

T.C
GAZİ ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
FİZYOLOJİ ANABİLİM DALI

**RAT İNCE BAĞIRSAĞINDA OLUŞTURULAN DENEYSEL İSKEMİK
REPERFÜZYON HASARLANMA MODELİNDE GELİŞEN ORGAN
HASARLANMASI ÜZERİNE VASKÜLER ENDOTELİYAL BÜYÜME
FAKTÖRÜNÜN (VEGF) ETKİSİ**

DOKTORA TEZİ

AYHAN KORKMAZ

Tez Danışmanı
Prof. Dr. Eser ÖZ OYAR

ANKARA
Nisan 2012

T.C
GAZİ ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
FİZYOLOJİ ANABİLİM DALI

**RAT İNCE BAĞIRSAĞINDA OLUŞTURULAN DENEYSEL İSKEMİK
REPERFÜZYON HASARLANMA MODELİNDE GELİŞEN ORGAN
HASARLANMASI ÜZERİNE VASKÜLER ENDOTELİYAL BÜYÜME
FAKTÖRÜNÜN (VEGF) ETKİSİ**

DOKTORA TEZİ

AYHAN KORKMAZ

Tez Danışmanı

Prof. Dr. Eser ÖZ OYAR

Bu tez Gazi Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi tarafından SBE-01/2010-55 proje numarası ile desteklenmiştir.

ANKARA

Nisan 2012

T.C.
GAZİ ÜNİVERSİTESİ
Sağlık Bilimleri Enstitüsü

Fizyoloji Ana Bilim Dalı Doktora Programı
çerçevesinde yürütölmüş olan bu çalışma aşağıdaki jüri tarafından
Doktora Tezi olarak Kabul edilmiştir.

Tez Savunma Tarihi: 12/04/2012

İmza
Prof. Dr. Aydan BABÜL
Gazi Üniversitesi
Jüri Başkanı

İmza
Prof. Dr. Eser ÖZ OYAR

Gazi Üniversitesi

İmza
Prof. Dr. Nedret KILIÇ

Gazi Üniversitesi

İmza
Prof. Dr. Metin Baştuğ

Ankara Üniversitesi

İmza
Prof. Dr. K. Gonca
AKBULUT
Gazi Üniversitesi

İÇİNDEKİLER

Kabul ve Onay	I
İçindekiler	II
Şekiller	V
Grafikler	V
Resimler, Tablolar	V
Semboller, Kısaltmalar	VII

1. GİRİŞ	1
2. GENEL BİLGİLER	6
2.1. İNCE BAĞIRSAK ANATOMİSİ	6
2.2. İNCE BAĞIRSAK KANLANMASI	7
2.3. İNCE BAĞIRSAK İSKEMİ REPERFÜZYON HASARI	8
2.4. SERBEST RADİKALLER	11
2.4.1. <u>Reaktif Oksijen Türlerinin Oluşumu</u>	13
2.4.1.1. Süperoksit Radikali	14
2.4.1.2. Hidrojen Peroksit	14
2.4.1.3. Hidroksil Radikali	16
2.4.1.4. Singlet Oksijen	16
2.4.1.5. Nitrik Oksit	16
2.4.1.6. Peroksinitrit	17
2.4.1.7. Hiperklorit	18
2.4.2. Serbest Radikallerin Etkileri	18
2.4.2.1. Proteinler	18
2.4.2.2. Nükleik Asitler ve DNA	19
2.4.2.3. Membran Lipidleri	19
2.4.2.4. Sitozolik Moleküller	20
2.5. ANTİOKSİDANLAR	21
2.5.1. <u>Antioksidan Enzimler</u>	22
2.5.1.1. Süperoksit Dismutaz (SOD)	22
2.5.1.2. Katalaz (KAT)	23
2.5.1.3. GlutasyonPeroksidaz (GSH-Px) ve Glutasyon Redüktaz (GSH-R)	23
2.5.1.4. Glutasyon S-Transferaz (GST)	24
2.5.1.5. Peroksiredoksin (Prx)	24
2.5.1.6. Tioredoksin Sistem (Trx)	24
2.5.2. <u>Zincir Kıran Antioksidanlar</u>	26
2.5.2.1. Glutasyon	26
2.5.2.2. C Vitamini	26
2.5.2.3. E Vitamini	27
2.5.2.4. Ubikinol	28
2.5.2.5. Karatenoidler	28

2.5.3. <i>Metal Bağlayan Proteinler</i>	28
2.6. ISI ŞOK PROTEİNLERİ (HSP'S:HEAT SHOCK PROTEİNS)	29
2.7. TELOMERAZ AKTİVİTESİ	31
2.8. PROTEİN OKSİDASYONU	33
2.8.1. <i>Karbonil Gruplarının Oluşumu</i>	34
2.8.1.1 <i>Global Modifikasyon</i>	34
2.8.1.2. <i>Spesifik Modifikasyon</i>	34
2.9. LİPID PEROKSİDASYONU	35
2.10. SİTOKİNLER	36
2.10.1. <i>Vasküler Endotelial Büyüme Faktörü (VEGF)</i>	37
2.10.1.1 <i>VEGF Ailesi Üyeleri</i>	38
2.10.1.1.1. <i>VEGF-A</i>	38
2.10.1.1.2. <i>VEGF-B</i>	39
2.10.1.1.3. <i>VEGF-C</i>	39
2.10.1.1.4. <i>VEGF-D</i>	40
2.10.1.1.5. <i>VEGF-E</i>	40
2.10.1.1.6. <i>VEGF-F (sv-VEGF)</i>	40
2.10.1.1.6. <i>Plasenta Büyüme Faktörü (PIGF)</i>	40
2.10.1.2. <i>VEGF Sentezi</i>	41
2.10.1.3. <i>VEGF Reseptörleri</i>	41
2.10.1.4. <i>VEGF ve NO</i>	42
2.11. APOPTOZİS	43
2.11.1 <i>Kaspaz Ailesi</i>	45
2.12. METALLOPROTEİNAZLAR	46
3. GEREÇ VEYÖNTEM	49
3.1. DENEY GRUPLARI	49
3.2. HISTOPATOLOJİ VE İMMÜNOHİSTOKİMYA	53
3.2.1. <i>Histopatolojik değerlendirme</i>	53
3.2.2. <i>İmmunohistokimyasal Değerlendirme</i>	54
3.3. BİYOKİMYASAL ANALİZLER	55
3.3.1. <i>Homojenizasyon</i>	55
3.3.2. <i>Western Blot Yöntemi</i>	55
3.3.3. <i>Total Malondialdehit (MDA) Tayini</i>	56
3.3.4. <i>Protein Karbonilleri Tayini</i>	57
3.3.5. <i>ORAC (Oxygen Radical Absorbing Capacity) Yöntemi</i>	57
3.3.6. <i>Total Glutasyon (TGSH) ve Okside Glutasyon (GSSG) Tayini</i>	57
3.3.7. <i>Süperoksit Dismutaz (SOD) Tayini</i>	58
3.3.8. <i>Telomeraz Aktivitesi Tayini</i>	58
3.3.9. <i>Plazma TNF-α Düzeyleri Tayini</i>	59
3.3.10. <i>Plazma IL-6 Düzeyleri Tayini</i>	59
3.3.11. <i>Plazma HIF-1α Düzeyleri Tayini</i>	59
3.4. İSTATİSTİKSEL ANALİZ VE GRAFİKLER	60
4. BULGULAR	61
4.1. İNCE BAĞIRSAK DOKUSU MDA DÜZEYLERİ	62
4.2. İNCE BAĞIRSAK DOKUSU TGSH VE GSSG DÜZEYLERİ	63

4.3. İNCE BAĞIRSAK DOKUSU SOD DÜZEYLERİ.....	65
4.4. İNCE BAĞIRSAK DOKUSU PROTEİN KARBONİLLERİ DÜZEYLERİ.....	67
4.5. İNCE BAĞIRSAK DOKUSU ORAC DÜZEYLERİ	68
4.6. İNCE BAĞIRSAK DOKUSU HSP70 DÜZEYLERİ	69
4.7. İNCE BAĞIRSAK DOKUSU TRX VE TxNIP DÜZEYLERİ	70
4.8. İNCE BAĞIRSAK DOKUSU CuZnSOD DÜZEYLERİ	72
4.9. İNCE BAĞIRSAK DOKUSU MnSOD DÜZEYLERİ	73
4.10. İNCE BAĞIRSAK DOKUSU KATALAZ DÜZEYLERİ	75
4.11. PLAZMA IL-6 DÜZEYLERİ	76
4.12. PLAZMA TNF-A DÜZEYLERİ	77
4.13. PLAZMA HIF-1A DÜZEYLERİ.....	77
4.14. WESTERN BLOT SONUÇLARI ÖRNEKLERİ.....	78
4.15. HISTOPATOLOJİK VE İMMUNOHİSTOKİMYASAL DEĞERLENDİRME	80
4.16. İNCE BAĞIRSAK DOKUSU TELOMERAZ AKTİVİTESİ.....	83
5.TARTIŞMA	86
6. SONUÇ	103
7. ÖZET	104
8. SUMMARY	106
9. KAYNAKLAR	108
10. EKLER	126
10.1. TEŞEKKÜR	126
10.2 ETİK KURUL İZİN BELGESİ.....	127
11. ÖZGEÇMİŞ.....	128

ŞEKİLLER

Şekil 1. İnce bağırsağın kanlanması.....	8
Şekil 2. Fenton ve Haber Weiss Reaksiyonu.....	13
Şekil 3. Süperoksit anyonunun oluşumu ve SOD aracılı hidrojen peroksit'e dönüştürülmesi.	14
Şekil 4. Hidrojen peroksitin katalaz, glutatyon peroksidaz ve redüktaz ile indirgenmesi.....	15
Şekil 5. Hidrojen peroksitin geçiş metalleri ile reaksiyonu sonucu hidroksil radikalının oluşması.....	15
Şekil 6. Oksijenden serbest radikal oluşumu ve nitrik oksit ile ilişkisi.	16
Şekil 7. Nitrik oksitten peroksinitrit oluşumu.....	17
Şekil 8. Süperoksit dismutazın süperoksit anyonunu hidrojen peroksit ve oksijene katalizasyonu.	22
Şekil 9. Katalaz enziminin hidrojen peroksidi su ve oksijene parçalaması.....	23
Şekil 10. Lipid hidroperoksitlerin GSH-Px ve GSH-R aracılı metabolizasyonu.....	24
Şekil 11. VEGF Reseptörleri ve Ligandları ¹⁰⁹	42

TABLolar

Tablo 1. Biyokimyasal analiz sonuçları-1	61
Tablo 2. Biyokimyasal analiz sonuçları-2	62
Tablo 3. Histopatolojik bulgulara ait skorlama tablosu.....	83
Tablo 4. Doku kaspaz aktivitesine ait skorlama tablosu	83
Tablo 5. Doku metalloproteinaz-9 skorlama tablosu.....	83
Tablo 6. Bağırsak dokusu telomeraz aktivitesi ile MDA ve TGSH'ın korelasyon testleri sonuçları.	85

RESİMLER

Resim 1. Rat ince bağırsak kanlanması.....	52
Resim 2. Süperior mezenterik arterin klempe edilmesi.....	52
Resim 3. 90 dakika süre ile süperior mezenterik arterin klempe edilmesi sonrası ince bağırsaklarda oluşan hasarlanma.....	53
Resim 4.; Hematoksilen-eozin ile boyanmış ince bağırsak histopatolojisi	78

GRAFİKLER

Grafik 1. Proksimal bağırsak MDA düzeyleri	63
Grafik 2. Distal bağırsak MDA düzeyleri.....	63
Grafik 3. Proksimal bağırsak dokusu total glutatyon düzeyleri.....	64
Grafik 4. Proksimal bağırsak dokusu okside glutatyon düzeyleri.....	64
Grafik 5. Distal bağırsak dokusu total glutatyon düzeyleri.....	65
Grafik 6. Distal bağırsak dokusu okside glutatyon düzeyleri.....	65
Grafik 7. Proksimal bağırsak dokusu süperoksit dismutaz düzeyleri.....	66
Grafik 8. Distal bağırsak dokusu süperoksit dismutaz düzeyleri.....	66
Grafik 9. Proksimal bağırsak dokusu protein karbonilleri düzeyleri.	67
Grafik 10. Distal bağırsak dokusu protein karbonilleri düzeyleri	67
Grafik 11. Proksimal bağırsak dokusu ORAC düzeyleri.	68
Grafik 12. Distal bağırsak dokusu ORAC düzeyleri.	68
Grafik 13. Proksimal bağırsak dokusu HSP70 düzeyleri	69
Grafik 14. Distal bağırsak dokusu HSP70 düzeyleri	69
Grafik 15. Proksimal bağırsak dokusu TRX düzeyleri.....	70
Grafik 16. Proksimal bağırsak dokusu TxNiP düzeyleri.....	71
Grafik 17. Distal bağırsak dokusu TRX düzeyleri.....	71
Grafik 18. Distal bağırsak dokusu TxNiP düzeyleri.....	72
Grafik 19. Proksimal bağırsak dokusu CuZnSOD düzeyleri.....	73
Grafik 20. Distal bağırsak dokusu CuZnSOD düzeyleri.....	73
Grafik 21. Proksimal bağırsak dokusu MnSOD düzeyleri.....	74
Grafik 22. Distal bağırsak dokusu MnSOD düzeyleri.....	74
Grafik 23. Proksimal bağırsak dokusu KAT düzeyleri.....	75
Grafik 24. Distal bağırsak dokusu KAT düzeyleri.....	76
Grafik 25. Plazma IL-6 düzeyleri.....	76
Grafik 26. Plazma TNF- α düzeyleri.....	77
Grafik 27. Plazma HIF-1 α düzeyleri.....	78
Grafik 28. Bağırsak dokusu telomeraz aktivitesi sonuçları.....	84

SEMBOLLER ve KISALTMALAR:

O₂⁻ : Süperoksit anyonu

aFGF : Asidik fibroblast büyüme faktörü

ATP : Adenozin trifosfat

bFGF : Temel fibroblast büyüme faktörü

cGMP : Siklik guonazin monofosfat

CoQ10H2 : Ubikinol

CuZnSOD : Bakır çinko süperoksit dismutaz

DNA : Deoksiribonükleik asit

DTNB : 5,5'-dithiobis 2-nitrobenzoik asit

EGF : Epidermal büyüme faktörü

EPO : Eritropoietin

FAD : flavin adenin dinukleotid

Fe : Demir

GM-CSF : Granülosit/makrofaj koloni stimüle eden faktör

Granülosit-CSF : Granülosit koloni stimüle eden faktör

GSH : Glutatyon

GSHPx : Glutatyon peroksidaz

GSHRD : Glutatyon redüktaz

GSSG : Okside glutatyon

GST : Glutatyon S-Transferaz

H₂O₂ : Hidrojen peroksit

HGF : Hepatosit büyüme faktörü

HIF : Hipoksi ile indüklenebilen faktör

HOCL : Hipoklorit asit

HSP : Isı şok proteini

IFN : Interferonlar

IGF : insülin benzeri büyüme faktörü

IL : İnterlökin

KAT : Katalaz

koenzim Q10 : Ubikinon

LIF : Lösemi inhibitör faktör

LOOH : Lipid hidroperoksit

MDA : Malondialdehit

MnSOD : Manganez süperoksit dismutaz

Multi-CSF : Multi koloni stimüle eden faktör

NADPH : Nikotinamid adenin dinükleotid fosfat

NBT : nitroblue tetrazolium

NGF : Sinir büyüme faktörü

NO : Nitrik oksit

NO₂⁻ : Nitrit

NO₃⁻ : Nitrat

OH⁻ : Hidroksil radikali

ONOO⁻ : Peroksinitrit

ORAC : Oksijen radikal absorbans kapasitesi

p38 MAPK : Mitojenle aktive protein kinaz

PDGF : Trombosit kaynaklı büyüme faktörleri

PMNL : Polimorf nüveli lökosit

Prx : Peroksiredoksin

RNA : Ribonükleik asit

ROT : Reaktif oksijen türleri

RTA : Relatif telomeraz aktivitesi

-SH : sülfhidril

SMA : Süperior mezenterik arter

SOD : Süperoksit dismutaz

SOR : Süperoksit redüktaz
TÇ : Çölyak trunkus
TGF : Transforme edici büyüme faktörleri
TGSH : Total glutatyon
TIMP : Doku metalloproteinaz inhibitörü
TNB : 5-thio-2-nitro benzoik asit
TNF : Tümör nekroz faktörleri
TNF-R : Tümör nekroz faktör reseptör
Trx : Tiyoredoksin
TrxR : Tiyoredoksin redüktazı
TxNiP : Thioredoxin interacting protein
Tyr : Tirozin
VEGF : Vasküler endoteliyal büyüme faktörü
VEGFR : Vasküler endotel büyüme faktörü reseptörü
XD : Ksantin dehidrogenaz
XO : Ksantin oksidaz

1. GİRİŞ

İskemi, kan akımı yetersizliği nedeniyle dokuların ihtiyacı olan oksijen ve metabolik substratların karşılanamadığı patolojik bir olaydır. Bağırsak iskemi-reperfüzyon hasarı yüksek derecede mortalite ve morbiditeye neden olan önemli bir faktördür ¹. Bozulmuş kan akımının neden olduğu iskemik hasar, metabolik açıdan aktif dokulara önemli derecede zarar vermektedir. Paradoksal olarak iskemik dokuda kan akımının yeniden sağlanması, iskemik hasara ilaveten reperfüzyon hasarı olarak belirtilen ek hücre hasarına yol açmaktadır. Bu reperfüzyon hasarı, iskeminin neden olduğu doku hasarlanmasını daha da arttırmaktadır ².

Gastrointestinal sistem iskemi-reperfüzyon hasarına karşı yüksek derecede hassastır ³. İntestinal iskemi reperfüzyon hasarı, akut mezenterik iskemi, intestinal obstrüksiyon, ince bağırsak transplantasyonu, travma ve şoku içeren birçok klinik vakada ortaya çıkmaktadır ^{4,5,6}. Normal fizyolojik koşullarda mukozal musin, epiteliyal hücre tabakası ve bozulmamış intestinal bariyer devamlılığı yaşamın sürdürülmesi açısından önemlidir. Ek olarak epiteliyal hücreler yüksek bir metabolizmaya sahip olup, iskemi nedeniyle ortaya çıkan oksijen eksikliğine karşı çok hassastırlar. İskemik hasar enterosit ve enterositleri destekleyen tabakalara zarar vermektedir ⁷. Azalmış kontraktıl aktivite, artmış mikro vasküler permeabilite ve mukozal bariyer disfonksiyonu intestinal iskemi-reperfüzyon hasarı ile ilişkilidir ⁸. Bağırsak bariyerinin bozulması besinlerin absorpsiyonunu azaltmakta ve bariyerin bozulması sebebiyle bağırsakta mevcut bulunan bakteriler de kana ya da diğer organlara geçebilmektedir. Bakteri translokasyonu ve bakteriler tarafından üretilip kana salınan zararlı maddeler inflamatuvar mediatörleri aktive edip “Sistemik İnflamatuvar Yanıt” ya da “Çoklu Organ Disfonksiyonu

Sendromu”nun ortaya çıkmasına neden olmaktadır ^{9,10}. Bu sebeble ince bağırsağın lezyonlara karşı korunmasında kullanılabilecek yöntemlerin bulunması önem kazanmaktadır.

İntestinal mukoza reaktif oksijen türlerine (ROT) karşı son derece hassastır ¹¹. İntestinal iskemi-reperfüzyon hasarından reaktif oksijen türleri sorumludur ¹². Hastalarda reaktif oksijen türlerinin ortadan kaldırılmasında antioksidanların kullanımı, klinik açıdan önemlerini arttırmaktadır. Meyve ve sebzelerin antioksidan içerik bakımından zengin olduğu kabul edilmektedir. Antioksidan zengin diyet süperoksit dismutaz, glutatyon peroksidaz gibi enzimleri de içeren hücresel antioksidan savunma sistemini geliştirmektedir ¹³.

İskemi reperfüzyon hasarı ile ilgili mekanizmalar multi-faktöriyel olup, literatürde geniş olarak araştırılıp yorumlanmıştır. Bunlardan biri olan, süperoksit anyonu (O_2^-), hidrojen peroksit (H_2O_2) gibi serbest oksijen radikaller ve inflamatuvar sitokinler mukozadaki doğal savunma sistemini bozup hücre hasarına sebep olmaktadırlar ^{14,15,16}. Serbest radikal bağımlı hasara karşı korunmada hücrelerin antioksidan aktivitesine sahip enzimleri içeren defans mekanizmaları bulunmaktadır. Serbest radikal hasarına karşı DNA, proteinler ve lipid gibi makro moleküllerin korunmasında süperoksit dismutaz (SOD), glutatyon peroksidaz (GSHPx), katalaz (KAT) gibi antioksidan enzimler birincil koruyuculardır. Süperoksit dismutazlar O_2^- 'yi hızlıca daha az zararlı olan H_2O_2 'ye, KAT ve GSHPx ise H_2O_2 'i suya dönüştürmektedir. Bu sebeple yüksek seviyedeki antioksidan enzimler hücresel makro molekülleri oksidatif stres bağımlı hasara karşı korumada etkilidirler ¹⁵.

İster dolaşımsal problemlere, ister cerrahi girişimlere, isterse de travmaya bağlı olsun iskemi, ilgili alanda doku hasarına yol açan bir olaydır. Dokunun iskemiye duyarlılığı ölçüsünde hasarın şiddeti de değişir.

Reperfüzyon biyokimyasal mekanizmaların aracılık ettiği sekonder hasara neden olan bir olaydır. Reperfüzyon hasarı, moleküler oksijenin toksik metabolitleri ile oluşur. Normalde oksijen, karbondioksit ve suya metabolize olur. Hipoksi sonucu, elektron transport sisteminde bozulmaya bağlı olarak reperfüzyon döneminde ani olarak artan oksijen, su ve karbondioksit yerine sitotoksik serbest oksijen radikallerine dönüşmeye başlar ¹⁷. Bu bilgiler ışığında, reperfüzyon hasarını azaltmak amacıyla serbest radikal temizleyicileri, immün sistem düzenleyicileri gibi birçok ajan kullanılmıştır.

İskemide hasarın şiddeti, hipoksinin süresi ve derinliğine bağlıdır. Hipoksi durumunda, hücre canlılığının devamı için gerekli olan enerji (ATP), glikojen depolarından glikoliz yoluyla yani anaerobik olarak üretilmeye başlar. Bu esnada, aerobik glikoliz neredeyse durma noktasına gelmekte ATP'nin sadece %7'si bu yolla üretilmektedir ¹⁸. Normal sıcaklıkta, 3-4 dakikalık iskemiyi takiben ATP depoları tamamen boşalır, mitokondriyal oksidatif fosforilasyon durur. ATP düzeyi sıfıra yaklaştığında intraselüler iyonik homeostazis için gerekli olan ve ATP'ye bağımlı membran iyon pompaları çalışamaz olur ¹⁹. İrreversibl hücresel hasar sürecinin başlamasında kalsiyum iyon homeostazisinin bozulması en kritik noktadır. İskemi esnasında, intraselüler kalsiyum hızla çoğalmakta, kalsiyum seviyesindeki bu artış sitoplazmik proteazlar ve nükleazların salınımını aktive etmektedir. Bunlar yapısal proteinlerin ve DNA'nın hasar görmesinden sorumlu olan enzimlerdir. Kalsiyumun aktive ettiği fosfolipazlar, membran lipidlerini araşidonik asit ve diğer çeşitli vazoaktif metabolitlere dönüştürecektir. Kalsiyum ile endotelial ksantin dehidrogenaz ksantin oksidaza dönüşür ki bu enzim reperfüzyon esnasında serbest radikal üretiminde rol alan önemli bir ajandır. Sonuç olarak, intraselüler kalsiyum konsantrasyonundaki yükselme, aspartat ve glutamat miktarının artmasına neden olur ¹⁹.

Post-iskemik resirkülasyon veya reperfüzyon, iskemik dokunun oksijenlenmiş kan ile perfüze edilmesiyle, enerji desteğinin sağlanması ve hücrel homeostazisin yeniden restorasyonu demektir ¹⁸. Ancak, reperfüzyon esnasında ortaya çıkan bazı toksik ajanlara bağlı lokal doku hasarı ve olumsuz sistemik etkiler, son yılların ilgi çeken araştırma konularından biri olmuştur ²⁰.

İskemi sırasında, ATP'nin hızla metabolize olması nedeniyle ksantin ve hipoksantin seviyeleri artmaktadır. Ortamda nikotinamidadenin dinükleotid fosfat (NADPH)'ın indirgenmiş formu ve ksantin veya hipoksantin bulunduğunda, moleküler oksijenin ksantin oksidaz aracılığıyla süperoksit ve diğer serbest radikallere dönüşmesi söz konusudur.

Trombosit Kaynaklı Büyüme Faktörleri (PDGF) Süper Ailesi'nin üyesi olan Vasküler Endotelial Büyüme Faktörü (VEGF) ailesi, özellikle endotel hücreleri için özgül etkilere sahip olan multifonksiyonel bir grup büyüme faktörünü içerir ²¹. VEGF, endotel hücresinin proliferasyonu, migrasyonu ve differensiasyonunu sağlar ²². Bu büyüme faktörü sadece büyüme ve gelişme sürecinde değil, çeşitli hastalık ve hastalıktan iyileşme süreçlerinde de gerçekleşen vaskülogenez ve anjiogenez için hem önemli hem de gereklidir ²³. Mevcut 5 tip reseptörü üzerinden VEGF, hücre-hücre ilişkisinin, hücre-matriks ilişkisinin, vaskülogenezin, anjiyogenezin, ve lenfanjiyogenezin kontrolünü sağlar. Hipoksi, VEGF ve reseptörlerinin yapımını indükleyerek anjiyogenezi başlatan en etkili uyarılardan biridir. Hipoksinin yanında azalan pH (asidoz) ve salınan sitokinlerin etkisiyle VEGF'in ekspresyonu artmaktadır ²². Eksojen olarak verilen VEGF'in, iskemik tavşan ekstremitelerinde ayrıca domuz koroner arterlerinde azalmış kan akımına cevap olarak yeni damar oluşumunu ve bölgedeki perfüzyonu arttırdığı gösterilmiştir. Ayrıca VEGF'in endotel hücrelerini apoptozise karşı koruduğu da bilinmektedir. Vasküler Endotelial Büyüme Faktörünün bir diğer etkisi de nitrik oksit (NO) salınımını ve NO aracılı

vazodilatasyonu uyarmasıdır. Bu büyüme faktörünün iskemi reperfüzyon hasarı üzerindeki antioksidan etkisi ilk kez bu çalışmanın yürütücüsü ve ekibi tarafından 2009 yılında çalışılmış ve literatüre eklenmiştir ²⁴. Literatürde farklı dokularda iskemi reperfüzyon hasarının etkilerinin azaltılması amacı ile kullanılan bu ajanın sadece vaskülogenez ve anjiogenez özelliği ile değil antioksidan ve vazodilatatör etkileri ile de fayda sağladığı düşünülmektedir ²⁵.

Bu çalışmanın amacı VEGF'in, deneysel iskemik reperfüzyon hasarının bağırsak dokusunda oluşturabileceği zararlı etkiler üzerindeki etkinliğini değerlendirmektir. Bu amaçla kullanılan ajan literatürde ilk olacaktır ve klinikte uygulamaya girmesi halinde hastalık tedavi planlanmasında yeni ufuklar açabilecektir.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. İnce Bağırsak Anatomisi

Karın boşluğunun büyük bir kısmını dolduran ve onun içinde oldukça serbest hareketli olan ince bağırsak pilordan ileoçekal bileşkeye kadar uzanan sindirim kanalının en uzun bölümünü oluşturur. Yaklaşık 5-7 m uzunluğunda olan ince bağırsak duodenum, jejunum ve ileum olmak üzere üç bölümde incelenir ²⁶.

Lümenli bir organ olan duodenum pilordan flexura duodenojejunalise (L2 hizasında ve orta hattın solunda) kadar yaklaşık 30 cm uzunluğundadır. L1 hizasında orta hattın sağından başlayıp, önce arka ve yukarı doğru, sonra da L3-L4 (göbek) düzeyine kadar alçalan bir yol izler ²⁷. Duodenum dört kısımda incelenir.

Pars süperior, duodenumun ilk bölümü olup intraperitonealdır ve klinikte bulbus olarak isimlendirilir. Pars descendens, eklenti salgı organlarının (karaciğer ve pankreas) döküldüğü bölümdür (papilla duodonei). Retroperitoneal yerleşimlidir. Pars horizontalis, retroperitoneal konumda ve L3 düzeyinde horizontal olarak yer alır. Pars ascendens, flexura duodenojejunalisle sonlanan duodenumun son kısmıdır. Ligamentum suspensorium (Treitz bağı) ile karın arka duvarına asılır ²⁸. Jejunum ve İleum flexura duodenojejunalis ile ostium ileocaecale arasındaki ince bağırsak bölümüdür. Makroskopik görünümüleriyle jejunum ve ileumu ayıran kesin bir sınır yoktur. Ancak bir kural olarak jejunumun karın sol alt tarafında, ileumun ise karın sağ alt tarafında yer aldığı söylenmektedir. Tüm jejunum, ileum ve bunların mezenterleri visseral peritonla örtülüdür. İnce bağırsak mezenterisi sol üstte duodenojejunal bileşkeden, sağ altta ileoçekal bileşkeye uzanır ve boyu yaklaşık 15 cm'dir. Bir yelpaze şeklinde açılarak, ortalama altı metre uzunluğundaki ince

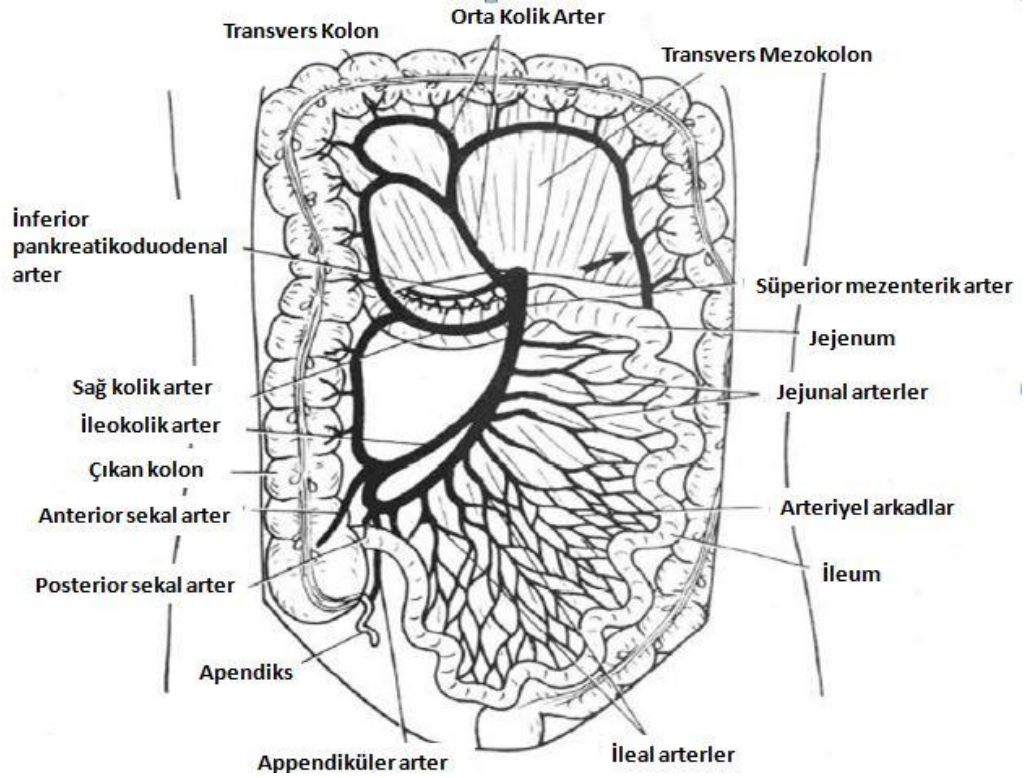
bağırsağı karın arka duvarına asar. Peritondan oluşan yapraklar arasında bağırsakların arterleri, venleri, lenfatikleri, lenf ganglionları, visseral sinirleri ve değişik miktarlarda yağ dokusu bulunur ^{28,29}.

2.2. İnce Bağırsak Kanlanması

Çölyak ekseninden beslenen duodenum dışında tüm ince bağırsağın arteriyel beslenmesi süperior mezenterik arter (SMA)'den sağlanır. SMA'dan çıkan jejunal ve ileal dallar kendi aralarında arklar oluştururlar.

Bu arklardan çıkan vasa rektalar bağırsak duvarına mezenterik kenardan girerek kanlanmayı sağlarlar. Vasa rektalar arasında kolleteral dallar da bulunmaktadır. Bağırsak duvarını delerek içeriye giren arterler submukozada güçlü bir arteriyel ağ oluştururlar. Venler arterlere eşlik ederler ve üst mezenter ven üzerinden vena portaya dökülürler ²⁹.

İnce bağırsakların kas ve salgı bezlerinin uyarılması parasempatik, baskılanması sempatik sinir sistemi yoluyla gerçekleştirilir. Birinci nöronlar parasempatik sinir sistemi içinde beyin sapında, sempatik sinir sisteminde ise trunkus sympathicusda bulunmaktadır. Sempatik sinir sistemin ikinci nöronları aorta abdominalisin önünde bulunan ganglion coeliacumda bulunmaktadır. Parasempatik sistemin ikinci nöronları ise bağırsak duvarında (plexus myentericus: Aurbach, plexus submukoza: Meissner) yer almaktadır ²⁸.



Şekil 1. İnce bağırsağın kanlanması.

2.3. İnce Bağırsak İskemi Reperfüzyon Hasarı

İskemi, kan akımı yetersizliği nedeniyle dokuların ihtiyacı olan oksijen ve metabolik substratların karşılanamadığı patolojik bir olaydır. İskemi sırasında hücrel enerji depolarının tükenmesi sonucunda iskemik kaskat olarak bilinen olaylar zinciri başlamaktadır. İskemik dokunun reperfüzyonu yani kesilen kan akımının tekrar sağlanması durumunda bir yandan iskemi sırasında kaybolan bazı fonksiyonların geri gelmesi sağlanırken, diğer yandan ani ve fazla miktardaki oksijen ve dolaşımdaki kan elemanlarının iskemik dokularda özellikle serbest oksijen radikalleri ile daha ileri hasarlara yol açmaktadır³⁰.

Bağırsak iskemisi en çok superior mezenterik arter (SMA) tıkanıklığı sonucu meydana gelmektedir. Mezenterik dolaşım bozukluğu yapan diğer birçok klinik durum da bağırsak iskemisine neden olur. Bunlar arasında trombüs ve emboli gibi doğrudan damar içini tıkayan patolojiler; inkarsere inguinal herni, invaginasyon, nekrozitan enterokolit, tümör, fibrotik band gibi dışardan bası yapan cerrahi hastalıklar; şok, hipovolemi, atriyal fibrilasyon gibi perfüzyon bozukluğuna yol açan nonokluziv durumlar sayılabilir ³¹.

