

T.C.
ABANT İZZET BAYSAL ÜNİVERSİTESİ
İZZET BAYSAL EĞİTİM VE ARAŞTIRMA HASTANESİ

RATLARDA OLUŞTURULAN İSKEMİ REPERFÜZYON
MODELLERİNDE ASTAKSANTİNİN ETKİSİNİN
BİYOKİMYASAL VE HİSTOPATOLOJİK BULGULAR İLE
DEĞERLENDİRİLMESİ

Dr. Yasin DURUKAN

ORTOPEDİ VE TRAVMATOLOJİ ANABİLİM DALI
UZMANLIK TEZİ

BOLU, 2017

T.C.
ABANT İZZET BAYSAL ÜNİVERSİTESİ
İZZET BAYSAL EĞİTİM VE ARAŞTIRMA HASTANESİ

RATLARDA OLUŞTURULAN İSKEMİ REPERFÜZYON
MODELLERİNDE ASTAKSANTİNİN ETKİSİNİN
BİYOKİMYASAL VE HİSTOPATOLOJİK BULGULAR İLE
DEĞERLENDİRİLMESİ

Dr. Yasin DURUKAN

ORTOPEDİ VE TRAVMATOLOJİ ANABİLİM DALI
UZMANLIK TEZİ

TEZ DANIŞMANI

Doç. Dr. Kutay Engin ÖZTURAN

Bu çalışma Abant İzzet Baysal Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi tarafından desteklenmiştir. (Proje numarası : 2017.08.17.1177)

BOLU, 2017

ÖZET

RATLARDA OLUŞTURULAN İSKEMİ REPERFÜZYON MODELLERİNDE ASTAKSANTİNİN ETKİSİNİN BİYOKİMYASAL VE HİSTOPATOLOJİK BULGULAR İLE DEĞERLENDİRİLMESİ

Turnike ekstremite cerrahisinde sıklıkla kullanılmaktadır. Turnikenin avantajları, kansız bir ortam sağlaması nedeniyle cerrahiyi kolaylaştırması, kan kaybını azaltması ve ameliyat süresini kısaltmasıdır. Turnike, distalinde kalan dokuların kan akışını engellemesi ve altındaki nöromusküler yapılara olan mekanik etkisi nedeniyle fizyolojik olmayan bir uygulamadır. Yararlı etkilerinin yanında, turnike ilişkili sinir paralizileri, vasküler yaralanmalar, tromboemboli, kompartman sendromu ve ekstremite iskemi/reperfüzyon hasarı iyi tanımlanmış ve ortopedik cerrahide halen ciddi morbidite ve mortalite nedeni olarak devam etmektedir. Şimdiye kadar kas dokusunda turnikeye bağlı iskemi/reperfüzyon (İ/R) hasarını azaltmak için bir takım kimyasallar, ilaçlar ve fiziksel yöntemler denenmiştir.

Antioksidan bir madde olan astaksantin oksidatif strese karşı etkisinin birçok çalışmada araştırılmasına karşın turnike kullanımının neden olduğu oksidatif strese karşı astaksantin kullanımı ile ilgili literatürde yapılmış bir çalışmaya rastlanmamıştır. Yaptığımız bu çalışmada ratlarda turnike etkisi oluşturmak için iskemi/reperfüzyon modeli oluşturuldu. Oluşan oksidatif strese karşı astaksantin koruyucu etkisini incelemeyi amaçladık.

Çalışmamız A,B,C ve D grubu olmak üzere 4 gruptan oluştu. Her grupta 8 adet olmak üzere toplam 32 adet rat kullanıldı. A grubu kontrol grubu, B grubu

iskemi/reperfüzyon grubu, C grubu iskemi/reperfüzyon + tedavi grubu ve D grubu ilaç grubu olarak belirlendi.

Serum ve doku örnekleri, biyokimya laboratuvarında malondialdehit (MDA), superoksit dismutaz (SOD), glutatyon peroksidaz (GSH-Px), total antioksidan kapasite (TAK) ve total oksidatif seviye (TOS) ölçümü yapılarak değerlendirildi. Histopatolojik çalışma için alınan kas dokusu, nekroz ve inflamasyon açısından değerlendirildi. Apoptozis açısından caspase-3 ile immunohistokimyasal değerlendirmesi yapıldı.

Serum SOD değerleri için gruplar arası yapılan değerlendirmede İ/R grubu ve İ/R + tedavi grubu arasında istatistiksel olarak anlamlı fark bulunmuştur ($p=0,028$). Nekroz skoru açısından değerlendirildiğinde İ/R grubu İ/R + tedavi grubu arasında anlamlı fark bulunmuştur ($p=0,005$). İnflamasyon bulguları değerlendirildiğinde İ/R grubu ile İ/R + tedavi grubu arasında istatistiksel olarak anlamlı fark bulunmuştur ($p=0,001$). Apoptozis açısından caspase-3 ile değerlendirildiğinde İ/R grubu ve İ/R + tedavi grubu arasında istatistiksel olarak anlamlı fark bulunmuştur ($p=0,000$).

İskemi/reperfüzyon hasarını önlemek için kullanılan astaksantin iyileştirici etkisi histopatolojik olarak bütün verilerde gösterilmiştir. Astaksantin iyileştirici etkisi biyokimyasal verilerin bazılarında gösterilmiştir. Astaksantin turnikeye bağlı oluşabilecek komplikasyonları önlemek için kullanılabileceğini düşünmekteyiz.

Anahtar kelimeler : astaksantin, iskemi/reperfüzyon, turnike, oksidatif stres, ekstremit

ABSTRACT

EVALUATION OF ASTAXANTHIN EFFECT WITH BIOCHEMICAL AND HISTOPATHOLOGICAL FINDINGS IN ISCHEMIA / REPERFUSION MODELS CREATED IN THE RATS

Tourniquet is frequently used in extremity surgeons. The advantages of tourniquet are to facilitate an attempt by providing a bloodless environment, to reduce blood loss and shorten the duration of the operation. A tourniquet is a non-physiological application due to the obstruction of the blood flow by the distal tissues and the mechanical effect of the underlying neuromuscular structure. In addition to its beneficial effects, tourniquet-related nerve paralysis, vascular injuries, thromboemboli, compartment syndrome and extremity ischemia/reperfusion (I/R) injury remain well defined and still cause serious morbidity and mortality in orthopedic surgery. To date, a number of chemicals, drugs and physical methods have been investigated to protect muscle against ischemia/reperfusion (I/R) injury.

Although the effect of antioxidant astaxanthin against oxidative stress has been investigated in a number of studies, no literature on the use of astaxanthin against oxidative stress has been found. In this study we made an ischemia / reperfusion model to create a tourniquet effect in rats. We aimed to investigate the protective effect of astaxanthin against oxidative stress.

Our study consisted of 4 groups; A, B, C and D groups. A total of 32 rats, 8 in each group, were used. Group A was the control group, group B was the ischemia / reperfusion group, group C was the ischemia / reperfusion + treatment group and group D was the drug group.

Serum and tissue samples were evaluated in biochemistry laboratory by measuring malondialdehyde (MDA), superoxide dismutase (SOD), glutathione peroxidase (GSH-Px), total antioxidant capacity (TAC) and total oxidative status (TOS). Muscle tissue taken for histopathological study, tissue was evaluated for necrosis and inflammation. Immunohistochemical evaluation with caspase-3 was performed for apoptosis.

There was a statistically significant difference between the I/R group and the I/R + treatment group for the serum SOD values between the groups ($p = 0.028$). When the necrosis score was evaluated, there was a significant difference between the I/R group and the I/R + treatment group ($p = 0.005$). There was a statistically significant difference between the I/R group and the I/R + treatment group when the inflammation findings were evaluated ($p = 0.001$). There was a statistically significant difference between the I/R group and the I/R + treatment group ($p = 0.000$) when evaluated with caspase-3 in terms of apoptosis.

The healing effect of astaxanthin, used to prevent ischemia / reperfusion injury, has been demonstrated histopathologically in all data. The healing effect of astaxanthin has been shown in some of the biochemical data. We speculate that astaxanthin can be used to prevent complications due to tourniquet.

Key words : astaxanthin, ischemia/reperfusion, tourniquet, oxidative stress, extremity

ÖNSÖZ

Abant İzzet Baysal Üniversitesi Tıp Fakültesi Ortopedi ve Travmatoloji Anabilim Dalı Başkanımız Doç. Dr. Kutay Engin Özturan olmak üzere saygıdeğer hocalarım Prof. Dr. Fuat Akpınar, Doç. Dr. Hüsamettin Çakıcı ve Doç. Dr. Cengiz Işık'a

Cerrahi becerilerimin gelişmesinde çok büyük katkıları olan değerli uzman abilerim Uzm. Dr. Recai Özkılıç, Uzm. Dr. Yasin Emre Kaya, Uzm.Dr. Tolgahan Kuru'ya

Ortopedi ve Travmatoloji eğitiminin her aşamasını birlikte öğrendiğim, mutluluğu ve üzüntüyü birlikte paylaştığım asistan arkadaşlarım Abdullah Alper Şahin, Hasan Kızılay, Mehmet Boz, Metin Çelik, Emre Atmaca, Emre Arıkan, Mahmut Kurtboğan ve Murat Bala'ya;

Tezimin hazırlama aşamasında rehberlik eden danışman hocam Doç. Dr. Kutay Engin Özturan'a, biyokimyasal analizler için çaba gösteren Prof. Dr. Güler Buğdaycı'ya, histopatolojik değerlendirmeler için emek sarfeden Yard. Doç. Dr. Tülin Fırat'a

Hastanede her an beraber çalıştığımız bütün yardımcı sağlık personeline;

Uzmanlık eğitim süresince her an bana yardımcı olan ve sürekli destek veren eşim Dr. Tuğba Durukan ve oğlum Kağan Efe'ye;

Bizleri yetiştirip bugünlere getiren annem ve babam olmak üzere bütün aileme;

Sonsuz teşekkürler.

Dr. Yasin DURUKAN

BOLU 2017

İÇİNDEKİLER

ÖZET	ii
ABSTRACT	iv
ÖNSÖZ	vi
İÇİNDEKİLER.....	vii
SİMGELER ve KISALTMALAR	xi
TABLolar	xiii
ŞEKİLLER	xv
1. GİRİŞ VE AMAÇ.....	1
2. GENEL BİLGİLER	3
2.1. İskemi	3
2.2. Reperfüzyon.....	7
2.3. İskemi – Reperfüzyon Modelleri	8
2.4. İskemi Reperfüzyon Hasarı	9
2.4.1. İskemi reperfüzyon hasarında kompleman sistemi	10
2.4.2. İskemi reperfüzyon hasarında sitokinler	10
2.4.3. İskemi reperfüzyon hasarında nötrofiller	11
2.4.4. İskemi reperfüzyon hasarında mitokondri	11
2.4.5. İskemi reperfüzyon hasarında lipid peroksidasyonu ve malonildialdehid	12
2.4.6. İskemi reperfüzyon hasarında nitrik oksit (NO)	12
2.4.7. İskemi reperfüzyon hasarında myeloperoksidaz (MPO)	13
2.4.8. İskemi reperfüzyon hasarında ksantin oksidaz (KO).....	13
2.5. İskemi Reperfüzyon Hasarında Serbest Radikaller	13

2.5.1. Süperoksit radikali	15
2.5.2. Hidrojen peroksit	16
2.5.3. Hidroksil radikali	17
2.5.4. Serbest radikallerin zararları	18
2.6. İskemi Reperfüzyon Hasarında Antioksidanlar.....	19
2.6.1. Süperoksit dismutaz	21
2.6.2. Katalaz	21
2.6.3. Glutasyon peroksidaz	22
2.6.4. C vitamini (askorbik asit).....	22
2.6.5. E vitamini.....	23
2.6.6. Melatonin	23
2.6.7. Ürik asit (ürat).....	23
2.6.8. Karotenoidler (β karoten, likopen, α karoten, β crytoksantin).....	24
2.7. Çalışmamızda Kullandığımız Antioksidan Astaksantin.....	24
2.7.1. Astaksantin biyosentezi	25
2.7.2. Astaksantin etki mekanizması	28
2.7.3. Astaksantin faydaları	30
2.7.4. Astaksantin kullanım alanları	31
2.7.5. Astaksantin pazarı	31
2.8. Total Antioksidan Kapasite	32
2.9. Total Oksidatif Seviye	33
3. GEREÇ VE YÖNTEM	33
3.1. Deney Hayvanları	33
3.2. Deney Grupları	34
3.3. Anestezi Uygulaması.....	34
3.4. Deneyin Yapılışı ve Örneklerin Alınması	35

3.5. Biyokimyasal İşlemler	42
3.5.1. Doku homojenizasyonu	42
3.5.2. Doku proteini tayini	42
3.5.3. SOD ölçümü.....	42
3.5.4. GSH-Px ölçümü	42
3.5.5. Total Antioksidan Kapasite ölçümü.....	43
3.5.6. Total oksidatif seviye ölçümü	43
3.5.7. Oksidatif stres indeksi (OSİ indeksi)	43
3.5.8. MDA ölçümü	43
3.6. Histopatolojik İşlemler	44
3.6.1. Işık mikroskopik incelemeler.....	44
3.6.2. Hematoksilen-eozin boyaması	44
3.6.3. Caspase-3 immün işaretleme	45
3.6.4. Nekroz skorlaması	46
3.6.5. İnflamasyon değerlendirmesi.....	47
3.6.6. Caspase-3 immün işaretleme ile apoptozis değerlendirmesi	47
3.7. İstatistiksel Analiz	47
4. BULGULAR	48
4.1. Biyokimyasal Değerlendirme Bulguları	48
4.1.1. Doku biyokimyasal değerlendirme bulguları.....	48
4.1.2. Serum biyokimyasal değerlendirme bulguları	56
4.2. Histopatolojik Değerlendirme Bulguları	64
5. TARTIŞMA	78
6. SONUÇ	83
7. KAYNAKLAR.....	85
8. EKLER.....	99

8.1. Etik Kurul Onay Belgesi.....	99
-----------------------------------	----



SİMGELER ve KISALTMALAR

AA	:Araşidonik Asit
ATP	:Adenozin Trifosfat
BKT	: β -Karoten Ketolaz
Ca⁺²	:Kalsiyum İyonu
CH	:Karotenoid Hidroksilaz
DNA	:Deoksiribo Nükleik Asit
FDA	:Food and Drug Administration
GSH-Px	:Selenyum Bağlı Glutatyon Peroksidaz
GPx	:Glutatyon Peroksidaz
μG	:Mikrogram
HE	:Hemotoksilen Eozin
H²O²	:Hidrojen Peroksit
HOCl	:Hipoklorik Asit
Ig M	:İmmunglobulin M
IL-1	:İnterlökin-1
IL-6	:İnterloklin-6
INF-γ	:İnterferon Gama
İ/R	:İskemi/Reperfüzyon
KO	:Ksantin Oksidaz
L	:Litre
L⁻	:Lipit Radikali
LCYB	:Likopen Siklaz
LOO⁻	: Lipid Peroksit Radikali
LOOH	: Lipit Hidroperoksit
MDA	:Malondialdehit
Mg	:Miligram
ml	:Mililitre
Mmol	:Milimol
MPO	:Myeloperoksidaz
MSK	:Membran Saldırı Kompleks
μM	:Mikrometre

Na⁺²	:Sodyum
NADPH	:İndirgenmiş Nikotinamid Adenin Dinükleotit Fosfat
NK	:Natural Killer
NO	:Nitrik Oksid
NO₂⁻	:Azot Dioksit
NO₂⁺	:Nitronyum İyonu
NOS	:Nitrik Oksid Sentaz
O₂	:Oksijen Molekülü
O₂⁻	:Süperoksit Anyon
OH⁻	:Hidroksil Radikali
ONOO⁻	:Peroksinitrit
OSİ	:Oksidatif Stres İndeksi
PDS	:Fitoen Desaturaz
PMNL	:Polimorfonükleer Lökosit
PSY	:Fitoen sentaz
ROM	:Reaktif Oksijen Molekülleri
ROS	:Reaktif Oksijen Türleri
SOD	:Superoksit Dismutaz
SOR	:Serbest Oksijen Radikalleri
SR	:Serbest Radikal
TAK	:Total Antioksidan Kapasite
TCA	:Tiyokloroasetik Asit
TNF	:Doku Nekroz Faktör
TOS	:Total Oksidatif Seviye
TXA₂	:Tromboxan A ₂
U	:Units
ZDS	:ζ- Karoten Desaturaz

TABLÖLAR

Tablo

- 2.1. Serbest Radikaller ve Radikal Olmayan Moleküller
- 2.2. Hücresel Serbest Radikallerin Etkilediği Moleküller
- 2.3. Antioksidan Maddelerin Sınıflandırılması
- 4.1. Doku Örneklerinin Biyokimyasal Bulguları
- 4.2. Doku MDA Biyokimyasal Bulgularının İstatiksel Verileri
- 4.3. Doku SOD Biyokimyasal Bulgularının İstatiksel Verileri
- 4.4. Doku TAK Biyokimyasal Bulgularının İstatiksel Verileri
- 4.5. Doku TOS Biyokimyasal Bulgularının İstatiksel Verileri
- 4.6. Doku OSI Biyokimyasal Bulgularının İstatiksel Verileri
- 4.7. Serum Örneklerinin Biyokimyasal Bulguları
- 4.8. Serum MDA Biyokimyasal Bulgularının İstatiksel Verileri
- 4.9. Serum SOD Biyokimyasal Bulgularının İstatiksel Verileri
- 4.10. Serum TAK Biyokimyasal Bulgularının İstatiksel Verileri
- 4.11. Serum TOS Biyokimyasal Bulgularının İstatiksel Verileri
- 4.12. Serum OSI Biyokimyasal Bulgularının İstatiksel Verileri
- 4.13. Gruplara Göre Nekroz Skoru Değerlendirme Sonuçları
- 4.14. Nekroz Skoru Bulgularının İstatiksel Verileri
- 4.15. Gruplara Göre İnflamasyon(Nötrofil sayısı) Değerlendirme Sonuçları
- 4.16. İnflamasyon Bulgularının İstatiksel Verileri
- 4.17. Gruplara Göre Caspase-3 Pozitif(Apoptotik hücre) Değerlendirme Sonuçları

4.18. Caspase-3 Bulgularının İstatiksel Verileri



ŞEKİLLER

Şekil

2.1. Hücre hasarında sitoplazmik kalsiyum artışının kaynakları ve sonuçları

2.2. İskemide membran hasarının mekanizmaları

2.3. Serbest radikallerin dönüşüm reaksiyonları

2.4. Astaksantin kimyasal yapısı

2.5. *Haematococcus pluvialis*'de astaksantin biyosentezi

2.6. Astaksantin üç boyutlu yapısı

2.7. Astaksantin biyosentezi

2.8. Astaksantin hücre zarındaki durumu

3.1. Oral yolla astaksantin uygulanması

3.2. Ratlara ketamin ksilazin anestezisi verdikten sonra sırtüstü pozisyonda sabitlenmiş hali

3.3. Sol inguinal bölgenin traşlanmış hali

3.4. İnguinal bölgenin betadinle boyanmış hali

3.5. Ratların boyandıktan sonraki örtülü hali

3.6. Sol inguinal insizyon sonrası

3.7. Sol femoral arterin açığa çıkarılmış hali.

3.8. Sol femoral artere bulldog mikroklemptakılmış hali

3.9. İnsizyon alanının ıslak gazlı bezle kapanmış hali

3.10. Median sternotomi sonrası

3.11. Gastroknemius kasının açığa çıkarılmış hali

- 4.1. Doku MDA değerlerinin gruplara göre dağılımı
- 4.2. Doku SOD değerlerinin gruplara göre dağılımı
- 4.3. Doku TAK değerlerinin gruplara göre dağılımı
- 4.4. Doku TOS değerlerinin gruplara göre dağılımı
- 4.5. Serum MDA değerlerinin gruplara göre dağılımı
- 4.6. Serum SOD değerlerinin gruplara göre dağılımı
- 4.7. Serum TAK değerlerinin gruplara göre dağılımı
- 4.8. Serum TOS değerlerinin gruplara göre dağılımı
- 4.9. Nekroz skoru değerlerinin gruplara göre dağılımı
- 4.10. İnflamasyon bulgularının gruplara göre dağılımı
- 4.11. Kontrol grubuna ait görüntü. Hematoksilen Eozin, 10x, bar 100µm
- 4.12. İ/R grubuna ait görüntü. Hematoksilen Eozin, 10x, bar 100µm
- 4.13. İ/R grubuna ait görüntü. Hematoksilen Eozin, 20x, bar 50 µm
- 4.14. İ/R + Tedavi grubuna ait görüntü. Hematoksilen Eozin, 10x, bar 100µm
- 4.15. İlaç grubuna ait görüntü. Hematoksilen Eozin, 10x, bar 100µm
- 4.16. Caspase-3 değerlerinin gruplara göre dağılımı
- 4.17. Kontrol grubuna ait görüntü. Caspase-3 immun boyama. 40x
- 4.18. İ/R grubuna ait görüntü. Caspase-3 immun boyama. 40x
- 4.19. İ/R + tedavi grubuna ait görüntü. Caspase-3 immun boyama. 40x
- 4.20. İlaç grubuna ait görüntü. Caspase-3 immun boyama. 40x



1. GİRİŞ VE AMAÇ

Turnike; ortopedi ve travmatoloji kliniğinde ekstremitte cerrahisinde yıllardan beri sıklıkla kullanılmaktadır. Ekstremitte cerrahisinde kan dolaşımını geçici olarak durdurma fikrini ilk kez kimin bulduğu bilinmemektedir. Milattan önce 600 yılında damarların üzerine taş yardımıyla basarak turnike yapıldığına kayıtlarda rastlanılmaktadır. Turnike terimi, Fransızca anlamı döndürmek olan "tourner" kelimesinden esinlenerek, 1718 yılında ilk kez Jean Louis Petit kullanmıştır. Turnike, önceleri amputasyon cerrahisinde daha sonraki yıllarda amputasyon dışındaki cerrahilerde de kullanılmıştır. Turnike ilk başlarda lastik bandaj kullanılarak yapılmaktayken 20. yüzyıl başlarında günümüzde kullandığımız pnömatik turnike geliştirilmiştir(1).

Turnikenin avantajları, kansız bir ortam sağlaması nedeniyle cerrahiye kolaylaştırması, kan kaybını azaltması ve ameliyat süresini kısaltmasıdır. Turnike, distalinde kalan dokuların kan akışını engellemesi ve altındaki nöromusküler yapılara olan mekanik etkisi nedeniyle fizyolojik olmayan bir uygulamadır. Yararlı etkilerinin yanında, turnike ilişkili sinir paralizileri, vasküler yaralanmalar, tromboemboli, kompartman sendromu ve ekstremitte iskemi/reperfüzyon hasarı iyi tanımlanmış ve ortopedik cerrahide halen ciddi morbidite ve mortalite nedeni olarak devam etmektedir(2, 3).

İskelet kasında turnike uygulamasına bağlı oluşan iskemi/reperfüzyon hasarı, temel mekanizması nötrofil aktivasyonu olan bir çeşit enflamasyondur. İskemik hasarın olmaması için kan akımının yeniden sağlanması kritik olmasına rağmen, reperfüzyonun sağlanmasıyla birlikte nötrofil artışı, mikrovasküler bariyerde hasar ve ödem oluşmasıyla giden bir reaksiyon dizisi başlar. Lökositlerin endotele gelmesiyle postkapiller venlerden geçişinin başlaması, reperfüzyon hasarının başlangıcıdır. Lökositlerin dokularda artışı, çeşitli oksidanların, enzim ve sitokinlerin açığa çıkmasını sağlayarak, parenkimal hücrelerde bozulmaya yol açar. Şimdiye kadar kas dokusunda turnikeye bağlı iskemi/reperfüzyon (İ/R) hasarını azaltmak için bir takım

kimyasallar, ilaçlar ve fiziksel yöntemler denenmiştir. Yapılan çalışmalarda oksidatif stresi önlemek için; kimyasal (superoksit dismutaz, katalaz), farmakolojik (dantrolen sodyum, allopurinol, heparin, antioksidanlar) ve fiziksel (hipotermi, hipoksik reperfüzyon) tedavi yaklaşımları kullanılmıştır(4-7).

Astaksantin pigmenti doğadaki en kuvvetli ve zararsız antioksidan olarak kabul edilmektedir. Antioksidan aktivitesinin C vitamininden 6000 kat, koenzim Q10'dan 800 kat, E vitamininden 550 kat, karotenden 11 kat daha güçlü olduğu bulunmuştur. Astaksantin, in vivo ve in vitro sistemlerde lipid peroksidasyonu ve oksidatif strese karşı en etkili antioksidanlardan biri olduğu gösterilmiştir(8, 9).

Çalışmamızda kullanacağımız Astaksantin (3,3'-dihidroksi- β , β' -karoten-4,4'-dion), yosun, balık ve kuşlarda bulunan doğal bir bileşiktir(10). Kabuklulardaki kırmızı renk, bazı kuşların tüylerindeki kırmızı renk ve somon balığı gibi bazı balıkların etinin pembeliği astaksantin pigmenti nedeniyledir. Karotenoidlerin keton ailesinden olan astaksantin hücre membran yapısının korunmasında etkili bir mekanizmaya sahip olduğu bildirilmektedir(11-13). Karotenoidlerin depolanmasına rağmen astaksantin vücutta A vitamini olarak depolanmaz. Astaksantin, in vivo ve in vitro sistemlerde lipid peroksidasyonuna ve oksidatif strese karşı en etkili antioksidanlardır(14-16). Kanseri, kronik inflamatuvar hastalıklar, diyabet, kardiyovasküler hastalıklar ve nörodejeneratif hastalıklar gibi çeşitli hastalıkların önlenmesi ve tedavisinde potansiyel iyileştirici etkilere sahiptir(17). Astaksantin ayrıca bağışıklık düzenleyici, antiinflamatuvar etkileri vardır ve yağ oksidasyonunu uyarır(10, 18, 19). İn vitro çalışmalar, astaksantin, β -karoten ve α -tokoferolden çok daha aktif bir serbest radikal süpürücü olduğunu göstermiştir(20). Astaksantin, oral uygulama sonrası kas, karaciğer ve böbrek dokularında birikir ve astaksantin, kas hasarını hafifletir ve uzun süreli egzersize bağlı olarak oluşan deoksiribo nükleik asit (DNA) ve lipidlerin peroksidasyonunu engeller(21).

Astaksantin immünomodülatör etkilerini araştıran çalışmalar, astaksantin'in hem hayvanlarda hem de insanlarda bağışıklık tepkisini uyardığını göstermiştir. Diyetle alınan astaksantin, genç sağlıklı dişilerde hem hücre aracılı hem de humoral bağışıklık yanıtlarını arttırmıştır. T-hücresi ve B hücresi mitojen kaynaklı lenfosit proliferasyonu, natural killer (NK) hücresi sitotoksik aktivitesi, interferon gama(INF-

γ) ve interlokin 6(IL-6) üretimi ve lökosit fonksiyon antijen-1 ekspresyonu gibi bağışıklık belirteçleri, astaksantin takviyesi sonrasında belirgin şekilde artmıştır.

Antioksidan bir madde olan astaksantin oksidatif strese karşı etkisinin birçok çalışmada araştırılmasına karşın(22-24) alt ekstremitelerde turnike kullanımının neden olduğu oksidatif strese karşı astaksantin kullanımı ile ilgili literatürde yapılmış bir çalışmaya rastlanmamıştır. Yapacağımız bu çalışmada ratlarda turnike etkisi oluşturmak için iskemi/reperfüzyon modeli oluşturularak oluşan oksidatif strese karşı astaksantin etkisi biyokimyasal ve histopatolojik olarak incelenecektir.

Bu çalışmanın amacı astaksantin ratlarda oluşturulan İ/R hasarına etkisinin araştırılmasıdır.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. İskemi

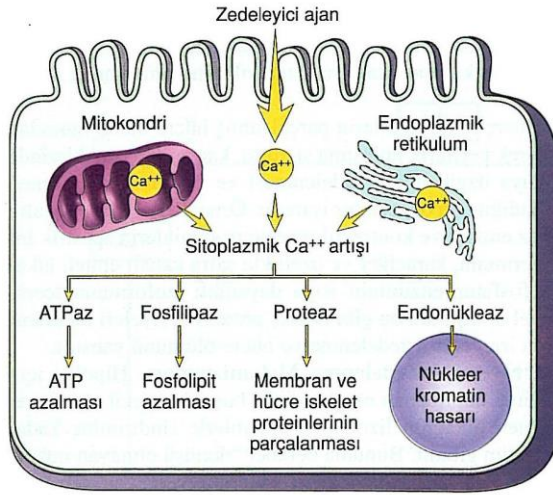
İskemi; kan akımının çeşitli sebeplerle (staz, cerrahi, trombüs vb) durması sebebiyle, dokunun ihtiyacı olan oksijen (O_2) ve metabolitlerin sağlanamaması ve meydana gelen zararlı doku ürünlerinin vücuttan atılamaması olarak tanımlanır(25). İskemi nedeniyle oluşan doku hasarında, hücresel enerji depolarının bitmesi ve toksik metabolitlerin artışı hücre ölümüne neden olur(26, 27). İskemideki hücre zedelenmesinin patogeneğinde, oksijen yetersizliğinin önemi belirtilmekle birlikte, reaktif oksijen türevleri de hücre ölümünün önemli sorumlularındandır. Serbest radikal türevleri hücre üzerinde lipid peroksidasyonu ve diğer zararlı etkilere neden olur(28).

Uzun bir iskemi süreci, birden fazla olumsuz hücresel, metabolik ve yapısal değişikliğe sebep olur. İskeminin hücreler üzerinde oluşturduğu etkiler; hücre tipleri arasındaki hipoksik tolerans, metabolik hız ve intrinsik adaptif mekanizmalara bağlı olarak farklılıklar gösterir. Bununla birlikte hücresel nekroz, uzun süre anoksi veya şiddetli hipoksi sonucu meydana gelmektedir(29)

Sitoplazmik serbest kalsiyum (Ca^{+2}) normalde adenozin trifosfat (ATP) bağımlı kalsiyum taşıyıcıları ile düşük yoğunluklarda tutulur. İskemi veya toksinler hücre dışı kalsiyumun plazma membranından içeri akışına yol açar. Bunu hücre içinde bulunan kalsiyumun serbest kalması izler. Serbest kalan kalsiyum miktarı arttıkça sitoplazmik kalsiyum, birbiri ardına, membran hasarını ilerleten fosfolipazları, yapısal ve membran proteinlerini parçalayan proteazları, ATP yıkımını arttıran ATPaz' ları ve çekirdekteki genetik bölümü parçalayan endonükleazları aktive eder(28).

İskemi klinik tıpta hücre zedelenmesine yol açan en sık nedendir(28). İskemi dokuları hipoksinin zedelediğinden daha çabuk zedeler. Hipoksi başlangıçta hücredeki oksidatif fosforilasyonu bozarak aerobik solunumu etkiler. Oksijen basıncının giderek azalması hücre içi ATP üretimini azaltır. ATP azalmasının hücre içindeki birçok olumsuz etkisi olur(28).

Yukarıda da tanımlandığı gibi iskemi sonucunda sitoplazmik serbest Ca^{+2} ' da bir artış vardır. Ayrıca, plazma membranı ATP bağımlı sodyum pompasının aktivitesi azalarak sodyumun hücre içinde artışına ve potasyumun hücre dışında artışına yol açar. Sodyumun hücre içi belirgin artışı, suyun izoozmotik artışı ile birlikte olup, akut hücresel şişmeye neden olur. Bu şişme inorganik fosfatlar, laktik asit ve pürin nükleozitleri gibi diğer metabolitlerin birikimi ile artan ozmotik yükü daha da artar(28).



Şekil 2.9. Hücre hasarında sitoplazmik kalsiyum artışının kaynakları ve sonuçları(28).

Hücresel ATP’de azalma ile birlikte, adenosin monofosfatta artma da, fosfofruktokinaz enzimini uyararak, glikojenden ATP üretimi ile hücrenin enerjisini temin amacıyla gelişen anaerobik glikoliz hızını artırır. Sonuç olarak glikojen hızla tükenir(28).

Glikolizin artması laktik asit ve inorganik fosfatların artışına neden olur. Bu olay hücre içi pH’ ın azalmasına yol açar(28). Daha sonra endoplazmik retikülumdaki ribozomların ayrılması ve polizomlardan monozomların oluşumu ile protein sentezinin azalmasıdır. Hipoksi ortadan kaldırılamazsa, hücrede mitokondrial fonksiyon daha da bozulur. Membran geçişi artarak, daha fazla morfolojik değişime neden olur. Tüm hücreler şişmiş gibi görünür. Eğer hipoksi zamanında düzelirse, yukarıdaki tüm bozukluklar normale dönebilir(28). Bununla beraber hipoksi devam ederse, hasar kalıcı olur ve iskemi oluşur.

Morfolojik olarak kalıcı hasara, mitokondrilerin şiddetli vakuolizasyonu ve mitokondri matriksinde Ca^{+2} ‘dan zengin yoğunlukların birikimi, plazma membranlarının geniş hasarı ve lizozomların şişmesi eşlik eder(28).

İskeminin hücresel etkileri aşağıdaki şekilde özetlenebilir(30):

1-Membran potansiyelinin değişmesi,

2-İyon dağılımının değişmesi (intraseküler Ca^{+2} / Sodyum(Na^{+2})),

3-Hücrel şişme,

4-Hücre iskeletinin disorganizasyonu,

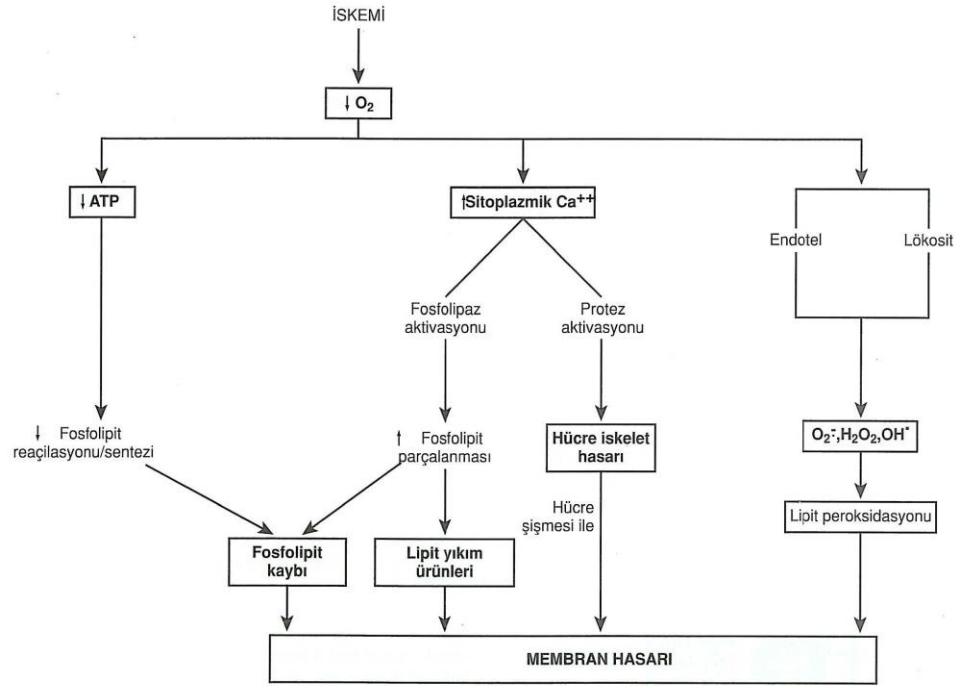
5-Artmış hipoksantin,

6-Azalmış ATP,

7-Azalmış fosfokreatin,

8-Azalmış glutatyon,

9-Hücrel asidoz.



Şekil 2.10. İskemide membran hasarının mekanizmaları(28).

Membran hasarının birçok potansiyel nedeni vardır(28) (Şekil 2).

1- Membran fosfolipitlerinin artan kaybı: İskemide bağılı sitoplazmik Ca^{+2} artması endojen fosfolipazların aktive ederek parçalanmaya neden olur.

2- Hücre iskelet anormallikleri: Hücre içi Ca^{+2} artması ile proteazlar aktive olarak hücre yapısına zarar verir.

3- Toksik oksijen radikalleri: İndirgenmiş oksijen türevleri hücre membranına zarar verir. Bu gibi oksijen radikalleri, iskemik dokularda, reperfüzyonla artar. Toksik oksijen türevlerinin, reperfüzyon nedeniyle gelen polimorfonükleer lökositler (PMNL) tarafından oluşturulduğu düşünülmektedir(28).

4- Lipit yıkım ürünleri: Fosfolipit parçalanması sonucu iskemik hücrelerde artan katabolik ürünler, membranlar üzerinde yıkıcı etki yapar. Bu olaya sitoplazmik Ca^{+2} 'un artışı neden olur(28)(Şekil 2).

2.2. Reperfüzyon

Reperfüzyon dönemi, iskemik olayın ortadan kalkmasından sonra kan akımının yeniden başlaması olarak tanımlanır. Bu dönemde hücreye yeniden sağlanan yüksek O_2 konsantrasyonu, dokuda bir inflamatuvar yanıtı başlatır. İskemik dokuda, hem hücrenin yenilenmesi, hem de toksik metabolitlerin atılması için, yeniden reperfüzyon gerekir. Ancak iskemik dokunun reperfüzyonu bir dizi olayın başlatarak paradoksal doku hasarına yol açar(27).

Reperfüzyon döneminde dokuda nötrofil infiltrasyonu, kompleman sisteminin aktivasyonu, kalsiyum aracılı proteazların aktivasyonu, araşidonik asit (AA) metabolizması gibi pek çok sistem, serbest radikal (SR) oluşumunu artırarak, hasara neden olmaktadır(27). Yanık, şok, sepsis gibi olgularda ortaya çıkan hipovolemi ile iskemi oluşur. Hipovoleminin düzeltilmesi ile reperfüzyon sağlanır ve reperfüzyon hasarı oluşur(27, 31). Serebrovasküler olaylarda, myokard enfarktüsünde yapılan trombolitik tedavi veya revaskülarizasyon ameliyatları reperfüzyonu sağlayarak reperfüzyon hasarına neden olmaktadır(27). Travma cerrahilerinde ve travma sonrası hipovolemi yada kanama kontrolü nedeniyle yapılan tampon uygulamaları iskemiye neden olurken, resusitasyon sonrası olan reperfüzyon ile yine İ/R hasarı gündeme gelmektedir(27, 31). Kardiovasküler cerrahide aort yada periferik arter klemp uygulaması sonrası oluşan durum İ/R hasarı ile karakterizedir. Transplantasyon cerrahisinde traansplante edilen organın iskemi ve reperfüzyonu oluşup, oluşan İ/R

hasarı organ fonksiyonlarını etkilemektedir. Sonuç olarak çoğu cerrahi işlem İ/R hasarına yol açar(27).

Daha önce de belirtildiği gibi iskemik dokuların reperfüzyonu, toksik serbest oksijen radikali (SOR) salınımına yol açar. Salınan süperoksit anyonlar (O_2^-), hipoklorik asit (HOCl), hidroksil radikalleri(OH^-), hidrojen peroksit (H_2O_2) ve peroksinitrittir(32). Serbest radikaller aracılığı ile oluşan hasarda ilk basamak, ksantin oksidazdan O_2^- anyonlarının üretilmesidir(33). İskemi sırasında hücrese ATP, hipoksantin oluşturmak üzere indirgenir. Normal koşullarda hipoksantin, ksantin dehidrogenaz yardımıyla ksantine oksidize edilir. Ancak iskemi sırasında ksantin dehidrogenaz, ksantin oksidaza dönüştürülür. Substrat olarak nikotinamid adenin dinükleotid kullanan ksantin dehidrogenazın tersine, ksantin oksidaz oksijeni kullanır ve bundan dolayı iskemi sırasında hipoksantin ksantine dönüşümünü katalize edemez ve bu da hipoksantin dokuda aşırı seviyelere çıkmasına yol açar. Reperfüzyonla oksijen tekrar sunulduğunda, fazla miktardaki hipoksantin ksantin oksidaz ile dönüştürülmesi toksik SOR oluşumu ile sonuçlanır(31).

Sellüler ve subsellüler membranların lipid peroksidasyonu da, oksijen kökenli SOR' in artırdığı hücre hasarında önemli bir mekanizmadır(32). Hücre membranları içerisinde poliansatüre yağ asitlerinin lipid peroksidasyonu, hücrese bütünlük ve fonksiyon kaybı ile sonuçlanabilir. Bu durum tek başına OH^- radikalleri ile başlatılabileceği gibi, uygun bir şelatör varlığında O_2^- ile de başlatılabilir(28).

2.3. İskemi – Reperfüzyon Modelleri

Ortopedik alt ekstremitte cerrahisinde pnömatik turnike kullanılmasına karşın ratlarda yapılan çalışmalarda alt ekstremitte iskemi/reperfüzyon modeli oluşturmak farklı iskemi modelleri kullanılmıştır(34).

İskemi modelleri; total arteryel(arter akımının tam olarak durdurulması), total venöz(ven akımının dışarıdan (bası, bükülme, v.s.) veya içeriden (tromboemboli) kaynaklanan bir nedenle kesilmesi), total global(dokuya gelen ve dönen kan akımının tam kesilmesini ifade eder), kısmi venöz (ven duvarının arter duvarına göre ince ve zayıf olması, dışarıdan olacak bası ve bükülmelerden daha fazla etkilenme sebebidir ve kısmi etki yaratılabilir.) iskemi yapılarak oluşturulabilir(34).

Yapılan bazı çalışmalarda lastik veya elastik sargı kullanılarak iskemi modeli(35-37) oluşturulmasına rağmen biz çalışmamızda, total arteriyel kan akımının durdurulması modelini tercih ettik(38-40).

2.4. İskemi Reperfüzyon Hasarı

İskemi sonrası dokuda meydana gelen hasarın başlıca nedeni; oksijen ve besin kaynaklarının tükenmesi ve normalde yapılan oksijenli solunumun yerini oksijensiz solunuma bırakmasıdır.

İskemi/reperfüzyon hasarı, yaygın bir durumdur. Kan akımının azalmasına bağlı uzamış iskemiye maruz kalan dokularda, kan akımının yeniden sağlanması sonucu meydana gelir. Klinikte şok, miyokard enfarktüsü ve organ transplantasyonu gibi çok çeşitli klinik ortamlarda ortaya çıkabilen bir patoloji olarak kendini gösterir. İskemi sırasında bir dokuya kan tedariki olmadığından; dokuda oksijen ve substrata ihtiyaç artar. Açığa çıkan toksik metabolitler ve hücresel enerji rezervlerinin tükenmesi hücre yaralanmasına neden olur. Reperfüzyon sırasında, reaktif oksijen türleri (ROS) meydana gelir ve kan dolaşımında artan bu serbest radikaller ve artık ürünler sayesinde doku hasarlanması devam eder. Oksijene en çok ihtiyaç duyan organlardan olan akciğerler, böbrekler, karaciğer, kalp, beyin ve bağırsaklar, dolaşan serbest radikaller sebebiyle zarar görebilir(41).

İskemi sürdükçe; asidoz, makromolekül sentezinin durması, hücre içi ve hücre dışı iyon dengesinin bozulması, ATP yıkım ürünlerinin artımı gibi olaylar meydana gelir(42, 43). Dokular iskemi zamanınca belirli bir ana kadar fonksiyonlarını sürdürebilirler. Daha sonra fonksiyonlarını kaybetmeye başlarlar. Dokunun canlılığını sürdürdüğü süreye ‘kritik iskemi süresi’ denir. Her dokunun belli bir kritik iskemi süresi vardır. Bu süre sinir dokuda 8 saat, deride 24 saat, iskelet kasında 4 saat, yağ dokuda 13 saat, ve kemik dokuda 4 gündür(44). Bu dokular arasında kas dokusunun en az dayanıklı olduğu görülmektedir.

Uzamış iskemi sonrası dokuların reperfüze edilmesine rağmen dolaşımın geri dönmemesine ‘no-reflow’ fenomeni denilmektedir. ‘no reflow’ fenomeni ilk önce beyin dokusunda gösterilmiş daha miyokard dokusunda gösterilmiştir. Kas dokusunda ‘no reflow’ fenomenini gösteren çalışmalar mevcuttur. Tam mekanizması

öz lemezle birlikte, mikrovasküler yapının bozulması sorumlu tutulmaktadır. Tehdit altındaki dokuda mikrovasküler direnç artışı, trombosit artışı, fibrin embolileri ve endotel hasarı olabilecek nedenlerdir(45-47).

Reperfüzyon ile dokunun kanlanması tekrar sağlanması rağmen doku hasarı paradoksal olarak artar(48). İskemi reperfüzyon hasarının mekanizmasının anlaşılabilmesi için süreçlerin tam olarak bilinmesi gerekmektedir.

2.4.1. İskemi reperfüzyon hasarında kompleman sistemi

Kompleman sisteminin aktivasyonu İ/R hasarına katkıda bulunabilir. Bu sistemde aktive olan proteinler; hasarlı dokuda bağlanabilir, hasar görmüş dokulardaki proteinleri bağlayabilir veya hücre hasarını ve inflamasyonunu arttıran ürünler üretebilir. Bunlar, proinflamatuvar komponentlerdir. Başılcı C3a, C5a, iC3b ve C5b-9 olarak sıralanabilir. C5a ve C3a anafolatoksinlerdir ve lökositleri aktive ederler ve kemotaksisin uyarılmasına neden olurlar. Kompleman tarafından sentezi uyarılan lökosit adhezyon molekülleri de etkili olabilir(49-51)

İskemiye bağlı hücre yüzeyinde yeni bir antijen oluşur. Böylece dolaşımdaki immunglobulin M (Ig M) antikoru bu antijene gelip bağlanır. Bunun sonucunda kompleman sistemi bileşenlerinden biri olan C1 bağlanması, kompleman aktivasyonu ve böylece kompleman sisteminin bileşenlerinden C3a ve C3b oluşur. C3b daha sonra kompleman zincirinin geri kalan kısmını aktive ederek ‘‘membran saldırı kompleks’’inin (MSK) oluşumunu sağlar. MSK hasarı oluşturan mediatörlerin temelini oluşturur. MSK ayrıca araşidonik asit metabolizmasını uyararak makrofajlardan prostoglandin E₂, nötrofillerden lökotrien B₄, tromboksan B₂, prostanoidler, interlökin-1 ve reaktif oksijen molekülleri (ROM) salınımı sağlar(52-54). ROM’lar güçlü okside edici ve redükte edici ajanlardır. Böylece lipid peroksidasyonu ile hücre membran hasarı yaratırlar(31).

2.4.2. İskemi reperfüzyon hasarında sitokinler

Sitokinler hücreler arası sinyalleşmeyi sağlayan moleküllerdir. Sitokin terimi ayrıca imm nmodulat r ajanlar (interlökinler ve interferonlar) için de kullanılır. Literatürde; interlökin-1 (İL-1), interlökin-6, tromboxan A₂ (TXA₂), doku nekroz

faktör (TNF)' ün I/R hasarındaki rolleri net olarak belirtilmiştir. Bu sitokinler lökosit ve vasküler endotelial bariyer arasında sinyal oluşturarak lökositlerin selektif adhezyonunu ve transmigrasyonunu sağlarlar(55-59).

2.4.3. İskemi reperfüzyon hasarında nötrofiller

Nötrofiller bölgesel yanıtın oluşmasında çok önemlidirler. İ/R hasarı sonucunda salınan kemotaktik faktörler nötrofilleri kılcal damar ağına doğru yönlendirir. Yapışma moleküllerinin de yardımıyla önce kan dolaşımındaki nötrofiller endotel boyunca yuvarlanma hareketini gerçekleştirir(60). Daha sonra oluşturdukları kuvvetli bağlarla endotele sıkıca yapışırlar. Endotele yapışma hücrelerin harekete geçmesi ve serbest oksijen radikallerini salınması için gereklidir(61). Aktive olmuş nötrofiller antimikrobiyal savunma sisteminde kullandıkları mekanizma olan nikotinamid adenin dinükleotid fosfat (NADPH) oksidaz enzimi aktivasyonu ile reperfüzyon sırasında gelen moleküler oksijeni kullanıp seri reaksiyonlar sonucunda O_2^- radikali, H_2O_2 , OH^- , $HOCl$ ve kloraminleri oluşturarak, ileri doku hasarına yol açar(62). Reperfüzyonda en önemli olay olan 'no re-flow' fenomenine, aktive olmuş nötrofillerin kan akımına engel olan kapiller tıkaçı oluşturarak yol açtığı açar(63).

Reperfüzyon hasarının patogenezinin lökosit infiltrasyonunun sorumlu olduğu birçok çalışma ile de kanıtlanmıştır. Antinötrofil serumun kemoterapotik kullanımı ya da radyasyona maruz tutularak lökopeni yapılan deney hayvanlarında iskemi sonrası doku hasarının önemli ölçüde azalttığı bildirilmiştir(64, 65).

2.4.4. İskemi reperfüzyon hasarında mitokondri

Mitokondri oluşan oksijen radikallerini elektron taşıma sistemi ile indirgemektedir. Normal şartlarda oksidatif fosforilasyonda oluşan radikaller farklı redoks mekanizmaları ile indirgenmektedir. Oysa iskemide mitokondri iş yükü, dolayısıyla da radikal oluşumu artmaktadır. Karşılanamayan indirgenme mitokondri zar yükünü bozarak, mitokondri zarındaki potasyum kanalları ve geçirgen porları açmaktadır. Bu durum mitokondri içine kontrolsüz iyon geçişine ve enerji metabolizmasının bozulmasına neden olmaktadır. Bu da hücrenin apoptozisi ile sonuçlanmaktadır(66).

2.4.5. İskemi reperfüzyon hasarında lipid peroksidasyonu ve malonildialdehid

Lipidler hücre zarını oluşturan temel yapılardandır ve hücreyi dış etkenlerden korumada büyük önem taşır. Lipidler serbest radikallere karşı en duyarlı biyomoleküllerdir. Hücre zarlarındaki kolesterol ve yağ asitlerinin doymamış bağları serbest radikallerle kolayca reaksiyona girerek peroksidasyon ürünleri oluştururlar. Lipid peroksidasyonu gitgide artarak ilerler ve hücrede büyük hasara yol açar. Hücre zarında bulunan lipid radikalleri ($L^{\cdot}$) ve lipid peroksit radikallerinin ($LOO^{\cdot}$) oluşması, hücrede meydana gelen hasarın önemli bir özelliğidir. Lipid peroksit ($LOOH$) yıkılarak aldehitleri oluşturur. Oluşan ürünler hücre içinde yok edilebilir veya hücrenin diğer bölümlerinde hasara yol açabilir. Yağ asitlerinin peroksidasyonu MDA'ı meydana getirir. Yağ asidi oksidasyonunun sonucu oluşarak idrar ve kanda tespit edilebilen MDA oluşur. Bu nedenle kan ve idrarda MDA ölçülmesi lipid peroksidasyon şiddetini gösterir. Lipid peroksidasyonu ürettiği ürünlerle hücreye hasar vererek birçok hastalığa neden olur(67, 68).

2.4.6. İskemi reperfüzyon hasarında nitrik oksit (NO)

Nitrik oksit, L-arjinin'den nitrik oksit sentaz(NOS) enziminin aktivitesi ile oluşur. NO hem normal hem de anormal süreçlerde aktif rol alan bir serbest radikaldir. NO'nun biyolojik olarak; vazodilatasyon, nörotransmisyon, hemostaz, yara iyileşmesi, inflamasyon ve sitotoksosite gibi birçok görevi vardır(69-71). Fakat NO'nun veya türevlerinin (peroksinitrit, nitrojen dioksit) aşırı üretimi durumunda in vivo ortamda mutasyona, septik şoka, tümöral oluşumlara ya da otoimmün hastalıklara sebep olabilir(72-76). Bu nedenlerle NO'nun yüksek seviyelerde oluşumunun önlenmesi bu hastalıklarla daha az karşılaşılmasını sağlayabilir.

NO, bazen antioksidan gibi davranarak lipid peroksidasyonunu engeller. Bazen süperoksid miktarı arttıkça NO, SOD enzimiyle yarışmaya girerek ve $O_2^{\cdot-}$ radikaliyle etkileşerek peroksinitriti ($ONOO^{\cdot}$) oluşturur(77). Böylece nitrik oksitin antioksidan etkisi yok edilir, oksidatif etkisi ortaya çıkar. Peroksinitrit nitrik oksit zehirlenmesinin başlıca sorumlusudur. Peroksinitritin protein ve fosfolipidlere ilgisinden dolayı reaktivitesi yüksektir. Bu nedenle protein ve lipidlerin oksidasyonuna neden olur(78,

79). Peroksinitrit proteinlere direkt zarar vererek nitronyum iyonu (NO_2^+), azot dioksit (NO_2^-), hidroksil radikali (OH^-), gibi toksik ürünlere dönüştür(32). İ/R hasarının oluşmasında oksijen kaynaklı serbest radikaller gibi azot kaynaklı serbest radikaller de önemlidir. Dokudaki nitrit, nitrat düzeylerinin tayin edilmesi azot kaynaklı serbest radikal hasarının bir göstergesi olarak kullanılmaktadır(80).

2.4.7. İskemi reperfüzyon hasarında myeloperoksidaz (MPO)

MPO, nötrofillerin granüllerinde yer alan bir enzimdir. MPO bakterilerin yok edilmesini sağlar. Bu bakterisidal etkiyi hidrojen peroksiti katalizleyerek HOCl oluşturarak yapar. HOCl antimikrobiyal etkisinin yanında çok güçlü bir oksidandır. Hücre zarının geçirgenliğini artırarak doku hasarına sebep olurken aynı zamanda hücredeki bazı moleküllerle reaksiyona girerek ROM'ları oluşturur(81-83). MPO çeşitli modellerde iskemi-reperfüzyonda nötrofil infiltrasyonunun göstergesi olarak kullanılmıştır(84).

2.4.8. İskemi reperfüzyon hasarında ksantin oksidaz (KO)

KO memeli dokularında bulunan, birçok endojen ve ekzojen kaynaklı substratın oksidasyonuna katılan bir enzimdir. Bu enzim sağlıklı hücrelerde oksijenize nikotinamid dinükleotide bağımlı dehidrogenaz (D formu) halinde bulunur. Enzimin bu formu reaktif serbest oksijen radikali üretmez. İskemi sırasında D formu O formuna dönüşerek oksidan üreten forma dönüşür. İskemi sürecinde hücre içindeki ATP, hipoksantin ve ksantine dönüşerek hücresel enerji miktarında azalmaya neden olur. Reperfüzyonun başlaması ile ortama katılan moleküler oksijen, iskemik süreçte birikmiş olan hipoksantin ve ksantin ile O formu aracılığı ile reaksiyona girerek O_2^- ve H_2O_2 açığa çıkarır(85-87).

2.5. İskemi Reperfüzyon Hasarında Serbest Radikaller

İskemik doku hasarının başlıca sebebi üretilen serbest radikallerdir. Bu hipotez 1980'lerin ortasında ilk kez ortaya çıkmıştır ve günümüze kadar iskemi sonrası lezyonlarda oksidatif stres ve ürünlerinin rolü incelenmiştir. Normal dokuda ROS üretimi, süperoksit anyon radikali, hidrojen peroksit, hidroksil radikali, vücutta bulunan antioksidan mekanizmalar ile denge halindedir. Bu denge, endojen

enzimlerin (süperoksit dismutaz, glutatyon peroksidaz, katalaz vb) oluşturduğu reaksiyonlar ve nonenzimatik mekanizmalarla sağlanır (glutatyon, ürik asit, vitamin C ve vitamin E vb). İ/R sonrasında, serbest radikal üretimi artar ve endojen oksidatif denge bozulur(88).

Serbest radikaller dış yörüngede tek sayıda eşleşmemiş elektron içeren atom veya moleküllerdir. Serbest radikallerin dış yörüngelerindeki eşleşmemiş elektron nedeniyle reaktiviteleri çok fazladır, yaşam süreleri çok kısa olmasına rağmen tüm hücre yapısını etkileyebilme özelliğine sahiptirler(89). Bu yapılar bazı spesifik enzimlerin katalize ettiği reaksiyonlarla birbirlerine dönüşerek organizmada dengede bulunurlar.

Serbest radikallerin oluşumu, organizmada endojen kaynaklı olabileceği gibi, dış etkenlere maruziyet sonucu eksojen kaynaklı da olabilir. Örneğin; mitokondriyal elektron taşıma sistemi, endoplazmik retikulumdaki detoksifikasyondan sorumlu sitokrom P-450 sistemi, araşidonik asit metabolizması, fagositoz ile hücre öldürülmesi ve yaşlanma süreci gibi olaylar, serbest radikal oluşturan endojen kaynaklardır. Eksojen kaynaklı reaksiyonlar ise; radyasyon, sigara dumanı, zehirli gazlar, ilaçlar, kanserojen maddeler ve pestisitlere maruziyet sonucu oluşur(90-92)

Normal hücre metabolizmasında düşük miktarlarda oluşan serbest radikaller fizyolojik mekanizmalarla kolaylıkla etkisiz hale getirilebilmektedir. Serbest radikaller çeşitli biyokimyasal reaksiyonları katalize ederler. Hücrenin mitokondriyal enerji metabolizmasında, prostaglandin sentezinde, fagositozda, ksenobiyotiklerin detoksifikasyonunda rol alırlar(89, 93).

Oksijen, serbest radikallerin oluşumunda rol oynayan ve elektron alıcısı olan en önemli moleküldür. O_2 'nin dış yörüngesinde iki serbest elektron vardır. Bir elektron alıcısı olarak reaksiyona girer ve oksidasyon yapar. Oksidasyon sonucunda indirgenmiş olur veya ROS oluşur. Bunlar, serbest radikal zincir reaksiyonlarının başlatılması ve yayılımı ile ilgili olabilen $O_2\cdot$, H_2O_2 , $HO\cdot$, peroksil ($ROO\cdot$) ve alkoksil ($RO\cdot$) radikalleridir ve hücrelere zarar verir. Oksijen dışında serbest radikal oluşturan diğer moleküller arasında karbon, nitrojen, fosfor ve kükürt sayılabilir(91, 94).

Tablo 2.1. Serbest Radikaller ve Radikal Olmayan Moleküller(91)

RADİKALLER	RADİKAL OLMAYANLAR
Süperoksid Anyonu (O_2^-)	Hidrojen peroksid (H_2O_2)
Hidroksil ($OH\cdot$)	Singlet Oksijen ($^*O_2$)
Peroksi ($ROO\cdot$)	Ozon (O_3)
Alkoksil ($RO\cdot$)	Hipokloröz asit ($HOCl$)
Nitrik oksit ($NO\cdot$)	Lipit hidroperoksit ($LOOH$)
Semikinonon radikali ($HQ\cdot$)	Peroksinitrit ($ONOO\cdot$)
Hemoproteine bağlı serbest radikaller	Azot dioksit (NO_2)
Organik radikaller ($R\cdot$)	N-Halojenli aminler ($R-NH-X$)
Organik peroksit radikali ($RCOO\cdot$)	Hipohalöz asit (HOX)

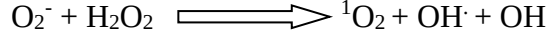
İskemi sırasında ATP kaynakları kullanılmakta ve hipoksantin oluşmaktadır. Reperfüzyon evresinde oksijenin yardımıyla hipoksantin ksantine dönüşmekte ve bu sırada süperoksit (O_2^-) radikali oluşmaktadır. İskemi uzayıp ATP tüketimi arttıkça hipoksantin üretimi dolayısıyla da reperfüzyon sırasında üretilen süperoksit radikallerinin miktarı artmaktadır.

Serbest radikaller organizmada meydana gelen yaşlanma, kanser gelişimi, kronik inflamatuvar hastalıklar, nörodejeneratif hastalıklar, diabetes mellitus ve kardiyovasküler hastalıklar gibi pek çok patolojik süreçle de ilişkilendirilmiştir(95).

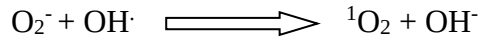
2.5.1. Süperoksit radikali

Süperoksit radikali tüm aerobik hücrelerde ksantin oksidaz ve NADPH oksidaz sistemi aracılığı ile oksijen molekülünün bir elektron alarak indirgenmesiyle oluşur. Bazı durumlarda süperoksit radikalının yapımı hücrel fonksiyonlar için gerekli olmaktadır. Aktive olan fagositik lökositler bol miktarda süperoksit üreterek yabancı organizmaları öldürürler. Genel olarak reaktivitesi düşük olan süperoksit radikalının zararlı olmasının nedeni hidrojen peroksiti oluşturması ve geçiş metal iyonları ile hidroksil radikali oluşturmak için reaksiyona girebilmesidir.

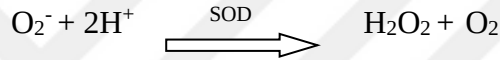
1. H_2O_2 ile tepkimeye girerek hidroksil radikali ($\text{OH}\cdot$) ve singlet oksijen ($^1\text{O}_2$) oluşturabilir.



2. Hidroksil radikali ile tepkimeye girerek singlet oksijen yapımına neden olur.



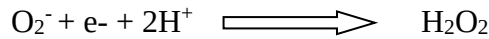
3. SOD aracılığı ile hidrojen peroksit ve oksijene dönüşümü meydana gelir.