Etiyolojisine bakmaksızın akut bağırsak iskemisinin prognozu kötü olup, mortalite oranı %25-75 arasındadır. Bütünyle mezenterik kan akımına bağlı olan ince bağırsak, bazı bölgelerinde karın arka duvarıyla vasküler bağlantıları olan kalın bağırsağa göre iskemiden daha çok etkilenir. Ancak yakın düzeylerdeki iskeminin oluşturduğu hasar, hızla gelişen sekonder bakteriyel invazyona bağlı olarak kalın bağırsakta daha fazladır. Kalın bağırsak tutulumunda iskemik zedelenme daha çok splenik fleksür ve rektumun orta kısmında görülür. Çünkü bu alanlar superior mezenterik, inferior mezenterik ve hipogastrik arter sistemlerinden en az yararlanan anatomik bölgelerdir. İnce bağırsakların mukoza ve submukozaları iskemiye kalın bağırsaklara oranla daha duyarlıdır. Arteriyel tıkanmada, komşu normal barsak dokusundan keskin bir sınırla ayrılma söz konusudur. Venöz tıkanmada sınırlar belirgin değildir ³².

İskeminin şiddetine göre bağırsak duvarındaki hasarın düzeyi tüm bağırsak tabakalarını içeren transmural enfarktüstü, kas tabakasını sağlam bırakarak sadece mukoza ve submukozayı etkileyen mural enfarktüse, muskularis mukozadan daha derine uzanmayan mukozal enfarktüse kadar değişir. İskemik hasar genelde içeride mukozadan başlayıp dış yüzeye doğru ilerler. Histopatolojik olarak ödem, villuslarda yassılaşma, interstisyel kanama, nekroz ve mukozanın parçalanması gözlenir. Bağırsak bakterileri 24 saat içinde gangrene ya da perforasyona

neden olurlar. İskemi mural veya mukozal tabakayı etkilediğinde bu bölgelerde özgün çok odaklı tutulum gözlenir. Bağırsak mukozasında kanamalı ve ödemli bir kalınlaşma, bazen de yüzeysel ülserasyonlar görülür³³. Mukoza tabanındaki hasar ise proteolitik enzimlerin, bakterilerin ve endotoksinlerin bağırsak lümeninden sistemik dolaşıma katılmasına yol açar³⁴.

İntestinal iskemik hasar mukozanın villüs tabakasında başlar. Mukoza tabanındaki hasar ise proteolitik enzimlerin, bakterilerin ve endotoksinlerin bağırsak lümeninden sistemik dolaşıma katılımına yol açar. Kardiyak baskılayıcı maddelerin salınımı ile birlikte hastanın kardiyak ve solunumsal fonksiyonları da kötü yönde etkilenmiş olur. Bağırsak iskemisi olan ve semptomların başlamasından sonraki ilk 12 saat içinde bağırsak rezeksiyonu yapılmaksızın tedavi edilen hastaların retrospektif analizi, intestinal ve kardiyopulmoner sorunların reperfüzyonundan sonra ortaya çıktığını göstermiştir.

Revaskülerize bağırsağın iyileşmesi genellikle birkaç hafta alır. Bu dönem genellikle diyare ve malabsorbsiyon ile karakterizedir. Sıklıkla mukozal ülserasyon ve lümen içine kanama gibi nadiren hayatı tehdit eden ama kan transfüzyonu gerektiren durumlar gözlenir. Sonraki bir safhada mukozal lezyonlar bazı hastalarda cerrahi tedavi gerektiren bağırsağın mekanik darlıklarına yol açar¹².

Daha önce yapılan bazı çalışmalarda, bağırsakların iskemik reperfüzyon hasarına karşı oldukça hassas olduğu gösterilmiştir. Villus nekrozu, intestinal iskemisi sırasında görülen en erken histopatolojik bulgudur. Bağırsaklar, serbest oksijen radikallerinin oluşumu için gerekli olan ksantin dehidrogenaz (XD)-ksantin oksidaz (XO) sisteminin en zengin kaynağıdır^{35,36}.

Reperfüzyon hasarının oluşmasında iki mekanizma söz konusudur. Bunlardan ilki serbest oksijen radikallerinin açığa çıkması, diğeri ise hidrolitik bir enzim olan fosfolipaz A2' nin iskemik dönemde kalsiyum etkisiyle aktive olarak membranlardaki yağ asitlerini parçalamasıdır ³⁷. Polimorf nüveli lökosit (PMNL)'ler myeloperoksidaz (MPO) enzimi ve intestinal mukoza hücrelerindeki ksantin oksidaz (XO) enzimi etkisiyle serbest oksijen radikalleri ortaya çıkar ³⁸. Fosfolipaz A2 hücre membranındaki yağ asitlerini fosfolipidlerden ayıran hidrolitik bir enzimdir. Fosfolipaz A2' nin etkisiyle lesitinden lizolesitin, sefalinden lizosefalin, fosfatidilkolinden lizofosfatidilkolin meydana gelir.

Fosfolipaz A2 ayrıca prostaglandinlerin ve lökotrienlerin üretimini de uyarır. Lizolesitin çok sitotoksik bir maddedir. Ayrıca lizofosfatidilkolin normalde iskemiden sonra görülen intestinal permeabiliteyi oldukça şiddetlendirir ^{38,39,40}.

2.4. Serbest Radikaller

Bir veya birden fazla eşleşmemiş elektron çiftine sahip ve bağımsız olarak varlığını sürdürebilen atom ve moleküller serbest radikal olarak tanımlanmaktadır. Oksidatif stres sonucu oluşan çeşitli serbest radikaller ve singlet oksijen ile hidrojen peroksit gibi radikal olmayan ara ürünlere genel olarak reaktif oksijen türleri (ROT) denir ⁴¹.

Normal metabolizma sırasında üretilen bazı reaktif oksijen türleri vücuda yoğun bir zarar verme potansiyeline sahiptir ⁴². Çoğunu serbest radikallerin oluşturduğu reaktif oksijen türleri normal oksijen molekülüyle karşılaştırıldığında, kimyasal reaktivitesi daha yüksek olan oksijen formlarıdır ⁴³. Serbest radikaller, dış atomik orbitallerinde bir veya daha fazla çift oluşturmamış elektron içeren yüksek enerjili, stabil olmayan bileşiklerdir. Bu çiftlenmemiş elektron serbest radikallere büyük bir

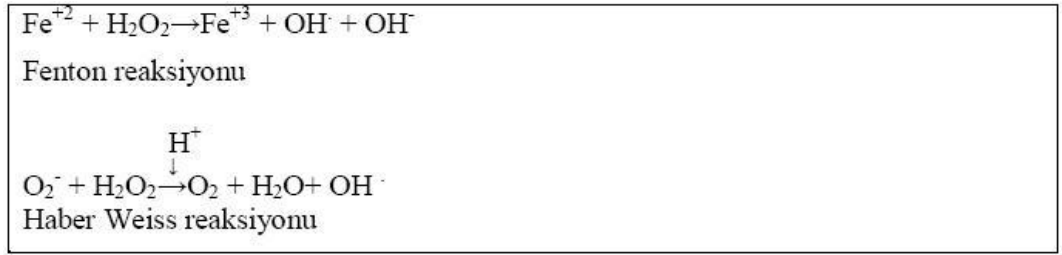
reaktiflik kazandırarak protein, lipid, DNA ve nükleotid koenzimler gibi birçok biyolojik materyale zarar vermelerine neden olmaktadır. Bu zararın yaşlanmayı teşvik ettiği ve ayrıca kalp-damar hastalıkları, çeşitli kanser türleri, katarakt, bağışıklık sisteminde zayıflama, sinir sistemi dejeneratif hastalıkları gibi birçok hastalığa sebep olduğuna dair bilgiler bulunmaktadır ⁴².

İskemi sırasında hücresel enerji bozulduğu için hücrenin kalsiyum dağılımını dengeleme yeteneği de bozulur. Hücre içi kalsiyum birikimi olur. Bu olay ksantin dehidrogenazı, ksantin oksidaz formuna dönüşmesine neden olur ⁴⁴. Vücuttaki ksantin dehidrogenaz ve ksantin oksidazın en zengin kaynağı bağırsaklardır. Bu enzimin en fazla bağırsak duvarında villus tabakasında olduğu gösterilmiştir ⁴⁵.

Reperfüzyon sırasında aniden ve çok miktarda oksijen sisteme katılır. Hipoksantin ksantin oksidaz katalizörlüğü altında ürik aside dönüşür. Elektronlar moleküler oksijene aktarılır, böylece oksijen süperoksid radikaline (O_2^-) ve hidrojen peroksit (H_2O_2)'e dönüşmektedir. Ayrıca süperoksit anyon radikali endotel hücrelerinde H_2O_2 , hidroksil radikali ($OH^\cdot$) ve hipoklorit asit ($HOCl$) gibi diğer O_2 metabolitlerinin açığa çıkmasına neden olur ⁴⁶.

İskemi sonrasında damar endotelinin hasar görmesi ile nötrofil ve trombosit aktivasyonu meydana gelmektedir. Bunun yanı sıra iskemik alanda ortaya çıkan kemotaktik faktörlerden kompleman 3a ve kompleman 5a nötrofillerin bölgeye göç etmesine neden olur. I/R alanına gelen nötrofiller, bu bölgede serbest oksijen radikalleri üretirler. Ortaya çıkan serbest oksijen radikalleri antiproteazları inaktive eder. Sonuçta, lizozomlardan proteolitik enzimler salınarak membran hasarı oluşur ⁴⁷.

Reperfüzyon süreci boyunca, oksijen hücre içerisine girerek, hipoksantin ve ksantin oksidaz ile reaksiyona girmek suretiyle O_2^- yi oluşturur. O_2^- , superoksit dismutaz enzimi ile hidrojen perokside (H_2O_2) dönüşür. Nihai olarak katalaz ve glutatyon peroksidaz (GSHPX) aracılığı ile H_2O_2 suya dönüştürülür. Ama diğer yandan, Fe^{+2} ve Cu^{+2} varlığında, H_2O_2 bu yoldan çıkıp, oldukça reaktif ve sitotoksik olan hidroksil radikallerine ($OH^\cdot$) dönüşebilir.(Fenton ve Haber-Weiss reaksiyonu) (Şekil1) Hidroksil radikalleri, hücre membran komponentlerinin lipid peroksidasyonunu başlatıp, granülositlerin mikrovasküler endotele yapışmasını sağlayan birtakım maddelerin salınımına yol açar. Yapışan granülositler, O_2^- ve bazı proteazların salınımı yoluyla endotel hasarını daha da artırır⁴⁸.



Şekil 2. Fenton ve Haber Weiss Reaksiyonu.

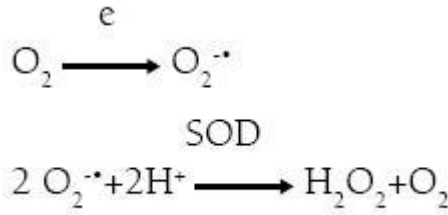
2.4.1. Reaktif Oksijen Türlerinin Oluşumu

Organizma sürekli olarak serbest radikal ataklarıyla karşı karşıyadır. Oksijenin aerobik organizmanın yaşamı için gerekliliği kaçınılmazdır. Serbest radikaller fizyolojik şartlarda ve dış etkenlere karşı organizmanın savunmasında da belirli oranda oluşur ve içsel mekanizmalarla organizmaya olabilecek zararlı etkileri önler. Biyolojik sistemlerde oluşan serbest radikallerin endojen kaynakları oksijen, nitrik oksit (NO), uyarılmış nötrofil, mitokondriyal elektron transport sistemi,

endoplazmik retikulum, peroksizom ve plazma membranı olarak sayılabilir. Solunan oksijenin % 95'inden fazlası mitokondrilerde ATP şeklinde enerji oluşumunda kullanılırken, yaklaşık %5 'i de son yörüngelerinde ortaklanmamış elektron içeren ve bu özellikleri nedeniyle de toksik serbest radikallere dönüşmektedir ⁴⁹.

2.4.1.1. Süperoksit Radikali

Süperoksit radikali, oksijen molekülüne bir elektron ilavesi ile oluşur ve serbest radikal hasarına karşı koruyucu antioksidan bir enzim olan ve oksidan hasar oluşumu ile birlikte artan süperoksit dismutaz (SOD) aracılığı ile hidrojen peroksit (H₂O₂)'e indirgenir. Hidrojen peroksit eşlenmemiş elektron içermediği için tek başına radikal değildir ⁵⁰.



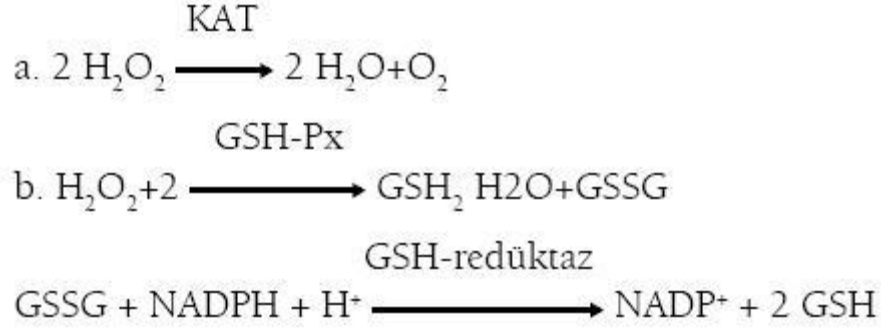
Şekil 3. Süperoksit anyonunun oluşumu ve SOD aracılı hidrojen peroksite dönüştürülmesi.

2.4.1.2. Hidrojen Peroksit

Oksijenin çevresindeki moleküllerden 2 elektron alması sonucu peroksit oluşur. Peroksit molekülü 2 hidrojen atomu ile birleşerek hidrojen peroksidi meydana getirir. H₂O₂ membranlardan kolayca geçebilen uzun ömürlü bir oksidandır. Katalaz enzimi ile H₂O₂ ve O₂ ye yıkılır.

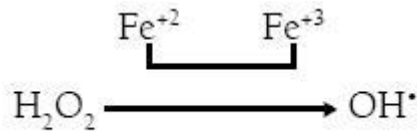
Hidrojen peroksitin hücre içinde metabolizması birkaç şekilde olabilir.

I- H_2O_2 , katalaz (KAT) veya glutatyon peroksidaz (GSHPx) tarafından toksik olmayan ürünlere dönüşür:



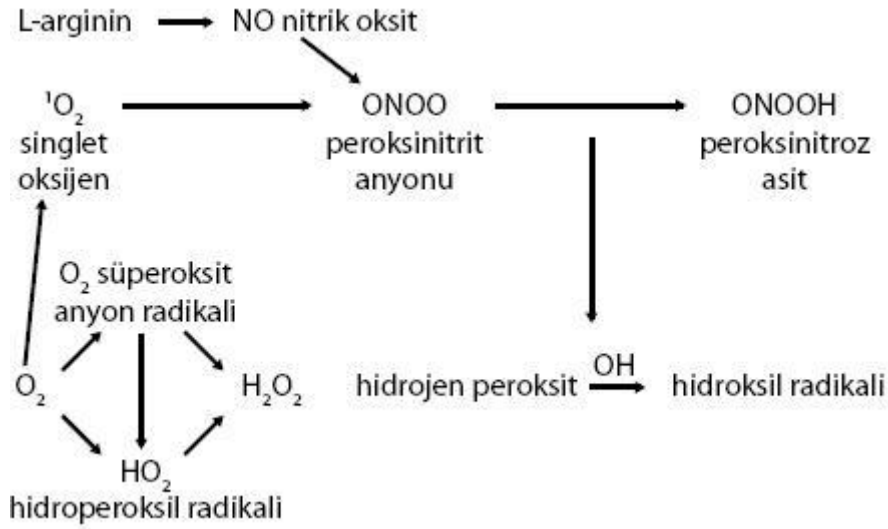
Şekil 4. Hidrojen peroksitin katalaz, glutatyon peroksidaz ve redüktaz ile indirgenmesi

II- H_2O_2 geçiş metallerinin varlığında toksik $\text{OH}^\cdot$ radikaline dönüşür: (Fenton reaksiyonu).



Şekil 5. Hidrojen peroksitin geçiş metalleri ile reaksiyonu sonucu hidroksil radikalının oluşması.

Hidroksil radikali oldukça reaktif ve toksik bir radikaldir. Hidroksil radikali büyük molekül yapısı ve elektronegativitesi nedeni ile DNA, protein, karbonhidrat ve lipidler gibi makromoleküllerle reaksiyona girerek bu yapılarda oksidatif hasara neden olur. Makromoleküller hücrelerde kısıtlı miktarlarda bulunduklarından bu yapılarda oluşan hasar oldukça önemlidir. İn vivo herhangi bir OH radikal süpürücüsünün etkili olabilmesi için mevcut hedef moleküllerin önemli bir bölümünü kapsayacak kadar yüksek konsantrasyonda bulunması gerekir. Bu nedenle OH radikalının oluşumunun önlenmesi, bu radikalın süpürülmesinden daha etkilidir ⁵¹.



Şekil 6. Oksijenden serbest radikal oluşumu ve nitrik oksit ile ilişkisi.

2.4.1.3. Hidroksil Radikali

Suyun yüksek enerjili iyonize edici radyasyona maruz kalması sonucu veya hidrojen peroksitin geçiş metalleri varlığında indirgenmesi ile (Fenton Reaksiyonu) oluşur. Yarılanma ömrü çok kısa olup son derece reaktiftir⁵².

2.4.1.4. Singlet Oksijen

Ortaklanmamış elektron olmadığından radikal olmayan reaktif oksijen molekülüdür. Serbest radikal reaksiyonu sonucu gelişebileceği gibi serbest radikal reaksiyonunun başlamasına da yol açabilir. Oksijenin elektronlarından birinin enerji alarak kendi spininin ters yönünde dönmesi sonucu oluşur⁵³.

2.4.1.5. Nitrik Oksit

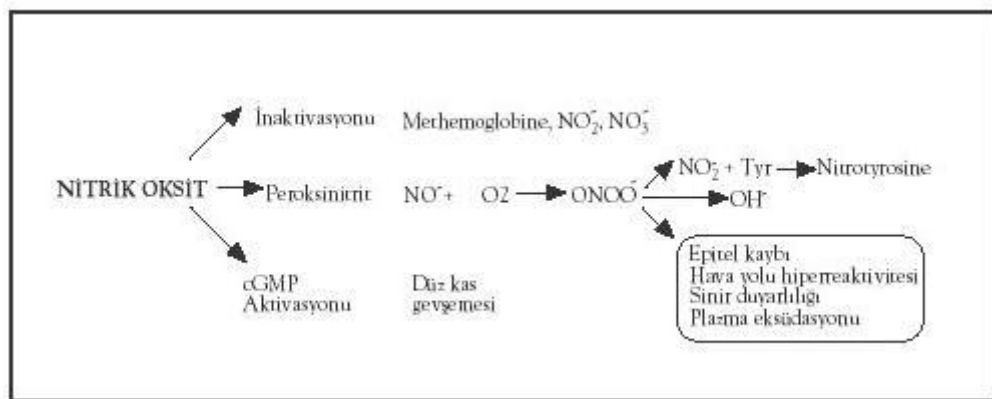
NO hemostatik olaylarda ve organizmanın savunma mekanizmalarında otokrin ve parakrin etkisi olan bir araçtır. Makrofajlar,

nötrofiller, hepatositler ve endotel hücreler tarafından üretilir. En önemli fonksiyonu vücudun çeşitli dokularında interlekin-1 ve sitokinlerin etkilerine paralel bir işlev görmesidir ⁵⁴. Tümör hücrelerini, parazitleri, bakteri ve mantar hücrelerini öldürmede görev alır. Ancak yüksek seviyelerde normal hücreler üzerinde toksik etkisi vardır. O_2^- anyonları ile inaktifleşir ve süperoksit dismutaz (SOD) enzimi ile korunur. Bu bakımdan serbest radikal tutucu olarak kabul edilse de uygun ortamlarda süperoksit ile güçlü bir oksidan olan peroksinitriti oluşturur. Düşük pH'da durağan değildir. Spontan olarak parçalanarak hidroksil radikali ve nitrojen oksit oluşur ⁵⁵.

2.4.1.6. Peroksinitrit

Nitrik oksit (NO) oluşuktan sonra:

- 1.Methemoglobin, nitrite (NO_2^-) ve nitrata (NO_3^-) dönüşerek inaktive olur.
- 2.Süperoksit anyonları (O_2^-) ile birleşerek peroksinitrite ($ONOO^-$) dönüşür. Peroksinitrit, hidroksil radikalleri (OH^-) ve tirozinle (Tyr) birleşerek nitrotirozini oluştururlar. OH^- ve $ONOO^-$ astım patogenezinde rol alan moleküllerdir.
- 3.Guanil siklaz aktivasyonu ile siklik guonazin monofosfat (cGMP)'ı artırarak düz kas gevşemesine neden olmaktadır ⁵⁶.



Şekil 7.Nitrik oksitten peroksinitrit oluşumu.

2.4.1.7. Hiperklorit

Hiperklorit, myeloperoksidaz aktivitesi ile hidrojen peroksitten oluşmaktadır. Hiperklorit çoğunlukla nötrofiller tarafından oluşturulmakla birlikte, tiyollerin, lipidlerin, askorbatın ve Nikotinamid adenin dinükleotit fosfat (NADPH)'ın oksidasyonu sonucu çeşitli sekonder ürünlerin oluşumu ile birçok biyomoleküle hasar vermektedir. Ayrıca asidik formda, bu oksidan hücre zarından geçebilmekte ve de proteinlerin birçok reaksiyonla fragmantasyonuna ve de agregasyonuna neden olmaktadır ⁴¹.

2.4.2 Serbest Radikallerin Etkileri

2.4.2.1. Proteinler

Doymamış ve sülfür-içeren moleküllerin serbest radikallerle reaktivitesi yüksek olduğu için triptofan, tirozin, fenilalanin, histidin, metionin, sistein gibi amino asitleri içeren proteinler serbest radikallerden kolaylıkla etkilenirler. Papain ve gliseraldehit- 3-fosfat dehidrogenaz gibi reaktiviteleri için yukarıdaki amino asitlere bağımlı olan enzimler serbest radikallere maruz kaldıklarında inhibe edilirler. Sitoplazmik proteinler ve membran proteinleri de okside edici ajanlara maruz kaldıklarında, örneğin ozon, dimerler ve büyük agregatlar oluşur ki inter-protein disülfid oluşumu yada serbest radikal ile amino asit kalıntıları arasında daha irreversibl reaksiyonlar nedeni ile sözü edilen yapılar meydana gelir.

Prolin, lizin gibi amino asitler ve protein yapısını oluşturan peptid bağları, indirgenmiş oksijen türevlerinden etkilenebilir; örneğin superoksit radikali, hidroksil radikali, hidrojen peroksit açığa çıkarıcı reaksiyon ortamında prolin ve lizin hidroksilasyonu non-enzimatik olarak oluşabilir.

Proteinlerin, serbest radikal harabiyetinden ne derece etkileneceği amino asit kompozisyonlarına bağlıdır. Proteinin hücreyel lokalizasyonuna ve radikalın toksisite gücüne göre protein harabiyetinin boyutları değişebilir ⁵⁷.

2.4.2.2. Nükleik Asitler ve DNA

Radyasyonla hücre içinde enerji depolanması sonucu iyonlar, serbest radikaller ve aktif moleküller meydana gelir. İyonize edici radyasyonla oluşan serbest radikaller, DNA'yı etkileyerek hücrede mutasyon ve ölüme yol açarlar. Sitotoksisite, büyük oranda, ya nükleik asit baz modifikasyonlarından doğan kromozom değişikliklerine, yada DNA'daki diğer bozukluklara bağlıdır. ⁵⁷.

2.4.2.3. Membran Lipidleri

Membran kolesterol ve yağ asitlerinin doymamış bağları serbest radikallerle reaksiyona girerek peroksidasyon oluştururlar. Bu reaksiyon, otokatalitik olabilir ve lipid peroksit, lipid alkol ve aldehitik yapıda ürünler verebilir.

Lipid peroksidasyonu sırasında, poliansature yağ asitleri (PUFAH) hidrojenini kaybeder ve moleküler oksijenle reaksiyona girer. Hücre membranındaki yağ asitlerinin kaybı, lipid peroksitlerin oluşumu ve lipidler tarafından oksijen alımı peroksidasyonun varlığını gösterir.

Plazma membranında ve organelde lipid peroksidasyonu, serbest radikallerin daha önce sözü edilmiş tüm kaynakları tarafından stimule edilebilir ve metal varlığında peroksidasyonun şiddeti artırılabilir. Bu metaller, redoks katalistleri gibi davranırlar ve süperoksit radikali ve hidrojen peroksitin güçlü oksidanlara dönüşümünü katalize ederler. Lipid

peroksitler de oksijenin serbest radikalleri gibi benzer hücresel komponentler üzerinde toksik etkilerini gösterirler.

Lipid radikallerin hidrofobik yapıları nedeni ile reaksiyonların büyük çoğunluğu membrana bağlı moleküller ile meydana gelecektir. Membran yağ asitlerinin peroksidasyonundan sonra ortamda kısa zincirli yağ asitlerinin varlığı membran permeabilitesini ve mikroviskoziteyi ciddi boyutlarda etkileyebilir.

Lipid peroksidasyon ürünlerinden malondialdehit, membran komponentlerinde çapraz bağlanma ve polimerizasyona yol açarak esneklik, iyon transportu, enzim aktivitesi ve hücre yüzeyi determinantlarının agregasyon durumu gibi intrinsek membran özelliklerine sahip olduğu için DNA'nın nitrojen bazları ile de reaksiyona girebilir. Bu özellikleri ile malondialdehit, mutajenik, kültür hücreleri için genotoksik ve karsinojeniktir ⁵⁷.

2.4.2.4. Sitozolik Moleküller

Sitozol proteinleri, sitoplazmik serbest radikaller etkisiyle değişime uğrarlar. Hemoproteinler, örneğin oksihemoglobin, superoksit radikallerinin ya da hidrojen peroksin demirle reaksiyonu sonucu methemoglobine dönüşür.

Hemoproteinlerin geniş bir spektrumu, oksijen türevi serbest radikaller tarafından harap edilebilir. Bir diğer önemli hemoprotein olan katalaz, superoksit radikali tarafından inhibe edilir. Superoksit, katalazı inaktif şekilleri olan ferroksi (Compound III) ve ferril (Compound II) formlarına dönüştürür. Superoksin dismutasyon ürünü olan hidrojen

peroksit, CuZn-Superoksit dismutaz enzimini, Cu^{+2} 'i Cu^{+} 'e indirgeyerek inhibe edebilir ⁵⁷.

2.5. Antioksidanlar

Organizmanın pro-oksidan/antioksidan dengesi sağlıklı bir yaşam sürdürebilmek için çok önemlidir. Serbest oksijen radikallerinin oluşumunu ve meydana getirdikleri hasarları önlemek ve detoksifikasyonu sağlamak üzere organizmayı koruyan “antioksidan savunma sistemi” dört yolla etki göstermektedir:

- I. Serbest oksijen radikallerini etkileyerek onları tutma, yok etme, “süpürücü etki”. Antioksidan enzimler, küçük moleküller bu yolla etki gösterirler ⁴⁹.
- II. Serbest oksijen radikalleriyle etkileşip onlara bir hidrojen aktararak aktivitelerini azaltma veya “inaktif şekle dönüştürücü etki”. Vitaminler, flavanoidler bu tarz bir etkiye sahiptirler ⁵⁸.
- III. Serbest oksijen radikallerini bağlayarak zincirlerini kırıp fonksiyonlarını engelleyici etki zincir kırıcı etkidir. Hemoglobin, seruloplazmin ve mineraller “zincir kırıcı etki” gösterirler ⁵⁹.
- IV. Serbest radikallerin oluşturdukları hasarın onarılması şeklinde “onarıcı etki” gösterirler ⁶⁰.

Endojen kaynaklı veya eksojen kaynaklı olan antioksidanların tanımlanmasında ve etkinliklerinin ortaya konmasında İ/R hasarı modelleri önemli katkı sağlamıştır. Antioksidan özelliği öne sürülmüş pek çok madde çeşitli İ/R modellerinde test edilerek değerlendirilmiştir.

Antioksidanlar üç temel grupta ele alınabilir ⁴¹:

- I. Antioksidan enzimler: Serbest radikal türlerinin yıkımını katalizleyen süperoksit dismutaz (SOD), süperoksit redüktaz

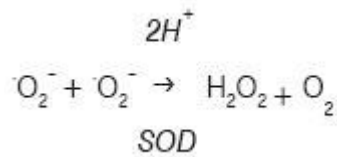
(SOR), katalaz (KAT), peroksiredoksin (Prx) ve glutatyon peroksidaz (GSH-Px), tiyoredoksin gibi enzimlerdir.

- II. Zincir kıran antioksidanlar: Bir elektron alınması veya verilmesi ile zincirleme radikal reaksiyonlarını bozan glutatyon, C ve E vitaminleri, karotenoidler ve ubikinol gibi moleküllerdir.
- III. Metal bağlayan proteinler: Metal iyonlarının serbest radikal oluşturmalarını engelleyen, metal bağlayan, transferrin, laktoferrin ve seruloplazmin gibi proteinlerdir.

2.5.1. Antioksidan Enzimler

2.5.1.1. Süperoksit Dismutaz (SOD)

Süperoksit dismutaz, süperoksit anyonunun (O_2^-), hidrojen peroksit (H_2O_2) ve oksijene dönüşümünü katalize ederek bu radikallerin etkisini azaltmaktadır. Bu olayda SOD enziminin aktif bölgesini oluşturan Zn önemli bir mineraldir.

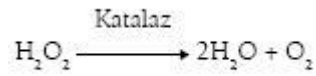


Şekil 8. Süperoksit dismutazın süperoksit anyonunu hidrojen peroksit ve oksijene katalizasyonu.

Normal metabolizma sırasında hücreler tarafından yüksek oranda O_2^- üretilmesine rağmen hücre içi düzeyi SOD tarafından düşük tutulur. Ancak, H_2O_2 geçiş metalleri varlığında Fenton ve Haber Weiss reaksiyonu ile son derece aktif OH^- radikaline dönüşmektedir. Bu durumda KAT ve GSH-Px enzimlerinin aktivitesi artarak H_2O_2 düzeylerini kontrol altına almaktadır ⁶¹.

2.5.1.2. Katalaz (KAT)

Katalaz esas olarak peroksizomlarda, daha az olarak sitozolde ve mikrozomal fraksiyonda bulunur. H_2O_2 'yi oksijen ve suya parçalar. Böylece H_2O_2 'nin OH^- oluşumunu önlemek için ortadan kalkmasını sağlar ⁶¹.

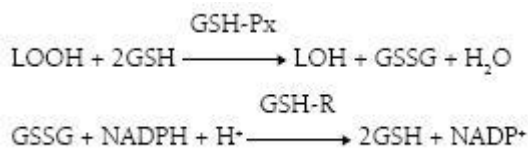


Şekil 9. Katalaz enziminin hidrojen peroksidi su ve oksijene parçalaması.

Hidrojen peroksit (H_2O_2), biyolojik önemi olan moleküllerin çoğu ile spesifik olarak reaksiyona girmemekle birlikte OH^- radikali gibi daha reaktif oksidanların oluşumunda bir ön madde olarak rol oynamaktadır. Peroksidazlar da katalaz enzimiyle aynı özelliklere sahiptir ⁶¹.

2.5.1.3. GlutatyonPeroxidaz (GSH-Px) ve Glutatyon Redüktaz (GSH-R)

Gerek H_2O_2 ve gerekse lipid hidroperoksitleri (LOOH) metabolize etmektedir. Selenyum-bağımlı ve selenyum-bağımsız iki farklı tipi vardır. Selenyum-bağımlı tipi H_2O_2 ve LOOH'leri, selenyum-bağımsız tipi sadece LOOH'leri metabolize eder. Bu reaksiyonlar esnasında GSH hidrojen verici olarak görev yaptığından H_2O_2 ve LOOH indirgenirken GSH ise okside şekline (GSSG) dönüşür. Okside glutatyon ise NADPH bağımlı glutatyon redüktaz (GSH-R) tarafından tekrar GSH'a indirgenir ⁶².



Şekil 10. Lipid hidroperoksitlerin GSH-Px ve GSH-R aracılı metabolizasyonu.

2.5.1.4. Glutasyon S-Transferaz (GST)

Glutasyon S-transferaz dimerik yapıda olup sitozolde bulunmaktadır. Yabancı maddelerin biyotransformasyonunda rolleri olan GST'ler çeşitli endojen ve eksojen bileşiklerin GSH ile konjugasyonunu katalize eder ⁶².

2.5.1.5. Peroksiredoksin (Prx)

Peroksiredoksinler (Prx; tiyoredoksin peroksidazlar), hidrojen peroksit ve farklı alkil hidroperoksitler gibi peroksitlerin doğrudan indirgenmesini sağlayan enzimlerdir ⁶³.

2.5.1.6. Tiyoredoksin Sistem (Trx)

Tiyoredoksin sistem oksidoredüktaz enzim aktivitesi gösteren tiyoredoksin (Trx) ile tiyoredoksin redüktazı (TrxR) içeren iki antioksidan enzim sistemi içerir. Memeli ve prokaryotik hücrelerde bulunur. Tiyoredoksin redüktaz NADPH kullanarak tiyoredoksinin disülfid aktif bölgesini ve pek çok substratı redükler. Yapılan çalışmalarda, tiyoredoksinin insanda immun sistem düzenlenmesiyle ilişkili olduğu ve farklı genler tarafından kodlanan üç farklı varyantı gösterilmiştir. Tiyoredoksin redüktaz izoenzimleri, her subünitesinde bir flavin adenin dinukleotid (FAD) bulunduran NADPH bağlı oksidoredüktazlardır ⁶⁴.

GSH sisteminin aksine Trx sistemi hücrede çok daha düşük konsantrasyonlarda bulunmaktadır ⁶⁵. Trx ve GSH'nun hücrenin korunmasındaki rolleri birbirinden farklıdır. GSH özellikle düşük redoks potansiyelinin ve serbest tiyol seviyelerinin yükseltilmesinden; Trx ise sinyal iletimi ve gen regülasyonunda rol oynayan tiyollerin redoks regülasyonundan sorumludur ⁶⁵. Trx'ler hücrede önemli biyosentetik reaksiyonlarda kullanılan, hücrenin önemli biyolojik fonksiyonlarını regüle eden ve hücrede birçok ayrı bölümde çeşitli izoformlarda karsımıza çıkan bir grup proteindir. Trx'ler TrxR'la beraber birçok proteinin disülfid bağlarının indirgenmesine katılır ve bu sistem peroksitlerin indirgenmesinde kullanılan peroksidazlarıda (Prxs) içermektedir ⁶⁶.