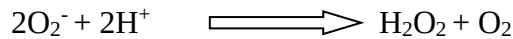
2.5.2. Hidrojen peroksit

Hidrojen peroksit iki yol ile oluşur;

1. Oksijenin iki elektronla indirgenmesi sonucu H_2O_2 ortaya çıkar.

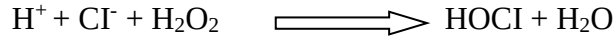


2. Biyolojik sistemlerde sıklıkla görülen süperoksidin üretimiyle oluşmaktadır ve böylece iki süperoksid anyon radikali, hidrojen peroksit ve oksijeni verecek şekilde birbiriyle reaksiyona girerler.

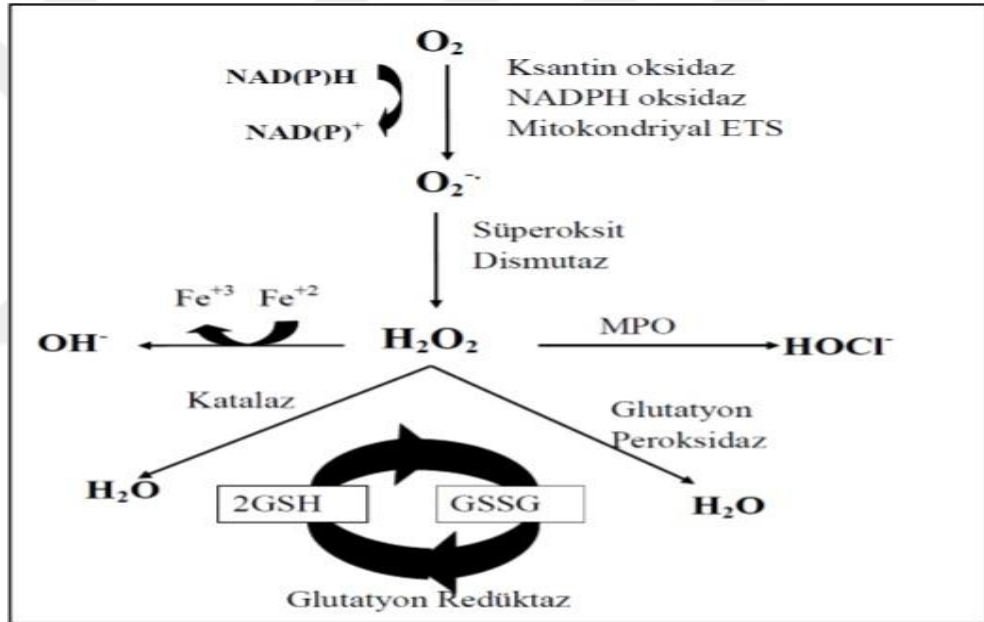


Süperoksit radikallerinin dönüştüğü bu reaksiyonu adı dismutasyon reaksiyonudur. Bu reaksiyon SOD tarafından oluşturulabileceği gibi kendiliğinden de oluşabilir. H_2O_2 yapısında eşleşmemiş elektron içermediği için bir serbest radikal değildir. Myeloperoksidaz enzimiyle tepkimeye girerek reaktif serbest oksijen radikali

olan HOCl'i oluşturur. Ayrıca indirgenmiş geçiş metalleri (örneğin demir veya bakır) varlığında güçlü bir radikal olan hidroksil radikalının öncülü olmasıdır(89).



Alternatif olarak, hidrojen peroksit, katalaz veya glutatyon peroksidaz gibi enzimler ile suya dönüştürülebilir ve bu şekilde uzaklaştırılır(95, 96).



Şekil 2.11. Serbest Radikallerin Dönüşüm Reaksiyonları

2.5.3. Hidroksil radikali

Reaktif oksijen türleri içerisinde bilinen en güçlü ve en reaktif radikaldır. Yarılanma ömrü çok kısadır ve bu nedenle olduğu yerde veya olduğu yerin yakınlarında etkisini gösterir. Hidroksil radikali canlı hücrelerde bulunan bütün moleküllerle reaksiyona girebilmektedir. Proteinlerde denatürasyona, fonksiyon bozukluklarına neden olabilirler. Hücre zarındaki yağ asitleriyle etkileşerek lipid

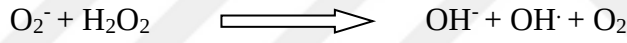
peroksidasyonunu başlatırlar; bu durum da zar yapısının bozularak geçirgenliğinin artmasına ve DNA iplikçiklerinde kırılmalara neden olur. Sonuçta hücre ölümüne yol açabilir(89, 95, 97).

Oksijenin bir elektronu eksik formu ile hidrojenin birleşmesinden oluşur. Oluşması için geçiş metalleri gereklidir. Pek çok molekülden hidrojen atomu çıkarılmasını sağlar.

Demir (Fe) katalizli - Haber Weiss reaksiyonu (Fenton Reaksiyonu)



Katalize olmayan Haber Weiss reaksiyonu



2.5.4. Serbest radikallerin zararları

Serbest radikaller vücutta birçok zarara neden olmaktadır. Belli başlı zararlar bunlardır;

1. DNA hasarı
2. Koenzimlerin parçalanması,
3. Hücrede zar fonksiyonu veya yapısının değişmesi,
4. Lipit metabolizmasında ve enzim aktivitelerindeki bozukluklar,
5. Protein ve lipitlerle kovalent bağlantılar yapması,
6. Hücre zarı geçiş sisteminin bozulması,
7. Hücrede zararlı bazı maddelerin birikimi,

8. Proteinlerin yıkılması ve bu nedenle protein oluşumunun artması,

9. Kollajen ve elastin gibi proteinlerin yapısını bozarak damarlarda tıkanıklığa yol açması,

10. Mukopolisakkaritlerin yıkımı(96)

Tablo 2.2. Hücresel Serbest Radikallerin Etkilediği Moleküller

Etkilenen bileşik	Sonuçlar
Doymamış aminoasitler ve kükürt içeren aminoasitler	a) Protein denatürasyonu b) Çapraz bağlanma c) Enzim inhibisyonu d) Organ ve hücre geçirgenliğinde değişimler
Nükleik Asit Bazları	a) Hücre gelişiminde değişimler b) Mutasyon
Karbonhidratlar	Hücre yüzey reseptörlerinde değişim
Doymamış Lipitler	Kolesterol ve yağ asit oksidasyonu oksidasyonu
Kofaktörler	a) Nikotinamid ve falvin içeren kofaktörlerin aktifliğinde azalma b) Askorbat ve porfirin oksidasyonu
Antioksidanlar	α - tokoferol ve β -karoten gibi antioksidanların aktifliğinin azaltılması
Proteinler	a) Denatürasyon b) Peptid zincirlerde kırılmalar
DNA	a) Baz modifikasyonları b) Zincirde kırılmalar
Hyalüronik asit	Sinoviyal sıvının viskozitesinde değişim

2.6. İskemi Reperfüzyon Hasarında Antioksidanlar

Serbest radikallerin oluşturduğu oksidatif strese karşı organizma çeşitli savunma mekanizmaları oluşturmuştur. Bunlar koruyucu mekanizmalar, onarım

mekanizmaları, fiziksel savunmalar ve antioksidan savunmalar olarak sıralanabilir. Serbest radikallerin oluşumunu önleyen ve/veya oluşan serbest radikallerin hasar oluşturmasını engelleyen maddelerin tümüne birden antioksidan denir. Antioksidan maddeler, aynı zamanda radikalleri kendilerine bağlayıp reaksiyon zincirini kırarak ve okside olarak zarar görmüş hücresel yapıları onararak etki gösterirler(98, 99)

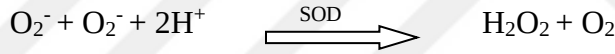
Dokuların ve organların farklı oranlarda oksijen tüketimi ve metabolik aktivitesi olduğundan; her dokunun antioksidan kapasitesi birbirinden farklıdır. Organizmalarda çevresel toksik maddelere duyarlılıkta farklı olduğundan, antioksidan sistemler de farklılık gösterebilir(99). Literatürde birçok antioksidan madde tanımlanmış ve çalışılmıştır.

Tablo 2.3. Antioksidan Maddelerin Sınıflandırılması

Enzimatik Antioksidanlar	Enzimatik Olmayan Antioksidanlar
Primer:	Vitamin E
Süperoksid dismutaz	Vitamin C
Glutasyon peroksidaz	Flavonoidler
Glutasyon transferaz	Deferoksamin
Katalaz	Melatonin
Sekonder:	Ebselen
NADPH-Kinon oksidoredüktaz	P-karoten
Glutasyon S-transferaz	Ürat
Epoksit hidrolaz	Seruloplazmin
Glukronil transferaz	Transferrin
Sulfonil transferaz	Albumin
Glutasyon redüktaz	Haptogloblin
Glukoz-6-fosfat dehidrogenaz	Likopen
6-fosfoglukonat dehidrogenaz	Metallotiyonein
İzositrat dehidrogenaz	Bilirubin
Okside glutasyon ve konjugat taşıyıcıları	Ubikinon

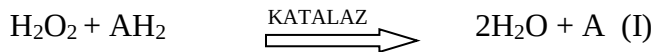
2.6.1. Süperoksit dismutaz

SOD, yüksek derecede reaktif süperoksit anyonun O_2^- 'ye ve daha az reaktif tür H_2O_2 'ye bozunmasını katalize eden metalloprotein yapısında antioksidan enzimdir. İnsanlarda SOD hücre içi, mitokondriyal ve sitozolik olmak üzere üç şekilde bulunur ve yüksek reaksiyon hızlarına sahiptir. Vücutta serbest radikallere karşı oluşan ilk savunma SOD enzimiyle gerçekleşir. Süperoksitler, radikal tepkimeleri başlatır. Böylece reaktif ve toksik etkili radikallerin yapımı engellenmiş olur. Organizmada oksidan stresin arttığı durumlarda SOD aktivitesi artarak koruyucu etkinliği sürdürmeye çalışır. Özellikle diğer enzimatik radikal temizleyicilerin aktivitelerinde azalma söz konusu olduğunda SOD aktivitesinde artma gösterilmiştir. SOD, katalaz ve glutatyon peroksidazdan farklı olarak serbest radikali substrat olarak kullanır(99, 100).



2.6.2. Katalaz

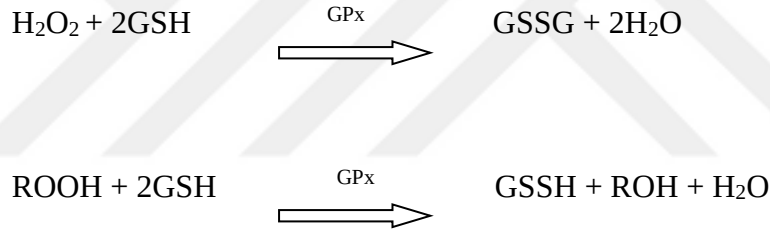
Katalaz, tüm hücre tiplerinde bulunan alt birim başına tek bir ferriprotoporfirin grubu içeren bir tetramerik enzimdir. SOD enziminin oluşturduğu hidrojen peroksit serbest radikal olmamasına rağmen en reaktif radikallerden olan hidroksil radikalini oluşturur. Bu nedenle çok fazla oksidatif hasara yol açar. Katalaz enzimi hidrojen peroksiti; su ve moleküler oksijene parçalar. Böylelikle hidrojen peroksiti ortadan kaldırarak hidroksil radikalinin oluşmasını engellemiş olur(99).



2.6.3. Glutasyon peroksidaz

Antioksidan savunma mekanizmalarının en önemli enzimlerinden biridir ve bu sitozolik enzim tetramerik dört selenyum atomu içerir. Glutasyon peroksidaz, hücre membran lipidlerini oksidatif hasara karşı korur ve bunu H_2O_2 ve organik hidroperoksitlerin detoksifikasyonunu sağlayarak yapar. Eritrositlerin membran bütünlüğünün sağlanmasında önemli rolü vardır. GPx, selenyuma bağımlı ve bağımsız olmak üzere iki gruba ayrılır. Selenyuma bağımlı GPx; monomerik yapıda selenyum içerir ve eritrositlerde bulunan türü bu gruba dahildir. Selenyumdan bağımsız GPx ise özellikle karaciğer mitokondrilerinde aktiftir.

GPx, aşağıda belirtilen reaksiyon basamaklarında rol almaktadır;



GPx, substrat olan H_2O_2 'yi katalaz ile paylaşmasına rağmen, lipid ve diğer organik hidroperoksitlerle etkili bir şekilde tepki verebilir, bu da düşük seviyeli oksidan strese karşı en büyük koruma kaynağıdır(99, 100)

2.6.4. C vitamini (askorbik asit)

Vücutta serbest radikallerin oluşturduğu zararlı etkiye karşı ilk savunmayı sağlar, güçlü bir indirgeyici ajandır ve lipid peroksidasyonunu engeller(101). Suda çözünen en güçlü antioksidan moleküldür. Hücreleri oksidatif hasara karşı savunur(102). Askorbik asit, E vitamininin ve redükte glutatyonun rejenerasyonunu sağlayarak yeniden kullanıma sokar.

2.6.5. E vitamini

Lipofilik bir antioksidan olan E vitamini hücre membranında ve lipoproteinlerde bulunur. Lipid peroksidasyonuna karşı koruyucu serbest radikal temizleyicilerindendir. Hücre membranlarında ve dolanan lipoproteinlerde bulunur. E vitamini zincir kırıcı bir antioksidan olup, her bir E vitamini molekülü iki oksidasyon zincirini durdurabilir. C vitaminini lipid peroksidasyonunu önlediği gibi E vitamini de bu faydayı sağlar. Aynı zamanda singlet oksijenin kuvvetli bir tutucusudur. Ayrıca hidroksil radikali, peroksil radikali ve süperoksitle direkt olarak reaksiyona girebilir. Okside olan E vitamini, parçalanmadan önce askorbik asit ve glutatyon tarafından tokoferole geri çevrilebilir. Yüksek doz E vitamini ve askorbat kombinasyonunun güneşten gelen zararlı ışınların oluşturduğu immünsupresyonu azalttığı gösterilmiştir(101).

2.6.6. Melatonin

Melatonin başlıca pineal bezden sentezlenip salgılanan bir hormondur. Sentezlenmesi için karanlığa ihtiyaç duyar. Oral uygulamırsa ilk geçiş etkisine maruz kalarak etkisi azalır. Melatonin başlıca karaciğerde metabolize edilir ve idrar ile atılır. Melatonin jetlag tedavisinde ilaç olarak kullanılmaktadır. Melatoninin antikanser etkisi olduğu, hücrel hasarı onardığı ve bağışıklığı güçlendirdiği gösterilmiştir(103).

Melatonin ve metabolitlerinin direkt serbest radikal temizleyici etkisi vardır(104). En reaktif radikallerden birisi olan hidroksil radikali ile direkt reaksiyona girer. Melatonin; reperfüzyon sonrası iskelet kasında meydana gelen doku hasarının azalttığı gösterilmiştir(105). Nitrik oksit sentetaz gibi preoksidatif enzimleri baskılar. Melatoninin glutatyon peroksidaz antioksidan enzim sisteminin sentezini direkt uyardığı gösterilmiştir(106).

2.6.7. Ürik asit (ürat)

Ürik asit, ksantin oksidazın ksantin, hipoksantini oksitlemesi ile oluşur. Pürin metabolizmasının son ürünüdür. Ürat, fizyolojik koşullarda singlet oksijen, hipoklorid ve hidroksil radikali gibi reaktif bileşikler baskılar, fakat süperoksit radikali ile

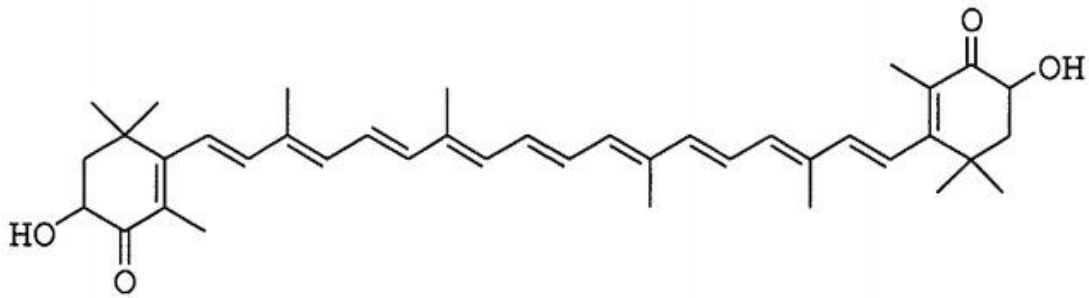
doğrudan reaksiyona girmez, peroksit kaynaklı lipit peroksidasyonuna karşı korur. Demir ve bakırı bağlayarak zararlı etkilerini engeller(107).

2.6.8. Karotenoidler (β karoten, likopen, α karoten, β crytoksantin)

En potent olanı, hakkında en çok çalışma yapılmış olan β karotendir. Vitamin A epiteli koruyarak kronik foto yaşlanmayı azaltır. Potansiyel antikarsinojen etkisi vardır(101).

2.7. Çalışmamızda Kullandığımız Antioksidan Astaksantin

Karotenoidlerin keton ailesinden olan astaksantin özellikle deniz canlılarının kabuklarında doğal olarak bulunan kırmızı renkli bir pigment olup, hücre membran yapısının korunmasında etkili bir mekanizmaya sahip olduğu bildirilmektedir(11). Bazı canlılar renk pigmenti yönünden oldukça zengindirler. Astaksantin içeren *Haematococcus pluvialis* bir klorofit alg türünden olup, organizmasında en yüksek düzeyde astaksantin biriktirmektedir(108). Kimyasal olarak β -karotene ve A vitaminine benzerdir.



Şekil 2.12. Astaksantinin kimyasal yapısı(108)

Astaksantin diğer karotenoidlere göre ısıya karşı dayanıklı olup, renk değişikliği göstermemektedir. Diğer antioksidanlara kıyasla yapısında oksijen içermesi ve lipofilik olması nedeniyle kan-beyin bariyerini kolaylıkla geçebilmektedir ve santral sinir sistemi ile beyin hücrelerini koruyucu etki gösterdiği bildirilmektedir(109, 110). Mitokondrium içinde gerçekleşen birden fazla oksidatif

reaksiyon sonucunda oluşan SOR hücrede oksidatif hasara neden olduğu bildirilmektedir(111).

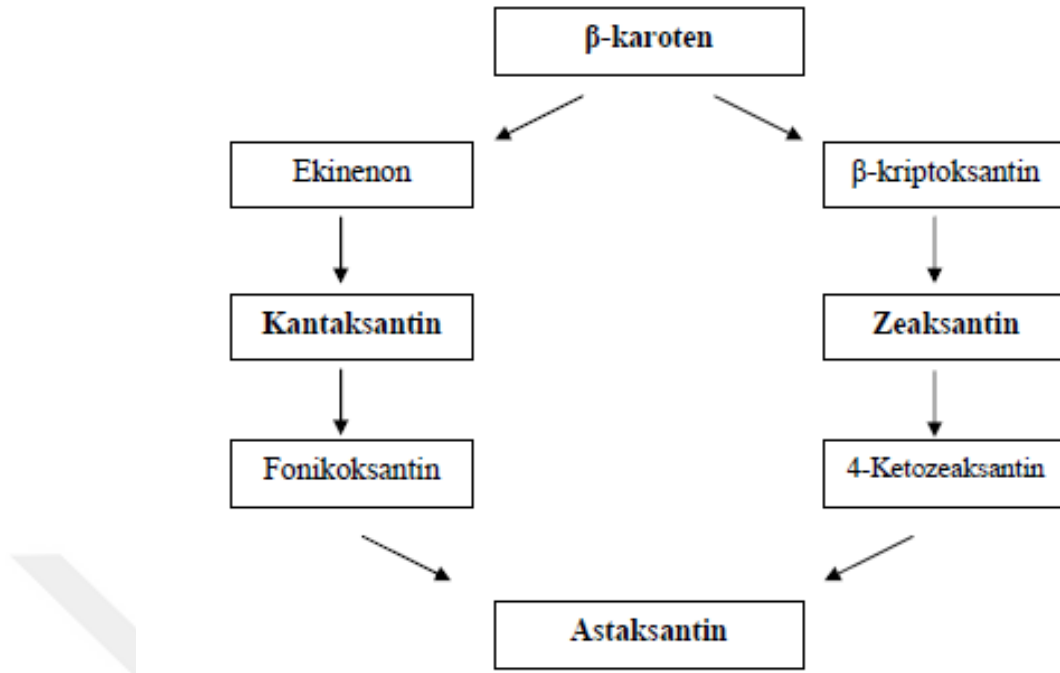
Astaksantin pigmenti doğadaki en kuvvetli ve zararsız antioksidan olarak kabul edilmektedir. Antioksidan aktivitesinin C vitamininden 6000 kat, koenzim Q10'dan 800 kat, E vitamininden 600 kat, karotenden 10 kat daha güçlü olduğu gösterilmiştir. Astaksantin, in vivo ve in vitro sistemlerde lipid peroksidasyonu ve oksidatif strese karşı en etkili antioksidanlardan biri olduğu gösterilmiştir.

2.7.1. Astaksantin biyosentezi

Astaksantin biyosentezi birkaç deniz canlısında yapılmakla birlikte *Hematococcus pluvialis* adlı algin doğal astaksantin biriktirme özelliği vardır. *Haematococcus pluvialis* tek hücreli bir mikroalgdır ve aşırı ışık, yüksek sıcaklık, besin eksikliği vb. koşullarda strese girerek astaksantin sentezini sağlar. Stres koşulları altında indüklenen hücrelerde biriken astaksantin mono ve di esterleri toplam karotenoidin %98'ni oluşturur ve hücre kuru ağırlığının yaklaşık %4'ü kadar astaksantin birikebilir(112, 113).

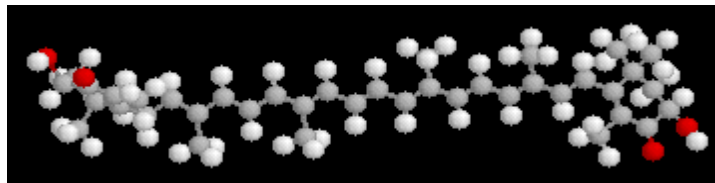
Haematococcus pluvialis'de astaksantin biyosentezinin nasıl gerçekleştiği hakkında araştırmalar devam etmekte olup henüz tam olarak kesin bir sonuca ulaşılamamıştır. Bu prosesin β -karoten ile başladığı ve kültür koşullarına bağlı olarak kantaksantin veya zeaksantin ile devam ettiği düşünülmektedir(114, 115).

Haematococcus'un genel kompozisyonu karotenoidler, yağ asitleri, proteinler, karbonhidratlar ve minerallerden oluşmaktadır(116). Astaksantin ilk defa bir ıstakoz ekstresinden 1938 yılında karakterize edilmiş ve isimlendirilmiştir. 1944 yılına kadar 'Haematochrom' olarak bilinen bu pigmentin Tisher tarafından, *Haematococcus*'un temel pigmenti olan astaksantin olduğunun belirtilmesi ile yanlışlık düzeltilmiştir.



Şekil 2.13. *Haematococcus pluvialis*'de astaksantin biyosentezi(114)

Astaksantin, lipid peroksidasyonuna ve oksidatif strese karşı hücre zarını ve dokuyu koruma özelliğindedir. Yüksek antioksidan aktivite gösterir. Antioksidan aktivite, hidroksil, peroksil gibi serbest radikallere karşı hücreyi koruma görevidir. Serbest radikaller bünyelerinde çiftleşmemiş elektron içeren atomlar yada bileşiklerdir. Bunlar protein, enzim gibi yapılardan elektron alarak kendi yapısının elektron çiftini tamamlarken diğer yapıda dejenerasyona neden olur. Astaksantin antioksidan aktivitesi, Vitamin-E'den 500 kat, β -karoten'den 10 kat daha etkilidir(117-121)



Şekil 2.14. Astaksantin üç boyutlu yapısı(122)

Astaksantin tanımı şu şekildedir(116):

Kimyasal adı : 3,3'-dihidroksi- β , β -karoten-4,4'-dion

Moleküler formülü : C₄₀H₅₂O₄

Moleküler ağırlığı : 596.82

CAS numarası : 472-61-7

EINECS numarası : 207-451-4

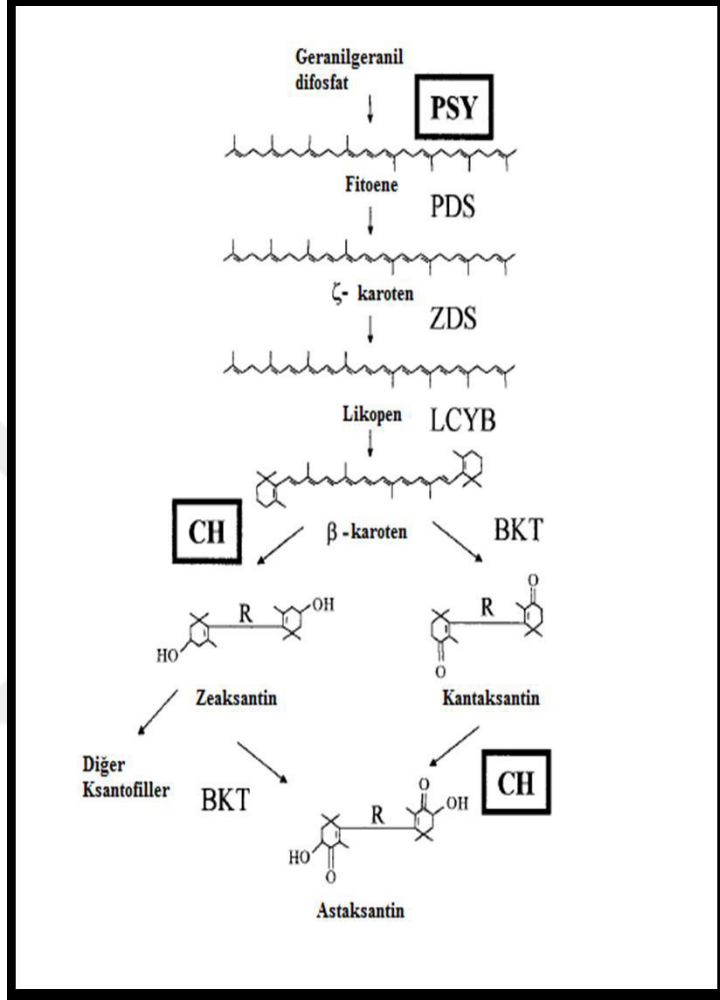
Astaksantin kimyasal sentetik formda ve doğal formda olmak üzere iki tipte bulunur. Sentetik formda olanlar, doğal olmayan konfigürasyonda astaksantin bileşikler içerir. Mikroorganizma kullanılarak üretilen doğal kaynaklı astaksantin formu bu nedenle daha değerlidir(114, 118).

Astaksantin sentezleyen diğer mikroorganizmalara göre en yüksek astaksantin içeriğine sahip olan yeşil alglerden *Haematococcus Pluvialis* Flotow olduğu rapor edilmiştir(123). Değerli bir pigment olan astaksantin ticari üretiminde, kullanılmaya en uygun adayın *Haematococcus Pluvialis* Flotow olması, bu algi özel ve önemli kılmalıdır.

Dünyada astaksantin üretimini gerçekleştiren pek çok kuruluş bulunmaktadır. Kimyasal olarak sentezini ilk gerçekleştiren 1990 yılında Roche olmuştur. Doğal yöntemlerle üretimini sağlayan en önde gelen şirketler Hawaii'de bulunan Aquasearch ve Cyanotech'tir. Doğal yollarla üretilen astaksantin de farmasötik ve gıda sanayiinde kullanılacak saflığa getirilerek son ürün olarak piyasaya sunulur(8).

Astaksantin biyosentezi geranilgeranil difosfat molekülünün fitoen formuna dönüşmesi ile başlar ve bunu fitoen sentaz enzimi başlatır. β -karotenin biyosentezi dörtlü zincir reaksiyonu önderliğinde gerçekleşir ve likopen sentezlenir. Bunu takiben de ikili döngü reaksiyonu gerçekleşir. *Hematococcus pluvialis*'deki β -karotenin astaksantine dönüşmesi, β -karoten ketolaz (BKT) ve karotenoid hidroksilaz (CH) enzimleri ile olur. Döngünün birinde BKT, β -caroteni kantaksantine dönüştürür. CH de kantaksantini astaksantine dönüştürür. Döngünün diğerinde ise CH, β -Karoteni

zeaksantine dönüştürür. BKT de zeaksantini diğer ksantofil ve astaksantine dönüştürür(124, 125).



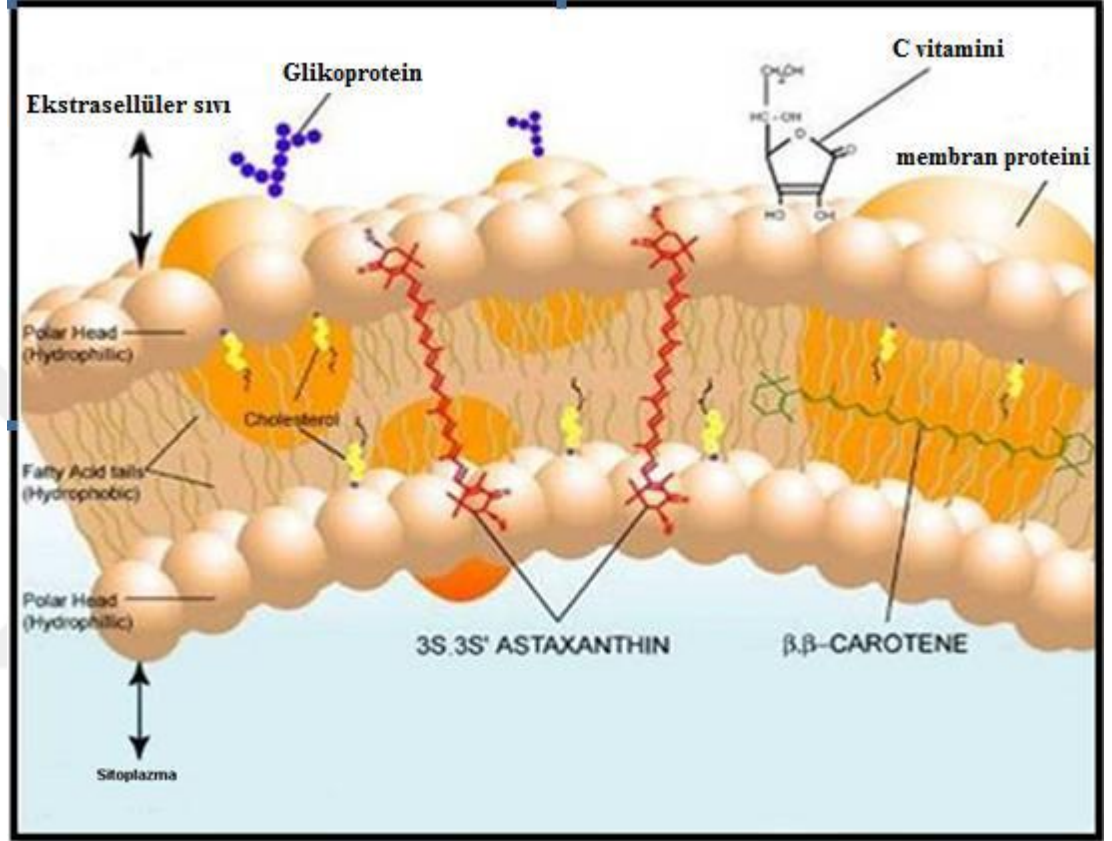
Şekil 2.15. Astaksantin biyosentezi(124)

Astaksantin biyosentezinde rol oynayan enzimler; Fitoen sentaz (PSY), Fitoen desaturaz (PDS), ζ- karoten desaturaz (ZDS), Likopen siklaz (LCYB), karotenoid hidroksilaz, β-karoten ketolaz

2.7.2. Astaksantin etki mekanizması

Astaksantin diğer karotenoidler gibi tekli oksijenin uyarılmasıyla açığa çıkan enerjiyi emerek tekli oksijen ve diğer serbest radikalleri elektrondan zengin polien

zincirlerini oluşturarak uzaklaştırılmasını sağlar. Bu şekilde astaksantin hücreleri ve dokuları hasardan korur. Karotenoid yapısı değişmeden kalır ve tekrar radikal tutucu olarak kullanılmaktadır.



Şekil 2.16. Astaksantin hücre zarındaki durumu

Astaksantin, karotenoid grubuna dahil bir antioksidanttır. β -karotenle hemen hemen aynı biyosentezi kullanır. Oluşan polien zincirleri hücreyi serbest radikallerden korumada rol oynamaktadır.

Astaksantin 3 mekanizma ile hücreleri korumaktadır:

- 1- Tekli oksijeni uzaklaştırma ve ısı olarak enerjiyi dağıtma,
- 2- Zincir reaksiyonlarını önlemek veya sonlandırmak için radikallerin uzaklaştırılması,

3- Membran lipid peroksidasyonunu inhibe ederek membran yapısını korumaktadır.

Astaksantinin aynı zamanda keto-hidroksil gruplarını içerdğinden bu özel moleküler yapısından dolayı hücre zarına çok iyi oriyente olmakta ve hücrenin hem iç ve hem de dış membranında kalıcı olmasını sağlanmaktadır. Astaksantinin bu özelliğı sadece iç veya dış membranda lokalize olabilen beta-karoten ve vitamin C'ye göre hücreyi membran peroksidasyonundan daha iyi bir korumaktadır.

Astaksantinin insanlar üzerindeki etkisi ile ilgili çalışmalar gün geçtikçe artmaktadır. Yapılan araştırmalarda güneş ışınlarına karşı koruyucu olduğı, Parkinson gibi nörodejeneratif hastalıkların önlenmesi üzerine olumlu etkileri olduğı tespit edilmiştir. Son yıllarda, İ/R hasarına karşı astaksantinin antioksidan etkisine daha fazla dikkat çekilmiştir(126).

2.7.3. Astaksantinin faydaları

Astaksantinin güçlü, biyoaktif antioksidan özelliğinin insan sağığı ve canlılar üzerine farklı olumlu etkileri şu şekilde sıralanabilir;

Anti-inflamatuvar etki göstermektedir.

Antikor sayısını arttırarak bağışıklık sistemini güçlendirir(117, 127).

Kan-beyin bariyerini geçerek nörodejeneratif hastalıkların karşı koruyucu etki göstermekte,

Vücudumuzun her yerinde olumlu antioksidan etki göstermektedir.

Ultraviöle ışınlarının zararlı etkilerinden deriyi korur(118, 128).

Yaşlanmadan kaynaklanan cilt dejenerasyonunu iyileştirir(122).

Alzheimer ve parkinson hastalıklarının oluşumunu azaltır(8).

Kanser hücrelerinin oluşumunu engeller(129, 130).

Kalp krizi riskini düşürmeye yardımcıdır.

Kolesterol düzeyini düzenler(8).

Hipertansiyonu önlemede yardımcıdır.

Prostat hiperplazisini düzeltmeye yardımcıdır.

Diyabeti önlemede önemli etkileri bulunmaktadır.

Gözleri ve deriyi radyasyonun zararlı etkilerine karşı korumaktadır.

Retinayı oksidatif zarardan korur(8).

Retina bariyerini geçebilen bir antioksidandır(15, 131)

2.7.4. Astaksantin kullanım alanları

Astaksantin, akuakültür ve gıda sanayilerinde pigment kaynağı olarak kullanılırken, kozmetik ve farmasötik sanayilerinde de yüksek antioksidan aktivitesi nedeni ile uygulama alanı bulur(117, 132). Gıda sanayisinde, insan sağlığı üzerine olumlu etkilerinden dolayı kullanımı yaygınlaşmaktadır(133). Astaksantin insan diyet katkısı olarak kullanımı, U.S. Food and Drug Administration (FDA) tarafından onaylanmıştır.

2.7.5. Astaksantin pazarı

Astaksantin ticari satış fiyatı yaklaşık olarak 3000 \$/kg'dır. Özellikle akuakültür sanayisine satışta, pazarın %95'lik kısmına kimyasal sentetik formdaki astaksantin sahipken, %5'lik kısmına alglerden ekstrakte edilen doğal kaynaklı astaksantin sahiptir. Aquakültür sanayiindeki gelişimle birlikte 2000 yılından itibaren yılda 100 ton astaksantin talep edilmeye başlanmıştır. Bu potansiyel talep mikrobiyal kaynaklı astaksantin üretimi için büyük pazarların açılmasına neden olabilir. Birkaç araştırma grubu tarafından mikrobiyal kaynaklı astaksantin büyük çaplı üretiminin kurulmasına yönelik girişimler yürütülmektedir(134).

Aquakültür sanayii için büyük çaplı kimyasal astaksantin üretimi, ilk olarak İsviçre'de Hoffman La Roche tarafından 1990'lı yıllarda başlatılmıştır. La Roche firmasının tahmini yıllık üretimi 80 ton olup, dünya astaksantin pazarında 2000 yılında 200 milyon \$'lık bir satış rakamına ulaşmıştır.

İlk olarak doğal kaynaklı astaksantin üretimi Hawai’de iki farklı firma olan Cyanotech ve Aquasearch tarafından başlatılmıştır. Her iki firmada farklı modellerde üretim gerçekleştirmektedir. Cyanotech firması Spirulina üretiminde kullandığı açık havuzları modifiye ederek *Haematococcus* üretimine uygun hale getirirken, Aquasearch firması yeni bir üretim modeli geliştirerek kapalı reaktörde mikro alg üretiminde artışı hedeflemiştir. Her iki firmada hedeflerinden uzakta kalarak aylık 1-2 tonluk astaksantin üretiminin üzerine çıkamamış ve iki firma arasında işbirliğine gidilmiştir. Üretimi arttırmayı hedefleyen bu birleşme medyaya da yansımış, ancak bu girişimler başarıya ulaşmamış istenen sonuçlar elde edilememiştir(135).

Haematococcus’dan astaksantin üretimi için ticari en son girişim İsrail’de Negev çölünün güney kısmında Ben Gurion Üniversitesinin Jacob Blaustein Araştırma Enstitüsünde gerçekleştirilmiştir. Üretimin ilk yılı 500 kg’lık astaksantin üretimi yapılmış ve son yıllarda üretim kapasitesi 50 tona ulaşmıştır. Üretim, güneş ışığından yararlanılarak tübüler reaktörlerde gerçekleştirilmektedir(135).

2.8. Total Antioksidan Kapasite

Vücudumuzda endojen ve eksojen serbest radikallerin oluşturduğu oksidatif stresi yenmeye çalışan antioksidan savunma sistemi mevcuttur. Antioksidan savunma sistemi bu zararlı reaksiyonları önler veya inhibe eder. Plazmada antioksidanlar sürekli etkileşim halindedirler. Bu maddeler sinerjist olarak çalışmaktadırlar. Ayrıca bir antioksidandaki azalma diğerindeki artış ile hemen kompanse edilebilmektedir.

Antioksidanların bu etkileşimi, tek tek yaptıkları etkinin toplamından daha kuvvetli bir etki oluşturmuş olur ve bu da total antioksidan kapasiteyi oluşturur. Farklı antioksidanların serum veya plazma konsantrasyonları laboratuvarlarda ayrı ayrı ölçülebilir, ancak ölçümler zaman alıcı, masraflıdır. Bundan dolayı, bir numunenin toplam antioksidan yanıtı ölçülür ve bu toplam antioksidan kapasite (TAK), toplam antioksidan aktivite, toplam antioksidan güç, toplam antioksidan durum olarak ta adlandırılabilir.

Total antioksidan kapasitenin ölçümü, antioksidanların ayrı ayrı seviyelerinin ölçümünden daha önemlidir. Bu nedenle kandaki antioksidan düzeyini saptamada ayrı ayrı antioksidanların hesaplanması yerine bunların toplam antioksidan değerini veren

toplam antioksidan kapasite ölçümü kullanılmaktadır. Kan vücutta oluşan oksidan durumların önlenmesinde önemli bir role sahiptir. Antioksidanların tüm vücuda dağıtılmasını sağlar(136-138).

2.9. Total Oksidatif Seviye

Oksidatif seviye; reaktif oksijen ürünlerinin, antioksidan enzim ve maddeleri aşması durumudur. Oksidatif metabolizmanın dengesini bozar. Bu fenomen, aşırı reaktif oksijen türlerinin üretimi veya antioksidan tampon mekanizmasının eksikliği sonucu oluşur. Oksidatif seviyenin toplam değeri; total oksidatif stres veya total oksidan status/seviye (TOS) olarak ifade edilir. Tam otomatik kolorimetrik bir yöntemdir. Total oksidatif seviyesinin ölçümü, oksidatif streste rol oynayan maddelerin seviyelerinin tek tek ölçümünden daha değerli bilgiler verir(139).

3. GEREÇ VE YÖNTEM

3.1. Deney Hayvanları

Çalışmamızda, Abant İzzet Baysal Üniversitesi Deney Hayvanları Uygulama ve Araştırma Merkezi'nden temin edilen ağırlıkları 200-250 gr. arasında değişen 32 adet 2-4 aylık sağlıklı dişi Wistar-Albino cinsi ratlar kullanıldı. Denekler 22-24°C ısı ve %45-50 nemli odalarda 12 saat aydınlık, 12 saat karanlıkta barındırılmışdır. Herhangi bir yem ve su kısıtlaması yapılmaksızın ad libitum beslendi.

Deney öncesi Abant İzzet Baysal Üniversitesi Hayvan Araştırmaları Yerel Etik Kurulu'na başvuruldu. 2017/13 karar numarası ile 22 Şubat 2017 tarihinde etik kurul tarafından onaylanmıştır. Tüm hayvan deneyleri, Abant İzzet Baysal Üniversitesi Deney Hayvanları Uygulama ve Araştırma Merkezi'nde gerçekleştirildi. Biyokimyasal parametreler Abant İzzet Baysal Üniversitesi Tıp Fakültesi Biyokimya Anabilim Dalı Laboratuvarı'nda çalışıldı. Histopatolojik parametreler Abant İzzet Baysal Üniversitesi Tıp Fakültesi Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı Laboratuvarı'nda çalışıldı.

3.2. Deney Grupları

Çalışmada kullanılan 32 adet rat randomize olarak her grupta ve kafeste sekiz adet olacak şekilde dört gruba ayrıldı. C grubu ve D grubundaki 1'er ader rat çalışma sürecinde öldü.

Grup A. Kontrol grubu: Ratlara herhangi bir işlem uygulanmadı. Anestezi altında intrakardiyak ponksiyon ile 4 ml kan örneği ve gastroknemius kası doku örneği olarak alınarak ratlar sakrifiye edildi.

Grup B. İskemi/reperfüzyon grubu: Anestezi altında ratların sol taraf femoral arterleri klemlenerek iskemi oluşturuldu ve 2 saat sonra klemp açılarak reperfüzyon sağlandı. 1 saat reperfüzyon sonrası intrakardiyak ponksiyon ile 4 ml kan örneği ve gastroknemius kası doku örneği olarak alınarak ratlar sakrifiye edildi.

Grup C. İskemi/reperfüzyon + Tedavi grubu: Ratlara 14 gün boyunca astaksantin (40mg/kg) oral yolla verildi (Şekil 3.1.). 15. gün anestezi altında ratların sol taraf femoral arterleri klemlenerek iskemi oluşturuldu ve 2 saat sonra klemp açılarak reperfüzyon sağlandı. 1 saat reperfüzyon sonrası intrakardiyak ponksiyon ile 4 ml kan örneği ve gastroknemius kası doku örneği olarak alınarak ratlar sakrifiye edildi.

Grup D. İlaç grubu: Ratlara 14 gün boyunca astaksantin (40mg/kg) oral yolla verildi. 15. gün anestezi altında intrakardiyak ponksiyon ile 4 ml kan örneği ve gastroknemius kası doku örneği olarak alınarak ratlar sakrifiye edildi.

3.3. Anestezi Uygulaması

Çalışmaya dahil edilen bütün hayvanlara deneye başlangıç aşamasında aynı anestezi indüksiyonu uygulandı. Anestezi, 90 mg/kg ketamin ve 10 mg/kg ksilazin HCI ile intramusküler enjeksiyon yolu kullanılarak sağlandı.



Şekil 3.1. Oral yolla astaksantin uygulanması

3.4. Deneyin Yapılışı ve Örneklerin Alınması

A ve D grubundaki ratlar sırtüstü pozisyonda tespit edildi (Şekil 3.2.). Daha sonra ratların karın ve göğüs bölgesi traşlandı. Betadin ile boyanarak örtüldü. Orta hat insizyonu ile batına girildikten sonra diyaframın proksimaline doğru göğüs kafesi açılarak median sternotomi uygulandı. Kalbe ulaşıldı. Ratlardan intrakardiyak ponksiyon ile 4 ml kan örneği alındı ve sol dizden sol ayak bileğine kadar cilt açılarak gastroknemius kası doku örneği olarak alınarak ratlar sakrifiye edildi.

B ve C grubundaki ratlar sırtüstü pozisyonda tespit edildi. Daha sonra ratların karın, göğüs bölgesi ve sol inguinal bölgesi traşlandı (Şekil 3.3.).



Şekil 3.2. Ratlara ketamin ksilazin anestezisi verdikten sonra sırtüstü pozisyonda sabitlenmiş hali



Şekil 3.3. Sol inguinal bölgenin traşlanmış hali

Bu bölgeler betadin ile boyanarak örtüldü (Şekil 3.4., 3.5.).

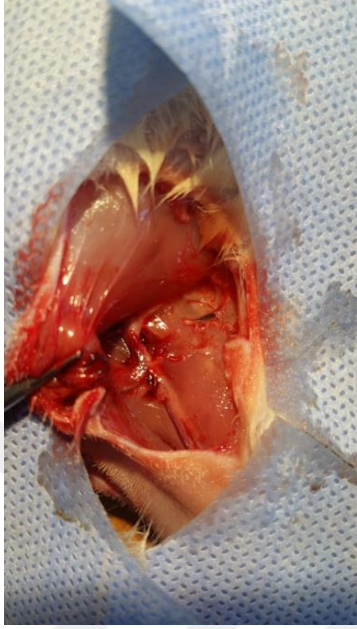


Şekil 3.4. İnguinal bölgenin betadinle boyanmış hali

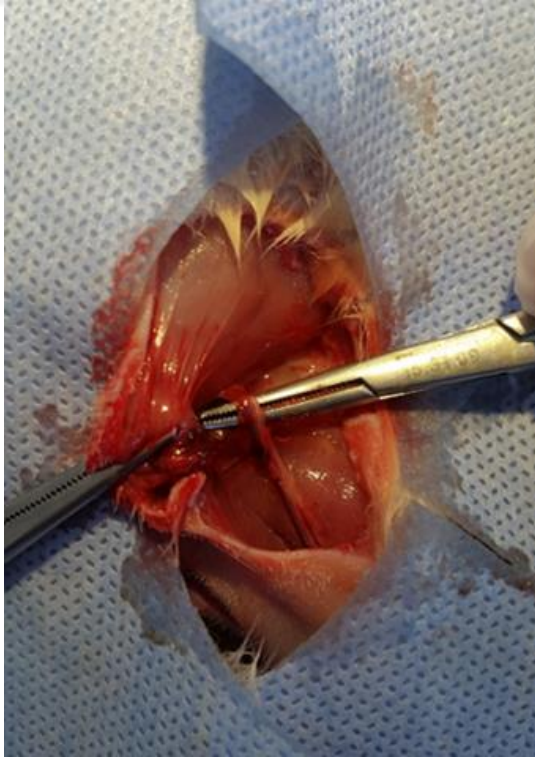


Şekil 3.5. Ratların boyandıktan sonraki örtülü hali

Sol inguinal insizyonla girildi (Şekil 3.6.). Cilt, cilt altı geçilerek ve yumuşak dokular sıyrılarak femoral artere ulaşıldı (Şekil 3.7.).

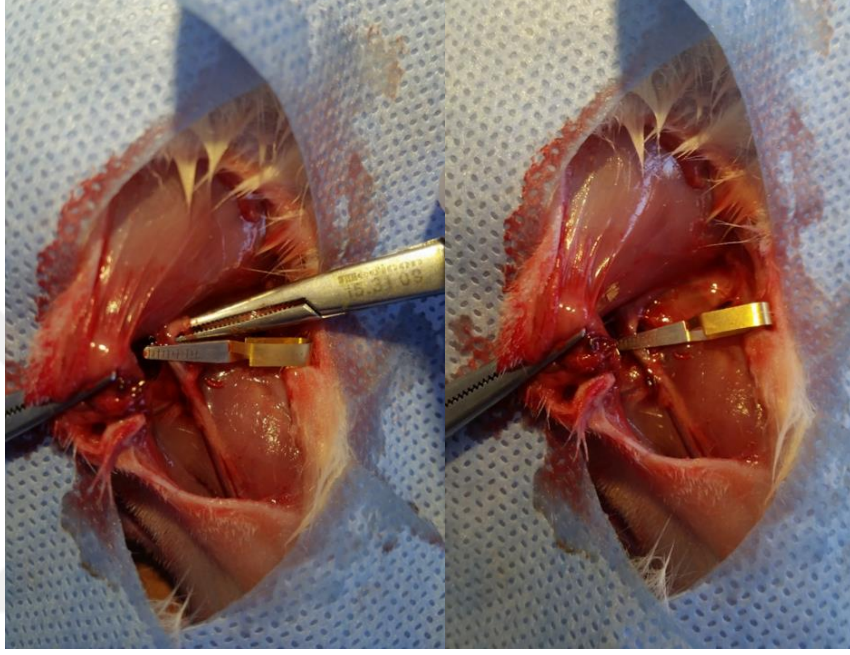


Şekil 3.6. Sol inguinal insizyon sonrası

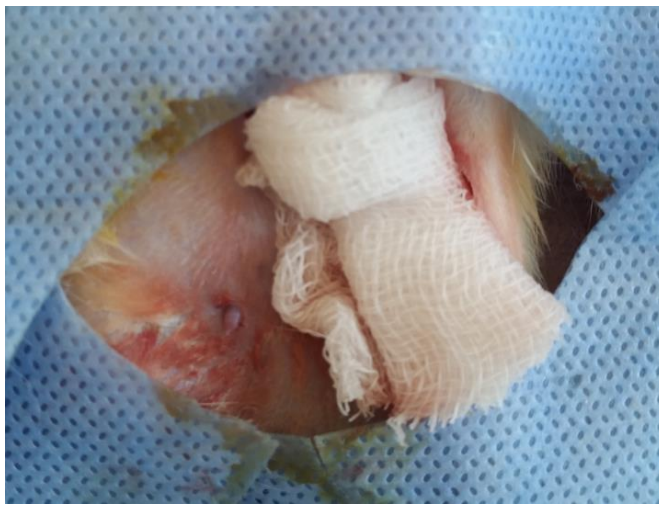


Şekil 3.7. Sol femoral arterin açığa çıkarılmış hali.

Sol taraf femoral arterleri atravmatik bulldog mikroklemple ile klemlenerek iskemi oluşturuldu (şekil 3.8.). İskemi sürecinde insizyon alanı ıslak gazlı bez ile kapatıldı (şekil 3.9.). 2 saat sonra klemple açılarak reperfüzyon sağlandı. Reperfüzyon sürecince insizyon alanı ıslak gazlı bez ile kapatıldı.



şekil 3.8. Sol femoral arterine bulldog mikroklemple takılmış hali



şekil 3.9. İnsizyon alanının ıslak gazlı bezle kapanmış hali

Reperfüzyondan 1 saat sonra ratlara yapılan orta hat insizyonuyla batına girilerek diyaframın proksimaline doğru göğüs kafesi açılarak median sternotomi uygulandı (Şekil 3.10.). Kalbe ulaşıldı. İntrakardiyak ponksiyon ile 4 ml kan örneği alındı.



Şekil 3.10. Median sternotomi sonrası

İnguinal insizyon distale sol ayak bileğine doğru uzatılarak gastroknemius kası açığa çıkartıldı (Şekil 3.11.) ve doku örneği olarak alınarak ratlar sakrifiye edildi.



Şekil 3.11. Gastroknemius kasının açığa çıkarılmış hali

Ratlardan alınan kan biyokimya tüplerine konuldu. 30 dk oda ısısında pıhtılaştıktan sonra 1500 g'de 10 dk santrifüj edilerek serumu ependorf tüplere ayrıldı ve -80°C de çalışma gününe kadar saklandı.

Alınan gastroknemius kası biyokimyasal ve histopatolojik çalışma için 2 parçaya ayrıldı.

Kas örnekleri biyokimyasal parametreler çalışılmak üzere serum fizyolojikle yıkandıktan sonra ependorf tüplerin içerisine konularak etiketlenerek çalışma gününe kadar -80°C de saklandı. Çalışma günü doku örnekleri uygun tampon solüsyon kullanılarak 1/9 (w/v) oranında homojenize edildi. Homojenize edilen dokuların santrifüj sonucu süpernatanı ayrıldı. Aşamalı olarak eritilen ve oda ısısına getirilen serum ve homojenize edilen doku örnekleri, biyokimya laboratuvarında MDA, SOD, GSH-Px, TAK ve TOS ve protein değerlerinin ölçümü ELİSA yöntemi ile çalışıldı.

Histopatolojik çalışma için alınan kas dokusu %10 nötral formalinde 24 saat tespit edildikten sonra parafin bloklar hazırlandı. 5µm kalınlığında kesitler hazırlanarak hemotoksilen eozin(HE) ile boyandı. Nekroz ve inflamasyon

değerlendirildi. Apoptozis açısından caspase-3 ile immunohistokimyasal değerlendirmesi yapıldı.

3.5. Biyokimyasal İşlemler

3.5.1. Doku homojenizasyonu

Derin dondurucuda (-80°C) saklanan kas dokuları kademeli olarak çözündürüldükten sonra ağırlıkları tartıldı. 100 mg doku örneği 900 mL fosfat tampon çözeltisi (0,02mM, pH7.0-7.2) içerisinde 1:9 (w/v) oranında karıştırıldı. Örnekler buz dolu bir kap içerisinde homojenizatör ile 16000 devir/dakika hızda homojenize edildi. Daha sonra 1500xg'de 4°C'de 15 dakika santrifüj edildi, süpernatantı doku proteini, GSH-Px, SOD, TAS, TOS ve MDA parametreleri çalışmak için kullanıldı.

3.5.2. Doku proteini tayini

Kas dokusu proteini Pierce BCA (bikinkoninik asit) protein analiz kiti (Thermo Scientific, Rockford, IL, ABD) ile ölçüldü. Sonuçlar 2000 mikrogram/mililitre($\mu\text{g/ml}$), 1500 $\mu\text{g/ml}$, 1000 $\mu\text{g/ml}$, 750 $\mu\text{g/ml}$, 500 $\mu\text{g/ml}$, 250 $\mu\text{g/ml}$, 125 $\mu\text{g/ml}$ ve 25 $\mu\text{g/ml}$ albümin standardı kullanılarak lineer kalibrasyon eğrisi ile hesaplandı.

3.5.3. SOD ölçümü

Örneklerdeki SOD düzeyleri, Cayman SOD kiti (Katalog no: 706002; Cayman, Ann Arbor, MI, ABD) kullanılarak ölçüldü. Sonuçlar, 0,005 Units/mililitre(U/ml), 0,001 U/ml, 0,002 U/ml, 0,003 U/ml, 0,004 U/ml ve 0,005 U/ml standartları kullanılarak çizilen kalibrasyon eğrisi ile hesaplandı. Sonuçlar serum örnekleri için U/ml , doku örnekleri için U/ml/mg protein olarak verildi.

3.5.4. GSH-Px ölçümü

Kas dokusu GSH-Px düzeyi Cayman GSH-Px kiti (Katalog no: 703102; Cayman, Ann Arbor, MI, ABD) kullanılarak ölçüldü. GSH-Px aktivitesi, glutatyon redüktazın da katıldığı bir çift reaksiyondan sonra meydana gelen NADPH miktarındaki azalma spektrofotometrik olarak 340 nanometre'de kinetik ölçümle

ölçüldükten sonra indirekt olarak hesaplandı. Sonuçlar serum örnekleri için nmol/min/ml ve kas dokusu için nmol/min/mg protein olarak ifade edildi.

3.5.5. Total Antioksidan Kapasite ölçümü

Serum ve kas dokusunun TAK düzeyi, Rel Assay Diagnostics ticari kit (Katalog no: RL0017, Gaziantep, Türkiye) kullanılarak Architect c8000 (Abbott, Chicago, IL, ABD) otoanalizöründe ölçüldü. Test sonuçları 1 Milimol (mmol) TroloxEquiv./Litre (L) standardı kullanılarak hesaplandı. Testin % CV değerleri, üretici firma tarafından, ± 10 , aralığı 1.20-1.50 mmol/L olarak bildirilmiştir. Sonuçlar serum için mmol/L ve diğer dokular için umol/mg protein olarak verildi.

3.5.6. Total oksidatif seviye ölçümü

Serum ve kas dokusu TOS düzeyi, Rel Assay Diagnostics ticari kit (Katalog no: RL0024, Gaziantep, Türkiye) kullanılarak Architect c8000 (Abbott, Chicago, IL, ABD) otoanalizöründe ölçüldü. Test sonuçları 10 umol H₂O₂ Equiv./L standardı kullanılarak hesaplandı. Testin %CV değerleri, üretici firma tarafından, ± 10 , aralığı 4-6umol/L olarak bildirilmiştir. Sonuçlar plazma için umol/L ve diğer dokular için umol/mg protein olarak verildi

3.5.7. Oksidatif stres indeksi (OSİ indeksi)

Total Oksidatif Seviye / Total Antioksidan Kapasite şeklinde bölünerek Oksidatif Stres İndeksi hesaplandı.

3.5.8. MDA ölçümü

Yağ asidi peroksidasyonunun son ürünü olan MDA, TBA ile reaksiyona girerek 530-540 nm'de maksimum absorbans veren renkli bir kompleksin oluştuğu prensip ile çalışan tiyokloroasetik asit (TCA) metodu kullanarak Cayman TBARS kiti (Katalog no: 10009055 Cayman, Ann Arbor, MI, ABD) ile ölçüldü. 50 Mikrometre(μ M), 25 μ M, 10 μ M, 5 μ M, 2.5 μ M, 1.25 μ M ve 0.625 μ M standartlar kullanıldı. Sonuçlar kas dokusu için μ mol/mg protein olarak ifade edildi.

3.6. Histopatolojik İşlemler

3.6.1. Işık mikroskopik incelemeler

1. Dokular %10'luk formaldehit ile tespit edildi.
2. Akan musluk suyu altında yıkandı.
3. %70'lik alkolde iki saat bekletildi.
4. %80'lik alkolde iki saat bekletildi.
5. %96'luk alkolde bir saat bekletildi.
6. %96'luk alkolde bir saat bekletildi.
7. %100'lük alkolde bir saat bekletildi.
8. %100'lük alkolde bir saat bekletildi.
9. Ksilol I'de bir saat bekletildi.
10. Ksilol II'de bir saat bekletildi.
11. Eşit miktarlarda hazırlanan Ksilol-Parafin karışımında 64°C etüvde 30 dakika bekletildi.
12. Parafin I'de 64°C etüvde üç saat bekletildi.
13. Parafin II'de 64°C etüvde üç saat bekletildi.
14. Takip edilen dokular bloklama kaplarında parafine gömülerek etiketlendi.

Hazırlanan bloklardan Leica® RM 2125 RT mikrotom ve Leica mikrotom cihazı ile 3-4 mikron kalınlığında kesitler alındı. Bu kesitlere genel dokuyu değerlendirmek için Hematoksilen-Eozin boyama ve apoptozisi göstermek için Caspase-3 ile immünohistokimyasal boyamalar yapıldı.

3.6.2. Hematoksilen-eozin boyaması

1. Parafin kesitler 60-64°C'lik etüvde 30 dakika bekletildi.
2. Ksilol I'de 2 dakika bekletildi.
3. Ksilol II'de 2 dakika bekletildi.
4. İki defa %100'lük alkolde 1'er dakika bekletildi.
5. İki defa %96'luk alkolde 1'er dakika bekletildi.
6. Akan suda yıkandı.
7. Hematoksilen boyasında 4-5 dakika bekletildi.
8. Akan suda yıkandı.
9. Asit alkole iki kere daldırıldı.

10. Akan suda yıkandı.
11. Amonyaklı suda 10 saniye bekletildi.
12. Akan suda yıkandı.
13. %80'lik alkolde 1 dakika bekletildi.
14. Eozin boyasında 1 dakika bekletildi.
15. İki defa %96'lık alkolde 2'şer dakika bekletildi.
16. İki defa %100'lük alkolde 2'şer dakika bekletildi.
17. Ksilolde 10 dakika bekletildi, çıkarılıp entellan damlatılarak lamel ile kapatıldı.

3.6.3. Caspase-3 immün işaretleme

Parafin bloklardan adezyonlu (polizinli) lamlara 3-4 mikron kalınlığında kesitler alındı. Kesitler boyama işleminden bir gece önce 37 derecelik etüvde bekletildi. Ertesi sabah 30 dakika 64°C'lik etüvde bekletildi.

1. İki kere 5'er dakika Ksilol'de bekletildi.
2. %100'lük alkolde 5 dakika bekletildi.
3. %96'lık alkolde 3 dakika bekletildi.
4. %70'lik alkolde 3 dakika bekletildi.
5. %50'lik alkolde 3 dakika bekletildi.
6. Distile suda 3 dakika bekletildi.
7. Kesitler sonra PBS'e alındı.
8. Taze hazırlanan Citrate Buffer (x10) solüsyonuna alınan kesitler 360°C'de 5 dakika kaynatıldı.
9. Solüsyon seviyesi kontrol edilip azaldıysa solüsyon eklenerek 5 dakika daha 360°C'de kaynatıldı.
10. Soğuduktan sonra dokuların etrafı pap-pen ile çizildi ve kurumamaları için PBS damlatıldı.
11. Hidrojen peroksit damlatılarak 15 dakika bekletildi.
12. İki kere PBS ile yıkandı.
13. Serum block damlatılarak 10 dakika bekletildi.
14. Caspase-3 (Thermo Fisher Scientific; cat no: PA5-16335) antikoru için 1:100 dilüsyon oranına göre hesaplama yapılarak Caspase-3 antikor + diluent karışımı taze olarak hazırlandı.