Trx sisteminin hücre gelişimi ve apoptozisin önlenmesinde önemli görevleri bulunmaktadır. Bu sistemi uyaran Trx'in indirgenmiş formudur. Bu nedenden dolayı Trx'in indirgenmesini sağlayan TrxR büyümenin regülasyonunda kilit rolü oynamaktadır. Hücre kültürlerinde selenyumun TrxR aktivitesini birkaç kat artırdığı gösterilmiştir. Artmış TrxR aktivitesinin, hücre büyümesini artırıcı etkileri net bir şekilde ortaya konmamış olsa da TrxR aktivitesinin inhibisyonunun hücre büyümesini inhibe ettiği net bir şekilde gösterilmiştir ⁶⁵.

Tiyoredoksinin sadece kendisi değil aynı zamanda tiyoredoksinin endojen inhibitörü TxNiP (Thioredoxin interacting protein) ile interaksyonu ile selüler redox balansını regüle ettiği yakın zamanda gösterilmiştir ⁶⁷.

2.5.2. Zincir Kıran Antioksidanlar

2.5.2.1. Glutasyon

GSH, hücreleri oksidan hasara karşı koruyan hücre içindeki antioksidan bir bileşiktir. Karaciğer başta olmak üzere pek çok dokuda glutamat, sistein ve glisinden sentezlenir. Sentezde γ -glutamil sistein sentaz ve GSH sentaz enzimleri katalizördür. Hemoglobinin oksitlenerek methemoglobine dönüşümünün engellenmesinde rol alır. Ayrıca proteinlerdeki sülfhidril (-SH) gruplarını redükte halde tutar ve bu grupları oksidasyona karşı korur, böylece fonksiyonel proteinlerin ve enzimlerin inaktivasyonunu engeller. GSH yabancı bileşiklerin detoksifikasyonu ve amino asitlerin membranlardan transportunu da sağlar. GSH eritrositleri, lökositleri ve göz merceğini oksidatif strese karşı korumada hayati öneme sahiptir ⁶².

GSH redoks sistemi birçok hücrel metabolik sürecin düzenlenmesinde önemli bir yer tutmaktadır. Aerobik metabolizma sırasında sürekli olarak ROT oluşması nedeniyle GSH redoks sistemi hücrenin varlığını devam ettirmesi açısından oldukça önemlidir ⁶⁸. Glutasyon redoks sistemi GSH, GSHPx ve NADPH'dan oluşmaktadır ⁶⁹.

2.5.2.2. C Vitamini

Vitamin C (askorbik asit) suda çözünen en güçlü antioksidan moleküldür. İnsanlarda sentez edilmediğinden diyetle alınması gerekir. Organizmada kolayca dehidroaskorbik aside oksitlenebilir. O_2^- , OH^- , singlet oksijen ile kolayca reaksiyona girerek onları etkisizleştirir. C vitamini kornea, lens, aköz hümör, adrenal, hipofiz, beyin, kalp, karaciğer,

dalak, böbrek ve pankreasta yüksek miktarda bulunur. Yeşil renkli taze sebze, meyve ve turunçgiller önemli C vitamini kaynaklarıdır. C vitamini antioksidan etkisi yanında oksidan etki de gösterir. Askorbik asit proteine bağlı ferrik demiri uzaklaştırarak ya da doğrudan indirgeyerek Fenton reaksiyonunda hidrojen peroksit ile etkileşmeye ve sonunda hidroksil radikali (OH[•]) oluşturmaya uygun ferröz demire dönüştürür. Bu özelliğinden dolayı vitamin C, serbest radikal reaksiyonlarının önemli bir katalizörü veya bir prooksidan olarak değerlendirilir. Ancak bu tip etkisinin sadece düşük konsantrasyonlarda görüldüğü, yüksek konsantrasyonlarda güçlü bir antioksidan olarak etki ettiği kaydedilmiştir. Vitamin C'nin fagositoz için de önemli olduğu gösterilmiştir ⁷⁰.

2.5.2.3. E Vitamini

Vitamin E yağda eriyen çok güçlü bir antioksidandır, hücre zarı fosfolipidlerinde bulunan poliansatüre yağ asitlerini serbest radikal etkisinden koruyan ilk savunma hattını oluşturur. Vitamin E, süperoksit ve hidroksil radikallerini, singlet oksijeni, lipid peroksit radikallerini ve diğer radikalleri indirger. Lipid peroksidasyonunun zincir reaksiyonu, vitamin E'nin zincir kırıcı etkisiyle sonlandırılabilir.

Oluşturduğu bu koruyucu reaksiyonlar sırasında kendisi radikal formuna dönüşse de, askorbik asit, glutatyon ve koenzim Q10 (ubikinon) tarafından tekrar aktif haline döndürülür. Vitamin E, selenyum metabolizmasında da önemli rol oynar; selenyumun organizmadan kaybını önleyerek veya onu aktif şekilde tutarak selenyum ihtiyacını azaltır. Serbest radikallerin kanserin başlamasında rol aldığı ve vitamin E ile diğer antioksidanların antikanserojen etki göstererek kanserin yayılmasını ve tümörün büyümesini önlediği gösterilmiştir ⁷¹.

2.5.2.4. Ubikinol

Ubikinonlar (koenzim Q10), mitokondrideki elektron taşıma zincirinin önemli yapıtaşlarıdır. Lipid peroksidasyonunun başlamasını ve ilerlemesini inhibe ettikleri bulunmuştur ⁷². Antioksidan form, ubikinonun indirgenme ürünü olan ubikinol (CoQ10H₂)'dür. Doğrudan antioksidan etkilerine ek olarak, α-tokoferol gibi yağda çözünen diğer antioksidanların da rejenerasyonunda iş görmektedirler ⁷³.

2.5.2.5. Karotenoidler

Vitamin A'nın ön maddesi olan β-karotenin singlet oksijeni bastırabildiği, süperoksit radikalini temizlediği ve OH⁻, alkoksil ve peroksil radikalleriyle direkt olarak etkileşerek antioksidan görev gördüğü ve lipid peroksidasyon reaksiyonunu önleyebildiği saptanmıştır. Singlet oksijen uzaklaştırıcı olarak bilinen en güçlü karotenoid likopendir ⁵².

2.5.3. Metal Bağlayan Proteinler

Demir bağlayan proteinler olan transferrin ve laktoferrin ile bakır bağlayan protein seruloplazmin bu grup içinde yer almaktadır. Bu proteinler serbest halde bulunan geçiş grubu metal iyonlarını bağlayarak bu metal iyonlarının serbest radikal oluşumuna katılmalarını engellemektedirler. ⁴¹.

2.6. Isı Şok Proteinleri (HSP's:Heat Shock Proteins)

Hücreler ani ısı artışı, anoksi, reaktif oksijen bileşikleri ve glukoz düzey değişikliğine maruz kaldıklarında ısı şok proteinleri olarak adlandırılan proteinler sentezlerler ⁷⁴. Oksidasyon ve toksik bileşenlerin parçalanması gibi pek çok stres faktörleri bütün hücrelerde cevap olarak ısı şok proteinlerinin sentezine neden olur. Bazı bakteriler stres faktörlerinden kendini korumak için yüksek miktarda ısı şok proteini üretirler. Isıya tolerans gelişimiyle ilgili veriler bazı bakterilerdeki ısı şok proteinlerinin majör gruplar halinde sınıflandırılmasına neden olmuştur. Hücrelerin 42°C'lik fetal olmayan ilk şok doza maruz kaldıktan sonra fetal doz olan 46°C' ye de kolay uyum sağladıkları gözlenmiştir. İlk şoka maruz kalan hücrelerin daha sonra normal protein sentezini durdurarak yeni bazı proteinlerin sentezine başladıkları saptanmıştır. Yüksek HSP düzeyi hastalıklara karşı hücre savunma mekanizmaları uyarılması, gen tedavisi gibi tedavi yaklaşımları için muhtemel bir hedef olarak düşünülmektedir ⁷⁵.

Artmış ısı şok protein seviyeleri mRNA sentezine, stabilitesine ve bu durumun devamına imkan sağlar. Yüksek ısı şok protein seviyeleri sadece stresin başlangıç dönemlerinde görülür. Hücre ilk şoktan sonra yüksek ısıya maruz kalmaya devam etse bile, ısı şok protein seviyeleri düşmeye başlar ve sonuçta normal seviyelerine iner. Çevresel faktörler değiştikçe, ısı şok cevabı da farklı adaptasyonların oluşmasına katkıda bulunur. Bu proteinlerin sadece ısı şokuna karşı değil hücreye yönelik stres yaratan değişik ajanların saldırılarına karşı da cevap olarak üretimlerinin artması "stres proteinleri" olarak adlandırılmalarına neden olmuştur.

Stres proteinlerinin önemi, diğer proteinlerle ilişkiye girip onların fonksiyon ve yapılarını değiştirebilme özelliklerine dayanır. Bu proteinlerin bazı fonksiyonel özellikleri belirlenmiştir;

I. HSP 90 gibi proteinler ligand yokluğunda hormon reseptör bağlayıcı etki gösterirler. Bu moleküller steroid reseptörlerine bağlanarak steroid hormonlar bağlanıncaya kadar steroid reseptörlerin nükleer DNA'ya bağlanmasını engeller. Böylece steroid reseptörler ile DNA arasında zamanından önce oluşacak bir etkileşim önlenmiş olur. Östrojen HSP 90'ın damar endotel hücrelerinde eNOS'a bağlanmasını uyararak kalsiyum duyarlılığını arttırırsa da salınımı üzerine etkisi yoktur ⁷⁶.

II. HSP 60 ve HSP 70 ailelerinin bireyleri, hücre içi polipeptidlerin katlanma, açılma ve translokasyonunda olduğu kadar, oligomerik protein komplekslerin toplanma, birleşme ve ayrılmasında da önemli rol oynar. Bu grup stres proteinleri, sitoplazmik proteinleri açarak mitokondri, kloroplast veya endoplazmik retikulumla taşır ve bu organellerin içinde tekrar katlanmalarını ve gerekiyorsa oligomerik kompleksler halinde birleşmelerini sağlarlar. HSP 70 endoplazmik retikulum içinde, immünoglobulin hafif zinciriyle birleşme oluncaya kadar, immün globulin ağır zincirine bağlı olarak kalır. Böylece, ağır zincirlerin prematür bir şekilde kendi aralarında birleşmesini engeller. Hafif zincir yokluğunda devamlı olarak ağır zincire bağlı kalır ve onu endoplazmik retikulum içinde tutar ⁷⁷.

III. HSP 70 açılmış proteinleri yakalayıp, parçalanmaya hazır hale getirir. Düşük molekül ağırlıklı stres proteini olan ubiquitin'in protein parçalanmasında bizzat rol oynadığı gösterilmiştir. Bu molekülün uyarılabilir formu sitoplazmadaki şaperon etkiyi arttırarak strese tolerans cevabına katkıda bulunur. HSP 70 ekspresyonu hipertermi, iskemi, epilepsi, kanama ve N-metil D-aspartat reseptör antagonisti verilmesi gibi çeşitli nörotoksik uyarılara cevapta farklılıklar gösterir. Akut hipertansiyonlu vakalarda artmış olan HSP 72 ekspresyonu esansiyel hipertansiyonun istenmeyen etkilerine karşı koruyucu rol oynamaktadır ⁷⁷.

IV. Alfa B kristalin ve HSP 25 yapısal ve fonksiyonel olarak küçük stres proteinleri ailesinden olup, sıcak ve iskemi gibi çeşitli uyarıcılarla tetiklenir. Her iki molekül böbrek glomerullerinde farklı kompartmanlarda bulunurlar. Renal iskemide her ikisi de birikime uğrarlar. HSP proksimal tubül hücrelerinde iskemiye bağlı aktin filamentinin bozukluğunun düzeltilmesinde önemli rol oynar ⁷⁸. HSP 25 ve mitojenle aktive protein kinaz (p38 MAPK) yolunun myositlerin farklılaşmasında önemli rol oynadıkları düşünülmektedir ⁷⁹.

V. HSP'leri lenfosit trafiğinde endotel hücre reseptörü olarak görev yaparlar.

Stres proteinlerinden, özellikle de HSP 60 ve HSP 70'in proteinlerinin açılması, taşınması, parçalanması ve katlanmasındaki rolleri, stres proteinlerinin antijen işleme ve sunmada da rolleri olabileceğini düşündürmektedir ⁷⁹.

HSP 70 ailesi (HSP 72 ve 73) hücre döngüsünün düzenlenmesinde yer alırlar. HSP 72 uyarıcı, HSP 73 ise düzenleyici fonksiyona sahiptir. Her ikisi de hem sitoplazmada, hem de nükleusta yer alır. HSP 70 ailesi açılmış proteinleri yakalayıp parçalanmaya hazır hale getirir, ATP'ye bağlanır ve güçlü ATPaz aktivitesi vardır ⁸⁰.

2.7. Telomeraz Aktivitesi

Telomerler, kromozomların DNA ve protein içeren terminal bölgeleridir. Diğer kromozomal DNA dizilerinden hem yapısal hem de

fonksiyonel olarak farklıdır. Telomer sentezinden telomeraz (telomer terminal transferaz veya revers transkriptaz) enzimi sorumludur⁸¹.

Telomeraz, kromozomal uçlardaki TTAGGG tekrarlarının sentezinden sorumlu olan ribonükleoprotein yapıda özel bir DNA polimerazdır. İlk defa Tetrahymena'da tanımlanan telomeraz enzimi, daha sonraları insanlarda HeLa hücrelerinde gösterilmiştir. Embriyonik hücreler ve erişkin kök hücrelerinde aktif olan bu enzim, normal somatik hücrelerde saptanmamakta, kanser hücrelerinde yeniden aktive olmaktadır⁸².

İnsan telomeraz enziminin bilinen 3 komponenti mevcuttur⁸³ :

1. İnsan telomerazı RNA komponenti (TERC/hTR)
2. İnsan telomerazı reverse transkriptazı (hTERT /hTRT/hEST2)
3. İnsan telomerazı protein komponenti (TEP 1/TP 1)

Ökaryotik hücrelerdeki DNA replikasyonunda, lider zincirdeki sentez tek RNA primeri kullanılarak 5'-->3' yönünde kesintisiz olarak tamamlanırken, kesikli zincirdeki sentez 8-12bp'lik RNA primerleri kullanılarak, "Okazaki fragmanları" şeklinde gerçekleşmektedir. Terminal RNA primerinin degradasyonuna bağlı olarak yeni sentezlenen yavru zincirin 5' ucunda, 8-12bp'lik bir boşluk oluşmaktadır. Kalıp DNA'nın 3' ucunun normal replikasyon mekanizmasıyla kopyalanamamasına "replikasyon sonu problemi" denmektedir ve bunu kompanse edecek moleküler mekanizmaların yokluğunda, her hücre bölünmesinde kromozomal DNA'nın 3' ucunda, yaklaşık 50-200 nükleotidlik kayıp olmakta ve sonuçta "hücre yaşlanma" gelişmektedir⁸⁴.

Telomerlerinin 3' ucunda bulunan "GT"den zengin 12-16 nükleotidlik uzantının elongasyonda kalıp görevi gördüğü düşünülmektedir⁸⁵. "hTR" telomerik DNA dizisine komplementer olan 8-30 bazlık kısa bir segmentini, zincirin 3' ucunun ekstansiyonunda kalıp olarak kullanmaktadır. Telomerazın katalitik alt birimi olan "hTERT", bu diziye

komplementer "GGTTAG" dizi tekrarlarını sentezleyerek "G"den zengin olan 3' ucuna ekler. RNA kalıbı yeni sentezlenen telomerik dizinin 3' ucuna doğru kayar ve DNA polimeraz, telomerazın sentezlediği bu diziyi kalıp olarak kullanarak karşı komplementer zinciri tamamlar ⁸⁶.

2.8. Protein Oksidasyonu

Proteinler birçok farklı mekanizma ile okside olabildiklerinden birden fazla protein oksidasyon türü vardır ⁸⁷. Proteinlerin oksidatif modifikasyonları için genel kabul gören bir sınıflandırma şekli yoktur. Ancak protein oksidatif modifikasyonu, oksitlenen rezidünün ve oluşan ürünün özelliğine göre iki gruba ayrılabilir ⁸⁸.

- I. Global Modifikasyon: Birden çok rezidünün değiştiği ve birden çok ürünün oluştuğu modifikasyonlardır. Karbonil gruplarının oluşumu bu tür modifikasyonun bir örneğidir.
- II. Spesifik Modifikasyon: Hem oksitlenen rezidünün, hem de oluşan ürünün oldukça spesifik olduğu modifikasyonlardır. Ditirozin oluşumu bu tip modifikasyonun bir örneğidir.

Protein oksidatif modifikasyonunun pek çok farklı tipi olduğundan, protein oksidasyonu için tek evrensel belirteç yoktur ⁸⁷. Ancak, protein karbonil grupları oksidatif indüklü hücresel hasarın en genel göstergesi olarak kabul edilmekte ve yaygın olarak kullanılmaktadır ⁸⁷. Bunun nedenleri arasında protein karbonil gruplarının birçok farklı mekanizma ile ortaya çıkabilmesi, stabil olması ve basit ama duyarlı yöntemlerle ölçülebilir olması sayılabilir ⁸⁹.

2.8.1. Karbonil Gruplarının Oluşumu

2.8.1.1 Global Modifikasyon

Proteinlerin ROT veya oksidatif stresin sekonder ürünleri ile reaksiyonu, karbonil gruplarına sahip peptid fragmanları veya protein türevlerinin oluşumuna neden olabilir. Karbonil gruplarının oluşumu birkaç mekanizma ile gerçekleşebilmektedir ⁹⁰.

I. Proteinlerin, ROT tarafından okside edilmesi aracılığıyla peptit bağlarının yıkılması sonucu karbonil grupları ortaya çıkabilir ⁹⁰.

II. Metal kataliz aracılı oksidasyon sistemleri ile bazı proteinlerin amino asit rezidülerinin yan zincirlerinin oksidasyonu sonucu da karbonil grupları ortaya çıkabilmektedir. ⁹⁰.

III. Reaktif karbonil grubu içeren proteinler aynı zamanda, oksidasyon ürünleri ile proteinlerin lizin rezidülerinin primer amino gruplarının sekonder reaksiyonları sonucu oluşabilir ⁹¹.

2.8.1.2. Spesifik Modifikasyon

Spesifik oksidasyon ürün örnekleri arasında fenilalanin rezidülerinin o-tirozine ve tirozinin ditirozine dönüşümleri bulunur ⁸⁸.

2.9. Lipid Peroksidasyonu

Serbest radikaller bütün biyolojik molekülleri etkilemekle birlikte, içlerinde en fazla etkilenen lipidlerdir. Serbest radikallerle kolayca tepkimeye giren hücre membranında bulunan kolesterol ve yağ asitleri peroksidasyon ürünlerinin oluşumuna neden olmaktadır. Lipid peroksidasyonu; çoklu yağ asitleri ve kolesterolün oksidatif hasarlanması olarak tanımlanmaktadır ve oluşan hasar geri dönüşümsüzdür.

Lipid peroksidasyonu ile oluşan hasar üç basamakta oluşmaktadır. İlk olarak çoklu doymamış yağ asitlerinin metil grubuna serbest radikal saldırısı ile lipid molekülündeki alkilik hidrojen kopartılır ve eş zamanlı alkil radikali oluşur. Oluşan alkil radikali oksijen ile tepkimeye girerek lipid peroksidasyonunu başlatabilen OH[•] radikalini oluşturur. İkinci basamakta radikal membran lipidlerinin oksijen ile reaksiyona girmesi ile lipid peroksit radikalleri oluşur. Lipid peroksit radikalleri de hücre membranının da bulunan çoklu doymamış yağ asitlerini etkileyerek yeni lipid radikallerini sağlamakta ve kendileri de açığa çıkan hidrojen atomlarını alarak lipid peroksitlerine dönüşmektedir. Lipid peroksidasyonu, lipid hidroperoksitlerin aldehit ve diğer karbonil bileşiklerine dönüşmesiyle sona ermektedir. Bu ürünlerden biri olan malondialdehit (MDA) proteinlerin amino grubuna, fosfolipidlere veya nükleik asitlere bağlanarak toksik etkisini gösterir. Sonuçta zincirler arası reaksiyon durmakta ve radikal olmayan ürün oluşmaktadır ⁹². MDA, yağ asidi oksidasyonunun özgün ya da kantitatif bir indikatörü değildir fakat lipid peroksidasyonunun derecesiyle benzerlik gösterir ⁹³.

2.10. Sitokinler

Sitokinler hücresel düzenleyici proteinlerdir. Çeşitli uyarılara karşı cevap olarak özel hücreler tarafından salgılanır ve hedeflenen hücrelerin davranışını etkilerler. Belli bir sitokin çeşitli hücreler tarafından farklı dokularda salgılanır fakat aynı biyolojik etkiyi gösterir. Sitokinlerin etkileri sistemik veya lokaldir. Bazıları klasik hormon gibi davranırlar. Belli hücreler tarafından kana veya çeşitli hücresel sıvılara salgılanıp vücudun diğer bölgelerindeki hücresel reseptörlerine bağlanırlar. Diğer sitokinler daha lokalize olmuş etkiler gösterirler. Bunlar otokrin (bir hücre tarafından salgılanan sitokinin aynı hücre üzerine etkisi) ve parakrin (belli bir hücre tarafından salgılanan sitokinin yakındaki komşu hücreye etkisi) etkilerdir ⁹⁴.

Sitokinlerin tanımlanması ve karakterize edilmesi çeşitli isimlendirme ve sınıflandırma sistemine göre yapılmıştır. Bu sınıflandırma sitokinler arasındaki fonksiyonel benzerliklere ve etki mekanizmalarına dayanmaktadır.

Sitokinler başlıca şu ana gruplara ayrılmaktadır:

I. Büyüme faktörleri (Epidermal büyüme faktörü, EGF; Trombosit orijinli büyüme faktörü, PDGF; insülin benzeri büyüme faktörü-1, IGF-1; Insülin benzeri büyüme faktörü-2, IGF-2; Sinir büyüme faktörü, NGF; Asidik fibroblast büyüme faktörü, aFGF; Temel fibroblast büyüme faktörü, bFGF; Neurolökin; Amfiregulin; Hepatosit büyüme faktörü, HGF v.b.)

II. Lenfokinler (interlökin-1a, IL-1a; IL-1b; IL-2; IL-3; IL-4; IL-5; IL-6; IL-7; IL-8; IL-9; IL-10; IL-11; IL-12; IL-13; IL-14; IL-15)

III. Koloni stimüle eden faktörler (Granülosit/makrofaj koloni stimüle eden faktör, GM-CSF; Granülosit-CSF; Multi-CSF; Eritropoietin, EPO; Lösemi inhibitör faktör, LIF)

IV. Transforme edici büyüme faktörleri (TGF- α ; TGF- β)

V. Tümör nekroz faktörleri (TNF- α ; TNF- β)

VI. Interferonlar (IFN- α ; IFN- β ; IFN- γ)⁹⁵.

2.10.1. Vasküler Endotelial Büyüme Faktörü (VEGF)

Trombosit Kaynaklı Büyüme Faktörleri Süper Ailesi'nin üyesi olan Vasküler Endotel Büyüme Faktörü ailesi, endotel hücreleri için özgüldür ve önemli etkileri vardır. VEGF, endotel hücresinin proliferasyonuna, migrasyonuna ve differensiasyonuna sebep olmaktadır²². VEGF, hem gelişim sırasında, hem de yetişkinde vaskülogenez ve anjiogenez için önemli ve gereklidir²³. Bu büyüme faktörü, özellikle damar oluşumunda kritik rol oynarken, endotel hücrelerinin yaptığı embriyogenez, yara iyileşmesi, tümör büyümesi, miyokardial iskemi, oküler neovasküler hastalıklar ve romatoid artrit gibi kronik inflamatuvar hastalıkları da kapsayan fizyolojik ve fizyopatolojik birçok fonksiyonda da gerekli olduğu görülmüştür²⁵.

Embriyoda kan damarları, vaskülogenez yoluyla oluşmaktadır. Endotelial progenitör hücrelerin (anjyoblastlar), embriyonik ve embriyo dışı mezoderm içerisinde, ilkel damarsal ağı oluşturmak üzere farklılaşması primordial damarsal sistemin gelişmesi olayı olup vaskülogenez olarak adlandırılmaktadır. Yeni kapillerlerin oluşması, tomurcuklanma ve önceden oluşan damar ağının yeniden düzenlenerek küçük ve büyük damarları oluşturması ile damarsal ağda uzama ve değişim gerçekleşmektedir. Perivasküler hücrelerin yeniden yapılanması ve bazal membran üzerinde yapılaşmasını sağlayan faktörler varlığında,

gelişen damarsal yapılar birbiri ardı sıra olgunlaşmaktadır. Embriyonik vaskülogenez sırasında oluşan olaylar, erişkin anjiyogenezine benzer ⁹⁶.

Önceden mevcut bulunan postkapiller venülerden endotel tomurcuklarının gelişimini ifade etmek için kullanılan anjiyogenez daha sonradan, primitif damar ağının kompleks bir ağ yapısına dönüşmesini ve yeniden şekillenmesini ifade etmek için kullanılmıştır. Anjiyogenez, tomurcuklanan ya da periendotelyal hücre sütunlarıyla veya transendotelyal hücre köprüleri ile bölünen, ayrılan venüllerin genişlemesini ve daha sonra ayrı ayrı kapillerlere ayrılmasını içermektedir. Erişkinlerde yeni damarlar büyük ölçüde angiogenez yoluyla meydana gelmektedir fakat erişkinlerde vaskülogenez de görülebilmektedir. Vaskülogenez sadece immatür, düşük derecede fonksiyonel bir vaskülatür oluşumuna yol açtığı için, terapötik hedef angiogenezdir ⁹⁷. Anjiyogenezin düzenlenmesi, ekstrasellüler matriks içindeki ve etrafındaki pek çok büyüme faktörü ve düzenleyici proteinin kontrolü altındadır. Tüm anjiyogenik etkileşimler net olarak bilinmese de muhtemelen anjiyogenik uyarıcılar ve anjiyogenez inhibitörleri arasındaki denge, normal damarsal bileşenlerin sessiz halde kalmalarını sağlamaktadır ⁹⁸.

2.10.1.1 VEGF Ailesi Üyeleri

VEGF ailesi, VEGF-A (Human-VEGF), VEGF-B, VEGF-C, VEGF-D, VEGF-E, VEGF-F (sv-VEGF) ve Plasenta büyüme faktörü (Plasenta Büyüme Faktörü; PlGF) adı verilen yedi üyeden oluşmaktadır ⁹⁹.

2.10.1.1.1. VEGF-A

Aynı zamanda Human-VEGF olarak bilinir. VEGF-A bazı yayınlarda sadece VEGF olarak adlandırılmaktadır ¹⁰⁰. VEGF-A'nın şu ana

kadar bilinen altı adet izoformu vardır. Bunlar VEGF110, VEGF121, VEGF145, VEGF148, VEGF165, VEGF183, VEGF189 ve VEGF206 olarak isimlendirilmişlerdir ve isimlerindeki sayılar içerdikleri amino asit sayılarını göstermektedir ²⁵. Bu izoformlardan VEGF121 hariç, hepsi heparine bağlanmaktadır. VEGF121, VEGF145 ve VEGF165 salgılandığında kolayca diffüze olur ve erimiş formları sıvılarda saptanabilir. VEGF189 ve VEGF206 ise salgılandığı halde hücre aracılı olarak kalır ve varlıkları testlerle kolayca saptanamaz ²⁵. VEGF206, VEGF'ün orijinal karakteristik formu olup, yaklaşık 34-46 kDa ağırlığında homodimerik bir glikoproteindir ²⁵. VEGF165, VEGF121'in aksine hücre yüzeyindeki veya ekstrasellüler matriksteki proteoglikanlara ve heparine bağlanan formdur. VEGF189 heparin ve heparan sülfat proteoglikanına bağlanmayı tetikler ve artırır ¹⁰¹.

2.10.1.1.2. VEGF-B

VEGF-A ile %23'ü homolog olan bir sinyal peptidinin bölünmesinden sonra, 186 amino asitli bir protein olarak oluşur. Sonra, ekson-6'da oluşan bir alternatif birleştirme ile tamamen farklı terminal COOH- grupları içeren 167 amino asitli bir proteine dönüşür ¹⁰². VEGF-B, vasküler endotel büyüme faktörü reseptörü-1 (VEGFR-1)'e bağlanarak monositlerin aktivasyonu ve farklılaşmalarında rol alır ¹⁰³.

2.10.1.1.3. VEGF-C

VEGF-benzeri protein olarak da bilinir. VEGF-A ile %16'sı benzeyen 388 amino asitten oluşmuştur ¹⁰². Lenfatik damarların oluşmasında (lenfanjiogenez) rol oynamaktadır. VEGFR-2 ve VEGFR-3'e bağlanarak vasküler ve lenfatik endotelial hücrelerde mitojenik etki yapar ^{99,103}.

2.10.1.1.4. VEGF-D

334 amino asitten oluşan ve VEGF-A'ya %31 oranında aynı amino asitler içeren bir proteindir ¹⁰⁴. C-terminal uçlarında zengin sistein domainleri içerir. Bu da VEGFR-2 ve VEGFR-3'e bağlanarak VEGF-C ile benzer işlevler yapar ^{102,103}.

2.10.1.1.5. VEGF-E

VEGF-A ile amino asit dizilimi %25 oranında aynı olan bir polipeptittir. Güçlü bir mitojen ve permeabilite artırıcı faktördür. VEGFR-1'e bağlanamamakla birlikte VEGFR-2'ye seçici olarak bağlanarak etkisini gösterir ¹⁰³.

2.10.1.1.6. VEGF-F (sv-VEGF)

Kısa bir süre önce Takahashi ve arkadaşlarının yaptığı bir çalışmada yılan zehirinde VEGF'ün moleküler yapısına çok benzeyen bir molekül tesbit etmişler ve bunu sv-VEGF (VEGFF) adını vermişlerdir. Bu yeni bulunan molekül anjiojenezi VEGF-A'dan 10 kat daha az arttırmasına rağmen, vasküler geçirgenliği şiddetle arttırdığı bildirilmiştir ¹⁰⁰.

2.10.1.1.6. Plasenta Büyüme Faktörü (PIGF)

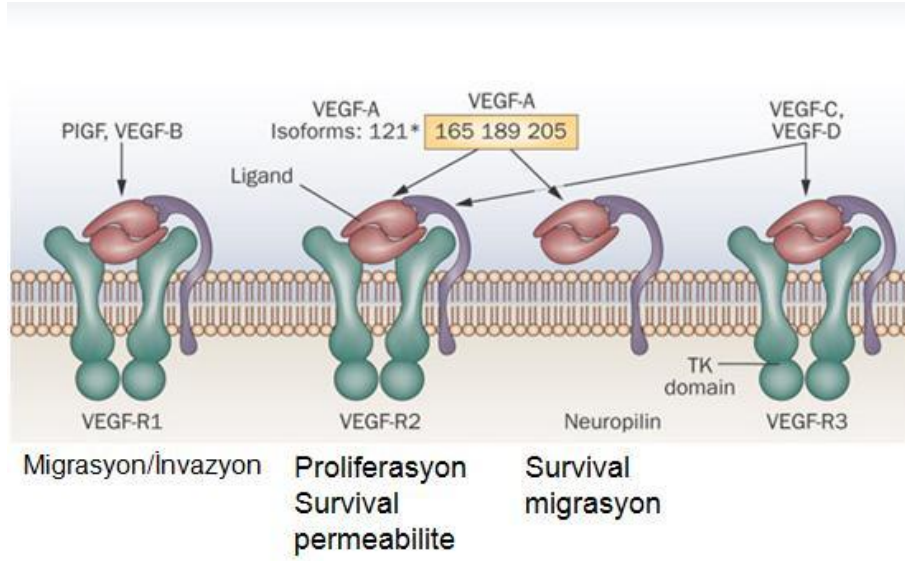
PIGF, VEGF ailesinin tanımlanan ilk üyesidir. Sinyal peptitlerinin bölünmesi sırasında önce 131 amino asite sahiptir. Daha sonra yeni amino asitlerin eklenmesiyle VEGF-A ile %37 oranında benzeşen ve 152 amino asit içeren son şekli oluşur ¹⁰². VEGF-B gibi VEGFR-1'e bağlanarak etki gösterir ¹⁰³.

2.10.1.2. VEGF Sentezi

VEGF fizyolojik olarak ovulasyondan hemen önce ovaryum folliküllerinden salgılanarak yeni damarların oluşumunu artırırken, ovulasyondan sonra bu salgılama görevini korpus luteum üstlenir. Erken implantasyon döneminde embriyo trofoblastlarınca salgılanır ¹⁰⁵. Embriyolojik gelişimin ilk dönemlerinin sonuna doğru VEGF biraz azalırken, organogenez döneminde oldukça yükselir. Yine VEGF yetişkinde akciğer alveolar hücrelerde, böbrek glomerüllerinde, proksimal tübüllerde ve düşük seviyede de olsa karaciğer hepatositleri ve beyinde gösterilmiştir ¹⁰⁶. Ayrıca, adrenal korteksin tüm hücrelerinde ve testiste testosteron üreten Leydig hücrelerinde VEGF yapımına ait mRNA'ların sentezlendiği gösterilmiştir. VEGF'ün demonstrasyonu için yapılan immunositokimyasal çalışmalarda aktive makrofajlarda, arterioller çevreleyen fibroblastlarda, akciğer bronşiyol epitelinde, koroid pleksus epitelinde ve renal glomerül visseral epitelinde varlığı gösterilmiştir ¹⁰¹.

2.10.1.3. VEGF Reseptörleri

VEGF biyolojik aktivitesini temel olarak üç reseptörü ile gerçekleştirir. Tirozin kinaz yapısında olan bu reseptörleri VEGF-R1 (flt-1), VEGF-R2 (flk-1/KDR) ve VEGF-R3 (flt-4) olarak sıralanabilir. Ayrıca nörofilin 1 ve nörofilin 2 olarak adlandırılan iki koreseptörü de bulunmaktadır. Bunlardan VEGF-R1 ve R2 endotel hücreleri üzerinde iken VEGF-R3 lenf damarları üzerinde bulunmaktadır ¹⁰⁷. VEGF reseptörlerinin aktivasyonu; fosfolipaz-C, fosfoinositol-3 kinaz ve ras GTPaz aktivatör proteinleri gibi bir dizi hücre içi sinyal iletim proteinlerini fosforile ederek endotel hücrelerinin proliferasyon, migrasyon, ve diferansiyasyonunu sağlar ¹⁰⁸.



Şekil 11. VEGF Reseptörleri ve Ligandları ¹⁰⁹.

2.10.1.4. VEGF ve NO

Nitrik oksit (NO) ise anjiogenezin VEGF-bağımlı bir mediatördür. VEGF'in NO sentez enzimi üzerindeki uyarıcı etkisi sonucu oluşan NO, endotel hücre migrasyonunda rol almaktadır ¹¹⁰.