15. Kesitlere Caspase-3 antikor damlatılarak üzeri parafilm ile kapatıldı ve +4°C’de bir gece inkübasyona bırakıldı.
16. Ertesi gün kesitlerin parafilmi dikkatle çıkarılarak iki kere PBS ile yıkandı.
17. Pap-pen kontrol edildi, silinenlerin tekrar etrafı çizildi.
18. Biotinylated antikor (sekonder) damlatılarak 30 dakika bekletildi.
19. PBS ile yıkandı.
20. Streptavidin damlatılarak 15 dakika bekletildi.
21. PBS ile yıkandı.
22. Taze hazırlanan DAB solüsyonu damlatılarak karanlıkta 30 saniye bekletildi.
23. Distile su ile yıkandı.
24. Taze olarak 1:3 oranında hematoksilin : distile su hazırlandı ve kesitlere damlatılarak 15 saniye bekletildi.
25. Distile su ile yıkandı.
26. %50’lik alkolde 1 dakika bekletildi.
27. %70’lik alkolde 1 dakika bekletildi.
28. %96’lık alkolde 1 dakika bekletildi.
29. %100’lük alkolde 1 dakika bekletildi.
30. Ksilol I’de 1 dakika bekletildi.
31. Ksilol II’de 1 dakika bekletildi.

Ksilol’den çıkarılan kesitler entellan damlatılıp lamel ile kapatıldı. Işık mikroskopunda değerlendirilecek olan preparatlar, lam kutusunda muhafaza edildi.

3.6.4. Nekroz skorlaması

Her kas dokusu için hematoksilin eozin ile boyanarak hazırlanan 2 preparatdan 1 tanesi rastgele seçilerek değerlendirmeye alındı. Değerlendirmeye alınan preparat ışık mikroskopu ile değerlendirilerek nekroz skorlaması(140) yapıldı.

Nekroz skorlamasında lezyonlar 0 ile 3 arasında derecelendirilmiştir. Bu skorlama sisteminin içeriği aşağıda gösterilmiştir.

Skor 0 – Yok (<%5 maksimum patoloji)

Skor 1 – Hafif (<%10 maksimum patoloji)

Skor 2 – Orta (<%15-20 maksimum patoloji)

Skor 3 – Ciddi (<%20-25 maksimum patoloji)

3.6.5. İnflamasyon değerlendirme

Her kas dokusu için hematoksilen eozin ile boyanarak hazırlanan 2 preparatdan 1 tanesi rastgele seçilerek değerlendirmeye alındı. Değerlendirmeye alınan preparat ışık mikroskobu ile değerlendirildi. İnflamasyonu göstermek için 400 büyütmedeki rastgele seçilen 10 alandaki nötrofil sayımı yapıldı(141).

3.6.6. Caspase-3 immün işaretleme ile apoptozis değerlendirme

Her kas dokusu için caspase-3 immün işaretleme yapılarak hazırlanan 2 preparatdan 1 tanesi rastgele seçilerek değerlendirmeye alındı. Değerlendirmeye alınan preparat ışık mikroskobu ile değerlendirildi. Apoptozisi göstermek için 400 büyütmedeki rastgele seçilen 10 alandaki caspase-3 pozitif (apoptotik hücreler) çekirdekler sayıldı(142).

3.7. İstatistiksel Analiz

İstatistiksel analizler Statistical Package for Social Sciences for Windows 20.0 paket programı kullanılarak yapıldı. İstatistiksel analizde tanımlayıcı istatistik olarak sayı, ortalama, standart sapma, medyan (ortanca), minimum ve maksimum değerler kullanıldı. Normal dağılıma uygunluk testleri yapıldı. Normal dağılıma uyan biyokimyasal ve histopatolojik veriler parametrik test olarak ANOVA testi (Post-Hoc için Tukey) ile, normal dağılıma uymayan biyokimyasal ve histopatolojik veriler ise nonparametrik test olarak Mann-Whitney U ve Kruskal Wallis Varyans Analizi testi kullanıldı. Kruskal Wallis Varyans Analizinde istatistiksel anlamlılığın olduğu durumlarda farkın kaynağının saptanması amacıyla Bonferroni Düzeltmeli Mann-Whitney U testi kullanıldı. İstatistiksel anlamlılık için $p < 0,05$ (Bonferroni Düzeltmeli Mann-Whitney U Testinde de anlamlılık düzeyi için $p < 0,01$) kabul edildi.

4. BULGULAR

4.1. Biyokimyasal Değerlendirme Bulguları

4.1.1. Doku biyokimyasal değerlendirme bulguları

Alınan doku örneklerinin biyokimyasal bulguları aşağıdaki tabloda gösterilmiştir.

Tablo 4.1. Doku Örneklerinin Biyokimyasal Bulguları

GRUP	MDA	SOD	GPx	TAS	TOS	OSI indeks
Kontrol 1	3,675	0,127	6,306	0,106	0,327	3,09
Kontrol 2	6,043	0,156	4,165	0,137	0,379	2,76
Kontrol 3	6,249	0,195	11,349	0,148	0,752	5,08
Kontrol 4	6,495	0,151	8,181	0,163	0,502	3,09
Kontrol 5	6,026	0,201	9,049	0,140	0,395	2,82
Kontrol 6	6,581	0,230	3,967	0,170	0,397	2,33
Kontrol 7	6,458	0,106	1,662	0,204	0,350	1,72
Kontrol 8	3,645	0,126	1,303	0,097	0,155	1,59
İ/R 1	7,785	0,233	0,854	0,113	0,399	3,51
İ/R 2	7,783	0,252	2,861	0,197	0,491	2,50
İ/R 3	7,425	0,160	0	0,108	0,238	2,20
İ/R 4	7,558	0,222	1,217	0,164	0,398	2,43
İ/R 5	4,601	0,129	3,553	0,130	0,315	2,43
İ/R 6	7,980	0,254	3,960	0,121	1,530	12,62
İ/R 7	9,546	0,204	3,076	0,235	0,984	4,18
İ/R 8	4,219	0,104	1,761	0,144	0,591	4,10

Tablo 4.1. Doku Örneklerinin Biyokimyasal Bulguları (Devamı)

İ/R + Tedavi 1	3,745	0,159	3,029	0,098	0,240	2,45
İ/R + Tedavi 2	7,965	0,163	5,342	0,175	0,606	3,45
İ/R + Tedavi 3	7,290	0,086	-13,352	0,198	0,392	1,98
İ/R + Tedavi 4	4,128	0,061	0,361	0,084	0,174	2,08
İ/R + Tedavi 5	4,613	0,152	1,552	0,100	0,235	2,36
İ/R + Tedavi 6	8,727	0,167	-3,424	0,226	0,589	2,60
İ/R + Tedavi 7	3,655	0,092	4,313	0,098	0,213	2,18
İlaç 1	3,575	0,133	-1,146	0,199	0,118	0,59
İlaç 2	2,756	0,076	0,917	0,106	0,215	2,02
İlaç 3	4,129	0,069	0,455	0,136	0,278	2,05
İlaç 4	4,507	0,097	1,160	0,153	0,295	1,93
İlaç 5	4,135	0,117	1,240	0,227	0,318	1,40
İlaç 6	2,965	0,079	2,759	0,123	0,334	2,72
İlaç 7	4,077	0,123	0,733	0,098	0,310	3,15

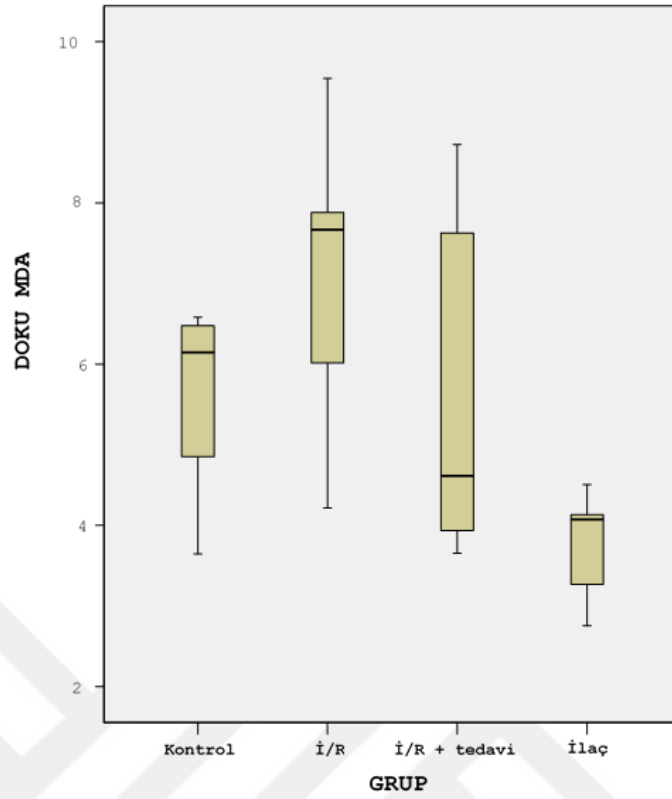
Doku MDA'in gruplara göre sayı, ortalama, medyan, standart sapma, minimum ve maksimum değerleri tabloda gösterilmiştir (Tablo 4.2.).

Tablo 4.2. Doku MDA Biyokimyasal Bulgularının İstatiksel Verileri

Doku MDA	Kontrol	İskemi/Reperfüzyon	İskemi/reperfüzyon + Tedavi	İlaç
Sayı	8	8	7	7
Ortalama	5,646	7,112	5,732	3,735
Medyan	6,15	7,670	4,613	4,077
Std. Sapma	1,243	1,795	2,178	0,659
Minimum	3,645	4,219	3,655	2,756
Maksimum	6,581	9,546	8,727	4,507

Yapılan istatistiksel analize göre doku MDA değerleri için gruplar arasında anlamlı fark bulunmuştur ($p=0,007$). Bu bilgi doğrultusunda gruplar arasında ayrı ayrı karşılaştırma yapılmıştır.

Doku MDA değerleri için gruplar arası yapılan değerlendirmede kontrol grubu ve İ/R grubu arasında istatistiksel olarak anlamlı fark bulunmuştur ($p=0,036$). Kontrol grubu ve ilaç grubu arasında istatistiksel olarak anlamlı fark bulunmuştur ($p=0,021$). İ/R grubu ve ilaç grubu arasında istatistiksel olarak anlamlı fark bulunmuştur ($p=0,002$). İ/R grubu ve İ/R + tedavi grubu arasında anlamlı fark çıkmamasına rağmen ($p>0,05$) İ/R + tedavi grubunda doku MDA değerlerinde belirgin düşme görülmektedir.



Şekil 4.21. Doku MDA değerlerinin gruplara göre dağılımı

Bu verilere göre İ/R grubunda doku MDA değerlerinin, kontrol ve ilaç grubuna göre anlamlı derecede yüksek çıkması uygulanan iskemi/reperfüzyonun MDA'ı yükselttiğini göstermiştir. Kontrol grubuna göre ilaç grubunda doku MDA değerlerinin anlamlı derece düşük çıkması kullanılan astaksantin, oksidan bir madde olan MDA değerlerini düşürdüğünü göstermiştir. İ/R grubuna göre İ/R + tedavi grubunda doku MDA değerlerinin daha düşük seviyede çıkması iskemi/reperfüzyon sonrası astaksantin kullanımı, oksidan bir madde olan MDA değerlerini düşürdüğünü göstermiştir.

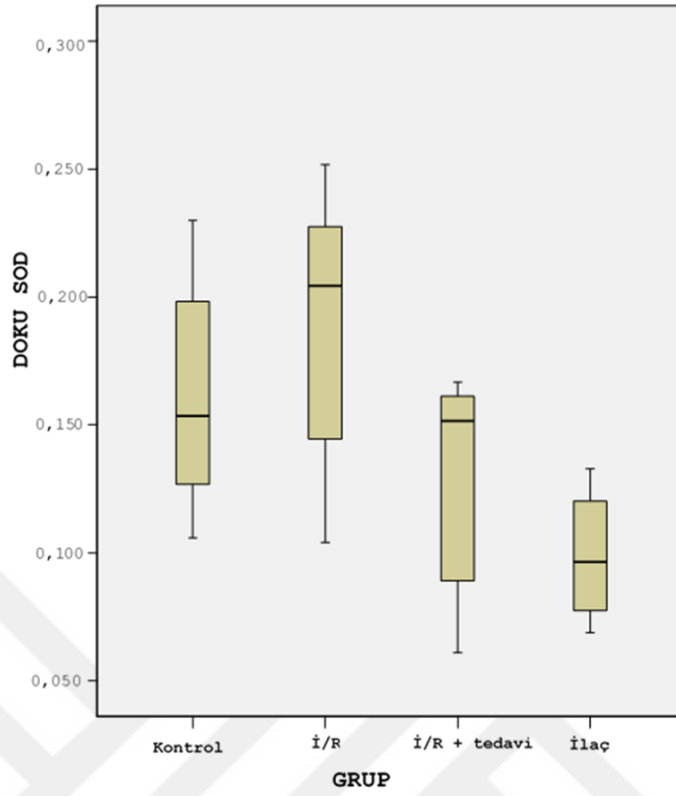
Doku SOD'ın gruplara göre sayı, ortalama, medyan, standart sapma, minimum ve maksimum değerleri tabloda gösterilmiştir (Tablo 4.3.).

Tablo 4.3. Doku SOD Biyokimyasal Bulgularının İstatiksel Verileri

Doku SOD	Kontrol	İskemi/Reperfüzyon	İskemi/reperfüzyon + Tedavi	İlaç
Sayı	8	8	7	7
Ortalama	0,162	0,195	0,126	0,099
Medyan	0,153	0,213	0,152	0,097
Std. Sapma	0,043	0,057	0,058	0,026
Minimum	0,106	0,104	0,061	0,069
Maksimum	0,230	0,254	0,167	0,133

Yapılan istatistiksel analize göre doku SOD değerleri için gruplar arasında anlamlı fark bulunmuştur ($p=0,002$). Bu bilgi doğrultusunda gruplar arasında ayrı ayrı karşılaştırma yapılmıştır.

Doku SOD değerleri için gruplar arası yapılan değerlendirmede İ/R grubu ve İ/R + tedavi grubu arasında istatistiksel olarak anlamlı fark bulunmuştur ($p=0,028$). İ/R grubu ve ilaç grubu arasında istatistiksel olarak anlamlı fark bulunmuştur ($p=0,002$). Kontrol grubuna göre İ/R + tedavi grubu ve ilaç grubu arasında anlamlı fark çıkmamasına rağmen ($p>0,05$) İ/R + tedavi grubu ve ilaç grubunda SOD değerlerinde belirgin düşme görülmektedir.



Şekil 4.22. Doku SOD değerlerinin gruplara göre dağılımı

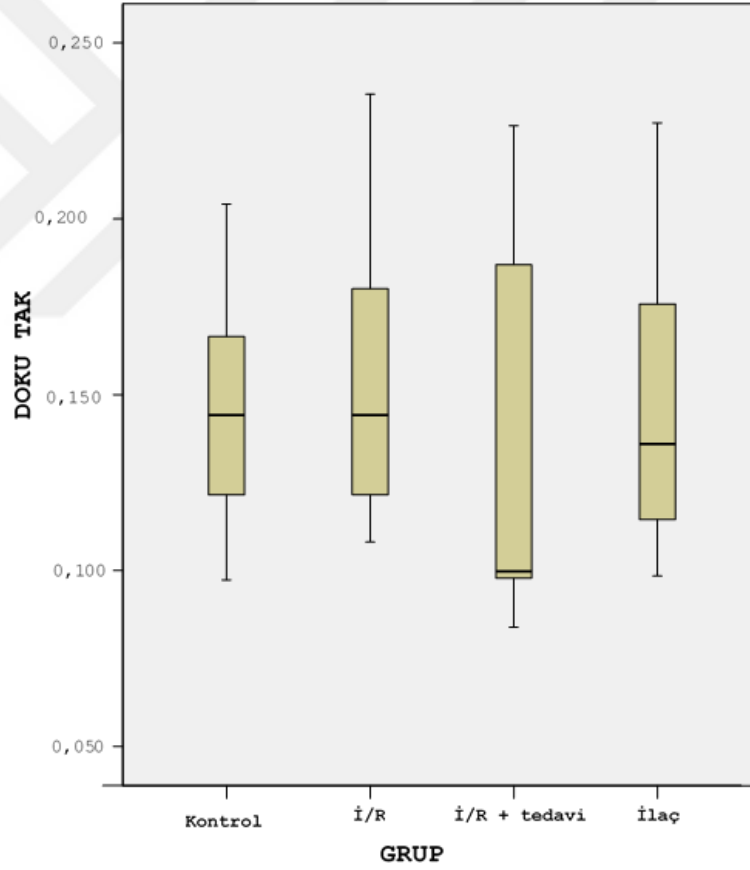
Bu verilere göre İ/R grubunda doku SOD değerlerinin, kontrol grubuna göre yüksek çıkması uygulanan iskemi/reperfüzyonun SOD'ı yükselttiğini göstermiştir. İ/R grubuna göre İ/R + tedavi grubunda ve ilaç grubunda doku SOD değerlerinin anlamlı derecede düşük çıkması kullanılan astaksantin antioksidan bir madde olan SOD değerlerini düşürdüğünü göstermiştir.

Doku TAK değerleri için grupların diğer gruplarla karşılaştırılmasında gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı fark bulunamamıştır ($p>0,05$).

Doku TAK'nin gruplara göre sayı, ortalama, medyan, standart sapma, minimum ve maksimum değerleri tabloda gösterilmiştir (Tablo 4.4.).

Tablo 4.4. Doku TAK Biyokimyasal Bulgularının İstatiksel Verileri

Doku TAK	Kontrol	İskemi/Reperfüzyon	İskemi/reperfüzyon + Tedavi	İlaç
Sayı	8	8	7	7
Ortalama	0,146	0,152	0,140	0,149
Medyan	0,144	0,137	0,100	0,136
Std. Sapma	0,035	0,057	0,058	0,048
Minimum	0,097	0,108	0,084	0,098
Maksimum	0,204	0,235	0,226	0,227

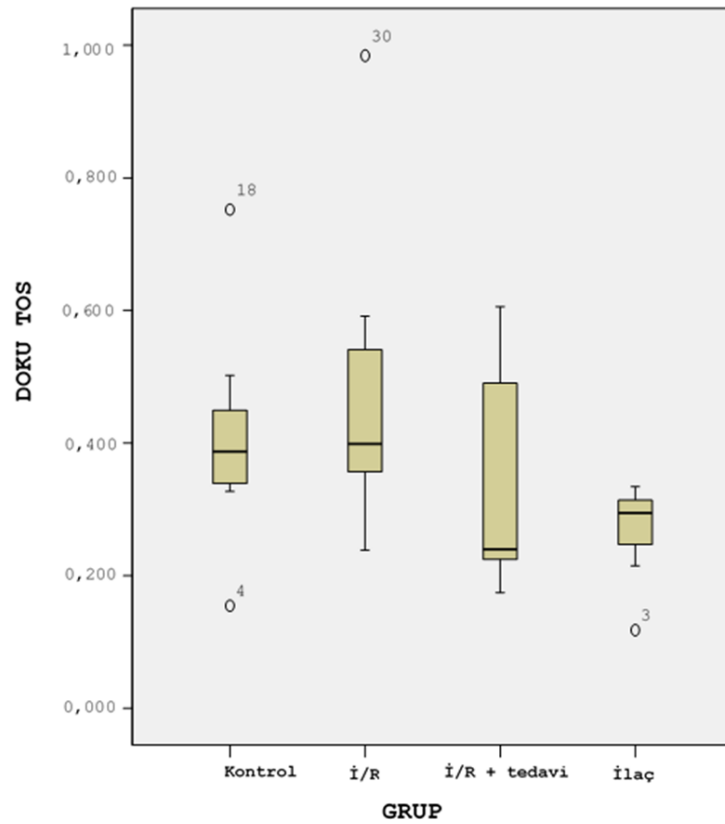


Şekil 4.3. Doku TAK değerlerinin gruplara göre dağılımı

Doku TOS'ın gruplara göre sayı, ortalama, medyan, standart sapma, minimum ve maksimum değerleri tabloda gösterilmiştir (Tablo 4.5.).

Tablo 4.5. Doku TOS Biyokimyasal Bulgularının İstatistiksel Verileri

Doku TOS	Kontrol	İskemi/Reperfüzyon	İskemi/reperfüzyon + Tedavi	İlaç
Sayı	8	8	7	7
Ortalama	0,407	0,488	0,350	0,267
Medyan	0,387	0,399	0,240	0,295
Std. Sapma	0,170	0,247	0,182	0,076
Minimum	0,155	0,238	0,174	0,118
Maksimum	0,752	0,984	0,606	0,334



Şekil 4.4. Doku TOS değerlerinin gruplara göre dağılımı

Doku TOS değerleri için grupların diğer gruplarla karşılaştırılmasında gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı fark bulunamamıştır ($p>0,05$). Anlamlı fark çıkmamasına rağmen kontrol grubuna göre ilaç grubunda ve İ/R grubuna göre İ/R + tedavi grubunda doku TOS değerlerinin daha düşük çıkması kullanılan astaksantin

toplam oksidatif seviyeyi düşürdüğü gösterilmiştir. Kontrol grubuna göre İ/R grubunda ve ilaç grubuna göre İ/R + tedavi grubunda doku TOS değerlerinin daha yüksek seviyede çıkması yapılan iskemi/reperfüzyonun total oksidatif seviyeyi arttırdığı gösterilmiştir.

Doku OSI'nin gruplara göre sayı, ortalama, medyan, standart sapma, minimum ve maksimum değerleri aşağıdaki tabloda gösterilmiştir.

Tablo 4.6. Doku OSI Biyokimyasal Bulgularının İstatistiksel Verileri

Doku OSI indeks	Kontrol	İskemi/Reperfüzyon	İskemi/reperfüzyon + Tedavi	İlaç
Sayı	8	8	7	7
Ortalama	2,809	3,051	2,442	1,981
Medyan	2,79	2,499	2,359	2,025
Std. Sapma	1,084	0,855	0,495	0,835
Minimum	1,590	2,204	1,975	0,593
Maksimum	5,082	4,180	3,452	3,148

Doku OSI değerleri için grupların diğer gruplarla karşılaştırılmasında gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı fark bulunamamıştır ($p>0,05$).

4.1.2. Serum biyokimyasal değerlendirme bulguları

Alınan serum örneklerinin biyokimyasal bulguları tabloda gösterilmiştir (Tablo 4.7.).

Tablo 4.7. Serum Örneklerinin Biyokimyasal Bulguları

GRUP	MDA	GPx	SOD	TAS	TOS	OSI indeks
Kontrol 1	22,436	1,698	3,102	1,947	2,960	1,520
Kontrol 2	30,292	6,792	2,429	2,261	3,457	1,529

Tablo 4.7. Serum Örneklerinin Biyokimyasal Bulguları (Devamı)

Kontrol 3	12,615	3,396	3,824	2,033	4,821	2,371
Kontrol 4	19,162	5,094	3,779	1,993	4,117	2,066
Kontrol 5	11,961	3,396	3,608	2,164	3,888	1,797
Kontrol 6	12,615	1,698	4,571	1,749	4,409	2,521
Kontrol 7	10,651	3,396	4,065	1,884	4,212	2,236
Kontrol 8	13,27	5,094	3,567	2,021	4,440	2,197
İ/R 1	8,032	3,396	3,527	2,133	10,843	5,083
İ/R 2	10,651	-3,396	3,234	1,884	6,747	3,581
İ/R 3	8,687	18,677	3,200	2,465	31,494	12,776
İ/R 4	13,925	13,584	2,681	2,288	25,861	11,303
İ/R 5	13,27	-10,188	3,234	2,191	8,839	4,034
İ/R 6	6,068	5,094	3,071	2,072	7,183	3,467
İ/R 7	7,378	8,490	2,608	2,025	3,963	1,957
İ/R 8	7,378	5,094	3,450	2,025	3,494	1,725
İ/R + Tedavi 1	4,759	0,000	4,065	1,889	10,323	5,465
İ/R + Tedavi 2	6,723	6,792	3,692	2,156	6,439	2,987
İ/R + Tedavi 3	13,27	-140,929	3,268	2,105	21,371	10,152
İ/R + Tedavi 4	8,032	176,586	4,333	1,865	20,699	11,099
İ/R + Tedavi 5	6,068	84,897	4,634	1,807	10,198	5,644
İ/R + Tedavi 6	8,032	-49,240	4,277	1,765	17,355	9,833
İ/R + Tedavi 7	5,414	1,698	3,303	1,804	11,548	6,401
İlaç 1	5,414	1,698	4,765	1,795	5,124	2,855
İlaç 2	6,723	3,396	3,339	1,607	4,789	2,980
İlaç 3	6,723	-1,698	4,765	1,94	11,017	5,679
İlaç 4	9,342	3,396	3,965	2,047	4,265	2,084
İlaç 5	2,14	-1,698	4,765	1,715	2,426	1,415
İlaç 6	8,687	-3,396	4,222	1,629	4,931	3,027
İlaç 7	4,759	0,000	3,965	1,848	10,198	5,518

Serum MDA'in gruplara göre sayı, ortalama, medyan, standart sapma, minimum ve maksimum değerleri aşağıdaki tabloda gösterilmiştir.

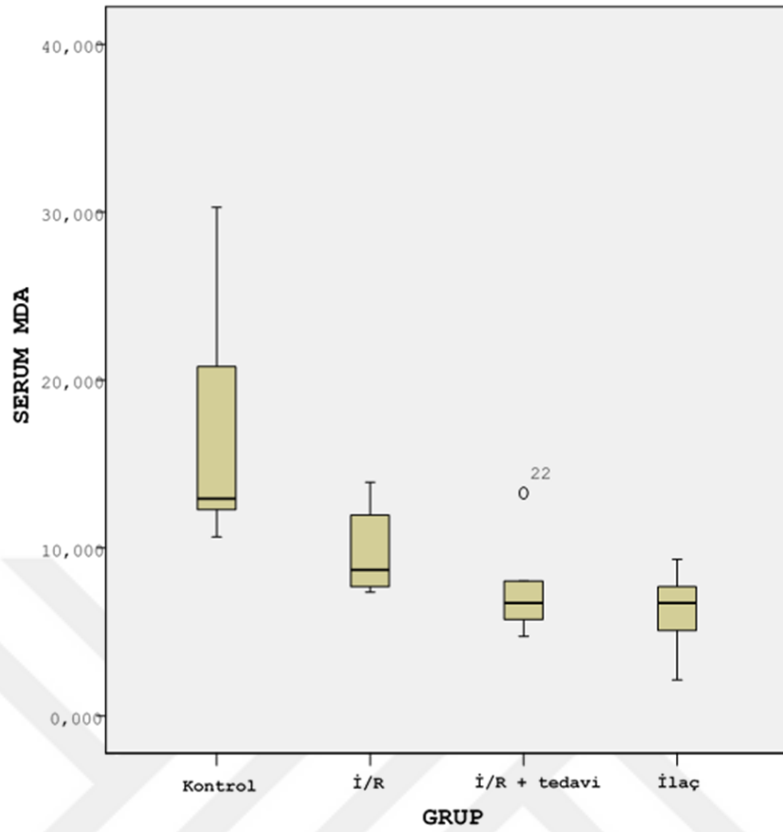
Tablo 4.8. Serum MDA Biyokimyasal Bulgularının İstatiksel Verileri

Serum MDA	Kontrol	İskemi/Reperfüzyon	İskemi/reperfüzyon + Tedavi	İlaç
Sayı	8	8	7	7
Ortalama	16,625	9,424	7,471	6,255
Medyan	12,943	8,360	6,723	6,723
Std. Sapma	6,844	2,895	2,839	2,441
Minimum	10,651	6,068	4,759	2,140
Maksimum	30,292	13,925	13,270	9,342

Yapılan istatistiksel analize göre serum MDA değerleri için gruplar arasında anlamlı fark bulunmuştur ($p=0,002$). Bu bilgi doğrultusunda gruplar arasında ayrı ayrı karşılaştırma yapılmıştır.

Serum MDA değerleri için gruplar arası yapılan değerlendirmede kontrol grubu ve İ/R grubu arasında istatistiksel olarak anlamlı fark bulunmuştur ($p=0,020$). Kontrol grubu ve İ/R + tedavi grubu arasında istatistiksel olarak anlamlı fark bulunmuştur ($p=0,006$). Kontrol grubu ve ilaç grubu arasında istatistiksel olarak anlamlı fark bulunmuştur ($p=0,001$). Diğer gruplar arasında anlamlı fark bulunamamıştır.

Elde edilen veriler ışığında kontrol grubuna göre ilaç grubunda, serum MDA değerlerinin anlamlı derecede daha düşük çıkması kullanılan astaksantin oksidan bir madde olan MDA düzeylerini azalttığı gösterilmiştir. İ/R grubu ve İ/R + tedavi grubu arasında anlamlı fark çıkmamasına rağmen İ/R + tedavi grubunda serum MDA değerlerinin daha düşük seviyede çıkması kullanılan astaksantin oksidan bir madde olan MDA düzeylerini azalttığı gösterilmiştir.



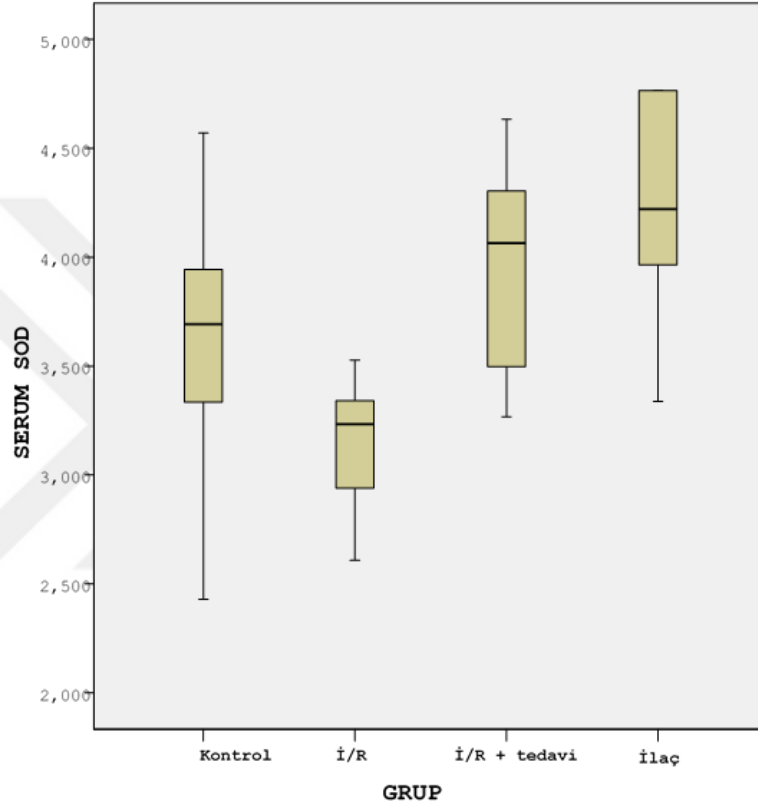
Şekil 4.23. Serum MDA değerlerinin gruplara göre dağılımı

Serum SOD'ın gruplara göre sayı, ortalama, medyan, standart sapma, minimum ve maksimum değerleri tabloda gösterilmiştir (Tablo 4.9.).

Tablo 4.9. Serum SOD Biyokimyasal Bulgularının İstatiksel Verileri

Serum SOD	Kontrol	İskemi/Reperfüzyon	İskemi/reperfüzyon + Tedavi	İlaç
Sayı	8	8	7	7
Ortalama	3,618	3,126	3,939	4,255
Medyan	3,694	3,217	4,065	4,222
Std. Sapma	0,639	0,330	0,530	0,546
Minimum	2,429	2,608	3,268	3,339
Maksimum	4,571	3,527	4,634	4,765

Yapılan istatistiksel analize göre serum SOD değerleri için gruplar arasında anlamlı fark bulunmuştur($p=0,002$). Bu bilgi doğrultusunda gruplar arasında ayrı ayrı karşılaştırma yapılmıştır.



Şekil 4.24. Serum SOD değerlerinin gruplara göre dağılımı

Serum SOD değerleri için gruplar arası yapılan değerlendirmede İ/R grubu ve İ/R + tedavi grubu arasında istatistiksel olarak anlamlı fark bulunmuştur ($p=0,028$). İ/R grubu ve İlaç grubu arasında istatistiksel olarak anlamlı fark bulunmuştur ($p=0,002$).

Elde edilen bu verilere göre İ/R grubu ve İ/R + tedavi grubu arasında istatistiksel olarak anlamlı fark çıkması verilen astaksantin antioksidan bir madde olan SOD düzeylerini İ/R + tedavi grubunda arttırdığı gösterilmiştir. Kontrol grubuna

göre ilaç grubunda serum SOD değerlerinin daha yüksek çıkması verilen astaksantin antioksidan düzeylerini arttırdığını göstermiştir.

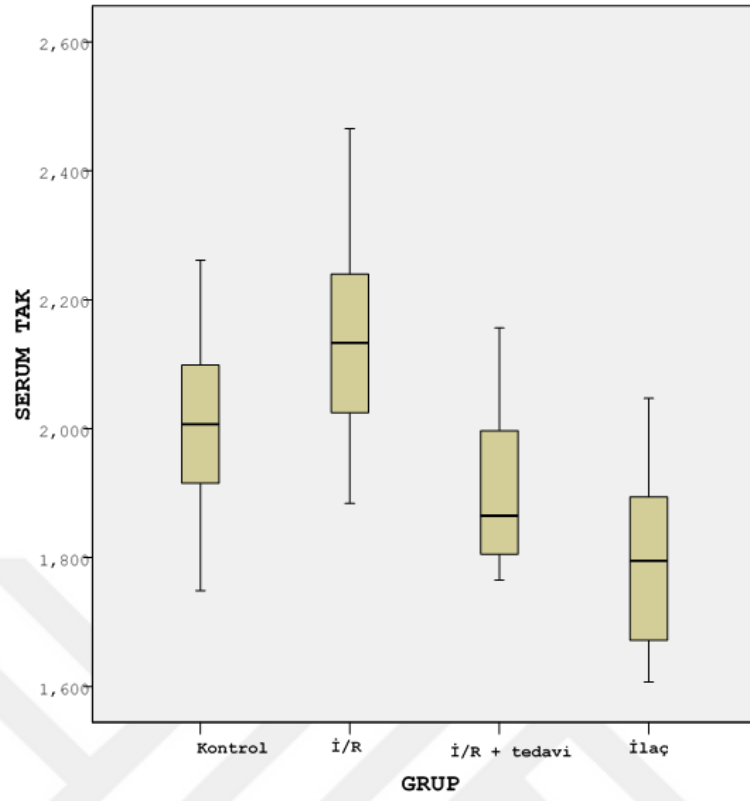
Serum TAK'nin gruplara göre sayı, ortalama, medyan, standart sapma, minimum ve maksimum değerleri aşağıdaki tabloda gösterilmiştir.

Tablo 4.10. Serum TAK Biyokimyasal Bulgularının İstatistiksel Verileri

Serum TAK	Kontrol	İskemi/Reperfüzyon	İskemi/reperfüzyon + Tedavi	İlaç
Sayı	8	8	7	7
Ortalama	2,007	2,135	1,913	1,797
Medyan	2,007	2,103	1,865	1,795
Std. Sapma	0,158	0,180	0,155	0,161
Minimum	1,749	1,884	1,765	1,607
Maksimum	2,261	2,465	2,156	2,047

Yapılan istatistiksel analize göre serum TAK değerleri için gruplar arasında anlamlı fark bulunmuştur ($p=0,004$). Bu bilgi doğrultusunda gruplar arasında ayrı ayrı karşılaştırma yapılmıştır.

Serum TAK değerleri için gruplar arası yapılan değerlendirmede İ/R grubu ve ilaç grubu arasında istatistiksel olarak anlamlı fark bulunmuştur ($p=0,003$). Bu bizim beklediğimiz bir sonuç değildi.



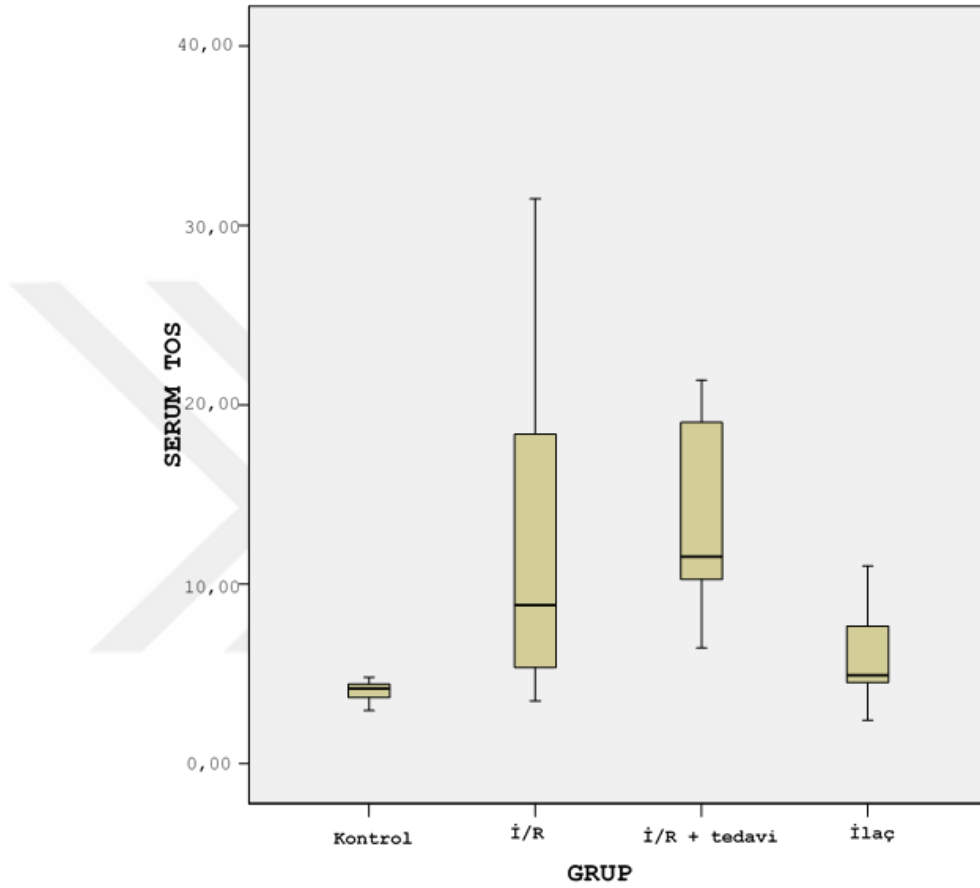
Şekil 4.7. Serum TAK değerlerinin gruplara göre dağılımı

Serum TOS'ın gruplara göre sayı, ortalama, medyan, standart sapma, minimum ve maksimum değerleri aşağıdaki tabloda gösterilmiştir.

Tablo 4.11. Serum TOS Biyokimyasal Bulgularının İstatiksel Verileri

Serum TOS	Kontrol	İskemi/Reperfüzyon	İskemi/reperfüzyon + Tedavi	İlaç
Sayı	8	8	7	7
Ortalama	4,038	12,303	13,990	6,107
Medyan	4,165	8,011	11,548	4,931
Std. Sapma	0,594	10,491	5,797	3,211
Minimum	2,960	3,490	6,440	2,430
Maksimum	4,820	31,490	21,370	11,020

Yapılan istatistiksel analize göre serum TOS değerleri için gruplar arasında anlamlı fark bulunmuştur ($p=0,013$). Bu bilgi doğrultusunda gruplar arasında ayrı ayrı karşılaştırma yapılmıştır.



Şekil 4.8. Serum TOS değerlerinin gruplara göre dağılımı

Serum TOS değerleri için gruplar arası yapılan değerlendirmede kontrol grubu ve İ/R + tedavi grubu arasında istatistiksel olarak anlamlı fark bulunmuştur ($p=0,025$).

Elde edilen veriler ışığında kontrol grubu ve ilaç grubuna göre İ/R grubu ve İ/R + tedavi grubunda serum TOS değerlerinin daha yüksek seviyede çıkması uygulanan iskemi/reperfüzyonun toplam oksidatif seviyeyi arttırdığı gösterilmiştir.

Serum OSI'nin gruplara göre sayı, ortalama, medyan, standart sapma, minimum ve maksimum değerleri tabloda gösterilmiştir (Tablo 4.12.).

Tablo 4.12. Serum OSI Biyokimyasal Bulgularının İstatiksel Verileri

Serum OSI	Kontrol	İskemi/Reperfüzyon	İskemi/reperfüzyon + Tedavi	İlaç
Sayı	8	8	7	7
Ortalama	2,030	5,491	7,369	3,365
Medyan	2,131	3,808	6,401	2,980
Std. Sapma	0,377	4,201	3,013	1,631
Minimum	1,520	1,725	2,987	1,415
Maksimum	2,521	12,776	11,099	5,679

Yapılan istatistiksel analize göre serum OSI değerleri için gruplar arasında anlamlı fark bulunmuştur ($p=0,005$). Bu bilgi doğrultusunda gruplar arasında ayrı ayrı karşılaştırma yapılmıştır.

Serum OSI değerleri için gruplar arası yapılan değerlendirmede kontrol grubu ve İ/R + tedavi grubu arasında istatistiksel olarak anlamlı fark bulunmuştur ($p=0,004$).

Bu verilere göre kontrol grubu ve ilaç grubuna göre İ/R grubu ve İ/R + tedavi grubunda OSI indeks değerlerinin daha yüksek seviyede çıkması uygulanan iskemi/reperfüzyonun toplam oksidatif seviyeyi arttırdığı gösterilmiştir.

4.2. Histopatolojik Değerlendirme Bulguları

Deney sonrası alınan kas örnekleri histopatolojik olarak nekroz açısından incelendiğinde, nekroz skoru(140) tablosu kullanılarak puanlandırılmıştır. Kas örneklerinin nekroz skoru sonuçları tablodaki gibidir (Tablo 4.13.)

Tablo 4.13. Gruplara Göre Nekroz Skoru Değerlendirme Sonuçları

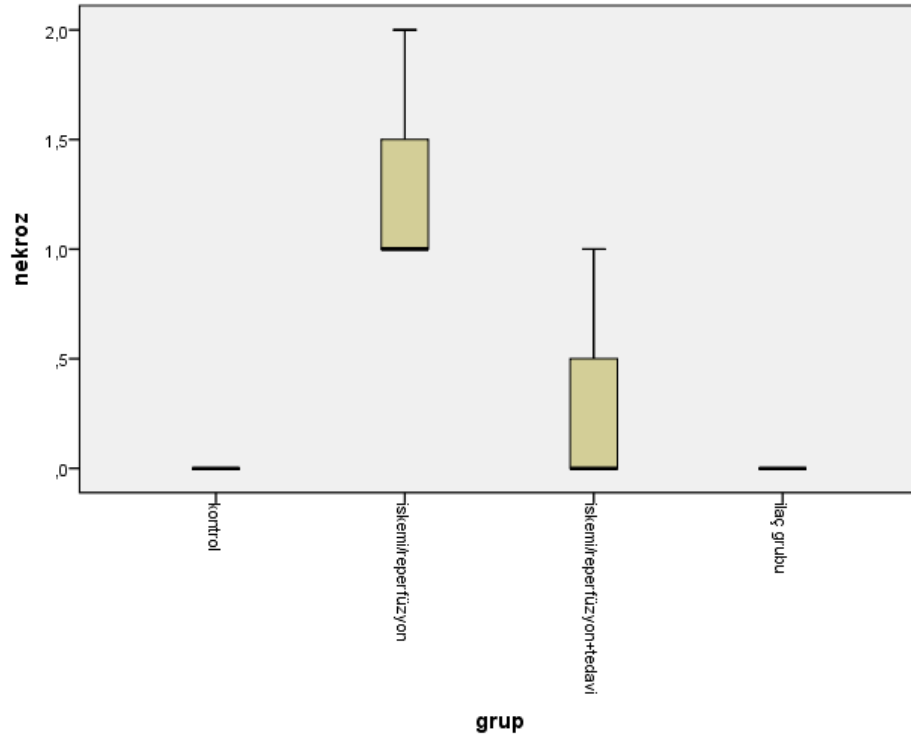
Hayvan numarası	Kontrol	İ/R	İ/R + Tedavi	İlaç
1	0	1	0	0
2	0	1	0	0
3	0	2	1	0
4	0	2	0	0
5	0	1	1	0
6	0	1	0	0
7	0	1	0	0
8	0	1		

Kontrol grubu ve ilaç grubunda herhangi bir iskemi/reperfüzyon uygulaması yapılmadığı için beklendiği gibi nekroz hiç görülmemiştir. Kontrol grubu ve ilaç grubundaki nekroz görülmemesi nedeniyle nekroz skoru açısından İ/R grubu İ/R + tedavi grubu arasında istatistiksel analiz yapılmıştır. Yapılan istatistiksel analizde İ/R grubu İ/R + tedavi grubu arasında anlamlı fark bulunmuştur ($p=0,005$).

Elde edilen verilere göre İ/R grubu ile İ/R + tedavi grubu arasında anlamlı fark bulunması astaksantin kullanımının nekroz skorunu azalttığını göstermiştir.

Tablo 4.14. Nekroz Skoru Bulgularının İstatistiksel Verileri

Nekroz	Kontrol	İskemi/Reperfüzyon	İskemi/reperfüzyon + Tedavi	İlaç
Sayı	8	8	7	7
Ortalama	0	1,25	0,29	0
Medyan		1,00	0,00	
Std. Sapma		0,463	0,488	
Minimum	0	1	0	0
Maksimum	0	2	1	0



Şekil 4.9. Nekroz skoru değerlerinin gruplara göre dağılımı

Deney sonrası alınan kas örnekleri histopatolojik olarak inflamasyon açısından incelendiğinde, nötrofil sayımı yapılarak değerlendirilmiştir. Kas örneklerinin inflamasyon (nötrofil sayısı) sonuçları tablodaki gibidir (Tablo 4.15.).

Tablo 4.15. Gruplara Göre İnflamasyon(Nötrofil sayısı) Değerlendirme Sonuçları

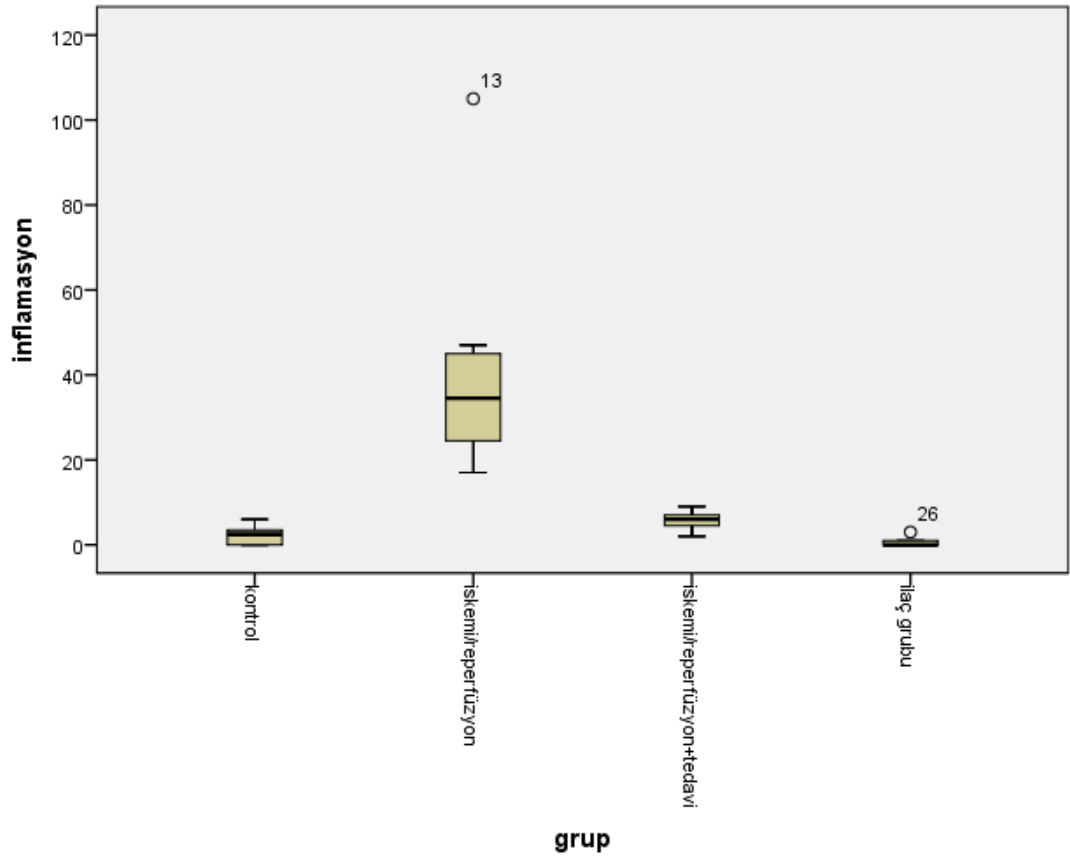
Hayvan numarası	Kontrol	İ/R	İ/R + Tedavi	İlaç
1	0	17	8	0
2	0	18	9	0
3	3	43	6	3
4	0	31	2	1
5	2	105	4	0
6	6	35	5	0
7	4	34	6	0
8	3	47		

Tablo 4.16. İnflamasyon Bulgularının İstatistiksel Verileri

İnflamasyon	Kontrol	İskemi/Reperfüzyon	İskemi/reperfüzyon + Tedavi	İlaç
Sayı	8	8	7	7
Ortalama	2,25	41,25	5,71	0,71
Medyan	2,50	34,50	6,00	0,00
Std. Sapma	2,188	27,840	2,360	1,113
Minimum	0	17	2	0
Maksimum	6	105	9	3

Yapılan istatistiksel analize göre inflamasyon bulguları için gruplar arasında anlamlı fark bulunmuştur ($p=0,000$). Bu bilgi doğrultusunda gruplar arasında ayrı ayrı karşılaştırma yapılmıştır.

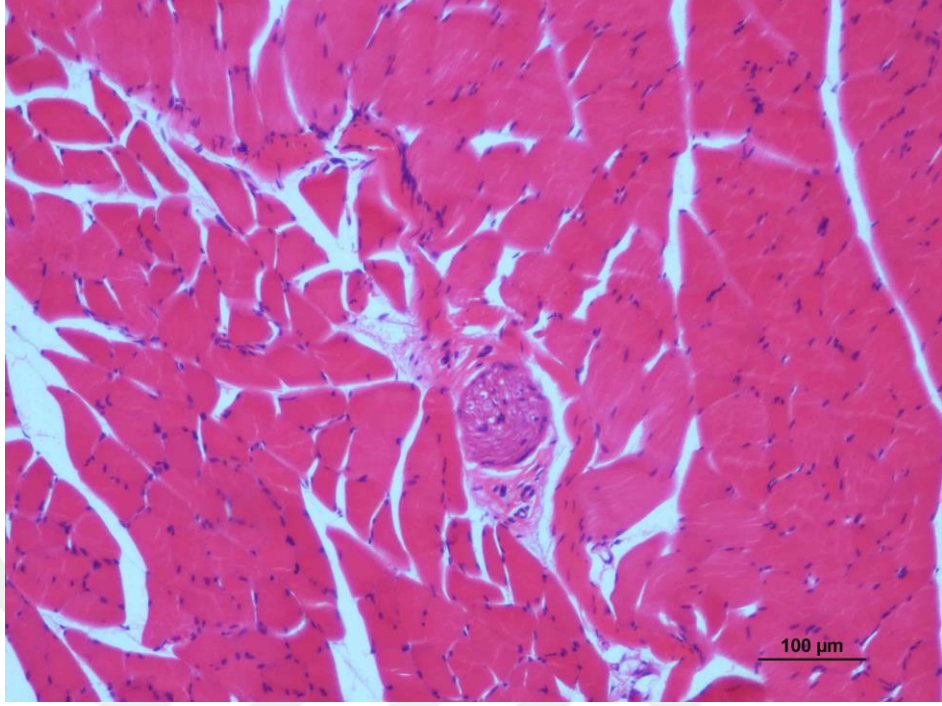
İnflamasyon bulguları için gruplar arası yapılan değerlendirmede kontrol grubu ve İ/R grubu arasında istatistiksel olarak anlamlı fark bulunmuştur ($p=0,001$). Kontrol grubu ve İ/R + tedavi grubu arasında istatistiksel olarak anlamlı fark bulunamamıştır ($p=0,019$ olmasına rağmen anlamlı değil, anlamlılık düzeyi bonferronide 0,01). Kontrol grubu ve ilaç grubu arasında istatistiksel olarak anlamlı fark bulunamamıştır ($p>0,01$). İ/R grubu ile İ/R + tedavi grubu arasında istatistiksel olarak anlamlı fark bulunmuştur ($p=0,001$). İ/R grubu ile ilaç grubu arasında istatistiksel olarak anlamlı fark bulunmuştur ($p=0,001$). İ/R + tedavi grubu ile ilaç grubu arasında istatistiksel olarak anlamlı fark bulunmuştur ($p=0,002$).



Şekil 4.10. İnflamasyon bulgularının gruplara göre dağılımı

Elde edilen verilere göre kontrol grubu ile İ/R grubu arasında ve ilaç grubu ile İ/R grubu arasında inflamasyon bulguları açısından anlamlı fark bulunması iskemi/reperfüzyon uygulamasının inflamasyonu arttırdığını göstermiştir. İ/R grubuna göre İ/R + tedavi grubunda inflamasyon bulgularının anlamlı derecede düşük çıkması kullanılan astaksantin'in iskemi/reperfüzyon hasarını azalttığını göstermiştir. Kontrol grubuna göre ilaç grubunda inflamasyon bulgularının daha az olması kullanılan ilacın inflamasyonu azalttığını göstermiştir.

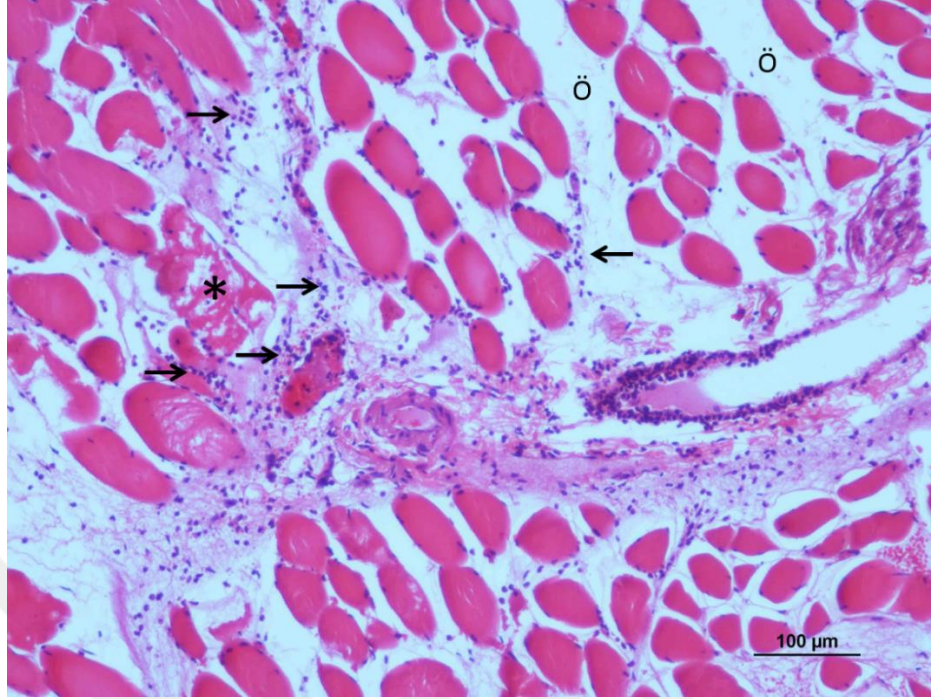
Deney sonrası alınan kas örnekleri histopatolojik olarak incelendiğinde, kontrol grubuna ait örnekler makroskobik olarak normal doku görünümünde olmakla birlikte; mikroskobik olarak normal doku görünümüne sahip olduğu tespit edildi (Şekil 4.11.).



Şekil 4.11. Kontrol grubuna ait görüntü. Kas hücreleri normal görünümündedir. Hematoksilen Eozin, 10x, bar 100μm

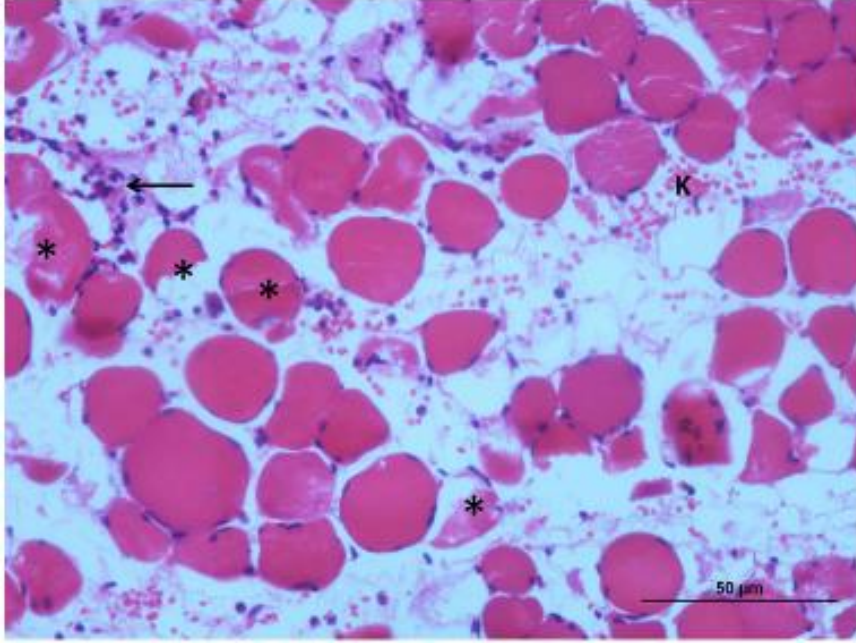
Deney sonrası alınan kas örnekleri histopatolojik olarak incelendiğinde, İ/R grubuna ait örnekler makroskopik olarak normal doku görünümünde olmakla birlikte; mikroskopik olarak hücrelerinin bir kısmında dejenerasyon (nekroz), kas hücreleri arasında ödem ve inflamatuvar hücrelerin(nötrofil) olduğu tespit edildi (Şekil 4.12.).

Elde edilen verilere göre iskemi/reperfüzyon uygulamasının nekroz, ödem ve inflamasyona neden olduğu gösterilmiştir.



Şekil 4.12. İ/R grubuna ait görüntü. Hematoksilen Eozin, 10x, bar 100μm Kas hücrelerinin bir kısmında dejenerasyon (nekroz) (*), kas hücreleri arasında ödem (Ö) ve inflamatuvar hücreler -nötrofil- (→) görülmekte.

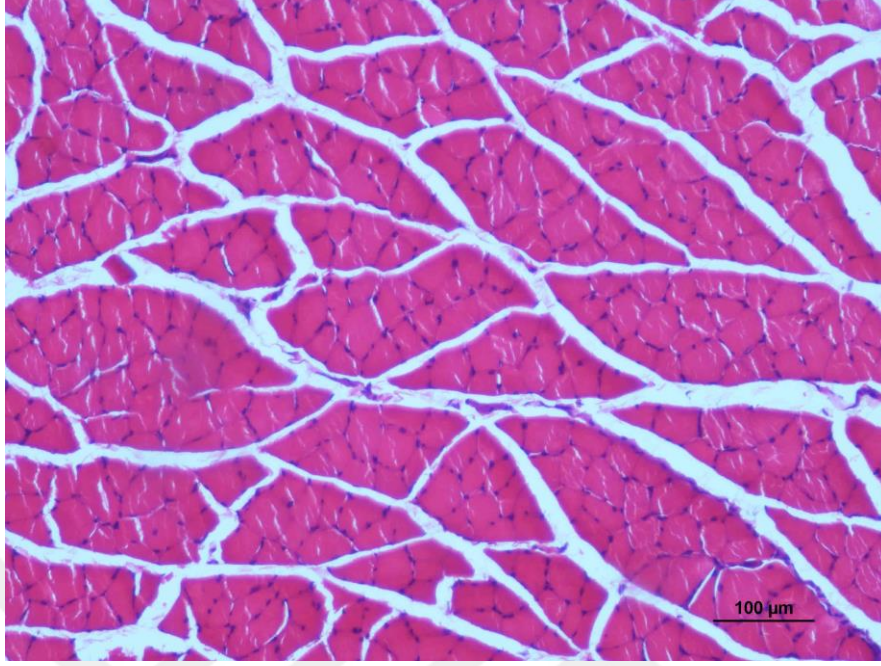
İskemi/reperfüzyon grubunda kas hücreleri arasında ödem, kanama odakları ve damar dışına ekstravaze olmaya başlamış ve hücreler arasında nötrofiller göze çarpmakta. Nekrotik kas hücreleri yer yer görülmekte. Kas hücrelerinde merkezi çekirdek de görülmesi hücre hasarını yansıtmaktadır (Şekil 4.13.).



Şekil 4.13. İ/R grubuna ait görüntü. Hematoksilen Eozin, 20x, bar 50 μ m Kas hücrelerinin bir kısmında dejenerasyon (nekroz) (*), kas hücreleri arasında ödem (Ö) ve nötrofiller(→) görülmekte. Ayrıca kanama da (K) gözlenmektedir.