Başta RAS, SRC ve HER-2 onkogenleri olmak üzere VEGF düzeyi; p53 gen mutasyonu, IL-1 β , IL-6, IL-10, IL-13, FGF-4, PDGF, TGF- β , IGF-1, TNF- α ve NO gibi birçok endojen ajan ile düzenlenmekte ve tümör hücrelerinde VEGF ekspresyonu artmaktadır ¹¹¹. Düşük glikoz seviyesi, oksidatif stres ve özellikle hipoksik ortamda düzeyi hızla artan hipoksi ile indüklenen faktör (HIF-1 α) de VEGF salınımında etkili rol oynamaktadır ¹¹².

HIF-1 iki alt birimden oluşan (HIF-1 α ve HIF-1 β) heterodimerik bir moleküldür. Oksijen varlığında HIF-1 α ubiquinasyona uğrayarak ve bilinmeyen yardımcı bazı mekanizmalarla inaktive olur. Ancak hipoksik koşullarda HIF-1 α kararlı kalır; komponentiyle birleşir ve VEGF-A sentezini sağlamaktadır ¹¹³.

Ayrıca, VEGF muhtemel temel anjiojenik faktör olma özelliği yanında; VEGF' e maruz kalan damarlarda, endotel hücreleri arasında fenestrasyon, vesiküler organeller ve transselüler gap oluşumuna olanak sağlayarak vasküler permeabiliteyi artırır ¹¹⁴. Endotel hücreleri için migratuar özelliğinin yanı sıra VEGF; hücre dışı matriks yıkımından sorumlu olan matriks metalloproteazlar ile urokinaz ve doku- tipi plazminojen aktivatörlerinin salınımını da uyarır. Böylelikle invazyon ve metastazı da kolaylaştırmaktadır ¹¹⁵.

Literatürde farklı dokularda iskemi reperfüzyon hasarının etkilerinin azaltılması amacı ile kullanılan bu ajanın sadece vaskülogenez ve anjiogenez özelliği ile değil antioksidan ve vazodilatatör etkileri ile de fayda sağladığı düşünülmektedir ²⁵.

2.11. Apoptozis

Apoptozis, normal yetişkin dokuların erken gelişim ve büyüme döneminde önemli rol oynayan morfolojik olarak farklı bir çeşit hücre ölümüdür ¹¹⁶.

Hücre proliferasyonunun düzenlenmesi gibi hücre ölümünün de düzenlenmesinin kompleks bir olay olduğu kabul edilmektedir. Çok hücreli organizmanın tüm farklılaşmış hücreleri, internal olarak kodlanan intihar programının aktivasyonu ile kendi ölümlerini sağlama yeteneğindedirler. Bu şekilde apoptozis olarak adlandırılan hücre ölümü başlatılır ¹¹⁷.

Apoptozis, ökaryotik hücre ölümünün en çok meydana gelen formu olup, tümör regresyonu ve embriyonik gelişim sırasında görülür. Apoptozis hücre sel morfolojide değişiklikler ile karakterizedir. Apoptozis,

dokuların gelişim evrelerinde, dokulardaki hücre sayısını belirleyici homeostatik mekanizmada, immün olaylarda, hücrelerin hastalık veya zararlı ajanlara bağlı hasarlanmalarında, yaşlanma sürecinde rol oynar. Apoptotik hücre ölümü, nekrotik hücre ölümünden farklıdır. Nekrotik hücre ölümü hızla hücre şişmesi ve lizisi ile karakterize akut hücre hasarlanma ile sonuçlanan hücre ölümünün patolojik bir formudur. Apoptotik hücre ölümü, hücrelerin kontrollü kendi kendilerini sindirimi ile karakterizedir. Apoptozis de hücreler kendi ölümlerini endojen proteazların aktivasyonu ile başlatırlar ¹¹⁸.

Apoptozis aynı zamanda nükleus içinde de karakteristik değişiklikler oluşturur. Nükleus yoğunlaşır, endonükleazlar aktive olup nükleer DNA'yı yıkmaya başlarlar. Apoptozis aynı zamanda mitokondriyal fonksiyon kaybı ile karakterizedir. Bu durum, apoptozisin düzenlenmesinde mitokondrinin önemli bir fonksiyona sahip olduğunu düşündürmektedir. Ölen hücre kendi plazma membran devamlılığını sürdürür. Ancak apoptotik hücrenin plazma membran değişiklikleri komşu fagositik hücrelere, fagositoz için sinyal niteliğindedir ve böylece yıkım işlemi tamamlanmış olur. Fagosit edilmemiş hücreler apoptotik cisimler olarak adlandırılan daha küçük membrana bağlı fragmanlara ayrılmaktadırlar ¹¹⁹.

Yarı ömrü kısa hücrelerin ölümü (nötrofiller vb), self reaktif T hücrelerin ortadan kaldırılması, gerekli büyüme faktörlerinden yoksun hücrelerin involusyonu, embriyonik ve erken postembriyonik gelişme sırasında hücrelerin morfogenetik ölümü, T hücreler, NK hücreler veya antikora bağımlı hücreler ile oluşan sitotoksik mekanizmalar için hedef olarak görev yapan hücrelerin ölümü gibi olaylar apoptozis ile gerçekleşmektedir ¹²⁰.

Hücreler aksi yönde uyarılmadıkça kalıtsal olarak sürekli ölürlür. Bu sebeble, apoptozis doku gelişim dönemlerinde sellüler dengeyi koruma, hücre proliferasyonu sırasında hücre sayılarını kontrol etmede önemlidir.

Diğer bir hücre ölüm şekli olan nekroz ise hipoksi, fiziksel hasar, hipertermi, kompleman aktivasyonu, UV ışık gibi zararlı hücre dışı uyaranlar sonucu oluşan istenmeyen bir süreçtir. Hücre plazma membran lipidlerinin peroksidasyonu sonucu hücre içeriği ortama dökülür, inflamatuvar yanıt oluşur ve komşu hücreler de etkilenir ¹²¹.

2.11.1 Kaspaz Ailesi

Son yıllarda yürütülen araştırmalar neticesinde, apoptozisten sorumlu moleküler mekanizmalar açıklığa kavuşmuştur. Bu çalışmalar sonucunda, kaspaz ailesi olarak adlandırılan, intrasellüler proteazların; apoptozisin gerek direk, gerekse indirek morfolojik ve biyokimyasal değişikliklerinden sorumlu olduğu ortaya konulmuştur ¹²². Öncelikle inaktif proteinler olarak sentezlenen bu enzimler çeşitli yollarla aktive edilmelerinin ardından hücresel hedeflerdeki tetrapeptit motifleri tanır ve substratı, bir aspartat rezidüsünün karboksil tarafından ayırır. Hücre ölümü sırasında meydana gelen pek çok sellüler ve morfolojik değişimler, bu enzimlerin rol oynadığı birtakım süreçler neticesinde gelişir ¹²³.

Kaspazlar tetrapeptit motiflerini aminoasit spesifitelerine göre tanır ve p4 pozisyonundaki aminoasitlere göre üç spesifik gruba ayrılır. Grup 1 kaspazlar (kaspaz-1, 4, 5, 13) P4 pozisyonunda hidrofobik aminoasitleri tanırlar ve sitokinlerin maturasyonuna aracılık ederler. Grup 2

kaspazların yeğledikleri ayırma noktası hücre ölümü sırasındaki pek çok proteinlerde gözlenir ve bununla ilintili olarak da grup 2 kaspazlar (kaspaz-2, 3, 7) apoptozisin major efektörleri olarak bilinirler. Grup 3 kaspazlar (kaspaz-6, 8, 9, 10) ise P4 pozisyonunda alifatik aminoasitleri tanır ve grup 2 kaspazların aktivasyonunda görev alır.

Hücrenin apoptozise gidebilmesi için ilk önce ilgili genetik mekanizmayı harekete geçirecek bir sinyalle karşılaşması gerekir. Bu sinyal, hücre içinden (DNA hasarı, hücre içi Ca^{++} seviyesinde artış, pH'da düşme, metabolik veya hücre siklus bozuklukları) veya hücre dışından (hipoksi, ısı, anti kanser ilaçlar, radyasyon, gamma ve UV ışınlar) gelebilir. Hücre dışından gelen sinyaller ölüm reseptörleri ve adaptör proteinlerle, iç sinyaller ise mitokondri aracılığı ile iletilirler. İletilen sinyaller başlatıcı kaspazları aktive eder, aktive olan başlatıcı kaspazlar ise zincirleme olarak diğer kaspazları aktive ederler ¹²⁴.

Zara bağlı reseptörlerden ölüm reseptörleri, tümör nekroz faktör reseptör (TNF-R) olarak adlandırılır ve proapoptotik sinyalleri hücre dışından hücre içine taşır. Tanımlanan 20'den fazla TNF-R vardır ve bunlar ölüm domaininin bulunup bulunmamasına göre 2 gruba ayrılır. Ölüm domaini bulunan reseptörler, sinyal iletimini kaspaz aktivasyonuna ve apoptozise neden olarak gerçekleştirirler ¹²⁵.

2.12. Metalloproteinazlar

Metalloproteinazlar, normalde ekstraselüler matriksi yapılandıran, hücresel aktiviteyi çeşitli yollarla düzenleyen, çinkoya bağlı endopetidazlardır. Söz konusu bu yollara, ekstraselüler matriks degradasyonu, hücre adezyonu, ekstraselüler matriks ile ayrılmış moleküller ve hücre dışı ortamdan sinyalleri dönüştüren hücre yüzey proteinlerindeki zarın değişimini sağlayan proteinlerdir. Birçok fizyolojik

dokunun yeniden yapılanması sürecinde rol almaktadır. Bununla birlikte, metalloproteinazların kontrolsüz ekspresyonu doku destrüksiyonu ve inflamasyonu ile sonuçlanabilir.

Metalloproteinazlar, klasik şekilde gelişim ve homeostazi sırasında dokunun yeniden modellenmesi ile ilgili, matriks indirgemeli enzimler olarak bilinir ve ateroskleroz, arterit, kanser ve nörodejenerasyonu içeren geniş çaplı ve farklı patolojik süreçlere dahil edilirler. Matriks metalloproteinaz ailesinin önceden tanımlanmış 7 üyesine birçok yeni metalloproteinazların eklenmesi ile bugün 24'ten fazla enzim bildirilmektedir ¹²⁶. Metalloproteinazları inhibe eden bazı faktörler mevcuttur. Bunlardan metalloproteinazların spesifik doku inhibitörleri *invivo* koşullarda bu enzimlerin aktivitesinin regülasyonunda önemli rol oynarlar. Organizmada fizyolojik olayların sürdürülmesinde metalloproteinazların aktivitesi ile onların spesifik endojen doku inhibitörleri (TIMP) arasındaki dengenin sürekliliği söz konusudur. Normal dokuda düşük düzeyde eksprese edilirler ve birçok biyolojik süreçte rol oynarlar ¹²⁷.

¹²⁸ Matriks metalloproteinaz ailesi aşağıdaki özelliklere sahiptir.

1. Ekstrasellüler matriksin en az bir komponentini parçalayan proteinazlardır.
2. Zn iyonu içerirler ve bu nedenle şelatlayıcı ajanlarla inhibe olabilirler.
3. Latent formda salgılanırlar ve proteolitik aktivitelerini göstermeleri için aktive olmaları gereklidir.
4. Metalloproteinazlar spesifik doku inhibitörleri ile (TIMP) inhibe olurlar.
5. Moleküler klonlama yöntemleri ile çeşitli grup üyelerinin aminoasit benzerlikleri olduğu gösterilmiştir.

Metalloproteinazların spesifik endojen doku inhibitörü olan TIMPs aktivitesi için bütünlüğü bozulmamış yapı gereklidir, yapısının bozulması ile aktivitesi ortadan kalkar ve tripsinle muamele edilerek oluşturulan parçalanmış kısmının aktivitesi yoktur. TIMPs aktivitesi EGF, TGF- β , IL-1 β , IL-6, retinoik asit, onkostatin, forbol esterleri, sitokinler, temel fibroblast büyüme faktörü gibi çeşitli ajanlarla arttırılabilir ¹²⁹.

3. GEREÇ veYÖNTEM

3.1. Deney Grupları

Çalışma sırasında kullanılan hayvanlar Gazi Üniversitesi Deneysel Araştırma Merkezi'nden (GÜDAM) temin edilmiştir. Bu hayvanların barındırılması ve bakımı da burada gerçekleştirilmiştir. Araştırmanın deneysel aşaması da GÜDAM'da gerçekleştirilmiştir. Kan ve dokuda çalışılacak parametreler (oksidatif stres belirteçleri, proinflamatuvar sitokin düzeyleri, apoptozis belirteçleri) Gazi Üniversitesi Tıp Fakültesi Biyokimya ve Fizyoloji ABD Laboratuvarlarında ve de University of Eastern Finland/Biomedicine/Physiology departmanında çalışılmıştır. Histopatolojik incelemeler Gazi Üniversitesi Tıp Fakültesi Patoloji ABD Laboratuvarlarında gerçekleştirilmiştir. Telomeraz aktivitesi Ankara Üniversitesi Tıp Fakültesi Onkoloji ABD Araştırma Laboratuvarında çalışılmıştır.

Bu deneysel araştırmanın gerçekleştirilebilmesi amacı ile 30 adet ortalama ağırlığı 241 ± 10 gr olan erişkin erkek Wistar-Albino ratlar kullanılmıştır. Hayvanlar randomize şekilde 5 gruba ayrılmıştır.

Yapılmış olan tüm cerrahi işlemler ketamin ve xylazine anestezisi altında steril koşullarda gerçekleştirilmiştir. Deneysel intestinal iskemi-reperfüzyon hasarı modeli, hayvanlarda süperior mezenterik arterin belli bir dönem klempe edilmesi ve takiben klempin kaldırılması suretiyle çalışılmıştır. Ancak literatürde bağırsaktaki iskemi-reperfüzyon hasarının oluşturulması için gerekli iskemi ve reperfüzyon süreleri konuları tartışmalıdır. Bu çalışmada Dwivedi ve arkadaşları tarafından kullanılan 90 dakikalık iskemi ve 4 saatlik reperfüzyon modelinin kullanılması planlanmıştır ¹³⁰. Bu modeli seçmemizin nedeni hem bağırsak dokusunda hem de uzak organlarda reperfüzyon hasarının tüm aşamalarının bu sürelerde

görülmesidir. Ayrıca uygulanan VEGF tedavi dozu, grubumuz tarafından daha önce yapılan çalışmalarla etkinliği gösterilmiş olan en düşük VEGF dozudur. Ekip daha önce ilaçla ilgili yaptığı çalışmalarda aşağıda belirtilen dozun altındaki kullanımlarının etkisiz, üzerindeki kullanımlarının da eşdeğer etkili olduğunu görerek en düşük doza bağlı etkileri yayın haline getirmişlerdir ²⁴.

Sham grubu (Gr S, n=6): Bu gruptaki ratlara anestezi altında laparotomi yapıldıktan sonra mezenter arter disseke edilerek klempe edilmek üzere hazırlanmış ancak klempe edilmeksizin bırakılmıştır. Hayvanın karnı kapatılarak 4 saat sonra anestezi altında bağırsak dokuları çıkarılmış bu dokularda immünohistokimyasal ve biyokimyasal değerlendirmeler yapılmıştır. Ayrıca ratların kanları alınarak ratlar kurban edilmiş ve alınan kan örneklerinde biyokimyasal ölçümler yapılmıştır.

VEGF grubu (Gr V, n=6): Bu gruptaki ratların kaudal kaval venleri kateterize edilmiş intravenöz VEGF(human) (0,8 µg/kg) verilmiştir. Tedaviden sonraki 4. saatte anestezi altında ratların bağırsak dokuları çıkartılmış ve bu dokularda immünohistokimyasal ve biyokimyasal değerlendirmeler yapılmıştır. Ayrıca ratların kanları alınarak ratlar kurban edilmiş ve alınan kan örneklerinde biyokimyasal ölçümler yapılmıştır.

İskemi-Reperfüzyon grubu (Gr I, n=6): Bu gruptaki ratlarda anestezi altında laparotomi yapıldıktan sonra mezenter arter disseke edilerek vasküler klemplerle klempe edilmiş ve 90 dakika süre ile intestinal iske mi gerçekleştirilmiştir. 90 dakikalık iske miyi takiben vasküler klemp i açılıp ve ratların karnı kapatılmıştır. İşlemden 4 saat sonra anestezi altında ratların bağırsak dokuları çıkartılmış ve bu dokularda immünohistokimyasal ve biyokimyasal değerlendirmeler yapılmıştır. Ayrıca ratların kanları alınarak ratlar kurban edilmiş ve alınan kan örneklerinde biyokimyasal ölçümler yapılmıştır.

İskemi-Reperfüzyon ve Reperfüzyonda VEGF grubu (Gr İR/V, n=6): Bu gruptaki ratlarda anestezi altında laparotomi yapıldıktan sonra mezenter arter disseke edilerek vasküler klemplerle klempe edilmiş ve 90 dakika süre ile intestinal iskei gerçekleştirilmiştir. 90 dakikalık iskeiye takiben damar klempi açılıp ve hemen akabinde reperfüzyon başlangıcında intravenöz VEGF (0,8µg/kg) uygulanmış ve ratların karnı kapatılmıştır. İşlemiden 4 saat sonra anestezi altında ratların bağırsak dokuları çıkartılmış ve bu dokularda immünhistokimyasal ve biyokimyasal değerlendirmeler yapılmıştır. Ayrıca ratların kanları alınarak ratlar sakrifiye edilmiş ve alınan kan örneklerinde biyokimyasal ölçümler yapılmıştır.

İskemi-Reperfüzyon ve İskei öncesi VEGF grubu (Gr V/İR, n=6): Bu gruptaki ratlarda anestezi altında laparotomi yapıldıktan sonra iskei yapılmadan hemen önce intravenöz VEGF (0,8µg/kg) tek doz uygulanmış, sonrasında mezenter arter disseke edilerek vasküler klemplerle klempe edilmiş ve 90 dakika süre ile intestinal iskei gerçekleştirilmiştir. 90 dakikalık iskeiye takiben damar klempi açılıp karnı kapatılmıştır. İşlemiden 4 saat sonra anestezi altında ratların bağırsak dokuları çıkartılmış ve bu dokularda immünhistokimyasal ve biyokimyasal değerlendirmeler yapılmıştır. Ayrıca ratların kanları alınarak ratlar sakrifiye edilmiş ve alınan kan örneklerinde biyokimyasal ölçümler yapılmıştır.

Ratlardan alınan bağırsak dokuları proksimal distal hattında 5 parçaya bölünüp 1,3 ve 5. parçalar biyokimyasal ölçümler için; 2. ve 4. parçalar ise histopatolojik incelemeler için kullanılmıştır.



Resim 1. Rat ince bağırsak kanlanması.



Resim 2. Süperior mezenterik arterin klempe edilmesi.



Resim 3. 90 dakika süre ile süperior mezenterik arterin klempe edilmesi sonrası ince bağırsaklarda oluşan hasarlanma.

3.2. Histopatoloji ve immünohistokimya

3.2.1. Histopatolojik değerlendirme

İnce bağırsak dokuları, parafin bloktan kesit almadan önce yaklaşık olarak 72 saat %10'luk formolde fikse edilmiştir. Hematoksilen eozin boyama için beş mikrometrelilik kesitler mikrotom (RM 2245, Leica, Wetzlar, Germany) kullanılarak alınmıştır. Kesitler, grupları bilmeyen bir histolog tarafından ışık mikroskopunda değerlendirilmiştir (DMI 4000 B Leica, Wetzlar, Germany). Mukozadaki iskemik değişimler Chiu ve arkadaşları tarafından belirlenmiş skorlama sistemi ile değerlendirilmiştir

3.2.2. İmmunohistokimyasal Değerlendirme

Formalin ile fikse edilip parafine gömülmüş 5-µm kalın doku kesitleri bir gece 37°C'de ve sonrasında 1 saat 60°C'de inkübe edilmiştir. Xylol uygulaması (15 dakika) iki kez gerçekleştirilmiştir. Kesitler daha sonra %96 absolut alkol ve %80 etanole 10'ar dakika daha sonrasında 5'er dakika distile suya konulmuştur. Kesitler yüksek sıcaklıkta mikrodalga fırında %10 sitrat buffer ile kaspaz 3 immünoperoksidaz için kaynatılmıştır. Oda sıcaklığında 20 dakika sonrasında, doku hidrofobik kalem (Super PAP PEN IM3580, Immunotech, a Beckman Coulter Company, 13009, Marseille, France) ile çember içine alınmıştır. Distile su ve fosfat buffer salin (0.02 M, pH 7.2) (PBS, Lab Vision Corporation) ile yıkandıktan sonra, endojen peroksidaz aktivitesi %0,3 hidrojen peroksit (Fisher Scientific, Melrose Park, IL) içinde 10 dakika uygulama ile bloke edilmiştir. Fosfat buffer salin ile yıkandıktan sonra ultra V blok (TA-125-UB, Thermo Fisher Scientific) uygulanmıştır. Daha sonra 1 saatlik Kaspaz-3 primer antikor (rabbit polyclonal antibody, Labvision/NeoMarkers Corp. Cat. #RB-1197) uygulaması sonrası numuneler fosfat buffer salin ile yıkanmıştır. Biotinlenmiş keçi anti-polivalan ve streptavidin peroksidaz ile son bir fosfat buffer salin uygulanmıştır. Fosfat buffer salin ile tekrar yıkamadan sonra numuneler 10 dakika AEC (3-amino, 9-etilkarbazol) (TA-125-HA, Thermo Fisher Scientific) kromojen içinde bekletildikten sonra son olarak Mayer hematoksilen 2 dakika süre ile uygulanmıştır. Bütün kesitler ışık mikroskobu kullanılarak değerlendirilmiştir (DMI 4000 B, Leica).

Kişiler arası farklı yorumların önlenmesi amacıyla bütün dokular aynı histolog tarafından dokuların grupları bilinmeksizin değerlendirilmiştir. İmmünoreaktivite boyama yoğunluğu, daha önce

McCarty ve arkadaşları tarafından açıklandığı gibi boyanma yoğunluğu ve dağılımı dikkate alınarak kantitatif olarak değerlendirilmiştir.

H-skor (histolojik skor), pozitif boyanmış hücrelerin yüzdesinin boyanma yoğunluğu ile çarpımı olarak belirlenmiştir. $H\text{-skor} = \sum P_i(I+1)$, I boyanma yoğunluğunu (0;sıfır ekspresyon, 1;hafif, 2;orta, 3;yoğun) ve P_i ise her bir yoğunluktaki boyanmış hücre yüzdesini göstermektedir ¹³².

3.3. Biyokimyasal Analizler

3.3.1. Homojenizasyon

Dokuların homojenizasyonu porselen bir kap içinde sıvı azot kullanılarak dokuların ezilerek toz haline getirilmesi sonrasında glutatyon ölçümleri için 1:5 %5 metafosforik asit solüsyonu içinde diğer ölçümler için 1:10 lizis buffer ile dilue edilmesi şeklinde gerçekleştirilmiştir. Numuneler 2500 rpm'de 10 dakika +4°C'de santrifüj edildikten sonra süpernatantlar ependorflara alınmıştır.

3.3.2. Western Blot Yöntemi

Bağırsak numuneleri lizis buffer içinde homojenize edildikten sonra "BCA Assay Kit" kullanılarak protein konsantrasyonları ölçülmüştür. Western blot yöntemi için her bir kuyucukta 20 µg protein konsantrasyonu olacak şekilde numuneler ve marker (Magic marker, Cat. No. LC5602 Invitrogen) %12,5'luk SDS (sodyum dodekil sülfat) jelde kuyucuklara pipet edilmiştir. %12,5'luk SDS jelde numunelerin 20 dakika 100 voltta ve 60-65 dakika 140 voltta elektroforezinden sonra, blotting aşamasında jeldeki proteinler 60 dakika, 100 voltta nitroselüloz membrana transfer edilmiştir

(Whatman -Protran Nitrocellulose 0.45 µm, blotting membrane). Bu aşamadan sonra membranlar “Ponceau S” solüsyonu kullanılarak 2-3 dakika boyanmış ve de membrandaki her bir numunenin jelden membrana transferi kontrol edilmiştir. TBS (Tris Buffered Saline) solüsyonu kullanılarak hazırlanan %5'lik süt tozu solüsyonu ile 37°C'de 1 saat süre ile membranlar bloklanmıştır. Daha sonraki aşamada primer antikorlar ile 4°C'de gece boyunca inkübe edilmiştir. Ertesi gün membranlar %0,1 TBS-T solüsyonu ile yıkanarak, sonrasında TBS-T (Tris Buffered Saline-Tween20) kullanılarak hazırlanan %5'lik süt tozu solüsyonu içinde hazırlanmış ‘Horse radish peroxidase-conjugated” anti-mouse (1:10000), anti-rat (1:10000) ve anti-rabbit (1:25000) immunoglobulinleri (StressGen ve Zymed San Francisco, Calif.) sekonder antikor olarak kullanılmıştır. Membranlardaki bantların ölçümleri Odyssey Infrared Scanner cihazı kullanılarak yapılmıştır. Membrandaki bantların değerlendirilmesi ve kuantifikasyonu yine Odyssey v3.0 programı kullanılarak yapılmıştır. Bağırsak numunelerinde western blot tekniği ile yapılmış olan ölçümlerde; Thioredoxin(TRX) (IMCO. Rabbit, ATRX06), Thioredoxin interacting protein (TxNiP) (MBL, Mouse, K0205-3), Heat Shock protein (HSP70) (Stressgen, Rabbit, SPA810), Cupper Zinc Superoxide Dismutase (CuZnSOD, SOD-100) (Stressgen, Rabbit), Manganese Superoxide Dismutase (MnSOD) (Stressgen, Rabbit, SOD-110), Catalase (Abcam, Rabbit, ab1877) ve Beta actin (β-actin) (Sigma, A5441) primer antbodileri kullanılmıştır. Beta-actin diğer primer antikor sonuçlarının kuantifikasyonu aşamasında “house keeping protein” olarak kullanılmıştır.

3.3.3. Total Malondialdehit (MDA) Tayini

Bağırsak numunelerinin total malondialdehit ölçümünde BHT (butylated hydroxytoluene) ile pH 1-2 ve 60°C'de 80 dakika inkübasyonu

prensibi ile ölçümler yapılmıştır. Sonuçlar 572nm'de ölçülmüş, standard olarak tetramethoksiopropan kullanılmıştır ¹³³.

3.3.4. Protein Karbonilleri Tayini

Bağırsak dokusundaki protein karbonilleri miktarı protein oksidasyonunun bir göstergesi olarak ölçülmüştür. ELISA yönteminde DNPH (2-4 dinitrophenylhydrazine) ile okside protein miktarları belirlenmiştir. Ölçümler 480 nm'de yapılmıştır ¹³⁴.

3.3.5. ORAC (Oxygen Radical Absorbing Capacity) Yöntemi

Numunelere ait antioksidan kapasite, floresein azalmasının inhibisyonu şeklinde ölçülmüştür. Bu amaçla fluorescein (FL) serbest radikal saldırısına karşı hedef, 2,2'-azobis (2-amidinopropane) dihidroklorid ise peroksil radikal üreticisi olarak kullanılmıştır. Trolox (Aldrich, Milwaukee, WI) kontrol standardı olarak ölçümlerde kullanılmıştır. Ölçümlerde eksitasyon filtresi 491 nm, emisyon filtresi 515 nm olarak kullanılmıştır ¹³⁵.

3.3.6. Total Glutasyon (TGSH) ve Okside Glutasyon (GSSG) Tayini

Bağırsak dokusu numuneleri homojenizasyon sonrası TGSH ve GSSG tayini için %5-metafosforik asit (MPA) ile deproteinize edilmiştir. TGSH ve GSSG tayini GSHRD (glutasyon redüktaz) geri dönüşüm metodu ile belirlenmiştir ¹³⁶. Bu metodta glutasyon 5,5'-dithiobis 2-nitrobenzoik asit (DTNB) ile okside glutasyona (GSSG) dönüşmektedir ve bu sırada 5-thio-2-nitro benzoik asit oluşmaktadır (TNB). Okside glutasyon, glutasyon

redüktaz ve NADPH ile tekrardan glutatyon'a dönüşmektedir. Oluşan TNB oranı 412 nm'de ölçülmektedir. Oluşan TNB miktarı numuneye ait toplam glutatyon ve okside glutatyon değerlerini vermektedir.

3.3.7. Süperoksit Dismutaz (SOD) Tayini

Süper oksit dismutaz ölçümü nitroblue tetrazolium (NBT) reduksiyonuna dayanmaktadır. Ksantin oksidaz NBT'yi redükte etmede süper oksit dismutaz üreticisi olarak kullanılmıştır. NBT'ye bağlı renk değişimi spektrofotometrede 560 nm'de belirlenmiştir ¹³⁷.

3.3.8. Telomeraz Aktivitesi Tayini

Çalışmamızda Telo TAGGG Telomeraz PCR ELİSA Plus (Roche, Mannheim, Almanya) kiti kullanılmıştır. TRAP kullanılarak relatif telomeraz aktivitesi (RTA) fotometrik enzim immunoassay ile kantitatif olarak belirlenmiştir.

Bu yöntem için kullanılan TELO TAGGG Telomerase PCR ELISA PLUS kiti gerekli olan tüm bileşenleri kendi içinde bulundurmaktadır. PZR reaksiyon karışımı kullanıma hazırdır. Bununla birlikte yöntemin tüm aşamaları nükleazların olmadığı şartlarda gerçekleştirildiğinde sonuçlar güvenlidir.

Absorbans değerleri kontrole (distile su) karsı 450nm'de okunmuştur. (referans dalga boyu uzunlugu A690nm'dir.) Sonuçlar % telomeraz aktivitesi (absorbans değeri 0,100 RTA'dan küçük olanlar 0 olarak kabul edilmiştir) olarak değerlendirilmiştir.

3.3.9. Plazma TNF- α Düzeyleri Tayini

Plazma TNF- α düzeyleri enzim bağımlı immunosorbant assay (ELİSA) yöntemi ile Commercial 96-well ELİSA kiti (Thermo Scientific Rat TNF- α ELISA Kit USA, Cat No: ER3TNFA, Lot No: LF144120) kullanılarak llmştur.

3.3.10. Plazma IL-6 Düzeyleri Tayini

Plazma IL-6 düzeyleri ELİSA yöntemi ile Commercial 96-well ELİSA kiti (Thermo Scientific Rat IL-6 ELISA Kit USA, Cat No: EH2IL-6, Lot No: KL138035) kullanılarak llmştur.

3.3.11. Plazma HIF-1 α Düzeyleri Tayini

Bağırsak dokusu HIF1 α düzeyleri ELİSA yöntemi ile Commercial 96-well ELİSA kiti (USCN Life Science Inc. Rat HIF1 α ELISA Kit China, Cat No: E90798Ra, Lot No: 111011285) kullanılarak llmştur.

3.4. İstatistiksel Analiz ve Grafikler

Verilerin istatistiksel analizi için SPSS 18 programı ve Mann Whitney U testi, verilere ait grafiklerin oluşturulmasında ise GraphPrism 5.0 programı kullanılmıştır. Sonuçların değerlendirilmesinde $p<0.05$ değerleri anlamlı olarak kabul edilmiştir.

4. BULGULAR

Tablo 1. Biyokimyasal analiz sonuçları-1

	Kontrol	VEGF	I/R-VEGF	I/R	VEGF-I/R
MDA-Proksimal (µM)	4.086 ±0.406	4.009 ±0.182	4.996 ±0.680	8.161 ±1.564	4.874 ±0.581
MDA-Distal (µM)	3.290 ±0.467	3.306 ±0.711	6.847 ±1.513	8.443 ±2.971	4.847 ±1.191
TGSH-Proksimal (µM)	326.000 ±32.782	317.200 ±13.682	250.333 ±48.748	183.167 ±31.505	299.667 ±86.489
TGSH-Distal (µM)	488.459 ±48.764	467.266 ±60.551	290.325 ±60.940	160.630 ±35.778	341.008 ±42.782
GSSG-Proksimal (µM)	3.938 ±1.390	3.910 ±0.761	4.662 ±0.832	8.293 ±1.467	3.623 ±1.197
GSSG-Distal (µM)	5.283 ±1.362	5.508 ±1.379	6.586 ±1.015	14.033 ±2.198	6.078 ±0.979
TGSH/GSSG (%) - Proksimal	1.208	1.233	1.862	4.528	1.209
TGSH/GSSG (%) - Distal	1.081	1.179	2.268	8.736	1.782
SOD-Proksimal (AU)	6.159 ±1.322	6.908 ±0.315	5.334 ±1.710	3.324 ±0.756	5.923 ±0.894
SOD-Distal (AU)	8.545 ±2.079	8.650 ±1.529	5.358 ±1.315	3.548 ±0.948	7.023 ±2.287
ORAC-Proksimal (µmol)	2752.200± 41.566	2666.400± 15.453	2745.500± 431.529	2695.667± 99.077	2824.333± 191.815
ORAC-Distal (µmol)	2701.347± 522.914	2938.353± 156.918	3575.815± 806.693	3582.773± 226.621	4452.473± 654.691
Protein Karbonilleri- Proksimal (AU)	0.103 ±0.013	0.101 ±0.005	0.105 ±0.006	0.114 ±0.011	0.097 ±0.010
Protein Karbonilleri- Distal (AU)	0.191 ±0.004	0.194 ±0.002	0.184 ±0.008	0.199 ±0.003	0.172 ±0.027

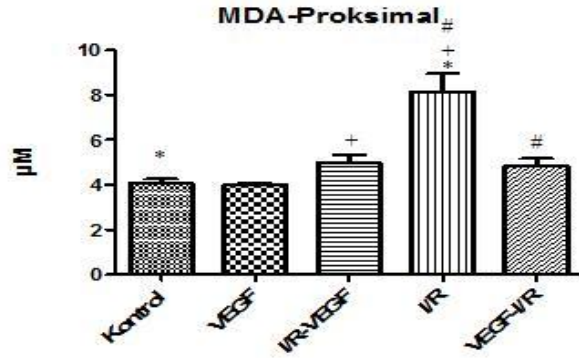
Tablo 2. Biyokimyasal analiz sonuçları-2

	Kontrol	VEGF	I/R-VEGF	I/R	VEGF-I/R
TRX-Proksimal (AU)	0.697 ±0.098	0.716 ±0.050	0.785 ±0.064	0.763 ±0.034	0.802 ±0.116
TRX-Distal (AU)	1.235 ±0.262	1.251 ±0.193	1.157 ±0.257	1.095 ±0.094	1.159 ±0.102
TxNiP-Proksimal (AU)	0.137 ±0.051	0.140 ±0.057	0.127 ±0.044	0.101 ±0.003	0.110 ±0.020
TxNiP-Distal (AU)	0.333 ±0.112	0.261 ±0.050	0.241 ±0.089	0.240 ±0.051	0.236 ±0.026
CuZnSOD-Proksimal (AU)	1.006 ±0.244	1.023 ±0.219	0.821 ±0.035	0.756 ±0.034	0.848 ±0.029
CuZnSOD-Distal (AU)	1.287 ±0.031	1.235 ±0.333	1.148 ±0.154	0.979 ±0.053	1.163 ±0.267
MnSOD-Proksimal (AU)	0.783 ±0.036	0.802 ±0.151	0.684 ±0.088	0.573 ±0.081	0.756 ±0.064
MnSOD-Distal (AU)	1.129 ±0.168	1.122 ±0.110	1.041 ±0.149	1.012 ±0.153	1.087 ±0.170
HSP70-Proksimal (AU)	0.513 ±0.247	0.493 ±0.209	0.675 ±0.200	0.823 ±0.186	0.644 ±0.395
HSP70-Distal (AU)	0.745 ±0.137	0.752 ±0.160	0.812 ±0.218	1.061 ±0.559	0.793 ±0.171
Katalaz-Proksimal (AU)	0.831 ±0.067	0.844 ±0.166	0.556 ±0.100	0.472 ±0.097	0.673 ±0.150
Katalaz-Distal (AU)	1.135 ±0.141	1.187 ±0.137	0.798 ±0.040	0.697 ±0.122	0.855 ±0.122
Plazma TNF- α (pg/ml)	124.222 ±20.701	110.389 ±19.902	109.056 ±5.053	326.267 ±84.934	114.759 ±14.931
Plazma IL-6 (pg/ml)	16.296 ±1.814	29.727 ±5.409	131.685 ±24.866	280.241 ±89.956	73.648 ±6.657
Plazma HIF-1 α (ng/ml)	9.623 ±4.027	13.892 ±2.455	13.840 ±2.024	15.012 ±0.510	13.568 ±3.515
Telomeraz Aktivitesi (%)	100	83,333	50	0	66,667

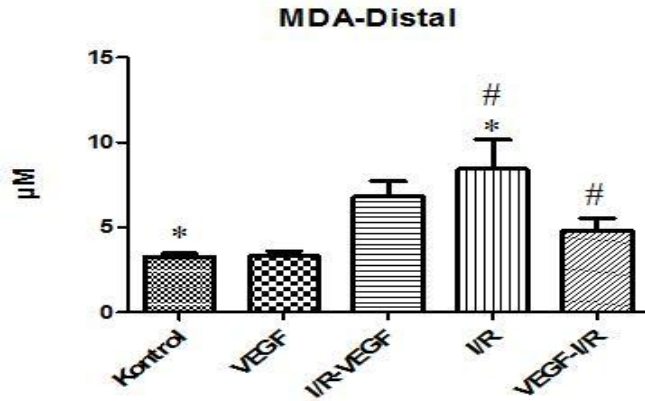
4.1. İnce Bağırsak Dokusu MDA Düzeyleri

Çalışmamızda proksimal ve distal bağırsak dokularında lipid peroksidasyonun derecesiyle benzerlik gösteren MDA düzeyleri ölçülmüştür. Proksimal ve distal bağırsak dokularında, I/R grubu MDA düzeyleri kontrol grubuna kıyasla anlamlı ölçüde artmıştır. VEGF uygulanan tedavi gruplarında ise MDA düzeyleri I/R grubuna kıyasla, proksimal bağırsakta her iki VEGF grubunda anlamlı azalış sağlarken,

distal bağırsakta sadece VEGF'in önce verildiği tedavi grubu anlamlı azalış göstermiştir ($p<0.05$) (Grafik 1,2).



Grafik 1. Proksimal bağırsak MDA düzeyleri (*, #, + $p<0.05$). (*: Kontrol-I/R , +: I/R/VEGF-I/R , #: I/R-VEGF-I/R)

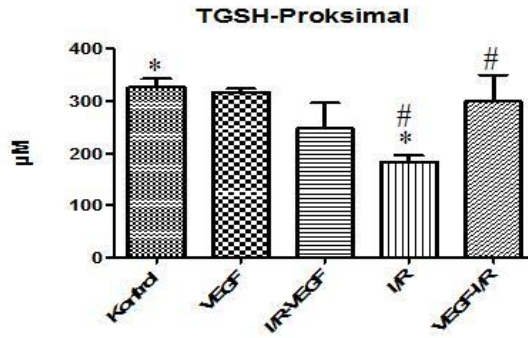


Grafik 2. Distal bağırsak MDA düzeyleri (*, # $p<0.05$). (*: Kontrol-I/R , #: I/R-VEGF-I/R)

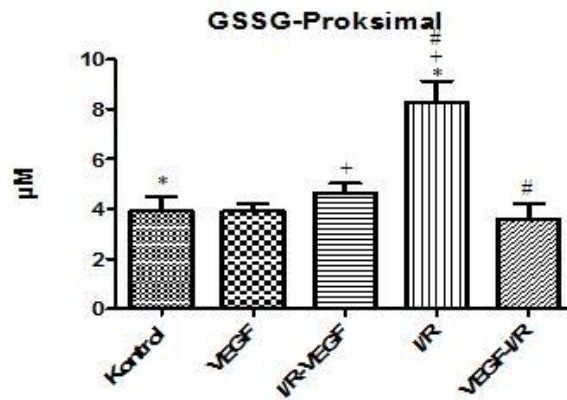
4.2. İnce Bağırsak Dokusu TGSH ve GSSG Düzeyleri

Çalışmamızda intrasellüler oksidatif durumun göstergesi olan total GSH, ve okside (GSSG) glutatyon düzeyleri proksimal ve distal bağırsak dokularında ölçülmüştür. Her iki dokuda da I/R grubu total glutatyon seviyeleri (TGSH) kontrol grubuna göre kıyasla anlamlı ölçüde

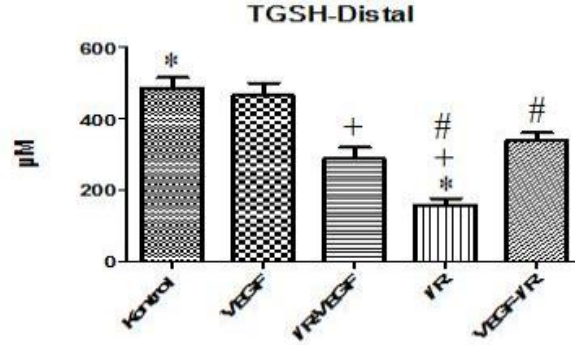
azalmış, VEGF uygulanan tedavi gruplarından proksimal bağırsak dokusuna ait VEGF'nün önce verildiği grupta, distal bağırsak dokusuna ait her iki grupta total glutatyon seviyeleri, I/R grubuna kıyasla anlamlı olarak yüksek bulunmuştur. Proksimal ve distal bağırsak okside glutatyon düzeyleri (GSSG), I/R gruplarında kontrol grubuna kıyasla anlamlı derecede artmış, VEGF uygulanan tedavi gruplarının her ikisinde de ölçülen GSSG değerleri I/R grubuna göre anlamlı olarak daha düşük bulunmuştur ($p<0.05$). (Grafik 3,4,5,6).



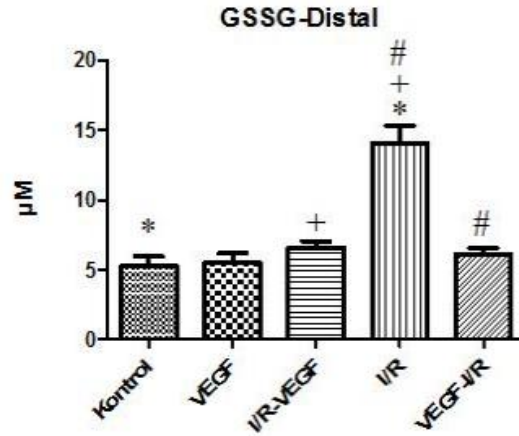
Grafik 3. Proksimal bağırsak dokusu total glutatyon düzeyleri (*, # ; $p<0.05$). (*: Kontrol-I/R , #: I/R-VEGF-I/R)



Grafik 4. Proksimal bağırsak dokusu okside glutatyon düzeyleri (*, #, + ; $p<0.05$). (*: Kontrol-I/R , +: I/R-VEGF-I/R , #: I/R-VEGF-I/R)



Grafik 5. Distal bağırsak dokusu total glutatyon düzeyleri (*,# ; $p<0.05$). (*: Kontrol-I/R , +: I/R/VEGF-I/R , #:I/R-VEGF-I/R)

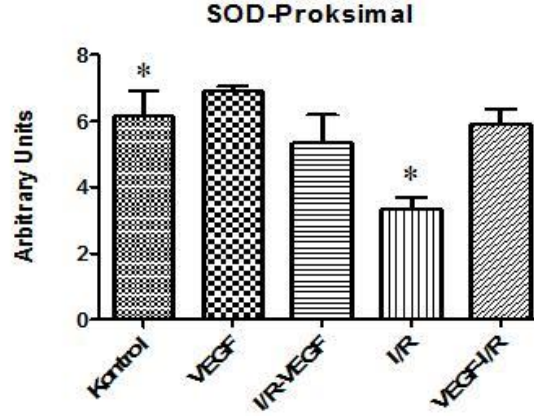


Grafik 6. Distal bağırsak dokusu okside glutatyon düzeyleri (*,#,+ ; $p<0.05$). (*: Kontrol-I/R , +: I/R/VEGF-I/R , #:I/R-VEGF-I/R)

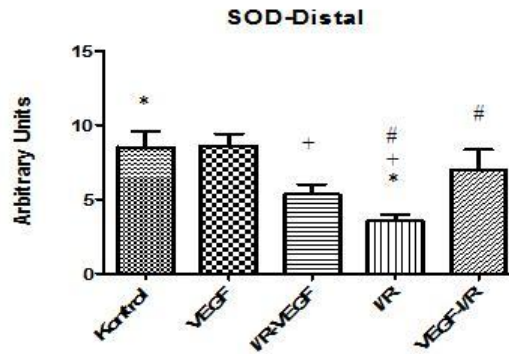
4.3. İnce Bağırsak Dokusu SOD Düzeyleri

Çalışmamızda proksimal ve distal bağırsak dokularında süperoksit dismutaz (SOD) düzeyleri ölçülmüştür. Her iki dokuda da I/R grubu süperoksit dismutaz düzeyleri kontrol grubuna göre kıyasla azalmış, VEGF uygulanan tedavi grupları SOD seviyeleri, I/R grubuna kıyasla bir

artış göstermiştir. Bu artış distal bağırsakta VEGF uygulanan tedavi gruplarından her ikisinde de anlamlıdır ($p<0.05$). (Grafik 7,8).



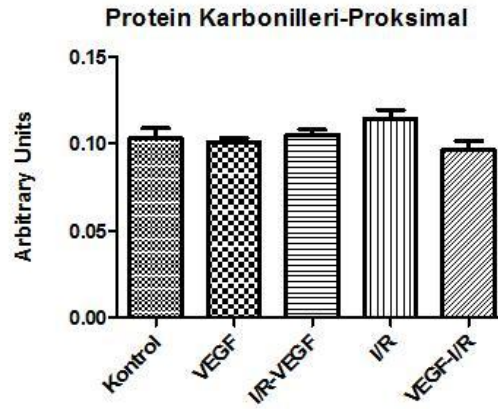
Grafik 7. Proksimal bağırsak dokusu süperoksit dismutaz düzeyleri (* ; $p<0.05$). (*: Kontrol-I/R)



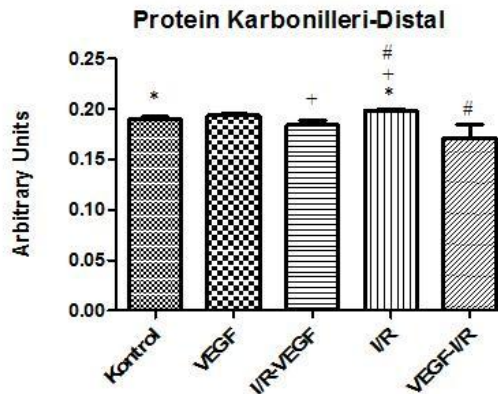
Grafik 8. Distal bağırsak dokusu süperoksit dismutaz düzeyleri (*, #, + ; $p<0.05$). (*: Kontrol-I/R , +: I/R-VEGF-I/R , #: I/R-VEGF-I/R)

4.4. İnce Bağırsak Dokusu Protein Karbonilleri Düzeyleri

Çalışmamızda proksimal ve distal bağırsak dokularında protein karbonilleri düzeyleri ölçülmüştür. Her iki dokuda da I/R grubu protein karbonilleri düzeyleri kontrol grubuna göre kıyasla artmış, ancak bu artış distal bağırsakta anlamlı olmuştur. VEGF uygulanan tedavi gruplarından her ikisinde de protein karbonilleri düzeyleri, I/R grubuna kıyasla distal bağırsakta anlamlı bir azalma göstermiştir ($p<0.05$). (Grafik 9,10).



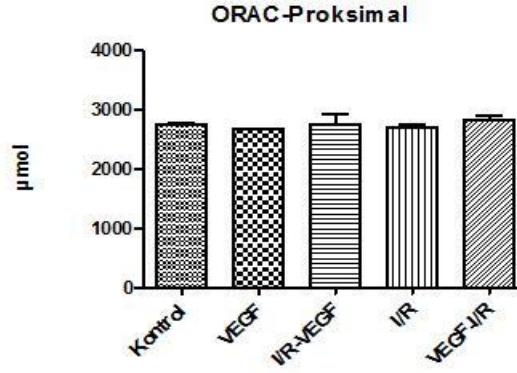
Grafik 9. Proksimal bağırsak dokusu protein karbonilleri düzeyleri.



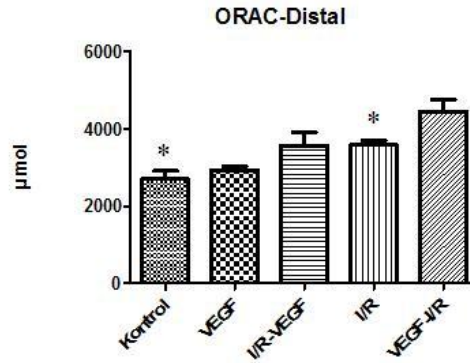
Grafik 10. Distal bağırsak dokusu protein karbonilleri düzeyleri (*, #, + ; $p<0.05$). (*: Kontrol-I/R , +: I/R/VEGF-I/R , #: I/R-VEGF-I/R).

4.5. İnce Bağırsak Dokusu ORAC Düzeyleri

Çalışmamızda proksimal ve distal bağırsak dokularında oksijen radikalleri absorbands kapasitesi (ORAC) düzeyleri ölçülmüş. Distal bağırsakta I/R grubu ORAC düzeyleri kontrol grubuna göre kıyasla anlamlı olarak artmış, VEGF uygulanan tedavi grupları ORAC düzeyleri, I/R grubuna kıyasla anlamlı bir fark göstermemiştir ($p<0.05$). (Grafik 11,12).



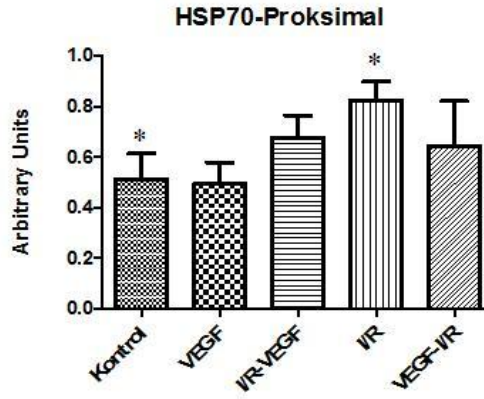
Grafik 11. Proksimal bağırsak dokusu ORAC düzeyleri.



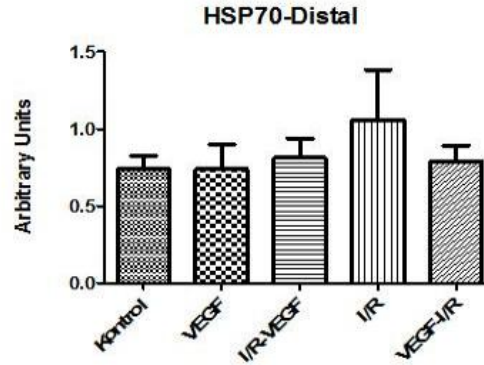
Grafik 12. Distal bağırsak dokusu ORAC düzeyleri. (*: Kontrol-I/R ,)

4.6. İnce Bağırsak Dokusu HSP70 Düzeyleri

Çalışmamızda proksimal ve distal bağırsak dokularında ısı şok protein 70 (HSP70) düzeyleri ölçülmüştür. Her iki dokuda da I/R grubu HSP70 düzeyleri kontrol grubuna göre kıyasla artmış, ancak proksimal bağırsak bölümündeki artış anlamlılık göstermiştir ($p<0.05$). VEGF uygulanan tedavi grupları HSP70 düzeyleri, I/R grubuna kıyasla bir azalma göstermiştir. Ancak bu azalma anlamlı değildir (Grafik 13,14).



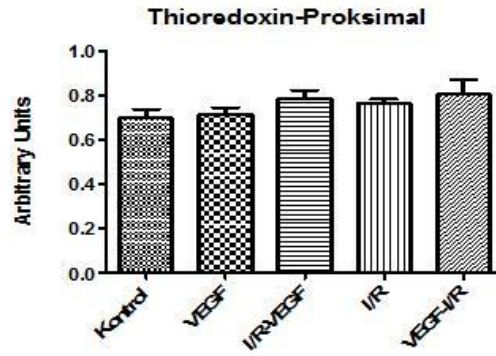
Grafik 13. Proksimal bağırsak dokusu HSP70 düzeyleri (* ; $p<0.05$). (*: Kontrol-I/R)



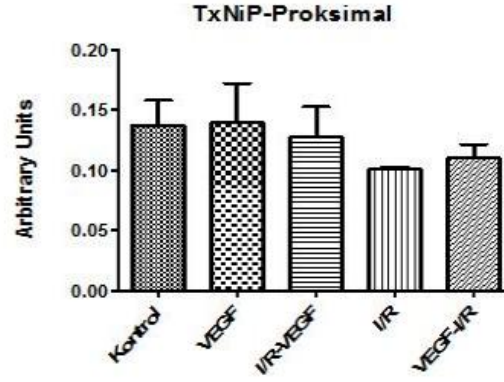
Grafik 14. Distal bağırsak dokusu HSP70 düzeyleri.

4.7. İnce Bağırsak Dokusu TRX ve TxNiP Düzeyleri

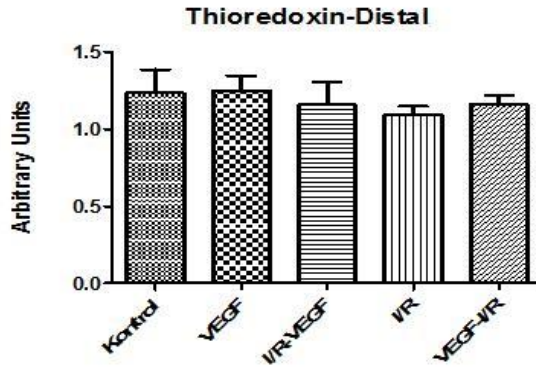
Çalışmamızda proksimal ve distal bağırsak dokularında thioredoxin (TRX) ve thioredoxin interacting protein (TxNiP) düzeyleri ölçülmüştür. Her iki dokuda da I/R grubu thioredoxin ve thioredoxin interacting protein (TxNiP) düzeyleri kontrol grubuna göre kıyasla anlamlı bir değişiklik göstermemiş, aynı anlamsız değişiklikler VEGF uygulanan tedavi gruplarında da gözlenmiştir. (Grafik 15,16,17,18).



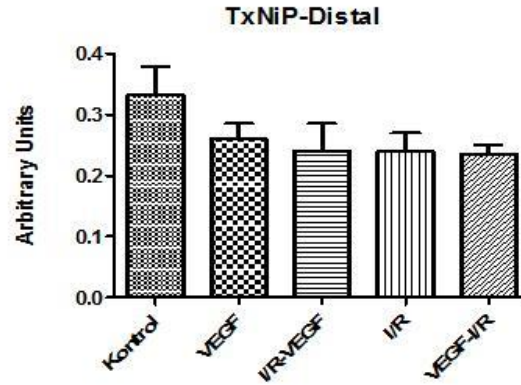
Grafik 15. Proksimal bağırsak dokusu TRX düzeyleri.



Grafik 16. Proksimal bağırsak dokusu TxNiP düzeyleri.



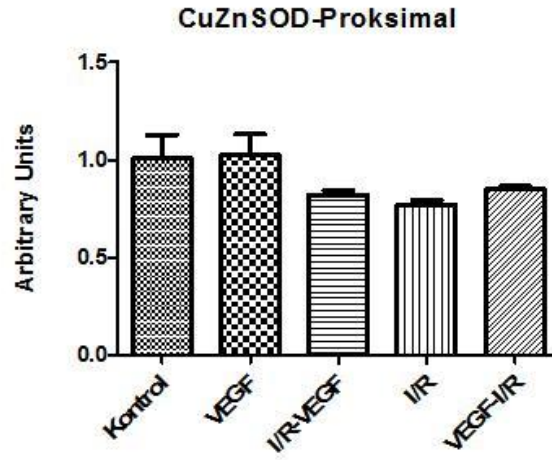
Grafik 17. Distal bağırsak dokusu TRX düzeyleri.



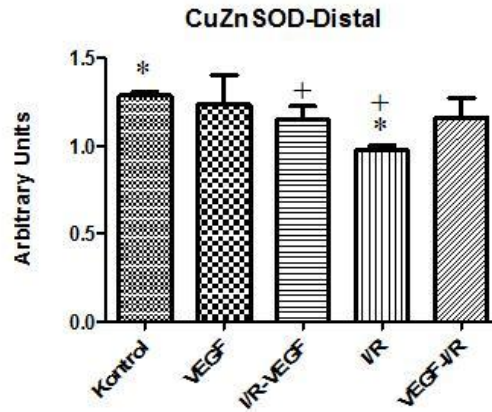
Grafik 18. Distal bağırsak dokusu TxNiP düzeyleri.

4.8. İnce Bağırsak Dokusu CuZnSOD Düzeyleri

Çalışmamızda proksimal ve distal bağırsak dokularında bakır çinko superoksit dismutaz (CuZnSOD) düzeyleri ölçülmüştür. Her iki dokuda da I/R grubu CuZnSOD düzeyleri kontrol grubuna göre kıyasla azalmış, bu azalmalardan distal bağırsak bölümündeki bakır çinko superoksit dismutaz azalışı anlamlılık göstermiştir ($p<0.05$). Yine distal bağırsak bölümünde VEGF uygulanan tedavi gruplarından VEGF'nün sonra verildiği grupta CuZnSOD düzeyleri, I/R grubuna kıyasla bir artış göstermiştir (Grafik 19,20).



Grafik 19. Proksimal bağırsak dokusu CuZnSOD düzeyleri.

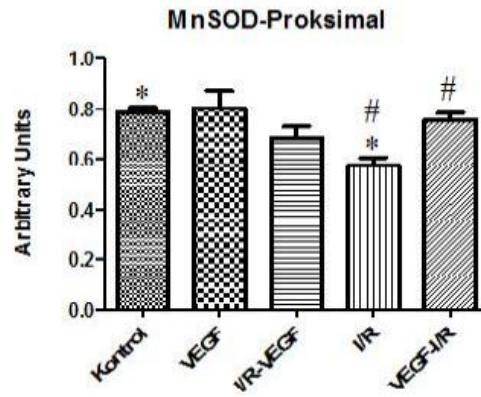


Grafik 20. Distal bağırsak dokusu CuZnSOD düzeyleri (*, + ; $p < 0.05$). (*: Kontrol-I/R , +: I/R/VEGF-I/R ,)

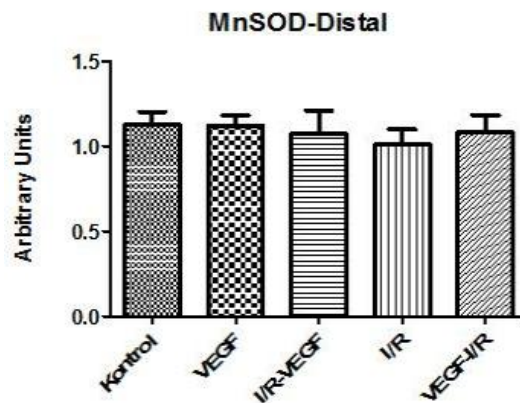
4.9. İnce Bağırsak Dokusu MnSOD Düzeyleri

Çalışmamızda proksimal ve distal bağırsak dokularında manganez superoksit dismutaz (MnSOD) düzeyleri ölçülmüştür. Her iki

dokuda da I/R grubu MnSOD düzeyleri kontrol grubuna göre kıyasla azalmış, ancak bu azalışlardan proksimal barsak bölümündeki azalma anlamlılık göstermiştir ($p<0.05$). Yine proksimal bağırsakta VEGF uygulanan tedavi gruplarından VEGF'nün önce verildiği grupta MnSOD düzeyleri, I/R grubuna kıyasla bir artış göstermiştir (Grafik 21,22).



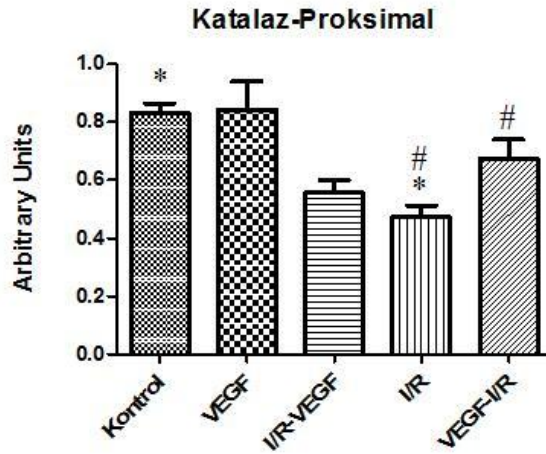
Grafik 21. Proksimal bağırsak dokusu MnSOD düzeyleri (*,# ; $p<0.05$). (*: Kontrol-I/R , #:I/R-VEGF-I/R)



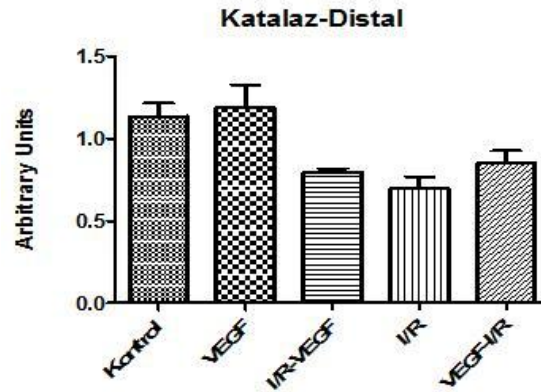
Grafik 22. Distal bağırsak dokusu MnSOD düzeyleri.

4.10. İnce Bağırsak Dokusu Katalaz Düzeyleri

Çalışmamızda proksimal ve distal bağırsak dokularında katalaz (KAT) düzeyleri ölçülmüştür. Her iki dokuda da I/R grubu katalaz düzeyleri kontrol grubuna göre kıyasla azalmış, bu azalma proksimal barsak bölümünde anlamlılık göstermiştir ($p<0.05$). VEGF uygulanan tedavi grupları katalaz düzeyleri, I/R grubuna kıyasla bir artış göstermiştir. Ancak bu artış proksimal bağırsakta ve VEGF uygulanan tedavi gruplarından VEGF'nün önce verildiği grupta anlamlılık göstermiştir ($p<0.05$). (Grafik 23,24).



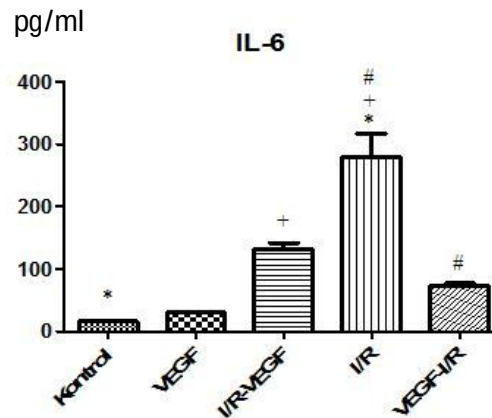
Grafik 23. Proksimal bağırsak dokusu KAT düzeyleri (*,# ; $p<0.05$). (*: Kontrol-I/R , #:I/R-VEGF-I/R)



Grafik 24. Distal bağırsak dokusu KAT düzeyleri.

4.11. Plazma IL-6 Düzeyleri

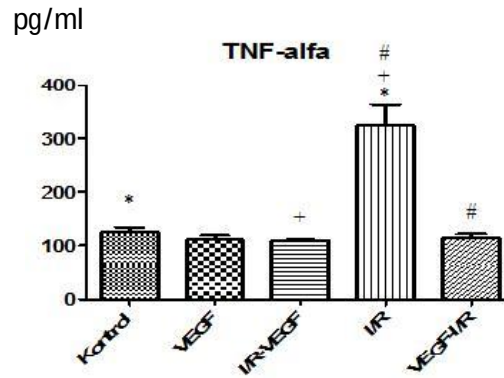
Çalışmamızda plazma interlökin-6 (IL-6) düzeyleri ölçülmüştür. I/R grubu IL-6 düzeyleri kontrol grubuna göre kıyasla anlamlı artmış, VEGF uygulanan tedavi gruplarının her ikisinde de IL-6 düzeyleri, I/R grubuna kıyasla anlamlı bir azalma göstermiştir ($p<0.05$). (Grafik 25).



Grafik 25. Plazma IL-6 düzeyleri (*,+,# ; $p<0.05$). (*: Kontrol-I/R , +: I/R/VEGF-I/R , #:I/R-VEGF-I/R)

4.12. Plazma TNF- α Düzeyleri

Çalışmamızda plazma tümör nekrozis faktör alfa (TNF- α) düzeyleri ölçülmüştür. I/R grubu TNF- α düzeyleri kontrol grubuna göre kıyasla anlamlı artmış, VEGF uygulanan tedavi gruplarından her ikisinde de TNF- α düzeyleri, I/R grubuna kıyasla anlamlı bir azalma göstermiştir ($p<0.05$). (Grafik 26).

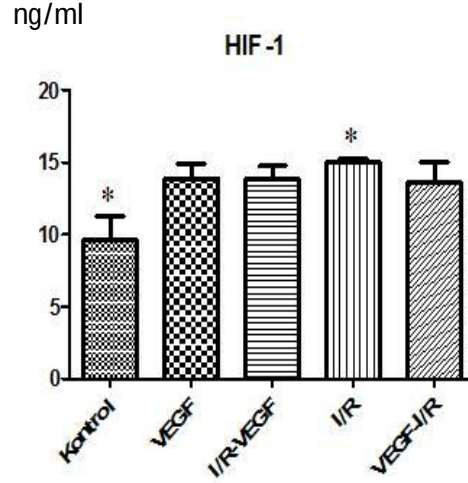


Grafik 26. Plazma TNF- α düzeyleri (*,+,# ; $p<0.05$). (*: Kontrol-I/R , +: I/R/VEGF-I/R , #:I/R-VEGF-I/R)

4.13. Plazma HIF-1 α Düzeyleri

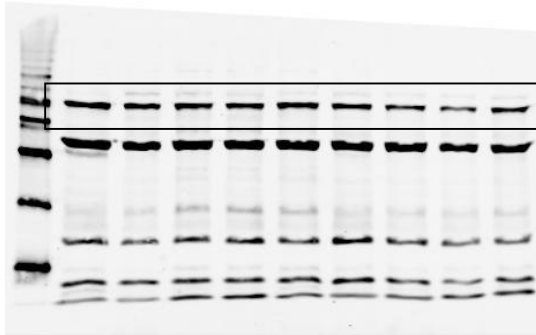
Çalışmamızda plazma hipoksi ile indüklenen faktör-1 α (HIF-1 α) düzeyleri ölçülmüştür. I/R grubu HIF-1 α düzeyleri kontrol grubuna göre kıyasla anlamlı olarak artmış, VEGF uygulanan tedavi grupları HIF-1 α

düzeyleri, I/R grubuna kıyasla bir azalma göstermiştir, ancak bu azalma anlamlı değildir ($p < 0.05$) (Grafik 26).