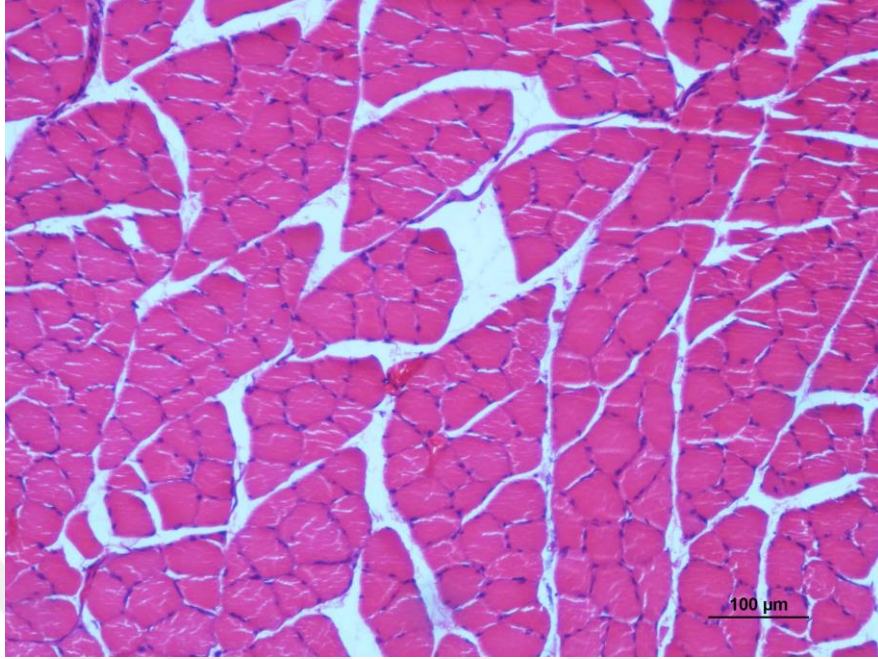
Deney sonrası alınan kas örnekleri histopatolojik olarak incelendiğinde, İ/R + tedavi grubuna ait örnekler makroskopik olarak normal doku görünümünde olmakla birlikte; mikroskopik olarak normale yakın doku görünümüne sahip olduğu tespit edildi (Şekil 4.14.).

Elde edilen verilere göre İ/R + tedavi grubunda dokuların hem mikroskopik hem de makroskopik olarak normale yakın görünümde olması uygulanan astaksantin'in iskemi/reperfüzyon hasarını azalttığı gösterilmiştir.



Şekil 4.14. İ/R + Tedavi grubuna ait görüntü. Hematoksilen Eozin, 10x, bar 100μm

Deney sonrası alınan kas örnekleri histopatolojik olarak incelendiğinde, ilaç grubuna ait örnekler makroskopik olarak normal doku görünümünde olmakla birlikte; mikroskopik olarak normal doku görünümüne sahip olduğu tespit edildi (Şekil 4.15.).



Şekil 4.15. İlaç grubuna ait görüntü. Hematoksilen Eozin, 10x, bar 100µm

Deney sonrası alınan kas örnekleri histopatolojik olarak caspase-3 immün işaretleme yapılarak incelendiğinde; caspase-3 pozitif işaretlenen hücrelerin (apoptotik hücreler) sonuçları tablodaki gibidir (Tablo 4.17.).

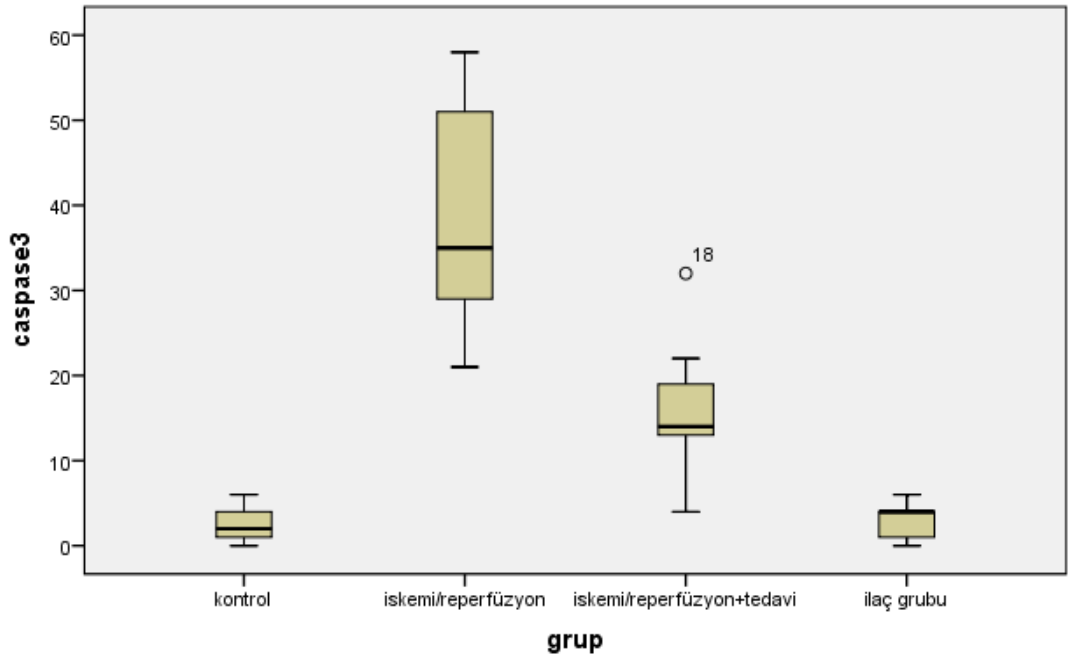
Tablo 4.17. Gruplara Göre Caspase-3 Pozitif(Apoptotik hücre) Değerlendirme Sonuçları

Hayvan numarası	Kontrol	İ/R	İ/R + Tedavi	İlaç
1	0	34	14	6
2	4	54	32	4
3	4	30	22	4
4	2	58	4	4
5	2	34	12	2
6	0	46	14	0
7	2	28	18	0
8	6	42		

Tablo 4.18. Caspase-3 Bulgularının İstatiksel Verileri

Caspase-3	Kontrol	İskemi/Reperfüzyon	İskemi/reperfüzyon + Tedavi	İlaç
Sayı	8	8	7	7
Ortalama	2,50	38,63	16,29	2,86
Medyan	2,00	35,00	14,00	4,00
Std. Sapma	2,070	13,233	8,751	2,268
Minimum	0	21	4	0
Maksimum	6	58	32	6

Yapılan istatistiksel analize göre caspase-3 bulguları için gruplar arasında anlamlı fark bulunmuştur ($p=0,000$). Bu bilgi doğrultusunda gruplar arasında ayrı ayrı karşılaştırma yapılmıştır.

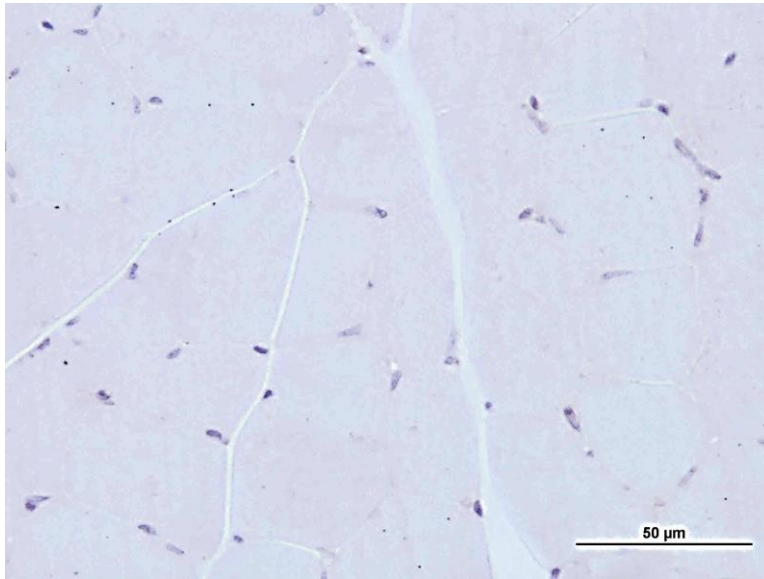


Şekil 4.16. Caspase-3 değerlerinin gruplara göre dağılımı

Caspase-3 bulguları için gruplar arası yapılan değerlendirmede kontrol grubu ve İ/R grubu arasında istatistiksel olarak anlamlı fark bulunmuştur ($p=0,000$). Kontrol grubu ve İ/R + tedavi grubu arasında istatistiksel olarak anlamlı fark bulunamamıştır ($p>0,01$). İ/R grubu ve İ/R + tedavi grubu arasında istatistiksel olarak anlamlı fark bulunmuştur ($p=0,000$). İ/R grubu ve ilaç grubu arasında istatistiksel olarak anlamlı fark bulunmuştur ($p=0,000$).

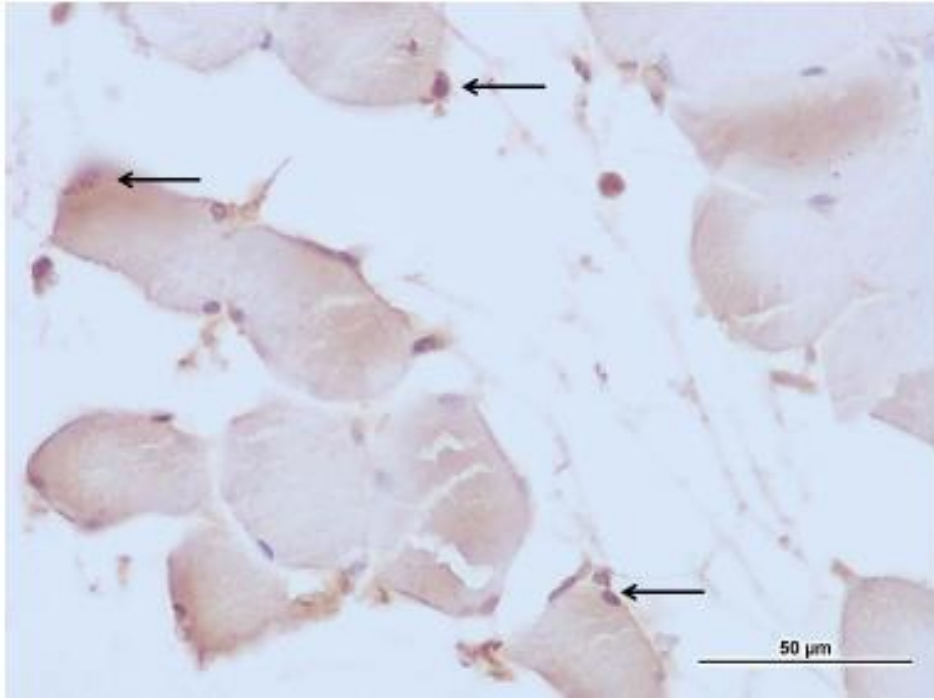
Elde edilen verilere göre kontrol grubu ile İ/R grubu arasında ve ilaç grubu ile İ/R grubu arasında caspase-3 bulguları açısından anlamlı fark bulunması iskemi/reperfüzyon uygulamasının caspase-3 (+) hücreleri (apoptotik hücreleri) arttırdığı gösterilmiştir. Kontrol grubuna göre İ/R + tedavi grubunda caspase-3 (+) hücrelerin fazla olmasına rağmen arasında anlamlı fark çıkmaması kullanılan astaksantin apoptozisi azalttığı gösterilmiştir. İ/R grubuna göre İ/R + tedavi grubunda caspase-3 (+) hücrelerin anlamlı derecede düşük çıkması kullanılan astaksantin iskemi/reperfüzyon hasarını azalttığı gösterilmiştir.

Deney sonrası alınan kas örnekleri histopatolojik olarak caspase-3 immün işaretleme yapılarak incelendiğinde, kontrol grubuna ait örnekler mikroskopik olarak normal doku görünümüne sahip olduğu tespit edildi (Şekil 4.17.).



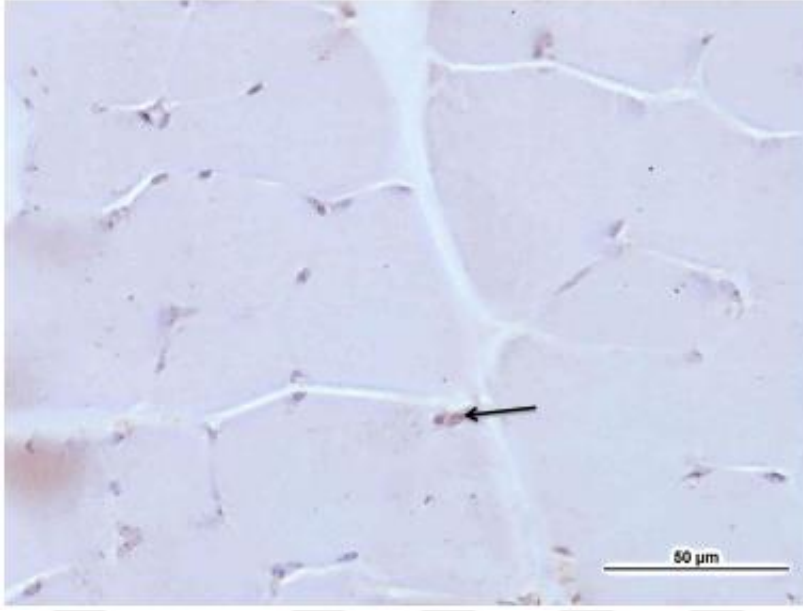
Şekil 4.17. Kontrol grubuna ait görüntü. Caspase-3 immün boyama. 40x

Deney sonrası alınan kas örnekleri histopatolojik olarak caspase-3 immün işaretleme yapılarak incelendiğinde, İ/R grubuna ait örnekler mikroskopik olarak caspase-3 (+) apoptotik çekirdeklere sahip olduğu tespit edildi (Şekil 4.18.). Bu verilere göre iskemi/reperfüzyon uygulamasının apoptozise yol açtığı gösterilmiştir.



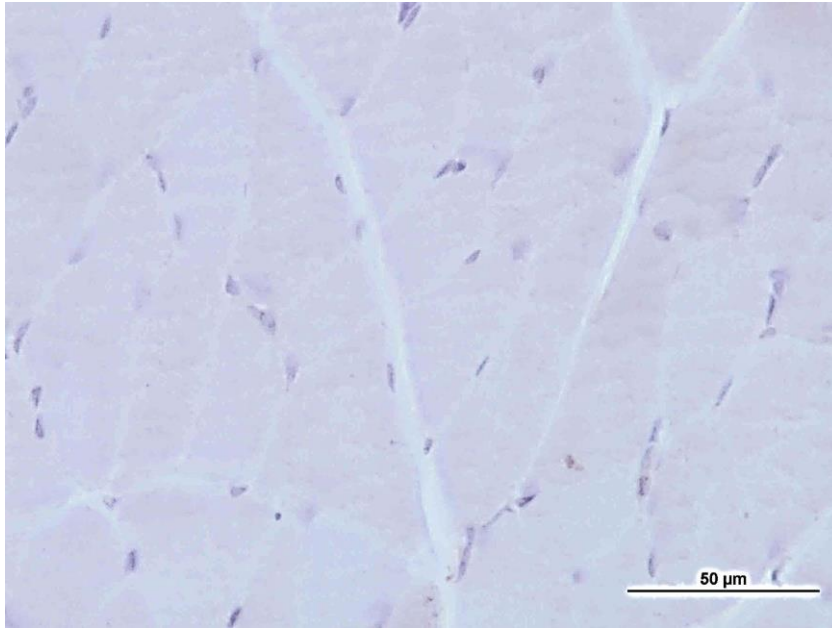
Şekil 4.18. İ/R grubuna ait görüntü. Caspase-3 (+) apoptotik çekirdekler. Caspase-3 immün boyama. 40x

Deney sonrası alınan kas örnekleri histopatolojik olarak caspase-3 immün işaretleme yapılarak incelendiğinde, İ/R + tedavi grubuna ait örnekler mikroskopik olarak İ/R grubuna göre daha az caspase-3 (+) apoptotik çekirdeğe sahip olduğu tespit edildi (Şekil 4.19.). Bu verilere göre astaksantin kullanımı iskemi/reperfüzyon hasarını azalttığı gösterilmiştir.



Şekil 4.19. İ/R + tedavi grubuna ait görüntü. Caspase-3 (+) apoptotik çekirdek. Caspase-3 immun boyama. 40x

Deney sonrası alınan kas örnekleri histopatolojik olarak caspase-3 immun işaretleme yapılarak incelendiğinde, ilaç grubuna ait örnekler mikroskopik olarak normal doku görünümüne sahip olduğu tespit edildi (Şekil 4.20.).



Şekil 4.20. İlaç grubuna ait görüntü. Caspase-3 immun boyama. 40x

5. TARTIŞMA

Turnike; ortopedi ve travmatolojide ekstremitte cerrahisinde yıllardan beri sıklıkla kullanılmaktadır. Turnikenin avantajları, kansız bir ortam sağlaması nedeniyle cerrahiyi kolaylaştırması, kan kaybını azaltması ve ameliyat süresini kısaltmasıdır. Turnike, distalinde kalan dokuların kan akışını engellemesi ve altındaki nöromusküler yapılara olan mekanik etkisi nedeniyle fizyolojik olmayan bir uygulamadır. Yararlı etkilerinin yanında, turnike ilişkili sinir paralizileri, vasküler yaralanmalar, tromboemboli, kompartman sendromu ve ekstremitte iskemi/reperfüzyon hasarı iyi tanımlanmış ve ortopedik cerrahide halen ciddi morbidite ve mortalite nedeni olarak devam etmektedir(2, 3).

Turnike kullanımına bağlı oluşan komplikasyonları önlemek, kabul edilmiş önerilere uyulması halinde olasıdır. Bu önerilerin başlıcaları şunlardır; güvenli turnike kullanımı için birçok çalışmada elektronik pnömatik turnike kullanımı önerilmiştir. Turnike manşonunun olabildiği kadar geniş ve ekstremitteye uyumlu olmalıdır. Hatta temin edilebilecek olsa, her hastaya özel genişlik, uzunluk ve şekildeki bir manşon kullanılmalıdır. Manşonun altındaki cildi korumak için manşonun altını elastik sitokinet veya yumuşak bir pamuk ile sarmak önerilmektedir. Ekstremitedeki kanın elastik bandaj veya Esmarch bandajı ile boşaltılması, boşaltılmasını takiben hızlı bir şekilde manşonun şişirilmesi önerilmektedir. Şişirilmiş turnikenin maksimum 2 saat takılı kalması önerilmekte olup eğer 2 saatten daha fazla süre turnike kalacak ise 10'ar dakikalık reperfüzyon aralığı verilmesi yapılmış çalışmaların önemli bir sonucudur(1, 7). Ancak bu kabul edilmiş önerilere uyulması halinde bile turnikeye bağlı komplikasyonlar oluşabilmekte ve bizimde çalışmamızda araştırdığımız iskemi/reperfüzyon hasarı meydana gelebilmektedir.

Turnike kullanımına bağlı komplikasyonların bilinmesi ve bunların önlenmesi çok önemlidir. Kliniğimizde sıklıkla kullanılan turnikenin komplikasyonlarına önlemek amacıyla herhangi bir tedavi uygulanmamaktadır. Literatür taramasında antioksidan etkisi kanıtlanan astaksantin, I/R modelleri üzerinde birçok çalışma yapılmış olmasına rağmen astaksantin kullanımı sonrası

İ/R modeli yapılan ekstremitelerde oksidatif stres üzerine nasıl bir etki yaptığına dair bir çalışma yoktur. Biz çalışmamızda astaksantin antioksidan etkisi ile ekstremitelerde oluşan İ/R hasarını azaltabileceğini düşündük. Yaptığımız bu çalışmada, ratlarda oluşturulan İ/R modellerinde astaksantin etkisi biyokimyasal ve histopatolojik bulgular ile değerlendirilmiştir.

Literatüre bakınca oluşan oksidatif stresi azaltmak için yapılmış birçok çalışma mevcuttur. Ikemoto Y ve ark. yaptıkları çalışmada deneklere turnike uygulamadan önce ekstremitelere soğuk uygulama yapmışlardır(4). Soğuk uygulamanın serum myoglobin miktarını azalttığını belirterek oksidatif strese bağlı kas hasarını azalttığını göstermişlerdir. Erturk E ve ark. intratekal anestezi ile artroskopik diz cerrahisi yapılan 60 hasta üzerinde yaptıkları çalışmada propofol ve N-asetil sistein infüzyonunun İ/R hasarını azalttığını göstermişlerdir(143). Koca K ve ark. turnike uygulayarak İ/R modeli oluşturdukları 32 adet rat üzerinde yaptıkları çalışmada hiperbarik oksijen ve ozon uygulamalarının rat iskelet kasında İ/R ile oluşan oksidatif strese karşı koruyucu etkisi olduğunu bulmuşlardır(144). Gurbuz H ve ark. yaptıkları bir çalışmada 7 gün süreyle tavşanlara E vitamini vermişler ve E vitamini kullanımının serbest oksijen radikallerinin lipid peroksidasyonunu engelleyerek antioksidan etki gösterdiği sonucuna ulaşmışlardır(145). Bizim çalışmamızda kullandığımız astaksantin lipid peroksidasyonu engelleyerek antioksidan etki göstermektedir. Astaksantin aynı zamanda keto-hidroksil gruplarını içeren özel moleküler yapısından dolayı hücre zarına çok iyi oriyente olmakta ve hücrenin hem iç hem de dış membranında kalıcı olmasını sağlamaktadır. Astaksantin bu özelliği sadece iç veya dış membranda lokalize olabilen beta-karoten ve vitamin C'ye göre hücreyi membran peroksidasyonundan daha iyi bir korumaktadır.

Yaptığımız literatür taramasında çalışmamızda kullandığımız antioksidan bir madde olan astaksantin oksidatif strese karşı etkisini araştıran birçok çalışma mevcuttur. Antioksidan etkisi kanıtlanan astaksantin, iskemi/reperfüzyon modelleri üzerine Xuefeng Qiu ve ark. renal İ/R hasarı oluşturdukları fareler üzerinde yaptıkları çalışmada 14 gün boyunca verilen astaksantin serbest radikalleri yakalayarak membran lipid peroksidasyonunu engellediğini böylece

antioksidan etkisi olduğunu göstermişlerdir(146). Otsuka T ve ark. fareler üzerinde in vivo ve in vitro retinal İ/R hasarı yaptıkları çalışmada iskemiden önce tek doz ve İ/R'dan sonra 4 gün boyunca astaksantin vermişlerdir. 5. gün in vivo olarak elektroretinograma ve histolojik analize, in vitro olarak ROS ve hücre ölümüne bakmışlardır. İn vivo olarak retinal iskemik hasarı azalttığını ve elektroretinogram bulgularını düzelttiğini, in vitro olarak serbest oksijen moleküllerini bağlayarak retinal iskemik hasarı azalttığını göstermişlerdir(147). Li J ve ark. fareler üzerinde hepatik iskemi/reperfüzyon hasarı yaptıkları çalışmada 14 gün boyunca verilen astaksantin apoptozisi ve ROS'u azaltarak hepatik hasarı azalttığını göstermişlerdir(148). Astaksantin, kardiovasküler sistemde etkisi üzerine yapılan bir çalışmada, serbest radikalleri yakalayıp, reaktif oksijen ve nitrojen türlerini azaltarak antioksidan etkisi gösterilmiştir. β -karotenden 11 kat, E vitamininden 550 kat daha potent olduğu ve depolanmadığı için güvenle kullanılabileceği vurgulanmıştır(9).

Literatüre bakılınca Hossain MM ve ark. yaptıkları çalışmada ratlara uygulanan astaksantin oksidatif stres belirteçleri olan MDA, NO'ı azalttığını gösterilmiştir(149). Xuan RR ve ark. yaptıkları çalışmada ratlara verilen astaksantin MDA değerlerini düşürdüğü gösterilmiştir(150). Choi HD ve ark. yaptıkları çalışmada ise 23 adet obez yetişkin 3 hafta boyunca astaksantin kullanımı sonrası bakılan MDA değerleri anlamlı derecede düşmüştür(16). Bu çalışmalarda astaksantin oksidan bir madde olan MDA'ı azaltarak antioksidan etkisi gösterilmiştir. Bizim çalışmamızda da uygulanan astaksantin MDA'ı azalttığını gösterilmiştir.

Literatüre bakılınca Zhang J ve ark. fareler üzerinde yaptıkları çalışmada astaksantin kullanımının SOD değerlerini arttırdığını göstererek asetaminofen kaynaklı karaciğer hasarını azalttığını belirtmişlerdir(151). Al Amin MM ve ark. yaptıkları çalışmada farelere uygulanan astaksantin SOD, katalaz ve glutatyon peroksidaz aktivitesini arttırdığını gösterilmiştir(152). Choi HD ve ark. yaptıkları çalışmada ise 23 adet obez yetişkin 3 hafta boyunca astaksantin kullanımı sonrası bakılan SOD değerleri anlamlı derecede yükselmiştir(16). Xuan RR ve ark. yaptıkları çalışmada ratlara verilen astaksantin SOD değerlerini de arttırdığı

gösterilmiştir(150). Bu çalışmalarda çıkan sonuçlar bizim çalışmamızda serum SOD değerleri için çıkan sonuca benzemektedir.

Ancak Meng H ve ark. yaptıkları çalışmada uygulanan astaksantin antioksidan olan SOD, katalaz ve glutatyon peroksidaz düzeylerini düşürdüğü gösterilmiştir(153). Bu çalışmalarda çıkan sonuçlar bizim çalışmamızda doku SOD değerleri için çıkan sonuca benzemekle birlikte beklediğimiz bir sonuç değildir.

Literatüre bakılınca Goda AA ve ark. yaptıkları çalışmada oksidatif strese karşı astaksantin kullanımı sonucunda TAK değerleri yükselişe geçmiştir(154). Choi HD ve ark. yaptıkları çalışmada ise 23 adet obez yetişkin 3 hafta boyunca astaksantin kullanımı sonrası bakılan TAK değerleri anlamlı derecede yükselmiştir(16). Turkez H ve ark. yaptıkları çalışmada oksidatif stresi arttıran bir maddenin zararlı etkisini azaltmaya yönelik verilen astaksantin TAK'ı arttırdığı gösterilmiştir(155). Ancak bizim çalışmamızda uygulanan astaksantin TAK'ı artırmasına beklememize rağmen TAK değerleri anlamlı olmamakla birlikte düşüş göstermiştir. Bu sonuç literatürde yapılmış çalışmalarda çıkan sonuçlarla uyum göstermemektedir.

Turkez H ve ark. yaptıkları çalışmada oksidatif stresi arttıran bir maddenin zararlı etkisini azaltmaya yönelik verilen astaksantin TOS'u düşürdüğü gösterilmiştir(155). Bu çalışmada çıkan sonuç çalışmamızda doku TOS değerleri için çıkan sonuçla benzerdir ve beklediğimiz bir sonuçtur. Ancak çalışmamızda serum TOS değerleri anlamlı olmamakla birlikte artma eğilimindedir. Bu beklediğimiz bir sonuç değildir.

Yapılan literatür taramasında Zhang J ve ark. fareler üzerinde yaptıkları çalışmada astaksantin kullanımının hepatik nekrozu azalttığını göstererek asetaminofen kaynaklı karaciğer hasarını azalttığını belirtmişlerdir(151). Fang Q ve ark. derin yanık modeli oluşturdukları ratlar üzerinde yaptıkları çalışmada astaksantin kullanımının oksidatif stres kaynaklı inflamasyon ve nekrozu azalttığını belirtmişlerdir(156). Chen G ve ark. yaptıkları çalışmada vitamin D, E ve astaksantin kullanımı inflamasyon ve nekrozu azaltarak nonalkolik yağlı karaciğer hastalığını önlediğini veya tedavi ettiğini belirtmişlerdir(157). Bizim

çalışmamızda İ/R modeli yapılan hücrelere mikroskopik olarak bakıldığında astaksantin kullanımı doku nekrozunu azaltmıştır. Doku nekrozu miktarına göre yapılan nekroz skorunu anlamlı derecede azalttığı gösterilmiştir ve literatürdeki çalışmalarla uyum içindedir.

Literatür taramasında Xu L ve ark. ratlar üzerinde yaptıkları çalışmada astaksantin kullanımının inflamasyonu azalttığını göstermiştir(158). Kang H ve ark. yaptıkları çalışmada astaksantin ve beta karoten içeren yiyeceklerin *Helicobakter pylorinin* indüklediği gastrik inflamasyonu azalttığını göstermiştir(159). Ni X ve ark. yaptıkları çalışmada farelere prostat kanser hücresi subkutan olarak inokule edilerek tümör belli bir büyüklüğe ulaşınca oral yolla verilen astaksantin ve zeytin yağı verilerek tümöre karşı koruyucu etkisine bakılmıştır. Yüksek doz verilen astaksantin inflamasyonu azalttığı ve antikanserojen etki gösterdiği belirtilmiştir(160). Kim B ve ark. yaptıkları çalışmada diyetle indüklenen obezite ve nonalkolik steatohepatit oluşturulan fare modellerinde astaksantin kullanımının karaciğer ve yağ dokusunda inflamasyon ve fibrozisi inhibe ettiği ve obez farelerdeki iskelet kasının mitokondrial yağ asidi oksidasyon kapasitesini arttırdığını belirtmişlerdir(161). Kuraji M ve ark. fareler üzerinde yaptıkları çalışmada 72 hafta boyunca astaksantin kullanımının inflamasyonu azaltarak yaşlanmaya bağlı tükürük salgısının azalmasını engellediğini belirtmişlerdir(162). Chen G ve ark. yaptıkları çalışmada vitamin D, E ve astaksantin kullanımı inflamasyonu azaltarak nonalkolik yağlı karaciğer hastalığını önlediğini veya tedavi ettiğini belirtmişlerdir(157). Bizim çalışmamızda da astaksantin kullanımı sonucu inflamasyonu azalttığı gösterilmiştir. Bunun sonucunda turnike kullanımı sonrası sistemik dolaşıma salınan inflamatuvar mediatörlerin yol açtığı hastalıkları bağlı morbidite ve mortaliteyi azaltacağını düşündük.