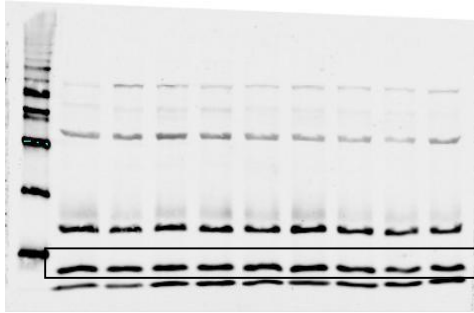


Grafik 27. Plazma HIF-1 α düzeyleri (*,+,# ; $p < 0.05$). (*: Kontrol-I/R)

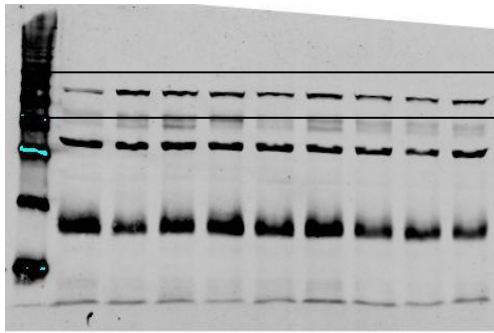
4.14. Western Blot Sonuçları Örnekleri



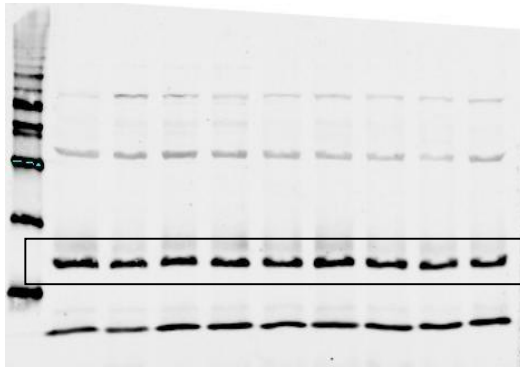
Distal bağırsak dokusu membran-2: Katalaz (65 kDa)



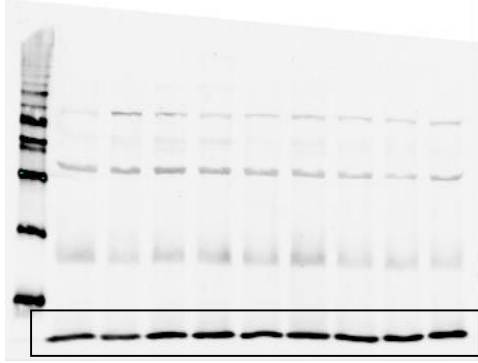
Distal bağırsak dokusu membran-2:;CuZnSOD (19 kDa)



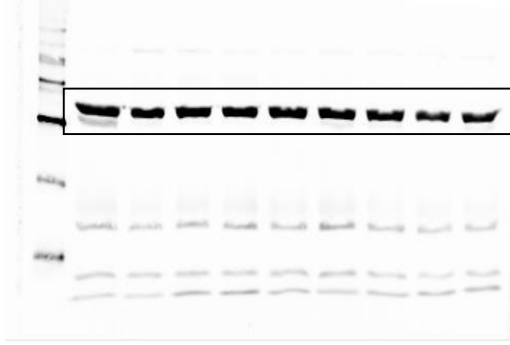
Distal bağırsak dokusu membran-2:HSP70 (72 kDa)



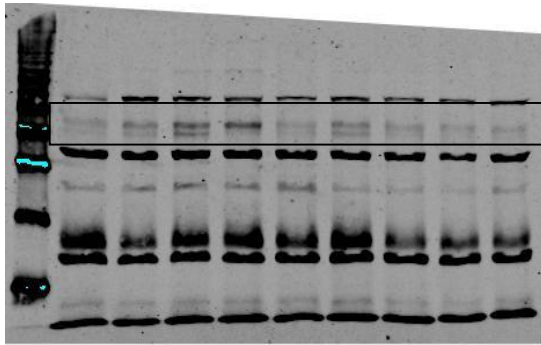
Distal bağırsak dokusu membran-2: MnSOD (25 kDa)



Distal bağırsak dokusu membran-2;TRX (12 kDa)



Distal bağırsak dokusu membran-2;Beta actin (45 kDa)

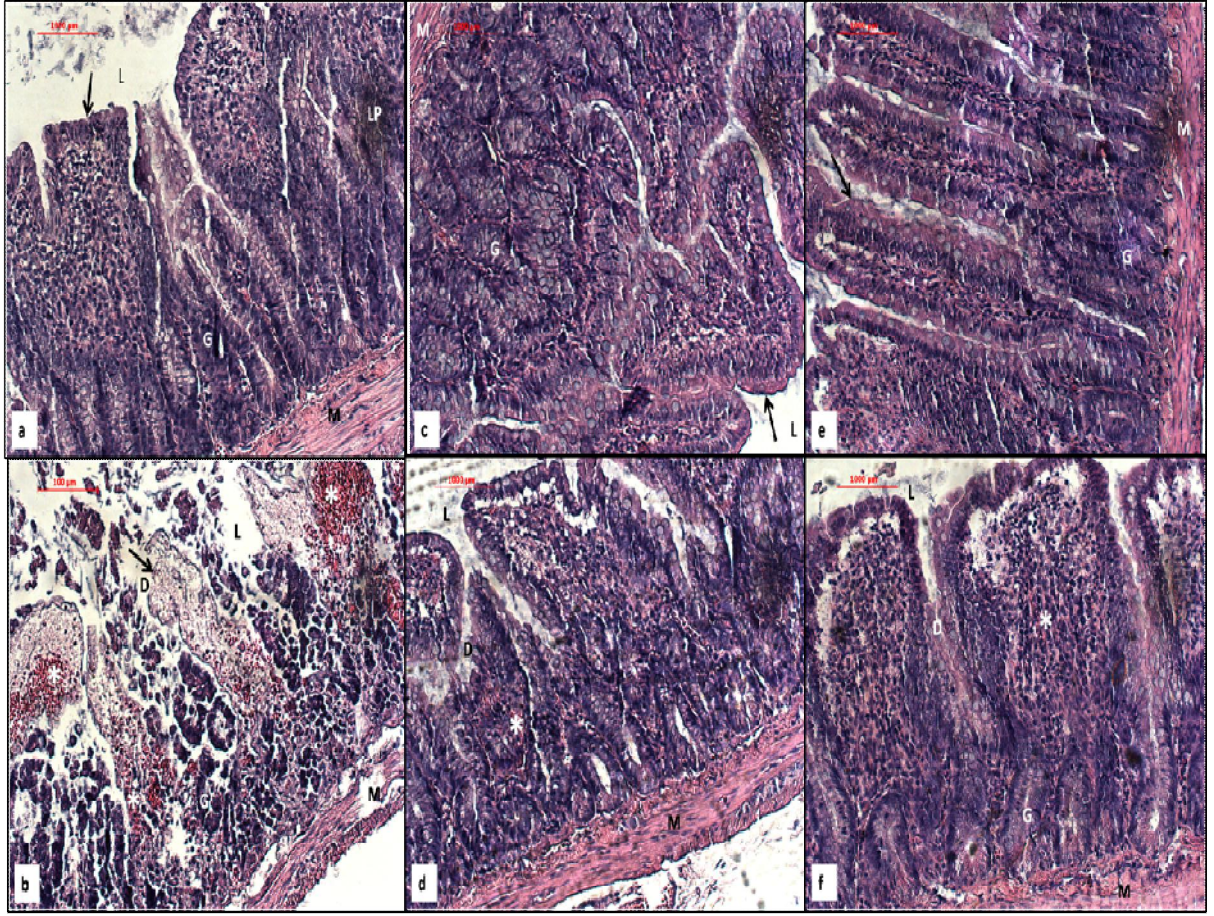


Distal bağırsak dokusu membran-2: TxNiP (~50 kDa)

4.15. Histopatolojik ve İmmunohistokimyasal Değerlendirme

Hemotoksilen&eozin boyanma sonucu kontrol ve VEGF gruplarında iskemik bulgulara rastlanmamıştır. (Figür a, c, e). Yaygın deskuamasyon ve mukozal kongesyon gibi iskemik hasar bulgularına I/R grubunda rastlanmıştır. (Figür b). Fokal deskuamasyon ve hafif mukozal kongesyon gibi hafif iskemik hasara VEGF'in sonra verildiği tedavi gruplarında rastlanmıştır. Gruplar arası yapılan karşılaştırmada kontrol ve I/R grupları arasında ve I/R ile VEGF tedavi grupları arasında histopatolojik skorlamada anlamlı fark gözlenmiştir. VEGF-I/R ve I/R-VEGF grupları ana histopatolojik skorlaması istatistiksel açıdan birbirinden farklı bulunmamıştır.

Histopatolojik incelemede I/R grubuna göre her iki VEGF tedavi grubu hasarı azaltmış olsada VEGF'in daha çok koruyucu etkisi iskemi öncesi uygulanan tedavi grubunda belirlenmiştir.



Resim 4. Hematoksilen-eozin ile boyanmış ince bağırsak histopatolojisi ; a-kontrol grubu: ince bağırsak normal morfolojik yapısı (Ok: İntestinal epitelyum, L:Lümen, G: İntestinal salgı bezi, LM: Lamina propria, M: Kas tabakası) b- iskemi grubu: İntestinal epitelyum içinde(Ok) yayılmış deskuamasyon (D), mukozada kongesyon (*) görülmektedir. (L:Lümen, M:Kas tabakası) c-VEGF grubu: Normal morfolojik yapı görülmektedir. (Ok: İntestinal epitelyum, L:Lümen, G: İntestinal salgı bezi, M: Kas tabakası) d-iskemi-VEGF grubu: fokal deskuamasyon, mukozada kongesyon (*) ve intakt kas tabakası (M) görülmektedir. e,f-VEGF+iskemi grubu: Resim e'de normal morfolojik yapı görülmektedir. (Ok: İntestinal epitelyum, L:Lümen, G: İntestinal salgı bezi, M:Kas tabakası) Resim f'de epitelyumda fokal deskuamasyon (D), mukozada kongesyon (*) görülmektedir. (L:Lümen, G:İntestinal salgı bezi , M:Kas tabakası) (Bar: 1000 µm)

Tablo 3. Histopatolojik bulgulara ait skarlama tablosu (a-d ; c-d ; d-e için p<0.05).

Histolojik Skor (Grade)	Kontrol ^a	VEGF ^b	I/R-VEGF ^c	I/R ^d	VEGF-I/R ^e
Grade 0	5	4			3
Grade I	1	2	5		3
Grade II			1	3	
Grade III				2	
Grade IV				1	
Ortalama	0.16	0.33	1.16	2.66	0.5

Tablo 4. Doku kaspaz aktivitesine ait skarlama tablosu (a-d ; c-d ; d-e için p<0.05).

Histolojik Skor Ortalama	Kontrol ^a	VEGF ^b	I/R-VEGF ^c	I/R ^d	VEGF-I/R ^e
	0.85±0.37	1.07±0.41	1.20±0.44	2.95±0.45	1.02±0.45

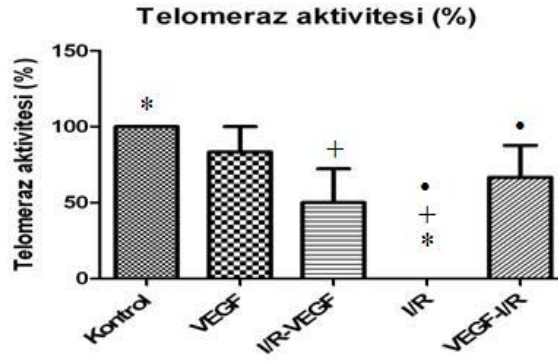
Tablo 5. Doku metalloproteinaz-9 skarlama tablosu (a-d ; c-d ; d-e için p<0.05).

Histolojik Skor Ortalama	Kontrol ^a	VEGF ^b	I/R-VEGF ^c	I/R ^d	VEGF-I/R ^e
	1.78±0.35	1.83±0.42	2.32±0.28	3.07±0.20	2.15±0.46

4.16. İnce Bağırsak Dokusu Telomeraz Aktivitesi

Çalışmamızda bağırsak dokusu telomeraz aktivitesi düzeyleri ölçülmüştür. I/R grubu telomeraz aktivitesi kontrol ve iskemi öncesi ya da sonrası VEGF uygulanan tedavi gruplarına kıyasla anlamlı olarak düşük bulunmuştur (p<0.05). İskemi öncesi ya da sonrası VEGF uygulanan tedavi grupları ile kontrol grubu kıyaslamasında anlamlı bir farklılık bulunmamıştır. Telomeraz aktivitesi sonuçlarına göre absorbans değerleri

0.1'in altında olanlar telomeraz aktivitesi açısından 0 olarak kabul edilmiş ve de telomeraz aktivitesi % olarak hesaplanmıştır.



Grafik 28. Bağırsak dokusu telomeraz aktivitesi sonuçları (*,+,• ; p<0.05).

Ayrıca telomeraz aktivitesi ile proksimal ve distal bağırsak dokularının MDA ve TGSH düzeyleri arasında korelasyon testi yapılmış (Spearman korelasyon testi) ve istatistiksel açıdan anlamlılıkları değerlendirilmiştir. Test sonuçlarına göre her iki dokuda da telomeraz aktivitesi ve MDA düzeyleri arasında ters bir korelasyon olduğu, telomeraz aktivitesi ve de TGSH düzeyleri arasında ise aynı yönde bir korelasyon olduğu bulunmuştur (p<0.05).

Tablo 6. Bağırsak dokusu telomeraz aktivitesi ile MDA ve TGSH'ın korelasyon testleri sonuçları.

P ve r değerleri	MDA_proksimal bağırsak dokusu		TGSH_proksimal bağırsak dokusu		MDA_distal bağırsak dokusu		TGSH_distal bağırsak dokusu	
Telomeraz	-0,518		0,691		-0,498		0,69	
p	0,023		0,001		0,03		0,002	

5.TARTIŞMA

İskemi, kan akımı yetersizliği nedeniyle dokuların ihtiyacı olan oksijen ve metabolik substratların karşılanamadığı patolojik bir olaydır. Bağırsak iskemi-reperfüzyon hasarı yüksek derecede mortalite ve morbiditeye neden olan önemli bir faktördür ¹. Bozulmuş kan akımının neden olduğu iskemik hasar metabolik açıdan aktif dokulara önemli derecede zarar vermektedir. Paradoksal olarak iskemik dokuda kan akımının yeniden sağlanması iskemik hasara ilaveten reperfüzyon hasarı olarak belirtilen ek hücre hasarına yol açmaktadır. Bu reperfüzyon hasarı, iskeminin neden olduğu doku hasarlanmasını daha da arttırmaktadır ².

Gastrointestinal sistem iskemi-reperfüzyon hasarına karşı yüksek derecede hassastır ³. Bağırsak bariyerinin bozulması besinlerin absorpsiyonunu azaltmakta ve bariyerin bozulması sebebiyle bağırsakta mevcut bulunan bakterilerde kana ya da diğer organlara geçebilmektedir. Bakteri translokasyonu ve bakteriler tarafından üretilip kana salınan zararlı maddeler inflamatuvar mediatörleri aktive edip “Sistemik İnflamatuvar Yanıt” ya da “Çoklu Organ Disfonksiyonu Sendromu”nun ortaya çıkmasına neden olmaktadır ^{9,10}. Bu sebeble ince bağırsağın lezyonlara karşı korunmasında kullanılabilecek yöntemlerin bulunması önem kazanmaktadır.

İskemi reperfüzyon hasarı ile ilgili mekanizmalar multi-faktöriyel olup, literatürde geniş olarak araştırılıp yorumlanmıştır. Bunlardan biri olan, süperoksit anyonu (O_2^-), hidrojen peroksit (H_2O_2) gibi serbest oksijen radikaller ve inflamatuvar sitokinler mukozadaki doğal savunma sistemini bozup hücre hasarına sebep olmaktadırlar ^{14,15,16}. Serbest radikal bağımlı hasara karşı korunmada hücrelerin antioksidan aktivitesine sahip enzimleri içeren savunma mekanizmaları bulunmaktadır.

Serbest radikal hasarına karşı DNA, proteinler ve lipid gibi makromoleküllerin korunmasında süper oksit dismutaz (SOD), glutatyon

peroksidaz (GSHPx), katalaz (KAT) gibi antioksidan enzimler birincil koruyuculardır. Süper oksit dismutazlar O_2^- 'yi hızlıca daha az zararlı olan H_2O_2 'ye, KAT ve GSHPx ise H_2O_2 'i suya dönüştürmektedir. Bu sebeple yüksek seviyedeki antioksidan enzimler hücrel makro molekülleri oksidatif stres bağımlı hasara karşı korumada etkilidirler ¹⁵.

İskemide hasarın şiddeti, hipoksinin süresi ve derinliğine bağlıdır. Hipoksi durumunda, hücre canlılığının devamı için gerekli olan enerji (ATP), glikojen depolarından glikoliz yoluyla yani anaerobik olarak üretilmeye baslar. Bu esnada, aerobik glikoliz neredeyse durma noktasına gelmekte ATP'nin sadece %7'si bu yolla üretilmektedir ¹⁸. Normal ısı derecesinde, 3-4 dakikalık iskemiyi takiben ATP depoları tamamen boşalır, mitokondriyal oksidatif fosforilasyon durur. ATP düzeyi sıfıra yaklaştığında intraselüler iyonik homeostazis için gerekli olan ve ATP'ye bağımlı membran iyon pompaları çalışamaz olur ¹⁹. İrreversibl selüler hasar sürecinin başlamasında kalsiyum iyon homeostazisinin bozulması en kritik noktadır. İskemi esnasında, intraselüler kalsiyum hızla çoğalmakta, kalsiyum seviyesindeki bu artış sitoplazmik proteazlar ve nükleazların salınımını aktive etmektedir. Bunlar yapısal proteinlerin ve DNA'nın hasar görmesinden sorumlu olan enzimlerdir. Kalsiyumun aktive ettiği fosfolipazlar, membran lipidlerini araşidonik asit ve diğer çeşitli vazoaktif metabolitlere dönüştürecektir. Endotelial ksantin dehidrogenaz ksantin oksidaza dönüşür ki bu enzim reperfüzyon esnasında serbest radikal üretiminde rol alan önemli bir ajandır. Sonuç olarak, intraselüler kalsiyum konsantrasyonundaki yükselme, beraberinde her ikisi de şiddetle nörotoksik olan aspartat ve glutamat miktarının artmasına neden olur ¹⁹. Post-iskemik resirkülasyon veya reperfüzyon, iskemik dokunun oksijenlenmiş kan ile perfüze edilmesiyle, enerji desteğinin sağlanması ve selüler homeostazisin yeniden restorasyonu demektir ¹⁸. Ancak, reperfüzyon esnasında ortaya çıkan bazı toksik ajanlara bağlı lokal doku

hasarı ve olumsuz sistemik etkiler, son yılların popüler araştırma konularından biri olmuştur ²⁰.

Hipoksi, VEGF ve reseptörlerinin yapımını indükleyerek anjiyogenezi başlatan en etkili uyarılardan biridir. Hipoksinin yanında azalan pH (asidoz) ve salınan sitokinlerin etkisiyle VEGF'in ekspresyonu artmaktadır ²². Ayrıca VEGF'in endotel hücrelerini apoptozise karşı koruduğu da bilinmektedir. Vasküler Endotelial Büyüme Faktörünün bir diğer etkisi de nitrik oksit (NO) salınımını ve NO aracılı vazodilatasyonu uyarmasıdır. Bu büyüme faktörünün iskemik reperfüzyon hasarı üzerindeki antioksidan etkisi ilk kez bu çalışmanın yürütücüsü ve ekibi tarafından 2009 yılında çalışılmış ve literatüre eklenmiştir ²⁴. Literatürde farklı dokularda iskemik reperfüzyon hasarının etkilerinin azaltılması amacı ile kullanılan bu ajanın sadece vaskülogenez ve anjiogenez özelliği ile değil antioksidan ve vazodilatatör etkileri ile de fayda sağladığı düşünülmektedir ²⁵.

Liu ve arkadaşları yaptıkları bir çalışmada renal iskemi reperfüzyon hasarında VEGF ve VEGFR2 ekspresyonunun arttığını göstermişlerdir. ¹³⁸

Poynter ve arkadaşlarının yaptıkları bir çalışmada kalpte iskemik hasara karşı korumada kısmen VEGF'in etkili olduğunu, VEGF üretiminin HIF-1 α transkripsiyon düzeyi ile regüle edildiğini, HIF-1 α aktivasyonu ile VEGF üretiminin arttığını belirtmişlerdir ¹³⁹.

Pande ve arkadaşlarının yaptıkları bir başka çalışmada VEGF'in potent bir anjiyogenik sitokin olduğu ve serbest radikaller ve reaktif oksijen ara ürünlerinin üretimi durumunda up-regüle olduğunu belirtmişlerdir ¹⁴⁰.

Bu bilgiler VEGF'in iskemi-reperfüzyon hasarına bağılı olarak oluşan oksidatif stres ve serbest radikallerin oluşumu ile yakından ilgili olduğunu göstermektedir.

Çalışmamızda superior mezenterik arterin oklüzyonu şeklinde ince bağırsakta iskemi gerçekleştirilmiştir. İnce bağırsak iskemisi meydana getirmek için aynı model literatürdeki birçok çalışmada kullanılmıştır ¹⁴¹.

İnce bağırsağın tüm kanı superior mezenterik arter (SMA) ve çölyak trunkus (TÇ) (daha çok SMA'dan olmak üzere) dan gelir. Vasküler anatomi insanlar arasında büyük farklılıklar gösterir. TÇ, aorttan çıktıktan sonra sol gastrik arter, hepatika communis ve lienal arter olmak üzere üç ana dala ayrılır. Hepatika comunisden de gastroduodenal, sağ gastroepiploik ve superior pankreatikoduodenal arter kaynaklanır. Lienal arterden pankreatik ve sol gastroepiploik arter çıkar. Bütün bu arterler mide, duodenum ve pankreası besler. SMA pankreas boynu hizasında aorttan çıkar ve dört ana dala ayrılır; inferior pankreatikoduodenal arter, orta kolik arter, sağ kolik arter ve ileokolik arter. Bu ana dalların yanında jejunum ve ileumun kanlanmasına katkıda bulunan çok sayıda küçük dallar da SMA in bu ana dallarından kaynaklanır. Jejunal ve ileal dallar ağ (arcade- kemer) oluşturarak distale doğru barsak duvarına kadar ilerler.

Mide, duodenum ve rektumda kollateral beslenme fazla olduğundan bu organlarda iskemi gelişmesi oldukça nadirdir. TÇ ve SMA arasındaki en büyük anastomoz TÇ'dan çıkan superior pancreaticoduodenal ve SMA den çıkan inferior pancreaticoduodenal arterler arasındadır. Bu iki arter birlikte pancreaticoduodenal arkadı oluştururlar ve duodenum ve pankreasın kanlanmasını sağlarlar. SMA ve inferior mezenterik arter (İMA) arasında üç ana anastomoz bölgesi bulunur ¹⁴². Bağırsak duvarındaki küçük damarlar anastomoz yaparak bir ağ oluştururlar, bu ağ antimezenterik tarafta daha zayıftır. Bu sebeble iskemi

durumunda ilk etapta etkilenen antimezenterik kısımdır. Venler arterleri takip ederek sub mezenterik vene dökülmektedir.

İskemi ve reperfüzyon olayında anlaşılacağı üzere serbest radikal metabolizması hasardan sorumlu önemli bir faktör olarak görülmektedir. Hücre içinde oluşan serbest radikal hasarına karşın enzimatik ve non-enzimatik savunma mekanizmaları mevcuttur. A, C ve E vitaminleri ile glutatyon nonenzimatik savunma mekanizmaları arasında önemli yer tutarken, süperoksit dismutaz (SOD), glutatyon peroksidaz (GSH-Px) ve katalaz (KAT) enzimleri, hücre için enzimatik savunma mekanizmalarıdır.

Reperfüzyonda oksijenden başka kan hücreleri ve kompleman sisteminin aktivasyonu gibi diğer bazı faktörler de doku hasarına yol açar. Yapılan çalışmalar tam kan reperfüzyonundaki polimorfonükleer (PMN) lökositlerin de bu hasarın oluşmasında önemli bir rolü olduğunu göstermiştir ¹⁴³.

Reperfüzyon başlangıcında meydana gelen olaylar inflamatuvar cevabın en önemli komponentleri olan nötrofiller ve endotelyum arasındadır ve erken reperfüzyon hasarı olarak ifade edilir. Lökositlerin doku içine migrasyonu için mutlaka endotel ile temas etmeleri gerekir. İnfiltrate olan aktif nötrofiller reaktif oksijen radikalleri ve proteazları salgırlar. Hücre içi savunma mekanizmalarında kullanılan serbest radikal süpürücü SOD ve peroksit yıkıcı KAT ve GSHPx enzimleri, lökositlerin salgıladıkları bu sitotoksik reaktif oksijen metabolitleri tarafından oluşturulan hasarı azaltabilme kapasitesine sahiptir ¹⁴³. Fakat bu radikal süpürücü ajanlar hücre içinde bulundukları için, hücre dışı mekanizmalarla olan bir hasarı önlemede yetersiz kalabilecekleri düşünülmektedir. Bu nedenle serbest radikal süpürücü ajanların dışarıdan vücuda verilmesi uygun bir tedavi seçeneği olabilir.

Malondialdehid lipid peroksidasyonu sonucu oluşur ve lipid peroksidasyonun derecesiyle aynı düzeydedir. Literatürde iskemi reperfüzyon hasarı sonucu oluşan MDA düzeyleri birçok çalışmada incelenmiştir. Jing ve arkadaşları ve de Wang yaptıkları ince bağırsak iskemi reperfüzyon hasarı üzerine çalışmalarda, iskemi-reperfüzyona bağlı olarak MDA düzeylerinin arttığını göstermişlerdir ^{144,145}. Bulgularımız aynı şekilde I/R grubunda oksidatif stresin oluşturduğu hasara bağlı olarak MDA düzeylerinin proksimal ve distal bağırsak dokularında kontrol grubuna kıyasla anlamlı olarak arttığını, tedavi gruplarında ise VEGF uygulamasının koruyucu bir etki göstererek MDA düzeylerini düşürdüğünü göstermektedir. Tedavi gruplarında iskemi öncesi verilen VEGF'in proksimal ve distal bağırsak dokularında MDA'yı I/R grubuna göre anlamlı derecede azalttığı görülürken, iskemi sonrası VEGF verilen tedavi gruplarında ise azalan MDA düzeyi sadece proksimal bağırsak dokusunda anlamlı olarak bulunmuştur.

Bir tripeptid olan glutatyon (L-γ-glutamil-L-sisteinil-glisin) ökaryotik hücrelerde bulunmaktadır ve bir tiyol grubu içermektedir. Antioksidan ve redükleyici ajan rolü ile glutatyon reaktif oksijen türlerinin temizlenmesinde önemli bir role sahiptir. Sisteinin fizyolojik depo formu olmakla beraber, hücre döngüsünün düzenlenmesinde görev almaktadır ¹⁴⁶. Glutatyon sitosolde yüksek oranlarda (%85-90) bulunurken, geriye kalan kısmı mitokondri, nükleer matriks ve peroksizomlarda yer almaktadır. Sistein rezidüsü nedeniyle glutatyon ROT ve reaktif nitrojen türleri gibi elektrofilik maddeler tarafından non-enzimatik olarak GSSG'ye dönüştürülmektedir. Hücrelerden GSSG'nin hücre dışına salınması, hücre içinde net bir glutatyon kaybına neden olmaktadır. Hücresel glutatyon değişimi ksenobiyotik detoksifikasyonunda, protein yetersizliğinde, oksidatif strese ve birçok patolojik durumda azalabilmektedir. Hücresel redoks durumunun

indikatörü olarak değerlendirilen GSH/GSSG oranı hücrelerin antioksidatif kapasitesini belirleyen en önemli redoks çiftidir ¹⁴⁷.

Literatürde daha önceden yapılmış olan iskemi reperfüzyon hasarı ile ilgili çalışmalarda, oksidatif stres ve doku hasarına bağlı olarak glutatyon düzeylerinin azaldığı, okside glutatyon düzeylerinin ise arttığı birçok çalışmada gösterilmiştir ^{148,149}.

Çalışmamızda proksimal ve distal bağırsak dokularında ölçmüş olduğumuz total glutatyon düzeyleri her iki dokuda da kontrol grubuna kıyasla I/R grubunda anlamlı olarak azalmıştır. İskemi öncesi ve sonrası VEGF verilen tedavi gruplarında ise glutatyon seviyeleri I/R grubuna kıyasla proksimal bağırsak dokusunda iskemiden sonra VEGF uygulanan grupta anlamlı bir artış gösterirken, distal bağırsak dokusunda ise iskemi öncesi ve sonrası VEGF uygulanan her iki grupta da anlamlı bir artış göstermiştir. Proksimal ve distal bağırsak dokularında oksidatif strese bağlı olarak I/R gruplarında okside glutatyon düzeyleri kontrol grubuna kıyasla anlamlı olarak artmış, iskemi öncesi ya da sonrası VEGF uygulanan gruplarda ise okside glutatyon düzeyleri I/R gruplarına kıyasla anlamlı olarak azalmıştır.

Süperoksidin hidrojen peroksit ve moleküler oksijene dönüşümünü katalizleyen bir enzim olan süperoksit dismutaz 3 ayrı formda bulunmaktadır. Bunlar sitozolde bulunan ve Cu ve Zn içeren dimerik tip (CuZnSOD), mitokondride bulunan ve Mn içeren tetramerik tip (MnSOD) ve de ekstrasellüler CuZnSOD'dır. Enzimin fizyolojik fonksiyonu; oksijeni metabolize eden hücreleri süperoksit serbest radikallerinin zararlı etkilerine karşı korumaktır. SOD aktivitesi, yüksek oksijen kullanımı olan dokularda özellikle eritrositlerde fazladır. Normal metabolizma sırasında süperoksit üretimi fazla olmasına rağmen SOD sayesinde intrasellüler süperoksit düzeyi düşük tutulur ^{150,151}.

Zhang ve arkadaşları yaptıkları bir çalışmada akciğerde iskemiye bağlı olarak süperoksit dismutaz düzeyinin kontrol grubuna göre azaldığını göstermişlerdir ¹⁵². Yine Leng ve arkadaşları tarafından yapılmış bir başka çalışmada süperoksit dimutaz düzeylerinin iskemi reperfüzyon hasarı sonucunda azalma gösterdiği belirtilmiştir ¹⁵³.

Çalışmamızda proksimal ve distal bağırsak dokusu süperoksit dismutaz, CuZnSOD ve MnSOD sonuçlarına göre, I/R grubu süperoksit dismutaz düzeyleri kontrol grubuna kıyasla azalmış, iskemi öncesi ya da sonrası VEGF uygulanan gruplarda süperoksit dismutaz düzeyleri artmıştır. Süperoksit dismutaz düzeylerine bakıldığında, proksimal ve de distal bağırsak dokularının her ikisinde de kontrol grubuna kıyasla I/R grubunda anlamlı bir azalma görülmüştür. İskemi öncesi ya da sonrası VEGF uygulanan gruplardaki artış sadece distal bağırsak dokusu sonuçlarında anlamlı olarak bulunmuştur. CuZnSOD düzeyi sonuçlarına bakıldığında kontrol grubuna kıyasla I/R grubunda görülen azalma distal bağırsak dokusu sonuçlarında bir anlamlılık gösterirken, proksimal bağırsak dokusunda bu azalma bir anlamlılık göstermemiştir. Yine sadece distal bağırsak dokusu iskemi sonrası VEGF uygulanan grupta I/R grubuna kıyasla anlamlı bir artış görülmüştür. MnSOD düzeyi sonuçlarında ise I/R grubundaki kontrol grubuna kıyasla görülen azalma proksimal bağırsak dokusunda bir anlamlılık göstermektedir. Yine proksimal bağırsak dokusu sonuçlarında iskemi sonrası VEGF uygulanan grubun I/R grubuna kıyasla anlamlı olarak MnSOD düzeylerinde bir artışa neden olduğu görülmektedir. Distal bağırsak dokusu MnSOD düzeyi sonuçları, proksimal bağırsak dokusu sonuçları ile korele olmakla birlikte gruplar arası anlamlı bir fark bulunamamıştır.

Proteinlerdeki karbonil grupları, reaktif oksijen türleri kaynaklı protein oksidasyonunun en güvenilir göstergelerinden biri olarak kabul

edilmektedir. Protein karbonilleri çok çeşitli mekanizmalar sonucunda ortaya çıkar ve oksidatif hasarı saptamada duyarlı bir marker olarak geniş çapta kullanılır ¹⁵⁴. Nastos ve arkadaşları yaptıkları bir çalışmada karaciğerde iskemi reperfüzyon hasarına bağlı olarak oluşan oksidatif stres sonucu protein karbonillerinin arttığını göstermişlerdir ¹⁵⁵. Literatürde oksidatif stres kaynaklı olarak doku protein karbonilleri düzeyinin arttığı birçok çalışmada gösterilmiştir ^{156,157}.

Çalışmamızda proksimal ve de distal ince bağırsak dokularında I/R grubu protein karbonilleri düzeyleri kontrol grubuna kıyasla artmış, iskemi öncesi ya da sonrası VEGF uygulanan tedavi gruplarında ise I/R grubuna kıyasla protein karbonilleri düzeyleri daha düşük bulunmuştur. Kontrol grubuna kıyasla I/R grubu protein karbonilleri düzeylerindeki artış ve de I/R grubuna kıyasla iskemi öncesi ya da sonrası VEGF uygulanan tedavi gruplarındaki düşüş sadece distal ince bağırsak dokusu sonuçlarında anlamlı olarak bulunmuştur. Proksimal ince bağırsak dokusu sonuçları distal ince bağırsak sonuçları ile korele olmakla birlikte istatistiksel açıdan bir anlamlılık göstermemektedir.

Bir metalloenzim olarak bilinen katalaz enzimi redoks reaksiyonunu teşvik eden en etkili protein katalistlerinden birisidir ¹⁵⁸. SOD enzimi faaliyeti sonucunda meydana gelen toksik hidrojen peroksit (H_2O_2), “katalaz” enzimi etkisiyle su ve oksijene dönüştürülmektedir ¹⁵⁹. Güneli ve arkadaşlarının yapmış oldukları bir çalışmada intestinal iskemi reperfüzyon hasarının dokudaki katalaz düzeylerini sham grubuna kıyasla I/R grubunda düştüğünü göstermişlerdir ⁵. Yıldız ve arkadaşlarının yaptıkları bir başka çalışmada yine intestinal katalaz düzeylerinin iskemi reperfüzyon hasarına bağlı olarak azaldığını göstermişlerdir ¹⁶⁰.

Çalışmamızda proksimal ve distal ince bağırsak dokularına ait katalaz düzeyleri I/R gruplarında kontrol gruplarına göre azalmış, iskemi öncesi ya da sonrası VEGF uygulanan tedavi gruplarında ise I/R

gruplarına kıyasla tedavi gruplarında bir artış göstermiştir. Kontrol grubuna kıyasla I/R grubu katalaz düzeylerindeki azalış ve de I/R grubuna kıyasla iskemi öncesi VEGF uygulanan tedavi grubu katalaz düzeylerindeki artış proksimal ince bağırsak dokusu sonuçlarında anlamlı olarak bulunmuştur. Distal ince bağırsak dokusu katalaz düzeyleri sonuçları proksimal ince bağırsak dokusu sonuçları ile korele olmakla beraber istatistiksel olarak bir anlamlılık göstermemiştir.

Isı şok proteinleri sitoprotektif proteinlerden olup hipertermi gibi ısı şoku, UV, ağır metaller, oksidanlar, amino asit analogları, enfeksiyon, oksidatif stres (iskemi), ozmotik stres, sıcaklık, egzersiz, metabolik değişim, yaşlanma, nikotin, etanol, serbest radikaller gibi etkenler tarafından indüklenmektedir. Bunlardan biri olan ısı şok proteini 70 (HSP70) esas olarak sitozolde bulunmaktadır ¹⁶¹. Literatürde iskemi reperfüzyon hasarı sonucu HSP70 düzeylerindeki değişiklikleri gösteren birçok çalışma bulunmaktadır. Vincenti ve arkadaşları yaptıkları bir çalışmada intestinal iskemi reperfüzyon hasarı sonucu HSP70 ekspresyonunun arttığını göstermişlerdir ¹⁶². Tirapelli ve arkadaşları yaptıkları bir çalışmada serebral iskemi sonrası dokuda HSP70 ekspresyonunun arttığını ve iskemik bölgedeki HSP70 artışının, HSP70 aracılı nöroeksitotoksisite ile hücre ölümünde önemli bir rolü olduğunu belirtmişlerdir ¹⁶³. Yine Xiao ve arkadaşları yaptıkları bir çalışmada, böbrek korteksinde HSP70 ekspresyonunun renal iskemi reperfüzyon hasarı sonucu arttığını göstermişlerdir ¹⁶⁴.

Çalışmamızda proksimal ve distal ince bağırsak dokularına ait HSP70 düzeyleri kontrol grubuna kıyasla I/R gruplarında artmış, iskemi öncesi ya da sonrası VEGF uygulanan tedavi gruplarında ise HSP70 düzeyleri, I/R grubuna kıyasla daha düşük düzeylerde bulunmuştur. İstatistiksel açıdan anlamlılık sadece proksimal ince bağırsak dokusunda

kontrol grubuna kıyasla I/R grubu HSP70 düzeylerindeki artışta görülmüştür.

Tiyoredoksin sistem (tiyoredoksin, tiyoredoksin redüktaz ve NADPH) selüler redüksiyon/oksidasyon durumunu regüle eden tiyol oksidoredüktaz bir sistemdir ¹⁶⁵. Tiyoredoksin, hücre sel fonksiyonda antioksidan özelliği ile direk olarak oksidatif stresi limite ederek ve protein-protein aracılı sinyalizasyonu ile indirek olarak etki etmektedir ¹⁶⁶. Tiyoredoksinin sadece kendisi değil aynı zamanda tiyoredoksinin endojen inhibitörü TxNiP (Thioredoxin interacting protein) ile interaksyonu ile selüler redox balansını regüle ettiği yakın zamanda gösterilmiştir ⁶⁷. Tao ve arkadaşları yaptıkları bir çalışmada tiyoredoksinin, oksidatif stresi azaltıcı etkisiyle post-iskemik miyokardial apoptozisi azalttığını göstermişlerdir ¹⁶⁷. Shibuki ve arkadaşları retinal iskemi reperfüzyon hasarı sonucu oluşan lipid peroksidlerin intravenöz tiyoredoksin verilen tedavi grubunda anlamlı olarak düştüğünü yaptıkları çalışmada göstermişlerdir ¹⁶⁸.

Çalışmamızda proksimal ve distal ince bağırsak dokularına ait tiyoredoksin düzeyleri I/R gruplarına kıyasla, iskemi öncesi ya da sonrası VEGF uygulanan tedavi gruplarında daha yüksek düzeylerde olmakla beraber istatistiksel açıdan bir anlamlılık bulunamamıştır. Tiyoredoksinin endojen inhibitörü olan TxNiP düzeyleri ise, proksimal ve distal ince bağırsak dokularında kontrol gruplarına kıyasla, diğer gruplarda bir azalma göstermiştir. Fakat istatistiksel açıdan bir anlamlılık bulunamamıştır.

Literatürde yapılmış birçok çalışmada antioksidan kapasitenin belirlenmesi amacıyla oksijen radikalleri absorbans kapasitesi (ORAC) yöntemi kullanılmıştır ^{169,170}. Çalışmamıza ait oksijen radikalleri absorbans kapasitesi düzeyleri, proksimal dokuya ait sonuçlarda, kontrol

grubuna kıyasla I/R grubunda bir azalma göstermiştir. İskemi öncesi ya da sonrası VEGF uygulanan tedavi gruplarında ise, I/R grubuna kıyasla bir artış görülmektedir fakat istatistiksel açıdan bir anlamlılık bulunamamıştır. Distal ince bağırsak dokusuna ait oksijen radikalleri absorbans kapasitesi sonuçlarında ise I/R grubu ORAC düzeyleri kontrol grubuna göre kıyasla anlamlı olarak artmış, VEGF uygulanan tedavi grupları ORAC düzeyleri, I/R grubuna kıyasla anlamlı bir fark göstermemiştir.

Biyokimyasal parametreler bakımından meydana gelen değişimler proksimal ve distal bağırsak bölümlerinde birbirleri ile koreledir. Ancak bazı verilerde gerek proksimal bağırsak gerekse distal bağırsakta istatistiksel olarak anlamlılık göstermemiştir. Bu değerlendirme literatürde ilktir. İnce bağırsak anatomisi ve vaskülerizasyonu göz önüne alındığında SMA'nın yelpaze şeklinde tüm dokuyu kanlandırması proksimal ve distal bağırsak bölümleri arasında fark olmamasını açıklayabilir. Diğer taraftan birbirleri ile korele olan sonuçların, istatistiksel anlamlılıklarının olmaması deney grubu sayısının azlığına, aynı zamanda ince bağırsak fonksiyonlarına bağlanabilir. Bilindiği gibi proksimal ince bağırsakta sindirim, distal ince bağırsakta emilim ağırlıklıdır.

Makrofaj kaynaklı bir sitokin olan TNF-alfa ayrıca miyokardial makrofajlar ve de miyositler tarafından da sentezlenmektedir ¹⁷¹. Sitotoksik etkisinin yanı sıra çeşitli hücrelerde pleiotropik etkisi bulunmaktadır ¹⁷². Pirojen özelliği olan TNF-alfa aralarında IL-1 ve IL-6'nın da bulunduğu diğer pirojenlerin sekresyonunu arttırmaktadır ¹⁷³. IL-6, makrofaj/monosit sistemi dahil olmak üzere lenfositler, nötrofiller, endotelial hücreler ve fibroblastlar gibi çok çeşitli hücre tipleri tarafından salgılanmakta, başlıca fonksiyonunu akut faz reaksiyonlarının ve immun cevabın düzenlenmesidir ¹⁷⁴. ¹⁷⁵. Yine Zhong ve arkadaşları yaptıkları bir çalışmada intestinal iskemi reperfüzyon hasarı sonucu, plazma TNF- α ve IL-6 düzeylerinin arttığını göstermişlerdir ¹⁷⁶.

Çalışmamıza ait plazma TNF- α ve IL-6 düzeylerinin her ikisi de, kontrol grubuna kıyasla I/R grubunda anlamlı olarak artmıştır. İskemi öncesi ya da sonrası VEGF uygulanan grupların TNF- α ve IL-6 düzeyleri ise, I/R grubuna kıyasla anlamlı olarak düşük bulunmuştur.

Plazma IL-6 ve TNF- α değerlerindeki anlamlı değişimler olayın sistemik yanının olduğunu göstermektedir. Bu nedenle deney sırasında akciğer, kalp, karaciğer, böbrek gibi uzak organlar alınmış ve sonuçları incelenmiştir.

Hipoksi indüklenabilir faktör-1 (HIF-1) iki alt birimden oluşan (HIF-1 α ve HIF-1 β) heterodimerik bir moleküldür. Oksijen varlığında HIF-1 α ubiquinasyona uğrayarak yıkılmaktadır. Ancak hipoksik koşullarda HIF-1 α kararlı kalarak komponentiyle birleşir ve bu sayede VEGF sentezini sağlamaktadır ¹⁷⁷ Mahfoudh-Boussaid ve arkadaşları böbrek iskemisi ile ilgili yaptıkları bir çalışmada, iskeminin HIF-1 α düzeylerini anlamlı olarak arttırdığını göstermişlerdir ¹⁷⁸. Grenz ve arkadaşlarının intestinal iskemi ve inflamasyonu ile ilgili yaptıkları bir başka çalışmada, yine aynı şekilde iskemiye yanıt olarak HIF-1 α düzeyinin arttığını belirtmişlerdir ¹⁷⁹.

Çalışmamıza ait plazma HIF-1 α düzeyleri aynı şekilde iskemik hasar sonrası, kontrol grubuna kıyasla I/R grubunda anlamlı olarak artmıştır. İskemi öncesi ya da sonrası VEGF uygulanan tedavi gruplarında ise HIF-1 α düzeyleri, I/R grubuna kıyasla bir azalma göstermekle beraber, istatistiksel açıdan bir anlamlılık göstermemektedir.

Hipoksi HIF-1 α düzeyini arttırmakta ve literatüre göre de HIF-1 α anjiyogenezi, VEGF'i arttırarak etkilemektedir. Çalışmamızda VEGF'i vererek HIF1- α düzeylerini incelememiz literatürde ilktir. Bilindiği gibi hipokside artan HIF1- α kısa sürede yıkılmaktadır. Ancak ortamda radikal bulunduğunda HIF-1 α asılı kalmaktadır. Bizim çalışmamızda

I/R'da HIF-1 α artmış, VEGF ile azalmış ancak bu azalış anlamlılık göstermemiştir.

Telomeraz (telomer terminal transferaz, telomer deoksinükleotidil transferaz), kromozomal uçlardaki "TTAGGG" tekrarlarının sentezinden sorumlu olan ribonükleoprotein yapıda özel bir DNA polimerazdır ¹⁸⁰. Embriyonik hücreler ve erişkin kök hücrelerinde aktif olan bu enzim, normal somatik hücrelerde saptanmamakta, immortal kanser hücrelerinde ise yeniden aktive olmaktadır ¹⁸¹. Eckers ve arkadaşları yaptıkları bir çalışmada ROT oluşuma bağlı olarak endotelial hücre apoptozisi aracılı endotelial disfonksiyonunun ortaya çıktığını, telomeraz aktivitesinin azaldığını ve de telomerlerin kıaldıklarını bildirmişlerdir ¹⁸². Werner ve arkadaşlarının yapmış oldukları bir başka çalışma da yine oksidatif stres kaynaklı endotelial apoptozise karşı telomeraz aktivitesinin önemli olduğu ve telomeraz aktivitesinin up-regüle edildiği durumlarda endotelial hücrelerin apoptozise karşı koruyucu olduğunu bildirmişlerdir ¹⁸³.

Çalışmamız telomeraz ve VEGF arasındaki ilişki bakımından literatürde ilktir. Bilindiği gibi telomeraz aktivitesi daha çok kanser patogenezinde ve yaşlanma da çalışılmaktadır. Bu iki konunun ortak noktası radikal hasarıdır. Bu sebeble I/R'da da telomeraz aktivitesi çalışılmaya başlanmıştır.

Çalışmamızda telomeraz aktivitesine ait bulgularımız, telomeraz aktivitesinin kontrol grubuna kıyasla I/R grubunda anlamlı olarak düştüğünü göstermektedir. İskemi öncesi ya da sonrası VEGF uygulanan tedavi grupları ile kontrol grubu arasında anlamlı bir fark bulunamamıştır. Bu da iskemi öncesi ya da sonrası VEGF uygulanan gruplarda iskemi reperfüzyon hasarına karşı bir koruyucu etkisinin olduğunu göstermektedir. Telomeraz aktivitesi % olarak değerlendirilmiş, ayrıca MDA ve TGSH düzeyleri ile de korelasyonu yapılmıştır. Yapılan

korelasyon testlerine göre hem proksimal hem de distal bağırsak dokuları MDA düzeyleri ile telomeraz aktivitesi arasında ters bir korelasyon bulunmuştur ve sonuçlar istatistiksel olarak anlamlıdır. TGSH düzeyleri ve telomeraz aktivitesi arasında, hem proksimal hem de distal bağırsak dokularında aynı yönde bir korelasyon bulunmuştur ve yine sonuçlar istatistiksel olarak anlamlıdır.

Hemotoksilen&eoizin boyama ile intestinal epitelyum, lümen, salgı bezleri ve kas tabakası morfolojik olarak incelendi ve iskemik hasar açısından değerlendirildi. Bu değerlendirmeyi yaparken fokal ya da yaygın deskuamasyon, mukozal kongesyon gibi veriler skorlandı.

Hemotoksilen&eoizin boyanma sonucu kontrol ve VEGF gruplarında iskemik bulgulara rastlanmamıştır. (Figür a, c, e). Yaygın deskuamasyon ve mukozal kongesyon gibi iskemik hasar bulgularına I/R grubunda rastlanmıştır. (Figür b). Fokal deskuamasyon ve hafif mukozal kongesyon gibi hafif iskemik hasara VEGF'in sonra verildiği tedavi gruplarında rastlanmıştır. Gruplar arası yapılan karşılaştırmada kontrol ve I/R grupları arasında ve I/R ile VEGF tedavi grupları arasında histopatolojik skorlamada anlamlı fark gözlenmiştir. VEGF-I/R ve I/R-VEGF grupları ana histopatolojik skorlaması istatistiksel açıdan birbirinden farklı bulunmamıştır. Ancak histopatolojik incelemede VEGF'in daha çok koruyucu etkisi iskemi öncesi uygulanan tedavi grubunda belirlenmiştir.

Programlanmış hücre ölümü olarak bilinen apoptozis kavramı ilk olarak Kerr Wyllie tarafından 1972'de tanımlanmıştır. Apoptozis, üzerinde çalışmaların en yoğun olduğu konulardan biri olmasına rağmen hala tartışmalara açık olup, moleküler ve biyokimyasal işleyişi tamamen açığa kavuşturulamamıştır¹⁸⁴.

Apoptozis; gelişmiş organizmalarda hücreler arası ilişkilerin gereği olarak gereksinim duyulmayan ve fonksiyonları bozulan hücrelerin, çevreye zarar vermeden programlı ölümüdür. Embriyo döneminden başlayarak tüm yaşam boyunca apoptotik mekanizma ve programlı hücre ölümü vardır. Bazı hücreler yıllarca yaşarken bir kısmı sadece birkaç saat yaşarlar. Deri, gastrointestinal sistem ve immün sistem gibi pek çok dokuda devamlılık apoptozis ve hücre yenilenmesine bağlıdır ¹⁸⁵.

Apoptozisin indüklenmesi birçok hücrenin sitoplazmasında inaktif olarak bulunan kaspaz (cysteiny aspartate-specific proteinases) adı verilen sitozilik enzimlerin aktivasyonu ile olmaktadır ¹⁸⁶.

Literatürde iskemi reperfüzyon hasarı sonucu kaspaz aktivitesi ve buna bağlı olarak apoptozisin arttığını gösteren birçok çalışma vardır. Zhang ve arkadaşları yaptıkları bir çalışmada, iskemi reperfüzyon hasarının ince bağırsak dokusu epitelyal hücrelerinde apoptozisi anlamlı olarak arttırdığını göstermişlerdir ¹⁸⁷.

Yücel ve arkadaşları yine yaptıkları bir çalışmada ince bağırsak dokusunda iskemi reperfüzyon hasarına bağlı oluşan oksidatif stres sonucu apoptozisin arttığını göstermişlerdir ¹⁸⁸.

Yu ve arkadaşları da yaptıkları bir çalışmada iskemi reperfüzyon sonrası kaspaz aktivitesinin arttığı ve buna bağlı olarak apoptozisde artış olduğunu bildirmişlerdir ¹⁸⁹.

Çalışmamızda elde ettiğimiz histolojik skorlama sonuçlarına göre kontrol grubuna kıyasla, I/R grubunda kaspaz aktivitesi ve de apoptozisin anlamlı olarak arttığını göstermektedir. İskemi öncesi ya da sonrası VEGF uygulanan tedavi gruplarında ise, I/R grubuna kıyasla kaspaz aktivitesi ve apoptozis skorlama sonuçları anlamlı olarak azalmıştır.

Matriks metalloproteinazları (MMPs); ekstrasellüler matriks (ECM) ile bazal membran komponentlerini parçalama yeteneğine sahip olan ve aktif bölgesinde çinko içeren homolog bir enzim ailesidir. Bu enzimler doku yeniden yapılanması, morfogenezis, yara iyileşmesi ve normal gelişimsel süreç gibi fizyolojik durumlarda önemli bir rol oynadıkları gibi tümör hücresi invazyonu, anjiyogenezis ve metastaz gibi patolojik süreçlerde de yer alırlar. MMP-9 ve MMP-2 düzeyleri yapılan çalışmalarda özellikle araştırma konusu olmuştur. Son zamanlarda yapılan çalışmalar iskemi reperfüzyon hasarı sonrası dokuda metalloproteinaz düzeylerinin arttığını göstermektedir. Chen ve arkadaşları ve de Hong ve arkadaşları yaptıkları çalışmalarda iskemi reperfüzyon hasarı sonrası doku metalloproteinaz düzeylerinin arttığını göstermişlerdir ^{190,191}.

Çalışmamıza ait elde ettiğimiz doku metalloproteinaz-9 histolojik skorlama sonuçları da literatürde daha önceden yayınlanmış olan çalışmaları desteklemektedir. Kontrol grubuna kıyasla, I/R grubu MMP-9 skorlama sonuçları anlamlı olarak artmıştır. I/R grubuna kıyasla, iskemi öncesi ya da sonrası VEGF uygulanmış olan tedavi grubu MMP-9 histolojik skorlama sonuçları anlamlı olarak azalmıştır.

6. SONUÇ

Yapmış olduğumuz bu çalışma, intestinal iskemi-reperfüzyon hasarına karşı vasküler endotelial büyüme faktörünün koruyucu etkilerinin araştırılması açısından literatürde ilktir. Tüm bu bulgularımız ışığında vasküler endotelial büyüme faktörünün ince bağırsak dokusunda meydana gelebilecek iskemi-reperfüzyon hasarına karşı histolojik ve biyokimyasal açıdan koruyucu bir etkisi olduğunu göstermiştir. Genel anlamda çalışmamızda ince bağırsağın proksimal ve distal bölümleri sonuçlarına bakıldığında bu bölümlerde artışlar ve azalışların korelasyon gösterdiği ve birbirini desteklediği izlenmiştir. Aynı şekilde tedavi gruplarında VEGF'in iskemiden önce ya da sonra verilmesi de benzer korelasyonu göstermiştir. Ancak histopatolojik inceleme VEGF'in iskemi öncesi uygulanmasının daha koruyucu olacağı yönündedir.

Yapılacak yeni çalışmalar vasküler endotelial büyüme faktörünün iskemi-reperfüzyon hasarına karşı koruyucu etkilerinin daha iyi anlaşılmasında fayda sağlamakla beraber, klinikte uygulamaya girmesi halinde hastalık tedavi planlanmasında yeni ufuklar açabilecektir.

7. ÖZET

Rat İnce Bağırsağında Oluşturulan Deneysel İskemik Reperfüzyon Hasarlanma Modelinde Gelişen Organ Hasarlanması Üzerine Vasküler Endotelial Büyüme Faktörünün (VEGF) Etkisi

Hücrel fonksiyonlar için kan akımının yeterli olmadığı durumlarda iskemi ortaya çıkmaktadır. Bağırsak dokusunun iskemi-reperfüzyon hasarı yüksek mortalite ve morbiditeye neden olan önemli bir faktördür. Paradoksal olarak, iskemik dokunun kan akımının restorasyonu ek olarak reperfüzyon hasarı olarak bilinen hücre hasarlanmasına neden olmaktadır.

Anjiyogenik faktör olan vasküler endotelial büyüme faktörü (VEGF) embriyo ve yetişkinde birçok neovaskülerizasyon prosesinde yer almaktadır. Ayrıca VEGF yeni damar oluşumu, devamlılığı ve vasküler yatakların fonksiyonlarında gereklidirler.

Yapmış olduğumuz bu çalışmada 30 adet Wistar Albino erkek ratlar kullanılmıştır. 30 adet rat her bir grupta n sayısı 6 olacak şekilde 5 gruba ayrılmıştır. Bu gruplar: 1-Kontrol, 2-VEGF, 3-İskemi-Reperfüzyon, 4-İskemi-Reperfüzyon-VEGF, 5-VEGF-İskemi-Reperfüzyon grupları şeklinde belirlenmiştir. Kontrol grubunda sadece cerrahi prosedür uygulanmıştır. VEGF grubunda cerrahi prosedürü takiben tek doz intravenöz VEGF (0,8 µg/kg) enjeksiyonu uygulanmıştır. İskemi-reperfüzyon ve tedavi gruplarında, cerrahi prosedür ve mesenterik arterin 90 dakika süresince klipajı uygulanmıştır. İskemi-reperfüzyon/VEGF grubunda reperfüzyon süreci öncesinde tek doz intravenöz VEGF (0,8 µg/kg) enjeksiyonu yapılmıştır. VEGF/İskemi-reperfüzyon grubunda ise tek doz intravenöz VEGF (0,8 µg/kg) enjeksiyonu 90 dakikalık iskemi periyodu öncesinde uygulanmıştır. İskemi periyodundan 4 saat sonra hayvanlar

feda edilerek kan ve doku numuneleri alınmıştır. Bütün prosedürler anestezi altında gerçekleştirilmiştir.

Dokularda biyokimyasal ve immünohistokimyasal analizler yapılmıştır. Yine kan örnekleri biyokimyasal analizler için alınmıştır.

Çalışmada elde ettiğimiz biyokimyasal analiz sonuçları ve histolojik incelemeler korele bulunmuştur. İstatistiksel açıdan gruplar arası anlamlı farklılıkların olup olmadığı Mann-Whitney U testi kullanılarak belirlenmiştir.

Sonuç olarak, elde ettiğimiz bulgular, özellikle iskemi öncesi verilen VEGF'nün intestinal iskemi-reperfüzyon hasarı üzerine koruyucu etkilerinin olduğunu göstermektedir.

Anahtar Kelimeler: İskemi-Reperfüzyon, İntestinal İskemi-Reperfüzyon Hasarı, Oksidatif Stres, Serbest Radikaller, Antioksidanlar.

8. SUMMARY

Effects of Vascular Endothelial Growth Factor (VEGF) on Developing Organ Damage During Experimental Intestinal Ischemia Reperfusion Injury Model in Rats

When blood flow is not enough for cellular functions ischemia occurs. Ischemia-reperfusion injury of the intestine is an important factor associated with high rates of morbidity and mortality. Paradoxically, restoration of blood flow to the ischemic tissue initiates a cascade of events that may lead to additional cell injury known as reperfusion injury.

Vascular endothelial growth factor (VEGF) is the angiogenic factor promoting processes of neovascularization taking place in the embryo and the adult. VEGF is required to sustain newly formed vessels and plays additional multiple roles in the maintenance and function of certain mature vascular beds.

In this study Wistar Albino male rats were used. Rats were divided into five groups (n= 6). Groups: Sham, VEGF, I/R, I/R-VEGF, VEGF-I/R. In sham and VEGF groups only surgical procedure is applied. In I/R and VEGF groups, surgical procedure and clip is applied on the mesenteric artery for 90 min. For I/R-VEGF and VEGF-I/R groups, before or after than ischemia period one dose intra venous VEGF (0,8 µg/kg) was given. 4 hours after than ischemia period, blood and tissue samples were collected. All procedure were done under anaesthesia.

On the tissues biochemical and immunohistochemical methods were used for analysis. Blood samples were taken for biochemical analysis.

Biochemical analysis measurement results are correlated with the results obtained from histological investigations. The differences are determined between the groups by using Mann Whitney U tests.

Our findings showed that VEGF, which is given before than ischemia, has most protective effects on intestinal ischemia-reperfusion injury.

Keywords: Ischemia-Reperfusion, Intestinal Ischemia-Reperfusion Injury, Oxidative Stress, Free Radicals, Antioxidants.

9. KAYNAKLAR

- 1.** Koike K. , Moore F. A. , Moore E. E. , Read R. A., Carl V. S., Banerjee A., Gut ischemia mediates lung injury by a xanthine oxidase-dependent neutrophil mechanism.J. Surg. Res. , 1993, 54, 469—473.
- 2.** Stallion A. , Kou T. D. , Miller K. A. , Dahms B. B., Dudgeon D. L. , Levine A. D., IL-10 is not protective in intestinal ischemia reperfusion injury.J. Surg. Res. , 2002 105, 145—152.
- 3.** Mojzis J, Hviscova K, Germanova D, Bukovicova D, Mirossay L. Protective effect of quercetin on ischemia/ reperfusion-induced gastric mucosal injury in rats. *Physiol Res* 2001;50(5):501-506.
- 4.** Mallick IH, Yang W, Winslet MC, Seifalian AM. Ischemia- reperfusion injury of the intestine and protective strategies against injury. *Dig Dis Sci* 2004;49(9):1359-1377.
- 5.** Guneli E, Cavdar Z, Islekel H, Sarioglu S, Erbayraktar S, Kiray M, Sokmen S, et al. Erythropoietin protects the intestine against ischemia/ reperfusion injury in rats. *Mol Med* 2007;13(9-10):509-517.
- 6.** Teke Z, Kabay B, Aytekin FO, Yenisey C, Demirkan NC, Sacar M, Erdem E, et al. Pyrrolidine dithiocarbamate prevents 60 minutes of warm mesenteric ischemia/ reperfusion injury in rats. *Am J Surg* 2007;194(2):255- 262.
- 7.** Grotz MR, Ding J, Guo W, Huang Q, Deitch EA. Comparison of plasma cytokine levels in rats subjected to superior mesenteric artery occlusion or hemorrhagic shock. *Shock* 1995;3(5):362-368.
- 8.** Carden DL, Granger DN. Pathophysiology of ischaemia-reperfusion injury. *J Pathol.* 2000;190:255—266.
- 9.** Heckbert SR, Vedder NB, Hoffman W, Winn RK, Hudson LD, Jurkovich GJ, Copass MK, et al. Outcome after hemorrhagic shock in trauma patients. *J Trauma* 1998;45(3):545-549.
- 10.** Antonsson JB, Fiddian-Green RG. The role of the gut in shock and multiple system organ failure. *Eur J Surg* 1991;157(1):3-12.

- 11.** Kong S. E. , Blennerhassett L. R. , Heel K. A. , McCauley R. D. , Hall J. C. , Aust. N. Z. Ischaemia-reperfusion injury to the intestine.J. Surg. , 1998, 68, 554—561.
- 12.** Schoenberg MH, Beger HG. Oxygen radicals in intestinal ischemia and reperfusion. Chem Biol Interact 1990; 76(2):141-61.
- 13.** Awika J. M. , Rooney L. W. , Wu X. , Prior R. L. , Cisneros-Zevallos L. , Screening methods to measure antioxidant activity of sorghum (sorghum bicolor) and sorghum products.J. Agric. Food Chem. , 2003, 51, 6657—6662.
- 14.** Carden DL, Granger DN. Pathophysiology of ischaemia–reperfusion injury. J Pathol 2000;190:255–66.
- 15.** Mallick JH, Yang W, Winslet MC, Seifalian AM. Ischemia–reperfusion injury of the intestine and protective strategies against injury. Dig Dis Sci 2004;49:1359–77.
- 16.** Yamamoto S, Tanabe M, Wakabayashi G, Shimazu M, Matsumoto K, Kitajima M. The role of tumor necrosis factor-alpha and interleukin-1 beta in ischemia–reperfusion injury of the rat small intestine. J Surg Res 2001;99:134–41.
- 17.** Kirshner DL, Kirshner RL, Heggeness LM, De- Weese JA: Spinal cord ischemia: An evaluation of pharmacologic agents in minimizing paraplegia after aortic occlusion. J Vasc Surg 1989, 9:305-8.
- 18.** Svensson L.G, Crawford E.S. Cardiovascular and vascular disease of the aorta. U.S.A. W.B. Saunders Company. 1997, 194-218.
- 19.** Krause G.S, White B.C, Aust S.D, et al: Brain cell death following ischemia and reperfusion: a proposed biochemical sequence. Critical Care Med. 1988, 16:714-26.
- 20.** Grace P.A. Ischemia-reperfuzyon injury. British Journal of Surgery. 1994, 81:637-47.
- 21.** Yancopoulos GD, Davis S, Gale NW, Rudge JS, Wiegand SJ, Holash J. Vascular-specific growth factors and blood vessel formation. Nature 2000; 407:242-8.

- 22.** Bikfalvi A. Recent developments in the inhibition of angiogenesis: examples from studies on platelet factor-4 and the VEGF/VEGFR system. *Biochemical Pharmacology* 2004; 68:1017-21.
- 23.** Shalaby R, Rossant J, Yamaguchi TP, Gertsenstein M, Wu X, Breitman ML, et al. Failure of blood-island formation and vasculogenesis in Flk-1 deficient mice. *Nature* 1995;376:62.
- 24.** Oz Oyar E, Kardes O, Korkmaz A, Omeroglu S. Effects of vascular endothelial growth factor on ischemic spinal cord injury caused by aortic cross-clamping in rabbits. *J Surg Res.* Jan; 2009,151(1):94-9.
- 25.** Zachary I. Molecules in focus VEGF. *Int J Biochem Cell Biol* 1998; 30:1169-74.
- 26.** Erimoğlu C. İnsan anatomisi. İstanbul: İstanbul Üniversitesi Basımevi, 1990:132-5.
- 27.** Yıldırım M. Topografik anatomi. İstanbul: Nobel Tıp Kitapevleri, 2000:244-8.
- 28.** Özkuş K, Demirci S, Barlas BO. İnce bağırsak anatomisi. *J Surg Med Sci* 2005;1(8):1-2.
- 29.** Kalaycı G. Genel cerrahi. İstanbul: Nobel Tıp Kitapevleri, 2002:374-5,1299-3000.
- 30.** Ateş B. İntestinal İskemi-Reperfüzyon Uygulamalarında Değişik Antioksidanların Koruyucu Etkilerinin Araştırılması (tez). Malatya: İnönü Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü; 2001.
- 31.** Ekingen G. İntestinal İskemi Reperfüzyon Hasarında Amrinon'un Etkisi (tez). Ankara: Gazi Üniversitesi Tıp Fak; 1999.
- 32.** Robbins SL, Kumar V (Çeviri: Ö. Uluoğlu). *Patoloji*. Ankara: Güneş Kitapevi; 1990: 685-6.
- 33.** Mitsuda S, Brandt LJ. Pathology of intestinal ischemia. *Surgical Clinics of North America* 1992;72(1):43-63.
- 34.** Ozturk C, Avlan D, Cinel I, Cinel L, Unlu A, Camdeviren H et al. Selenium pretreatment prevents bacterial translocation in rat intestinal ischemia/reperfusion model. *Pharmacol Res* 2002;46(2):171-5.

- 35.** Ogura W, Itagaki S, Kurokawa T, Noda T, et al. Protective effect of lutein on ischemia-reperfusion injury in rat small intestine. *Biol.Pharm.Bull.* 2006; 29(8): 1764-1766
- 36.** Desmukh DR, Mirochnitchenko O, Ghole VS, Agnese D, et al. Intestinal ischemia and reperfusion injury in transgenic overexpressing copper-zinc superoxide dismutase. *Am J Physiol Cell Physiol* 1997; 273: 1130-1135
- 37.** Udassin R., Vromen A., Haskel Y. The time sequence of injury and recovery following transient reversible intestinal ischemia. *J Surg Res* 1994, 56: 221-225.
- 38.** Otamiri T.Oxygen radicals, lipid peroxidasyon, and neutrophil infiltration after small intestinal ischemia and reperfusion. *Surgery* 1989, 105:593-597.
- 39.** Schoenberg MH., Muhl E.. Sellin D. Posthypotensive generation of superoxide free radicals-possible role in the pathogenesis of the intestinal mucosal damage. *Acta Chir Scand* 1984, 150:301-309.
- 40.** Schoenberg MH. Reperfusion injury after intestinal ischemia. *Crit Care Med* 1993, 21:1376- 1386.
- 41.** Halliwell B. and Gutteridge J.M.C., 2003, *Free Radicals in Biology And Medicine*, 3rd ed: Oxford University Press.
- 42.** Diplock, A. Healthy lifestyles nutrition and physical activity: Antioxidant nutrients. *ILSI Europe concise monograph series*, 59 p. ,1998.
- 43.** Nawar, W.W. Lipids. In "Food Chemistry", O.R. Fennema (Ed), pp: 225-319. 1996.
- 44.** Hatungil R. Serbest radikallerin yol açtığı doku hasarı. *MEÜ Tıp Fak Derg* 2002;3:460-9.
- 45.** Van Ye TM, Roza AM, Pieper GM, Henderson J Jr, Johnson CP, Adams MB. Inhibition of intestinal lipid peroxidation does not minimize morphologic damage. *J Surg Res* 1993;55(5):553-8.
- 46.** Urbaniak J.R, Seaber A.V, Chen L. Assessment of ischemia and reperfusion injury. *Clin Orthop Relat Res* 1997;334:30-6.

47. Türkyılmaz Z. Karaciğer iskemi-reperfüzyon zedelenmesinde pentoksifilin, dimetilsülfoksit ve eksojen melatoninin koruyucu etkilerinin karşılaştırılması (tez). Edirne: Trakya Üniversitesi Tıp Fak; 2003.
48. Ergun Y, Kurutas EB, Cetinus E, Ergun UG. Ischemia-reperfusion injury in rat skeletal muscle is attenuated by zinc aspartate. J Surg Res. 2006; 137(1): 109-116
49. Reiter RJ. Oxidative processes and antioxidant defense mechanisms in the aging brain. FASEB J, 1995; 9: 526-533.
50. Davies SJ, Reichardt-Pascal SY, Vaughan D, Russel GI. Differential effect of ischemia-reperfusion injury on anti-oxidant enzyme activity in the rat kidney. Exp Nephrol 1995; 3: 348-354.
51. Reiter RJ, Acuña-Castroviejo D, Tan DX, Burkhardt S. Free radicalmediated molecular damage. Mechanisms for the protective actions of melatonin in the central nervous system. Ann N Y Acad Sci 2001; 939: 200-215.
52. Akkuş İ. , Serbest Radikaller ve Fizyopatolojik Etkileri. s. 3-10, 1. Baskı, Mimoza Yayınları, 1995.
53. Grisham MB. , Mc Cord JM.: Chemistry and cytotoxicity of reactive oxygen metabolites. In: Physiology of oxygen radicals. Ed: Taylor AE, Malton S, Ward PA. American Phsiology Society, Bethesda, Maryland, USA, pp: 1-18, 1986.
54. Aktan ÖA, Yalçın SA. Ischemia-reperfusion injury, reactive oxygen metabolites and the surgeon. Turk J Med Sci 1998;1-5.
55. Ayvaz S. N-Asetilsisteinin intestinal iskemi-reperfüzyon hasarına etkisi (tez). Edirne:Trakya Üniversitesi Tıp Fak; 2005.
56. Özkan M. , Yüksekol İ. Nitrik Oksit ve Akciğerler. Türk Toraks Dergisi. Nisan 2003, Cilt 4, Sayı 1, Sayfa(lar) 088-094.
57. Kavas (Özelçi) G. Serbest Radikaller ve Organizma Üzerine Etkileri. Türkiye Klinikleri 1989, Cilt 9, Sayı 1.
58. Cherubini A, Ruggiero C, Morand C, Lattanzio F, Dell'aquila G, Zuliani G, Di Iorio A, Andres-Lacueva C. Dietary antioxidants as potential

pharmacological agents for ischemic stroke. *Curr Med Chem.* 2008; 15: 1236-1248.

59. Mickle DA, Weisel RD. Future directions of vitamin E and its analogues in minimizing myocardial ischemia-reperfusion injury. *Can J Cardiol* 1993; 9: 89-93.

60. Virág L, Szabó C. The therapeutic potential of poly(ADP-ribose) polymerase inhibitors. *Pharmacol Rev* 2002; 54: 375-429.

61. Rodriguez C, Mayo JC, Sainz RM, Antolín I, Herrera F, Martín V, Reiter RJ. Regulation of antioxidant enzymes: a significant role for melatonin. *J Pineal Res* 2004; 36: 1-9.

62. Reiter RJ, Melchiorri D, Sewerynek E, Poeggeler B, Barlow-Walden L, Chuang J, Ortiz GG, Acuña-Castroviejo D. A review of the evidence supporting melatonin's role as an antioxidant. *J Pineal Res* 1995; 18: 1-11.

63. CHAE, H.Z., KANG, S.W., RHEE, S.G., 1999, Isoforms of mammalian peroxiredoxin that reduce peroxides in presence of thioredoxin. *Methods in Enzymology*, 300, 219–226.

64. Nordberg J, Arner ESJ. Reactive Oxygen Species, Antioxidants and The Mammalian Thioredoxin System. *Free Radical Biology and Medicine*, 2001; 31(11): 1287-1317

65. Schafer FQ, Buettner GR. Redox environment of the cell as viewed through the redox state of the glutathione disulfide/glutathione couple. *Free Radic Biol Med* 2001; 30:1191-1212.

66. Arner ES, Holmgren A. Physiological functions of thioredoxin and thioredoxin reductase. *Eur J Biochem* 2000; 267:6102-6109.

67. Chutkow WA, Patwari P, Yoshioka J, Lee RT. Thioredoxin-interacting protein (Txnip) is a critical regulator of hepatic glucose production. *J Biol Chem.* 2008 Jan 25;283(4):2397-406. Epub 2007 Nov 12.

68. Jefferies H. , Coster J. , Khalil A., Bot J., McCauley R.D., Hall J.C., 2003. Glutathione. *ANZ Journal of Surgery*, 73: 517-522.

69. Jokanovic M. , Biotransformation of organophosphorous compounds. *Toxicology*, 2001, 166: 139-160.

- 70.** Silalahi J. Anticancer and health protective properties of citrus fruit components. *Asia Pac J Clin Nutr* 2002; 11: 79-84.
- 71.** González-Pérez O, Moy-López NA, Guzmán-Muñiz J. [Alpha-tocopherol and alpha-lipoic acid. An antioxidant synergy with potential for preventive medicine] *Rev Invest Clin*. 2008; 60: 58-67.
- 72.** Frei B, Kim C.M., Ames N.B., 1990, Ubiquinol-10 is an effective lipid-soluble antioxidant at physiological concentrations. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 87 (12), 4879–4883.
- 73.** Ernster L. , Forsmark P. , Nordenbrand, K. The mode of action of lipid-soluble antioxidants in biological membranes: relationship between the effects of ubiquinol and vitamin E as inhibitors of lipid peroxidation in submitochondrial particles, *Biofactors*, 3 (4), 241-248. 1992
- 74.** De Maio A. Heat shock proteins: facts, thoughts, and dreams. *Shock* 1999; 11(1):1-12.
- 75.** Clark JI, Muchowski PJ. Small heat shock proteins and their potential role human disease. *Curr Opin Biol* 2000; 10(1);52-9.
- 76.** Russell KS, Haynes MP, Glaser T, et al. Estrogen stimulates Hsp 90 binding to eNOS in human vascular endothelial cells. *J Biol Chem* 2000; 275(7);5026-30.
- 77.** Miller MJ, Boyd JE, Gedamu L. Induction of HSP 72 protects against organ damage in essential hypertension. *Can J Cardiol* 2000; 16(1);44-8.
- 78.** Smoyer WE, Ransom R, Harris RC, et al. Ischemic acute renal failure induces differential expression of small HSP. *J Am Soc Nephrol* 2000; 11(2)211-21.
- 79.** Davidson SM, Morange M. Hsp25 and the p38 MAPK pathway are involved in differentiation of cardiomyocytes. *Dev Biol* 2000; 218(2);146-60.
- 80.** Henle KJ, et al. Stress proteins and glycoproteins. *Int J Mol Med* 1998 Jan; 1(1):25-32.
- 81.** Atılı K, Bozcuk AN. Telomerler ve Hücresel Yaşlanma. *Geriatri* 2002; 5: 111-4.

- 82.** Morin GB. Telomere Control of Replicative Lifespan. *Exp Gerontol* 1997; 32: 375-82.
- 83.** Kevser Pi_kin Özden. Telomeraz. *Hacettepe Tıp Dergisi* 2000; 31(2):158-68.
- 84.** Allsopp RC, Chang E, Kashefi-Aazam M, et al. Telomere shortening in associated with cell division in vitro and in vivo. *Experimental Cell Research* 1995; 220:194-200.
- 85.** Colgin LM, Reddel R. Telomere maintenance mechanisms and cellular immortalization. *Current Opinion in Genetics & Development* 1999; 9:97-103.
- 86.** Zakian VA. Life and cancer without telomerase. *Cell* 1997; 91(October 3):1-3.
- 87.** Shacter E. Quantification and significance of protein oxidation in biological samples. *Drug Metab Rev* 2000; 32:307-326.
- 88.** Levine RL. Carbonyl modified proteins in cellular regulation, aging, and disease. *Free Radic Biol Med* 2002; 32: 790-796.
- 89.** Shan X, Aw Ty, Jones DP. Glutathione-dependent protection against oxidative injury. *Pharmac Ther* 1990; 47: 61-71.
- 90.** Stadtman ER, Levine RL. Free radical-mediated oxidation of free amino acids and amino acid residues in proteins. *Amino Acids* 2003; 25:207-218.
- 91.** Grandhee S, Monnier VM. Mechanism of formation of the Maillard protein cross-link pentosidine. *J Biol Chem* 1991; 266:11649-11653.
- 92.** Cui K, Luo X, Xu K, Ven Murthy MR. Role of oxidative stress in neurodegeneration: recent developments in assay methods for oxidative stress and nutraceutical antioxidants. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry* 2004;28(5):771-99.
- 93.** Shah PC, Brolin RE, Amenta PS, Deshmukh DR. Effect of aging on intestinal ischemia and reperfusion injury. *Mech Ageing Dev* 1999;107(1):37-50.
- 94.** Kubly, J., Immunology, 1992 W.H. Freeman and Company, 245.

- 95.** Clemens, M.J., Cytokines, Oxford, 1991 Bios Scientific Publishers Ltd., 57-75.
- 96.** Drake CJ, Little CD. VEGF and vascular fusion: implications for normal and pathological vessels. *J Histochem Cytochem.* 1999; 47: 1351-1356
- 97.** Benjamin, L.E., Herno, I.& Keshet, E. A plasticity window for blood vessel remodelling is defined by pericyte coverage of the preformed endothelial network and is regulated by PDGF- B and VEGF. *Development* 1998, 125, 1591-98.
- 98.** Carmeliet P. Angiogenesis in health and disease. *Nat Med.* 2003; 9: 653-660.
- 99.** Ferrara N, Gerber HP, Le Couter J. The biology of VEGF and its receptors. *Nat Med* 2003; 9:669-76.
- 100.** Yazır Y. Vasküler Endotel Büyüme Faktörü (Vegf):Reseptörleri ve Fonksiyonları. *C.Ü. Tıp Fakültesi Dergisi* 29 (3): 128-136, 2007
- 101.** Thomas KA. VEGF, a potent and selective angiogenic agent. *J Biol Chemistry* 1996; 271:603-6.
- 102.** Ortega N, L'faqihi F-E, Plouet J. Control of VEGF angiogenic activity by the extracellular matrix. *Biol Cell* 1998; 90:381-390.
- 103.** Clauss M. Molecular biology of the VEGF and the VEGF receptor family. *Semin Thromb Hemost* 2000; 26:561-9.
- 104.** Achen MG, Stacker SA. The VEGF family; proteins which guide the development of the vasculature. *Int Exp Path* 1998; 79:255-265.
- 105.** Tamanini C, De Ambrogi M. Angiogenesis in developing follicle and corpus luteum. *Reprod Domest Anim* 2004; 39:206-16.
- 106.** Monacci WT, Merrill MJ, Oldfield EF. Expression of vascular permeability factor/vascular endothelial growth factor in normal rat tissues. *Am J Physiol* 1993; 264:C995-C1002.
- 107.** Stacker SA, Caesar C, Baldwin ME et al. VEGF-D promotes the metastatic spread of tumor cells via the lymphatics. *Nat Med* 2001; 7:186-91.
- 108.** Dvorak HF, Brown LF, Detmar M et al. Vascular permeability factor/

vascular endothelial growth factor, microvascular hyperpermeability and angiogenesis. *Am J Pathol* 1995; 146: 1029-39.

109. Grothey, A. , Galanis, E. Targeting angiogenesis: progress with anti-VEGF treatment with large molecules. *Nat. Rev. Clin. Oncol.* doi:10.1038/nrclinonc.2009.110

110. Noiri E, Lee E, Testa J et al. Podokinesis in endothelial cell migration: Role of nitric oxide. *Am J Physiol* 1998; 43: 236-44.

111. Ria R, Roccaro AM, Merchionne F et al. Vascular endothelial growth factor and its receptors in multiple myeloma. *Leukemia* 2003; 17: 1961-1966.

112. Longo R, Sarmiento R, Fanelli M et al. Anti-angiogenic therapy: Rationale, challenges and clinical studies. *Angiogenesis* 2002; 5: 237-256.

113. Hoeben A, Landuyt B, Highley MS, Wildiers H, Van Oosterom AT, De Bruijn EA. Vascular endothelial growth factor and angiogenesis. *Pharmacol Rev.* 2004 Dec;56(4):549-80.

114. Bates DO, Hillman NJ, Williams B et al. Regulation of microvascular permeability by vascular endothelial growth factors. *J Anat* 2002; 200: 587-597.

115. Ferrara N, Davis-Smyth T. The biology of vascular endothelial growth factor. *Endocrin Rev* 1997; 18: 4-25.

116. Gerschenson LE, Rotello RJ. Apoptosis: a different type of cell death. *Faseb J* 1992; 6:2450-55.

117. Sandau K, Pfeilschifter J, Brüne B. Nitric oxide and superoxide induced p53 and Baxaccumulation during mesengial cell apoptosis. *Kidney Int*, 1997; 52:378-386.

118. Vercammen D, Brouckaert G, Denecker G, Craen MV, Declercq W, Vandenabeele P. Dualsignaling of the fas receptor: Initiation of both apoptotic and necrotic cell death athways. *J Exp Med*, 1998 ; 188: 919-930.

- 119.** Thompson CB. Apoptosis in the pathogenesis and treatment of disease. *Science*, 1995; 267:1456-1462.
- 120.** John Cohen J. Apoptosis. *Immunology Today* 1993; 14:126-30
- 121.** Searle J, Kerr JFR, Bishop CJ. Necrosis and apoptosis. *Pathology Annual* 1982;17:229-59.
- 122.** Nicholson DW, Thornberry NA. Caspases: killer proteases. *Trends Biochem Sci.* 1997 Aug; 22(8):299-306.
- 123.** Nicholson DW. Caspase structure, proteolytic substrates, and function during apoptotic cell death. *Cell Death Differ* 1999; 6:1028-1042.
- 124.** Fadeel B, Orrenius S, Zhivotovsky B. The most unkindest cut of all: On the multiple roles of mammalian caspases. *Leukemia* 2000;14:1514-25.
- 125.** Locksley RM, Killeen N, Lenardo MJ. The TNF and TNF receptor superfamilies: Integrating mammalian biology. *Cell* 2001;104:487-501.
- 126.** Murray CJL, Lopez AD. Mortality by cause for eight regions of the world. *Global Burden of Disease Study. Lancet.* 1997; 349. 1269-76.
- 127.** Bamford J, Sandercock P, Dennis M, Burn J, Warlow C. Classification and natural history of clinically identifiable subtypes of cerebral infarction. *Lancet.* 1991 Jun 22;337(8756):1521-6.
- 128.** Gordon JL, Drummond AH, Galloway WA. Metalloproteinase inhibitors as therapeutics. *Clinical and Experimental Rheumatology* 1993; 11(Suppl.8):S91-94.
- 129.** Murphy G. The regulation of connective tissue Metalloproteinases by natural inhibitors. *Progress in inflammation Research and Therapy* 1991.
- 130.** Dwivedi AJ, Wu R, Nguyen E, Higuchi S, Wang H, Krishnasasthy K, Marini CP, Ravikumar TS, Wang P. Adrenomedullin and adrenomedullin binding protein-1 prevent acute lung injury after gut ischemia-reperfusion. *J Am Coll Surg.* 205(2):284-93 (2007).
- 131.** Chiu CJ, McArdle AH, Brown R, Scott HJ, Gurd FN. Intestinal mucosal lesion in low-flow states. I. A morphological, hemodynamic, and metabolic reappraisal. *Arch Surg.* 1970; 101:478-83

- 132.** McCarty KS Jr, Miller LS, Cox EB, et al. Estrogen receptor analyses. Correlation of biochemical and immunohistochemical methods using monoclonal antireceptor antibodies. *Arch Pathol Lab Med* 1985;109: 716–21.
- 133.** Gérard-Monnier D, Erdelmeier I, Régnard K, Moze-Henry N, Yadan JC, Chaudière J. Reactions of 1-methyl-2-phenylindole with malondialdehyde and 4-hydroxyalkenals. Analytical applications to a colorimetric assay of lipid peroxidation. *Chem Res Toxicol.* 1998 Oct;11(10):1176-83.
- 134.** Oksala NK, Paimela H, Alhava E, Atalay M. Heat shock preconditioning induces protein carbonylation and alters antioxidant protection in superficially injured guinea pig gastric mucosa in vitro. *Dig Dis Sci.* 2007 Aug;52(8):1897-905. Epub 2007 Apr 7.
- 135.** Prior RL, Hoang H, Gu L, Wu X, Bacchiocca M, Howard L, Hampsch-Woodill M, Huang D, Ou B, Jacob R. Assays for hydrophilic and lipophilic antioxidant capacity (oxygen radical absorbance capacity (ORAC(FL))) of plasma and other biological and food samples. *J Agric Food Chem.* 2003 May 21; 51(11):3273-9.
- 136.** Tietze F. Enzymic method for quantitative determination of nanogram amounts of total and oxidized glutathione: applications to mammalian blood and other tissues. *Anal Biochem.* 1969 Mar;27(3):502-22. No abstract available.
- 137.** Beauchamp C, Fridovich I. Superoxide dismutase: improved assays and an assay applicable to acrylamide gels. *Anal Biochem.* 1971 Nov;44(1):276-87. No abstract available.
- 138.** Liu F, Lou YL, Wu J, Ruan QF, Xie A, Guo F, Cui SP, Deng ZF, Wang Y. Upregulation of MicroRNA-210 Regulates Renal Angiogenesis Mediated by Activation of VEGF Signaling Pathway under Ischemia/Perfusion Injury in vivo and in vitro. *Kidney Blood Press Res.* 2011 Nov 25;35(3):182-191. [Epub ahead of print].

- 139.** Poynter JA, Manukyan MC, Wang Y, Brewster BD, Herrmann JL, Weil BR, Abarbanell AM, Meldrum DR. Systemic pretreatment with dimethyloxallylglycine increases myocardial HIF-1 α and VEGF production and improves functional recovery after acute ischemia/reperfusion. *Surgery*. 2011 Aug;150(2):278-83.
- 140.** Pande D, Negi R, Khanna S, Khanna R, Khanna HD. Vascular endothelial growth factor levels in relation to oxidative damage and antioxidant status in patients with breast cancer. *J Breast Cancer*. 2011 Sep;14(3):181-4. Epub 2011 Sep 29.
- 141.** Petrat F, de Groot H. Protection against severe intestinal ischemia/reperfusion injury in rats by intravenous resveratrol. *J Surg Res*. 2011 May 15;167(2):e145-55. Epub 2010 Jun 29.
- 142.** Dobrucalı A. İntesitnal İskemik Hastalıkların Teşhis ve Tedavisi. <http://www.drahmetdobrucali.com/wp-content/uploads/Akut-mesenterik-iskemi.pdf> [cited 10 march 2012]
- 143.** Lucchesi BR. Reperfusion injuries and clinical capillary leak syndrome. Futura Publishing Company; Armonk, NY. (1994)
- 144.** Jing H, Shen G, Wang G, Zhang F, Li Y, Luo F, Yao J, Tian XF. MG132 Alleviates Liver Injury Induced by Intestinal Ischemia/Reperfusion in Rats: Involvement of the AhR and NF κ B Pathways. *J Surg Res*. 2011 Sep 29. [Epub ahead of print].
- 145.** Wang B. Chemical characterization and Ameliorating effect of polysaccharide from Chinese jujube on intestine oxidative injury by ischemia and reperfusion. *Int J Biol Macromol*. 2011 Apr 1;48(3):386-91. Epub 2010 Dec 8.
- 146.** Estrela J.M. , Ortega, A. , Obrador E. Glutathione in cancer biology and therapy. *Critical Reviews in Clinical Laboratory Sciences*, 43: 143-181, 2006.
- 147.** Wu, G. , Fang Y.Z. , Yang S. , Lupton J.R. , Turner N.D. Glutathione metabolism and its implications for health. *Journal of Nutrition*, 134: 489-492, 2004.

- 148.** Seifi B, Kadkhodae M, Delavari F, Mikaeili S, Shams S, Ostad SN. Pretreatment with Pentoxifylline and N-Acetylcysteine in Liver Ischemia Reperfusion-Induced Renal Injury. *Ren Fail.* 2012 Feb 27. [Epub ahead of print].
- 149.** Karadeniz Cerit K, Karakoyun B, Yüksel M, Ozkan N, Cetinel S, Tolga Dağlı E, Yeğen BC, Tuğtepe H. The antifibrotic drug halofuginone reduces ischemia/reperfusion-induced oxidative renal damage in rats. *J Pediatr Urol.* 2012 Feb 26. [Epub ahead of print]
- 150.** Ohno H. , Matsuura N. , Ishikawa M. Serum Mn-SOD in patients with Diabetes Mellitus and Thyroid Dysfunction as Judged by an ELISA. *Horm. Metab. Res.* 23:449-451, 1991.
- 151.** Sugawara M., Kita T. Deficiency of Superoxide Dismutase endemic goiter Tissue. *J Clin Endoc and Metabol.* 67(6): 1156-1161, 1988.
- 152.** Zhang Z, Shen H, Qin HD, Xu Y, Ma MZ, Bao L, Wang H. Zhang Z, Shen H, Qin HD, Xu Y, Ma MZ, Bao L, Wang H. *Zhongguo Wei Zhong Bing Ji Jiu Yi Xue.* 2012 Feb;24(2):111-5.
- 153.** Leng YF, Zhang Y, Zhang Y, Xue X, Wang T, Kang YQ. Ischemic post-conditioning attenuates the intestinal injury induced by limb ischemia/reperfusion in rats. *Braz J Med Biol Res.* 2011 May;44(5):411-7. doi: 10.1590/S0100-879X2011007500045. Epub 2011 Apr 8.
- 154.** Dalle-Donne I. , Rossi R. , Giustarini D. , Milzani A. , Colombo R. , Protein carbonyl groups as biomarkers of oxidative stress, *Clinica Chimica Acta*, 2003, 329 (1-2), 23–38.
- 155.** Nastos C, Kalimeris K, Papoutsidakis N, Defterevos G, Pafiti A, Kalogeropoulou H, Zerva L, Nomikos T, Kostopanagiotou G, Smyrniotis V, Arkadopoulos N. Antioxidant treatment attenuates intestinal mucosal damage and gut barrier dysfunction after major hepatectomy. Study in a porcine model. *J Gastrointest Surg.* 2011 May;15(5):809-17. Epub 2011 Mar 5.
- 156.** Korivi M, Hou CW, Huang CY, Lee SD, Hsu MF, Yu SH, Chen CY, Liu YY, Kuo CH. Ginsenoside-Rg1 Protects the Liver against Exhaustive

Exercise-Induced Oxidative Stress in Rats. Evid Based Complement Alternat Med. 2012;2012:932165. Epub 2011 Sep 20.

157. Damodara Reddy V, Padmavathi P, Gopi S, Paramahamsa M, Varadacharyulu NCh. Protective Effect of *Emblica officinalis* Against Alcohol-Induced Hepatic Injury by Ameliorating Oxidative Stress in Rats. Indian J Clin Biochem. 2010 Oct;25(4):419-24. Epub 2010 Sep 14.

158. Larson, R.A. 1988. The antioxidants of higher plants. Phytochemistry. 27(4); 969-978.

159. Duthie, G.G. , Wahle, K.W.J. and James, W.P.T. 1989. Oxidants, antioxidants and cardiovascular disease. Nutr. Res. Rev. 2; 51-62.

160. Yildiz Y, Kose H, Cecen S, Ergin K, Demir EM, Serter M. Protective effects of leflunomide on intestinal ischemia-reperfusion injury: leflunomide against intestinal ischemia-reperfusion. Dig Dis Sci. 2010 Feb;55(2):245-52. Epub 2009 Feb 20.

161. Kregel, K.C.2002. Molecular Biology of Thermoregulation Invited Review: Heat shock proteins: modifying factors in physiological stress responses and acquired thermotolerance. J Appl Physiol 92: 2177–2186.

162. Vincenti M, Behrends M, Dang K, Park YH, Hirose R, Blasi-Ibanez A, Liu T, Serkova NJ, Niemann CU. Induction of intestinal ischemia reperfusion injury by portal vein outflow occlusion in rats. J Gastroenterol. 2010 Nov;45(11):1103-10. Epub 2010 Jun 15.

163. Tirapelli DP, Carlotti Jr CG, Leite JP, Tirapelli LF, Colli BO. Expression of HSP70 in cerebral ischemia and neuroprotective action of hypothermia and ketoprofen. Arq Neuropsiquiatr. 2010 Aug;68(4):592-6.

164. Xiao B, Ma LL, Xiao CL, Lu M, Xu W, Huang Y, Zhang SD, Hou XF. Protective effect of heat shock protein 70 and magnesium sulfate supplementation on renal ischemia reperfusion injury. Beijing Da Xue Xue Bao. 2011 Aug 18;43(4):525-30.

165. Arnér ES, Holmgren A. Physiological functions of thioredoxin and thioredoxin reductase. Eur J Biochem. 2000 Oct;267(20):6102-9.

- 166.** Hirota K, Nakamura H, Masutani H, Yodoi J. Thioredoxin superfamily and thioredoxin-inducing agents. *Ann N Y Acad Sci.* 2002 May;957:189-99
- 167.** Tao L, Gao E, Hu A, Coletti C, Wang Y, Christopher TA, Lopez BL, Koch W, Ma XL. Thioredoxin reduces post-ischemic myocardial apoptosis by reducing oxidative/nitrative stress. *Br J Pharmacol.* 2006 Oct;149(3):311-8. Epub 2006 Aug 21.
- 168.** Shibuki H, Katai N, Yodoi J, Uchida K, Yoshimura N. Lipid peroxidation and peroxynitrite in retinal ischemia-reperfusion injury. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 2000 Oct;41(11):3607-14.
- 169.** Ishimoto H, Tai A, Yoshimura M, Amakura Y, Yoshida T, Hatano T, Ito H. Antioxidative Properties of Functional Polyphenols and Their Metabolites Assessed by an ORAC Assay. *Biosci Biotechnol Biochem.* 2012 Feb 23;76(2):395-9. Epub 2012 Feb 7.
- 170.** Vergely C, Perrin-Sarrado C, Clermont G, Rochette L. Postischemic recovery and oxidative stress are independent of nitric-oxide synthases modulation in isolated rat heart. *J Pharmacol Exp Ther.* 2002 Oct;303(1):149-57.
- 171.** Gurevitch J, Frolkis I, Yuhas Y, Paz Y, Matsa M, Mohr R, Yakirevich V. Tumor necrosis factor-alpha is released from the isolated heart undergoing ischemia and reperfusion. *J Am Coll Cardiol.* 1996 Jul;28(1):247-52.
- 172.** Gulick T, Chung MK, Pieper SJ, Lange LG, Schreiner GF. Interleukin 1 and tumor necrosis factor inhibit cardiac myocyte beta-adrenergic responsiveness. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1989 Sep;86(17):6753-7.
- 173.** Dinarello CA, Cannon JG, Wolff SM, Bernheim HA, Beutler B, Cerami A, Figari IS, Palladino MA Jr, O'Connor JV. Tumor necrosis factor (cachectin) is an endogenous pyrogen and induces production of interleukin 1. *J Exp Med.* 1986 Jun 1;163(6):1433-50.
- 174.** Brach MA, Herrmann F. Interleukin 6: presence and future. *Int J Clin Lab Res.* 1992;22(3):143-51.

- 175.** Karatepe O, Kurtulus I, Yalcin O, Battal M, Kamali G, Aydin T. Adrenomedulline improves ischemic left colonic anastomotic healing in an experimental rodent model. *Clinics (Sao Paulo)*. 2011;66(10):1805-10.
- 176.** Zhong SS, Song JX, Zhang ZS, Li SM, Wang L. The protective effects of bifidobacterial adhesin on ischemic reperfusion injury of intestine in rats. *Zhonghua Nei Ke Za Zhi*. 2011 Oct;50(10):863-7.
- 177.** Ann Hoeben, Bart Landuyt et al. Vascular Endothelial Growth Factor and Angiogenesis. *Pharmacological Reviews* 2004;56:549-580
- 178.** Mahfoudh-Boussaid A, Zaouali MA, Hadj-Ayed K, Miled AH, Saidane-Mosbahi D, Rosello-Catafau J, Abdennebi HB. Ischemic preconditioning reduces endoplasmic reticulum stress and upregulates hypoxia inducible factor-1 α in ischemic kidney: the role of nitric oxide. *J Biomed Sci*. 2012 Jan 17;19(1):7.
- 179.** Grenz A, Clambey E, Eltzschig HK. Hypoxia signaling during intestinal ischemia and inflammation. *Curr Opin Crit Care*. 2012 Apr;18(2):178-85.
- 180.** Meyerson M. Telomerase enzyme activation and human cell immortalization. *Toxicology Letters* 1998; 102- 103:41-5.
- 181.** Gorham H, Yoshida K, Sugino T, et al. Telomerase activity in human gynaecological malignancies. *J Clin. Pathol*. 1997; 50: 501-4.
- 182.** Eckers A, Altschmied J, Haendeler J. Oxidative stress in endothelial cells and in diabetes type 2. *Z Gerontol Geriatr*. 2012 Feb;45(2):90-4.
- 183.** Werner C, Gensch C, Pösch J, Haendeler J, Böhm M, Laufs U. Pioglitazone activates aortic telomerase and prevents stress-induced endothelial apoptosis. *Atherosclerosis*. 2011 May;216(1):23-34. Epub 2011 Feb 17.
- 184.** Raff MC. Social control on cell survival and cell death. *Nature* 1992; 356:397-400.
- 185.** Cohen JJ. Apoptosis. To be or not to be. *Postgraduate Syllabus (AAAA-I)* 1998;1:1-19.

- 186.** Fujikawa DG. Prolonged seizures and cellular injury: Understanding the connection. *Epilepsy Behav* 2005;7 (Suppl 3):S3-11.
- 187.** Zhang XY, Liu ZM, Wen SH, Li YS, Li Y, Yao X, Huang WQ, Liu KX. Dexmedetomidine Administration before, but Not after, Ischemia Attenuates Intestinal Injury Induced by Intestinal Ischemia-Reperfusion in Rats. *Anesthesiology*. 2012 Mar 13. [Epub ahead of print]
- 188.** Yucel AF, Kanter M, Pergel A, Erboga M, Guzel A. The role of curcumin on intestinal oxidative stress, cell proliferation and apoptosis after ischemia/reperfusion injury in rats. *J Mol Histol*. 2011 Dec;42(6):579-87. Epub 2011 Oct 8.
- 189.** Yu QS, Yu HL, Pan JF. Effect of qihuang decoction on mRNA expressions of Bcl-2, Bax, and Caspase-3, 9 in intestinal mucosa epithelium of ischemia/reperfusion injured rats. *Zhongguo Zhong Xi Yi Jie He Za Zhi*. 2011 Feb;31(2):223-7.
- 190.** Chen YQ, Pan WH, Liu JH, Chen MM, Liu CM, Yeh MY, Tsai SK, Young MS, Zhang XM, Chao HM. The Effects and Underlying Mechanisms of S-Allyl L-Cysteine Treatment of the Retina After Ischemia/Reperfusion. *J Ocul Pharmacol Ther*. 2011 Nov 4. [Epub ahead of print]
- 191.** Hong JS, Chu YK, Lee H, Ahn BH, Park JH, Kim MJ, Lee S, Ryoo HS, Jang JH, Lee SR, Park JW. Effects of berberine on hippocampal neuronal damage and matrix metalloproteinase-9 activity following transient global cerebral ischemia. *J Neurosci Res*. 2012 Feb;90(2):489-97. doi: 10.1002/jnr.22756. Epub 2011 Nov 3.

10. EKLER

10.1. TEŞEKKÜR

Doktora eğitimim süresince benden yardımını hiçbir zaman esirgemeyen tez danışmanım Sayın Prof. Dr. Eser ÖZ OYAR'a, Gazi Üniversitesi AbD. Bölüm Başkanı Sayın Prof. Dr. Aydan BABÜL'e ve değerli Fizyoloji Bölümü Hocalarıma, Fizyoloji AbD. asistan arkadaşlarıma, tez çalışmama ait biyokimyasal değerlendirmelerin bir bölümünü kendi laboratuvar ve imkanlarını sunarak tamamlamamda büyük yardımı olan ve desteğini benden esirgemeyen University of Eastern Finland, Fizyoloji Bölümü öğretim üyesi Sayın Doç. Dr. Mustafa ATALAY'a ve laboratuvar çalışanlarına, ayrıca benden hiçbir zaman desteğini esirgemeyen aileme, Minna TIIHONEN'e, Duygu ALTIN'a ve de tez çalışmam süresince emeği geçen bütün herkese teşekkürü bir borç bilirim.

10.2 ETİK KURUL İZİN BELGESİ



T.C.
GAZİ ÜNİVERSİTESİ
REKTÖRLÜĞÜ
Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurul Başkanlığı

06/02/2010

SAYI : B.30.2.GÜN.0.05.06.00/64-3754
KONU:

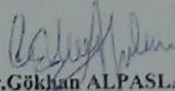
Sayın
Prof. Dr.Eser ÖZ OYAR
Gazi Üniversitesi Tıp Fakültesi
Fizyoloji Anabilim Dalı
Öğretim Üyesi

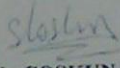
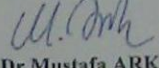
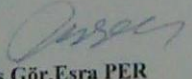
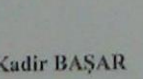
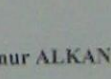
G.Ü.ET-09.102 kod numaralı ve “Rat ince bağırsağında oluşturulan deneysel iskemik reperfüzyon hasarlanma modelinde gelişen organ hasarlanması üzerine vasküler endotelial büyüme faktörünün (VEGF) etkisi” başlıklı araştırma öneriniz incelenmiş ve Gazi Üniversitesi Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurul Yönergesindeki ilkelere uygun olduğu saptanarak onaylanmasına oybirliği ile karar verilmiştir.

Bilgilerinizi saygılarımla rica ederim.

It is unanimously approved that the research project numbered G.Ü.ET-09.102 and entitled “The effects of vascular endothelial growth factor (VEGF) on tissues in an experimental rat model of intestinal ischemic reperfusion injury” is in compliance with Gazi University Animal Experiments Local Ethics Committee regulations.

With my best regards.


Prof.Dr.Gökhan ALPASLAN
Gazi Üniversitesi
Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurul Başkanı
Chairman
Gazi University Animal Experiments Ethics Committee

Prof.Dr.Sevim ERCAN	Prof.Dr.Nurten TÜRKÖZKAN	Prof.Dr.Tahir HATİPOĞLU
		
Doç.Dr.Şule COŞKUN CEVHER	Doç.Dr.Mustafa ARK	Uzman Dr.Seyda DİKER
		
Arş.Gör.Esra PER	Kadir BAŞAR	İlknur ALKAN

11. ÖZGEÇMİŞ

Adı: Ayhan

Soyadı: KORKMAZ

Doğum Yeri ve Tarihi: BALIKESİR 14.06.1983

Eğitimi:

09/10- ... University of Eastern Finland, Institute of Biomedicine, Physiology, Kuopio/Finland, Araştırmacı

01/07- 04/12 Gazi Üniveristesi, Sağlık Bilimleri Fakültesi, Fizyoloji Bölümü, Doktora Öğrencisi, Ankara

09/04-01/07 Gazi Üniveristesi, Sağlık Bilimleri Fakültesi, Fizyoloji Bölümü, Yüksek Lisans Öğrencisi, Ankara

9/00-6/04 Hacettepe Üniversitesi, Fen Fakültesi, Biyoloji Bölümü, Ankara

9/99-6/00 Karşıyaka Anadolu Lisesi, İzmir

9/96-6/99 Mehmet Akif Ersoy Anadolu Lisesi, Çorlu

9/94-6/96 19 Mayıs Türk Maarif Koleji, Girne, Kuzey Kıbrıs

Yabancı Dili:

İngilizce, Fince (Başlangıç)

Bilimsel Etkinlikler:

2010 University of Eastern Finland, Institute of Biomedicine, Physiology, Kuopio, Araştırmacı

2010 University of Eastern Finland, Institute of Biomedicine, Physiology, Kuopio, Araştırmacı, CIMO Bursu

2007 University of Eastern Finland, Institute of Biomedicine, Physiology, Kuopio, Erasmus Öğrenci Değişim Programı

2007-2012 Doktora Öğrencisi, Gazi Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Fizyoloji Bölümü, Ankara

2004-2007 Yüksek Lisans Öğrencisi, Gazi Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Fizyoloji Bölümü, Ankara

2003 Ankara Eğitim Araştırma Hastanesi, Ankara, Staj

2000-2004 Hacettepe Üniversitesi, Fen Fakültesi, Biyoloji Bölümü, Ankara

BURSLAR:

TBGS-National Graduate School of Musculoskeletal Disorders and Biomaterials 2010-2011, Araştırma Bursu

CIMO Scholarship, University of Eastern Finland, Institute of Biomedicine, Physiology, Kuopio/Finland 2009-2010, Araştırma Bursu

LLLE SCHOLARSHIP – Life Long Learning Erasmus Scholarship for winter semester in 2007-2008, University of Eastern Finland, Institute of Biomedicine, Physiology, Kuopio /FINLAND, Erasmus Öğrenci Değişim Programı

ÇALIŞMA KONULARI:

Oksidatif Stres

Antioksidanlar

İskemi Reperfüzyon Hasarı

POSTERLER

Tavşanlarda Spinal Kord İskemi Reperfüzyon Hasarı Üzerine Melatoninin Etkisi, XXXII. Uluslararası Fizyoloji Kongresi, Pamukkale Üniversitesi, Denizli, 2006

Tavşanlarda Vasküler Endotelial Büyüme Faktörünün Spinal Kord İskemi Reperfüzyon Hasarı Üzerine Etkisi, XXXIV. Uluslararası Fizyoloji Kongresi, Atatürk Üniversitesi, Erzurum, 2008

Endokrin Bozucuların Serebellum ve Korteks Nitrik Oksit Düzeyleri Üzerine Etkileri, ISOPS 9th Farmasötük Bilimler Uluslararası Kongresi, Ankara Üniversitesi, Eczacılık Fakültesi, Ankara, 2009

Tavşan Ağız Mukoza Kesi Yarası İyileşmesinde Tükürük Bezinde Oksidan, Antioksidan Mekanizma ve Melatoninin Etkisi, XXXV. Uluslararası Fizyoloji Kongresi, Gazi Üniversitesi, Ankara, 2009

TOPLANTI ve SEMPOZYUMLAR

Gene Expression and Chromatin Structure in Health and Disease A minisymposium organized by the Doctoral Program in Molecular Medicine, University of Eastern Finland June 20,2011

TBDP National Doctoral Programme of Musculoskeletal Disorders and Biomaterials Fifth Annual Meeting June 9-10, 2011

COST BM0602 Final meeting: A Key Target for Prevention of the Metabolic Syndrome, Kuopio, Finland, 2011