Yapılan literatür taramasında Li X ve ark. ratlar üzerinde oksidatif stres uygulanarak yapılan bir çalışmada kullanılan astaksantin caspase-3 ve caspase-9 (+) hücre sayısını azalttığını göstermiştir(163). Zhang M ve ark. yaptıkları çalışmada travma uygulanarak oluşan caspase-3 (+) hücre sayısını astaksantin kısmi olarak azalttığını göstermiştir(164). Masoudi A ve ark. yaptıkları çalışmada ciddi spinal kord hasarı oluşturdukları yetişkin ratlar üzerinde astaksantin

etkisine bakmışlardır. Astaksantin caspase-3 (+) hücre sayısını azalttığını ve spinal kord hasarının gerilediğini göstermişlerdir(165). Xu L ve ark. ratlar üzerinde yaptıkları çalışmada astaksantin kullanımının caspase-3 ve caspase-9 (+) hücre sayısını azalttığını göstermiştir(158). Jang HY ve ark. in vitro sığır embriyosunda yaptıkları çalışmada astaksantin caspase-3 (+) hücreleri azalttığını göstermiştir(166). Camera E ve ark. astaksantin, kantaksantin ve beta karotenin oksidatif stres üzerine etkileri için yaptıkları çalışmada astaksantin kullanılan grupta en az caspase-3 (+) hücreyi görmüşlerdir(167). Ni X ve ark. yaptıkları çalışmada farelere prostat kanser hücresini subkutan olarak inokule etmişlerdir. Tümör belli bir büyüklüğe ulaştınca oral yolla astaksantin ve zeytin yağı verilerek tümöre karşı koruyucu etkisine bakılmıştır. Yüksek doz verilen astaksantin caspase (+) hücreleri azalttığı gösterilerek antitümoral etkisi belirtilmiştir(160). Fang Q ve ark. derin yanık modeli oluşturdukları ratlar üzerinde yaptıkları çalışmada astaksantin kullanımının oksidatif stres kaynaklı caspase aktivitesini azaltarak apoptozise daha az yol açtığını ve böylece yanık etkilerinin gerilediğini belirtmişlerdir(156). Bizim çalışmamızda yapılan mikroskopik incelemede caspase-3 (+) hücre sayısı astaksantin kullanılan grupta daha az görülmüştür. Bu sonuç, hücrelerdeki apoptozisi astaksantin kullanımının anlamlı derecede azalttığı yani turnike kullanımı sonrası oluşabilecek kas ölümü ve sinir paralizilerinin önüne geçilebileceğini göstermiştir.

6. SONUÇ

İ/R grubunda doku MDA değerlerinin, kontrol ve ilaç grubuna göre anlamlı derecede yüksek çıkması uygulanan iskemi/reperfüzyonun MDA'ı yükselttiğini göstermiştir. Kontrol grubu ve ilaç grubuna göre İ/R grubu ve İ/R + tedavi grubunda serum TOS değerlerinin daha yüksek seviyede çıkması uygulanan İ/R'un toplam oksidatif seviyeyi arttırdığı gösterilmiştir. Bu sonuçlar çalışmamızda İ/R hasarı oluştuğunu ve uygulanan turnikenin vücutta oksidan stres oluşturduğunu göstermektedir.

Kontrol grubuna göre ilaç grubunda doku ve serum MDA değerleri anlamlı derece düşük çıkmıştır. Kullanılan astaksantin MDA değerlerini düşürdüğü göstermiştir. Kontrol grubuna göre ilaç grubunda ve İ/R grubuna göre İ/R + tedavi grubunda doku TOS değerleri daha düşük çıkmıştır. Böylece çalışmamızda astaksantin antioksidan etkisi olduğu gösterilmiştir.

İ/R grubuna ait hücrelerin bir kısmında dejenerasyon, kas hücreleri arasında ödem ve inflamatuvar hücrelerin olduğu tespit edildi. İ/R + tedavi grubuna ait hücrelerin normale yakın doku görünümüne sahip olduğu tespit edildi. İ/R uygulamasının nekroz, ödem ve inflamasyona neden olduğu ve uygulanan astaksantin nekroz, ödem ve inflamasyonu azalttığı bu nedenle turnike kullanımı öncesi ve sonrasında astaksantin kullanılabileceği gösterilmiştir.

İ/R + tedavi grubuna ait örnekler İ/R grubuna göre daha az caspase-3 (+) apoptotik çekirdeğe sahip olduğu tespit edildi. Astaksantin kullanımının apoptozisi azaltarak turnike kullanımının neden olduğu kas ve sinir hücrelerinde ölümü azaltılabileceği gösterilmiştir.

Bütün sonuçları değerlendirecek olursak astaksantin histopatolojik olarak tüm verilerde biyokimyasal olarak ise verilerin çoğunda antioksidan etkili olduğu gösterilmiştir. Bu nedenle, turnike kullanılması önceden planlanmış ameliyatlarda cerrahi öncesi ve sonrası astaksantin kullanımının yararlı olacağı ve ortaya çıkacak serbest oksijen radikallerinin ve bunlara bağlı doku hasarının azaltılabileceğini düşünmekteyiz. Astaksantin hakkında daha çok ve geniş kapsamlı çalışmalar yapılarak daha net bilgiler edinebiliriz. Yapılan çalışmaların tamamına yakını hayvan deneyi olması nedeniyle insanlar üzerindeki etkisini öğrenebilmek için klinik çalışmalar yapılabilir. Çalışmamız sonucu turnike kullanımı öncesi veya sonrasında astaksantin kullanımının oluşabilecek olan İ/R hasarına karşı koruyucu veya tedavi edici olarak kullanılabileceğini düşünmekteyiz. Ancak yine de tumikenin aslında oldukça tehlikeli bir alet olduğu ve çok dikkatli kullanılması gerekliliği akıldan çıkarılmamalıdır.

7. KAYNAKLAR

1. Tecimer T, Yedek I, Bilgic E, Zaim E, Kilickap C. Usage of tourniquet in extremity surgery. *Acta Orthop Traumatol Turc.* 2004;29(2):172-6.
2. Murry CE, Jennings RB, Reimer KA. Preconditioning with ischemia: a delay of lethal cell injury in ischemic myocardium. *Circulation.* 1986;74(5):1124-36.
3. Garcia-Criado F, Eleno N, Santos-Benito F, Valdunciel J, Reverte M, Lozano-Sanchez F, et al. Protective effect of exogenous nitric oxide on the renal function and inflammatory response in a model of ischemia-reperfusion. *Transplantation.* 1998;66(8):982-90.
4. Ikemoto Y, Kobayashi H, Usui M, Ishii S. Changes in serum myoglobin levels caused by tourniquet ischemia under normothermic and hypothermic conditions. *Clinical orthopaedics and related research.* 1988;234:296-302.
5. Klenerman L, Lowe NM, Miller I, Fryer PR, Green CJ, Jackson MJ. Dantrolene sodium protects against experimental ischemia and reperfusion damage to skeletal muscle. *Acta orthopaedica Scandinavica.* 1995;66(4):352-8.
6. Lee KR, Cronenwett JL, Schlafer M, Corpron C, Zelenock GB. Effect of superoxide dismutase plus catalase on Ca^{2+} transport in ischemic and reperfused skeletal muscle. *Journal of Surgical Research.* 1987;42(1):24-32.
7. Swanson AB, Livengood LC, Sattel AB. Local hypothermia to prolong safe tourniquet time. *Clinical orthopaedics and related research.* 1991;264:200-8.
8. Akin O. *Haematococcus pluvialis* mikroalginden astaksantin ekstraksiyonu: Ege Üniversitesi; 2005.
9. Fassett RG, Coombes JS. Astaxanthin in cardiovascular health and disease. *Molecules.* 2012;17(2):2030-48.
10. Aoi W, Naito Y, Takanami Y, Ishii T, Kawai Y, Akagiri S, et al. Astaxanthin improves muscle lipid metabolism in exercise via inhibitory effect of oxidative CPT I modification. *Biochemical and biophysical research communications.* 2008;366(4):892-7.
11. Gök V, Kayacı A, Telli R. Hayvansal ve mikrobiyal kaynaklı doğal antioksidanlar. *Gıda Teknolojileri Elektronik Dergisi.* 2006;2:35-40.
12. Torrissen O, Christiansen R. Requirements for carotenoids in fish diets. *Journal of Applied Ichthyology.* 1995;11(3-4):225-30.

13. Torrissen O, Hardy R, Shearer K. Pigmentation of salmonids-carotenoid deposition and metabolism. *CRC Crit Rev Aquat Sci.* 1989;1(2):209-25.
14. Chan Kc, Mong Mc, Yin Mc. Antioxidative and Anti-Inflammatory Neuroprotective Effects of Astaxanthin and Canthaxanthin in Nerve Growth Factor Differentiated PC12 Cells. *Journal of food science.* 2009;74(7).
15. Tripathi D, Jena G. Intervention of astaxanthin against cyclophosphamide-induced oxidative stress and DNA damage: a study in mice. *Chemico-biological interactions.* 2009;180(3):398-406.
16. Choi HD, Kim JH, Chang MJ, Kyu-Youn Y, Shin WG. Effects of astaxanthin on oxidative stress in overweight and obese adults. *Phytotherapy Research.* 2011;25(12):1813-8.
17. Yuan JP, Peng J, Yin K, Wang JH. Potential health-promoting effects of astaxanthin: A high-value carotenoid mostly from microalgae. *Molecular nutrition & food research.* 2011;55(1):150-65.
18. Park JS, Chyun JH, Kim YK, Line LL, Chew BP. Astaxanthin decreased oxidative stress and inflammation and enhanced immune response in humans. *Nutrition & metabolism.* 2010;7(1):18.
19. Res PT, Cermak NM, Stinkens R, Tollakson T, Haenen GR, Bast A, et al. Astaxanthin supplementation does not augment fat use or improve endurance performance. *Medicine & Science in Sports & Exercise.* 2013;45(6):1158-65.
20. Kurashige M, Okimasu E, Inoue M, Utsumi K. Inhibition of oxidative injury of biological membranes by astaxanthin. *Physiological chemistry and physics and medical NMR.* 1990;22(1):27-38.
21. Aoi W, Naito Y, Sakuma K, Kuchide M, Tokuda H, Maoka T, et al. Astaxanthin limits exercise-induced skeletal and cardiac muscle damage in mice. *Antioxidants and Redox Signaling.* 2003;5(1):139-44.
22. Maezawa T, Tanaka M, Kanazashi M, Maeshige N, Kondo H, Ishihara A, et al. Astaxanthin supplementation attenuates immobilization-induced skeletal muscle fibrosis via suppression of oxidative stress. *The Journal of Physiological Sciences.* 2017;67(5):603-11.
23. Shibaguchi T, Yamaguchi Y, Miyaji N, Yoshihara T, Naito H, Goto K, et al. Astaxanthin intake attenuates muscle atrophy caused by immobilization in rats. *Physiological reports.* 2016;4(15):e12885.

24. Yoshihara T, Yamamoto Y, Shibaguchi T, Miyaji N, Kakigi R, Naito H, et al. Dietary astaxanthin supplementation attenuates disuse-induced muscle atrophy and myonuclear apoptosis in the rat soleus muscle. *The Journal of Physiological Sciences*. 2017;67(1):181-90.
25. Carden DL, Granger DN. Pathophysiology of ischaemia–reperfusion injury. *The Journal of pathology*. 2000;190(3):255-66.
26. Huk I, Brovkovich V, Nanobash Vili J, Weigel G, Neumayer C, Partyka L, et al. Bioflavonoid quercetin scavenges superoxide and increases nitric oxide concentration in ischaemia–reperfusion injury: an experimental study. *British Journal of Surgery*. 1998;85(8):1080-5.
27. Cantürk NZ, Sayek İ. Cerrahi araştırma: Nobel Tıp Kitabevleri; 2005.
28. Kumar V, Cotran R, Robbins S. Temel Patoloji (Basic Pathology). 2000:6-10,30-6.
29. Eltzschig HK, Collard CD. Vascular ischaemia and reperfusion injury. *British medical bulletin*. 2004;70(1):71-86.
30. Collard CD, Gelman S. Pathophysiology, clinical manifestations, and prevention of ischemia-reperfusion injury. *The Journal of the American Society of Anesthesiologists*. 2001;94(6):1133-8.
31. Toyokuni S. Reactive oxygen species-induced molecular damage and its application in pathology. *Pathology international*. 1999;49(2):91-102.
32. Ernster L. Biochemistry of reoxygenation injury. *Critical care medicine*. 1988;16(10):947-53.
33. Granger DN. Role of xanthine oxidase and granulocytes in ischemia-reperfusion injury. *American Journal of Physiology-Heart and Circulatory Physiology*. 1988;255(6):H1269-H75.
34. Dick F, Li J, Giraud M-N, Kalka C, Schmidli J, Tevæarai H. Basic control of reperfusion effectively protects against reperfusion injury in a realistic rodent model of acute limb ischemia. *Circulation*. 2008;118(19):1920-8.
35. Murata I, Miyake Y, Takahashi N, Suzuki R, Fujiwara T, Sato Y, et al. Low-Dose Sodium Nitrite Fluid Resuscitation Prevents Lethality From Crush Syndrome by Improving Nitric Oxide Consumption and Preventing Myoglobin Cytotoxicity in Kidney in A Rat Model. *Shock*. 2017;48(1):112-8.
36. Chang Y-K, Huang S-C, Kao M-C, Huang C-J. Cepharanthine alleviates liver injury in a rodent model of limb ischemia–reperfusion. *Acta Anaesthesiologica Taiwanica*. 2016;54(1):11-5.

37. Gürsul C, Ekinci Akdemir FN, Akkoyun T, Can İ, Gül M, Gülçin İ. Protective effect of Naringin on experimental hindlimb ischemia/reperfusion injury in rats. *Journal of enzyme inhibition and medicinal chemistry*. 2016;31(sup1):56-61.
38. Duehrkop C, Rieben R. Refinement of tourniquet-induced peripheral ischemia/reperfusion injury in rats: comparison of 2 h vs 24 h reperfusion. *Laboratory animals*. 2014;48(2):143-54.
39. Duehrkop C, Banz Y, Spirig R, Miescher S, Nolte MW, Spycher M, et al. C1 esterase inhibitor reduces lower extremity ischemia/reperfusion injury and associated lung damage. *PLoS One*. 2013;8(8):e72059.
40. Zhang S, Wotzkow C, Bongoni AK, Shaw-Boden J, Siegrist M, Taddeo A, et al. Role of the plasma cascade systems in ischemia/reperfusion injury of bone. *Bone*. 2017;97:278-86.
41. Daban Ugras UM, Oguzhan O, Mehmet Y, Seçkin A, Gazi OO, Cem O, et al. Protective effects of escin on hepatic ischemia-reperfusion injury in rats. *Acta Medica*. 2016;32:973.
42. Harris K, Walker P, Mickle D, Harding R, Gatley R, Wilson G, et al. Metabolic response of skeletal muscle to ischemia. *American Journal of Physiology-Heart and Circulatory Physiology*. 1986;250(2):H213-H20.
43. Reilly PM, Schiller HJ, Bulkley GB. Pharmacologic approach to tissue injury mediated by free radicals and other reactive oxygen metabolites. *The american journal of surgery*. 1991;161(4):488-503.
44. Chafin B, Belmont MJ, Quraishi H, Clovis N, Wax MK. Effect of clamp versus anastomotic-induced ischemia on critical ischemic time and survival of rat epigastric fasciocutaneous flap. *Head & neck*. 1999;21(3):198-203.
45. Boztosun B, Gunes Y, Kirma C. No-reflow'a guncel yaklasim/Current management of no-reflow. *The Anatolian Journal of Cardiology (Anadolu Kardiyoloji Dergisi)*. 2006;6(3):255-61.
46. Strock P, Majno G. Microvascular changes in acutely ischemic rat muscle. *Surgery, gynecology & obstetrics*. 1969;129(6):1213.
47. Mäkitie J, Teräväinen H. Histochemical studies of striated muscle after temporary ischemia in the rat. *Acta neuropathologica*. 1977;37(2):101-9.
48. Giannoudis P. Current concepts of the inflammatory response after major trauma: an update. *Injury*. 2003;34(6):397-404.
49. Şener G, ÇB Y. İskemi reperfüzyon hasarı. *Klinik Gelişim Derg*. 2009;22(3):5-13.

50. Rubin E, Reisner HM. Essentials of Rubin's pathology: Lippincott Williams & Wilkins; 2009.
51. Arumugam TV, Magnus T, Woodruff TM, Proctor LM, Shiels IA, Taylor SM. Complement mediators in ischemia–reperfusion injury. *Clinica Chimica Acta*. 2006;374(1):33-45.
52. Hänsch GM, Seitz M, Betz M. Effect of the late complement components C5b-9 on human monocytes: release of prostanoids, oxygen radicals and of a factor inducing cell proliferation. *International Archives of Allergy and Immunology*. 1987;82(3-4):317-20.
53. Hansch GM, Seitz M, Martinotti G, Betz M, Rauterberg E, Gerns D. Macrophages release arachidonic acid, prostaglandin E₂, and thromboxane in response to late complement components. *J Immunol*. 1984;133(4):2145-50.
54. Morgan BP. Regulation of the complement membrane attack pathway. *Critical Reviews™ in Immunology*. 1999;19(3).
55. Ascer E, Mohan C, Gennaro M, Cupo S. Interleukin-1 and thromboxane release after skeletal muscle ischemia and reperfusion. *Annals of vascular surgery*. 1992;6(1):69-73.
56. Ascer E, Gennaro M, Cupo S, Mohan C. Do cytokines play a role in skeletal muscle ischemia and reperfusion? *The Journal of cardiovascular surgery*. 1991;33(5):588-92.
57. Seekamp A, Warren JS, Remick D, Till G, Ward P. Requirements for tumor necrosis factor- α and interleukin-1 in limb ischemia/reperfusion injury and associated lung injury. *The American journal of pathology*. 1993;143(2):453.
58. Yi E, Ulich TR. Endotoxin, interleukin-1, and tumor necrosis factor cause neutrophil-dependent microvascular leakage in postcapillary venules. *The American journal of pathology*. 1992;140(3):659.
59. Zhang F, Hu EC, Topp S, Lei M, Chen W, Lineaweaver WC. Proinflammatory cytokines gene expression in skin flaps with arterial and venous ischemia in rats. *Journal of reconstructive microsurgery*. 2006;22(08):641-7.
60. Türegün M, Güdemez E, Newman P, Zins J, Siemionow M. Blockade of platelet endothelial cell adhesion molecule-1 (PECAM-1) protects against ischemia-reperfusion injury in muscle flaps at microcirculatory level. *Plastic and reconstructive surgery*. 1999;104(4):1033-40.
61. de la Ossa JC, Malago M, Gewertz BL. Neutrophil-endothelial cell binding in neutrophil-mediated tissue injury. *Journal of Surgical Research*. 1992;53(1):103-7.
62. Mathes SJ, Nahai F. *Reconstructive surgery: principles, anatomy & technique*: Churchill Livingstone; 1997. 39-46 p.

63. Okada Y, Copeland BR, Fitridge R, Koziol JA, Del Zoppo GJ. Fibrin contributes to microvascular obstructions and parenchymal changes during early focal cerebral ischemia and reperfusion. *Stroke*. 1994;25(9):1847-53.
64. Korthuis RJ, Grisham MB, Granger DN. Leukocyte depletion attenuates vascular injury in postischemic skeletal muscle. *American Journal of Physiology-Heart and Circulatory Physiology*. 1988;254(5):H823-H7.
65. Schlag M, Harris K, Potter R. Role of leukocyte accumulation and oxygen radicals in ischemia-reperfusion-induced injury in skeletal muscle. *American Journal of Physiology-Heart and Circulatory Physiology*. 2001;280(4):H1716-H21.
66. Franzoni F, Quiñones-Galvan A, Regoli F, Ferrannini E, Galetta F. A comparative study of the in vitro antioxidant activity of statins. *International journal of cardiology*. 2003;90(2):317-21.
67. Marnett LJ. Lipid peroxidation—DNA damage by malondialdehyde. *Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis*. 1999;424(1):83-95.
68. Bircan FS, Balabanli B, Turkozkan N, Ozan G. Effects of taurine on nitric oxide and 3-nitrotyrosine levels in spleen during endotoxemia. *Neurochemical research*. 2011;36(11):1978-83.
69. Moncada S, Palmer R, Higgs E. Nitric oxide: physiology, pathophysiology, and pharmacology. *Pharmacological reviews*. 1991;43(2):109-42.
70. Lowenstein CJ, Alley EW, Raval P, Snowman AM, Snyder SH, Russell SW, et al. Macrophage nitric oxide synthase gene: two upstream regions mediate induction by interferon gamma and lipopolysaccharide. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 1993;90(20):9730-4.
71. Lowenstein CJ, Snyder SH. Nitric oxide, a novel biologic messenger. *Cell*. 1992;70(5):705-7.
72. Liu RH, Hotchkiss JH. Potential genotoxicity of chronically elevated nitric oxide: a review. *Mutation Research/Reviews in Genetic Toxicology*. 1995;339(2):73-89.
73. Wink DA, Kasprzak KS, Maragos CM, Elespuru RK, Misra M, Dunams TM, et al. DNA deaminating ability and genotoxicity of nitric oxide and its progenitors. *Science*. 1991:1001-3.
74. Nguyen T, Brunson D, Crespi C, Penman B, Wishnok J, Tannenbaum S. DNA damage and mutation in human cells exposed to nitric oxide in vitro. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 1992;89(7):3030-4.

75. Kilbourn RG, Gross SS, Jubran A, Adams J, Griffith OW, Levi R, et al. NG-methyl-L-arginine inhibits tumor necrosis factor-induced hypotension: implications for the involvement of nitric oxide. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 1990;87(9):3629-32.
76. Miller M, Sadowska-Krowicka H, Chotinaruemol S, Kakkis JL, Clark DA. Amelioration of chronic ileitis by nitric oxide synthase inhibition. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*. 1993;264(1):11-6.
77. Memişoğulları R. Diyabette serbest radikallerin rolü ve antioksidanların etkisi. 2005.
78. Nakazawa H, Fukuyama N, Takizawa S, Tsuji C, Yoshitake M, Ishida H. Nitrotyrosine formation and its role in various pathological conditions. *Free radical research*. 2000;33(6):771-84.
79. Çakatay U, Telci A, Kayali R, Tekeli F, Akçay T, Sivas A. Relation of aging with oxidative protein damage parameters in the rat skeletal muscle. *Clinical biochemistry*. 2003;36(1):51-5.
80. Chen H-Y, Hung Y-C, Lee E-J, Chen T-Y, Chuang I-C, Wu T-S. The protective efficacy of magnolol in hind limb ischemia-reperfusion injury. *Phytomedicine*. 2009;16(10):976-81.
81. Arnhold J. Properties, functions, and secretion of human myeloperoxidase. *Biochemistry (Moscow)*. 2004;69(1):4-9.
82. Hampton MB, Kettle AJ, Winterbourn CC. Inside the neutrophil phagosome: oxidants, myeloperoxidase, and bacterial killing. *Blood*. 1998;92(9):3007-17.
83. Klebanoff SJ. Myeloperoxidase: friend and foe. *Journal of leukocyte biology*. 2005;77(5):598-625.
84. Cobelens PM, van Putte BP, Kavelaars A, Heijnen CJ, Kesecioglu J. Inflammatory consequences of lung ischemia-reperfusion injury and low-pressure ventilation. *Journal of Surgical Research*. 2009;153(2):295-301.
85. Ernster L, Dallner G. Biochemical, physiological and medical aspects of ubiquinone function. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Molecular Basis of Disease*. 1995;1271(1):195-204.
86. Kavas GÖ. Serbest radikaller ve organizma üzerine etkileri. *Türkiye Klinikleri Journal of Medical Sciences*. 1989;9(1):1-8.
87. McCord JM. Oxygen-derived free radicals in postischemic tissue injury. *New England Journal of Medicine*. 1985;312(3):159-63.

88. Margail I, Plotkine M, Lerouet D. Antioxidant strategies in the treatment of stroke. *Free Radical Biology and Medicine*. 2005;39(4):429-43.
89. Kılınç K, Kılınç A. Oksijen toksisitesinin aracı molekülleri olarak oksijen radikalleri Hacettepe Tıp Dergisi. 2002;33(2):110-8.
90. Akpoyraz M, Durak İ. Serbest radikallerin biyolojik etkileri. Ankara Üniversitesi Tıp Fakültesi Mecmuası. 1995;48(02).
91. Tarr M, Samson F. Oxygen free radicals in tissue damage: Springer Science & Business Media; 2013.
92. Davies KJ. Oxidative damage & repair: Chemical, biological and medical aspects: Elsevier; 2013.
93. Greenstock C. Radiation and aging: free radical damage, biological response and possible antioxidant intervention. *Medical hypotheses*. 1993;41(5):473-82.
94. Olmez I, Ozyurt H. Reactive oxygen species and ischemic cerebrovascular disease. *Neurochemistry international*. 2012;60(2):208-12.
95. Dröge W. Free radicals in the physiological control of cell function. *Physiological reviews*. 2002;82(1):47-95.
96. Kehrer JP, Klotz L-O. Free radicals and related reactive species as mediators of tissue injury and disease: implications for Health. *Critical reviews in toxicology*. 2015;45(9):765-98.
97. Halliwell B. Free radicals, antioxidants, and human disease: curiosity, cause, or consequence? *The lancet*. 1994;344(8924):721-4.
98. Valko M, Leibfritz D, Moncol J, Cronin MT, Mazur M, Telser J. Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease. *The international journal of biochemistry & cell biology*. 2007;39(1):44-84.
99. Limón-Pacheco J, Gonsebatt ME. The role of antioxidants and antioxidant-related enzymes in protective responses to environmentally induced oxidative stress. *Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis*. 2009;674(1):137-47.
100. Matés JM, Pérez-Gómez C, De Castro IN. Antioxidant enzymes and human diseases. *Clinical biochemistry*. 1999;32(8):595-603.
101. Derviş E. Oral antioksidanlar. *Dermatoz*. 2011;2(1):263-7.

102. Öztürk M, Güzelhan Y, Sayar K, Tüzün Ü. Yaygın gelişimsel bozukluğu olan çocuklarda plazma malondialdehit ve glutatyon düzeylerinin araştırılması. Klinik Psikofarmakoloji Bülteni. 2001;11(3):155-9.
103. Reiter RJ. Oxidative processes and antioxidative defense mechanisms in the aging brain. The FASEB journal. 1995;9(7):526-33.
104. Allegra M, Reiter R, Tan DX, Gentile C, Tesoriere L, Livrea M. The chemistry of melatonin's interaction with reactive species. Journal of pineal research. 2003;34(1):1-10.
105. Wang WZ, Fang XH, Stephenson LL, Baynosa RC, Khiabani KT, Zamboni WA. Microcirculatory effects of melatonin in rat skeletal muscle after prolonged ischemia. Journal of pineal research. 2005;39(1):57-65.
106. Frei B. Reactive oxygen species and antioxidant vitamins: mechanisms of action. The American journal of medicine. 1994;97(3):S5-S13.
107. Velioğlu S. Doğal antioksidanların insan sağlığına etkileri. GIDA/THE JOURNAL OF FOOD. 2000;25(3).
108. Weeratunge W, Perera B. Formulation of a fish feed for goldfish with natural astaxanthin extracted from shrimp waste. Chemistry Central Journal. 2016;10(1):1-7.
109. Olaizola M, Huntley ME. Recent advances in commercial production of astaxanthin from microalgae. Biomaterials and Bioprocessing (Fingerman, M and Nagabhushanam, R, eds) Science Publishers. 2003.
110. Tinkler JH, Böhm F, Schalch W, Truscott TG. Dietary carotenoids protect human cells from damage. Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology. 1994;26(3):283-5.
111. Gershon D. The mitochondrial theory of aging:: Is the culprit a faulty disposal system rather than indigenous mitochondrial alterations? Experimental gerontology. 1999;34(5):613-9.
112. Boussiba S, Bing W, Yuan J-P, Zarka A, Chen F. Changes in pigments profile in the green alga *Haematococcus pluvialis* exposed to environmental stresses. Biotechnology Letters. 1999;21(7):601-4.
113. Boussiba S. Carotenogenesis in the green alga *Haematococcus pluvialis*: cellular physiology and stress response. Physiologia Plantarum. 2000;108(2):111-7.
114. Margalith P. Production of ketocarotenoids by microalgae. Applied microbiology and biotechnology. 1999;51(4):431-8.

115. Yokoyama A, Miki W. Composition and presumed biosynthetic pathway of carotenoids in the astaxanthin-producing bacterium *Agrobacterium aurantiacum*. *FEMS microbiology letters*. 1995;128(2):139-44.
116. Lorenz RT. A technical review of *Haematococcus* algae. *NatuRose™ Technical Bulletin*. 1999;60:1-12.
117. Chen Y, Li D, Lu W, Xing J, Hui B, Han Y. Screening and characterization of astaxanthin-hyperproducing mutants of *Haematococcus pluvialis*. *Biotechnology letters*. 2003;25(7):527-9.
118. Hagen C, Grünewald K, Xyländer M, Rothe E. Effect of cultivation parameters on growth and pigment biosynthesis in flagellated cells of *Haematococcus pluvialis*. *Journal of Applied Phycology*. 2001;13(1):79-87.
119. Hata N, Ogbonna JC, Hasegawa Y, Taroda H, Tanaka H. Production of astaxanthin by *Haematococcus pluvialis* in a sequential heterotrophic-photoautotrophic culture. *Journal of Applied Phycology*. 2001;13(5):395-402.
120. Naguib YM. Antioxidant activities of astaxanthin and related carotenoids. *Journal of agricultural and food chemistry*. 2000;48(4):1150-4.
121. Miki W. Biological functions and activities of animal carotenoids. *Pure and Applied Chemistry*. 1991;63(1):141-6.
122. Tominaga K, Hongo N, Karato M, Yamashita E. Cosmetic benefits of astaxanthin on humans subjects. *Acta Biochimica Polonica*. 2012;59(1):43.
123. Johnson EA, Schroeder WA. *Biotechnology of astaxanthin production in Phaffia rhodozyma*. ACS Publications; 1996.
124. Steinbrenner J, Linden H. Regulation of two carotenoid biosynthesis genes coding for phytoene synthase and carotenoid hydroxylase during stress-induced astaxanthin formation in the green alga *Haematococcus pluvialis*. *Plant Physiology*. 2001;125(2):810-7.
125. Vidhyavathi R, Venkatachalam L, Sarada R, Ravishankar GA. Regulation of carotenoid biosynthetic genes expression and carotenoid accumulation in the green alga *Haematococcus pluvialis* under nutrient stress conditions. *Journal of Experimental Botany*. 2008;59(6):1409-18.
126. Mentese A, Turkmen S, Karaguzel E, Karaca Y, Tatli O, Sumer AU, et al. The predictive value of ischemia-modified albumin in long-term results of ischemia-reperfusion injury in an experimental testicular torsion model. *Urology*. 2012;80(3):689-94.

127. Kobayashi M, Kurimura Y, Kakizono T, Nishio N, Tsuji Y. Morphological changes in the life cycle of the green alga *Haematococcus pluvialis*. *Journal of Fermentation and Bioengineering*. 1997;84(1):94-7.
128. O'Connor I, O'Brien N. Modulation of UVA light-induced oxidative stress by β -carotene, lutein and astaxanthin in cultured fibroblasts. *Journal of dermatological science*. 1998;16(3):226-30.
129. Fábregas J, Domínguez A, Regueiro M, Maseda A, Otero A. Optimization of culture medium for the continuous cultivation of the microalga *Haematococcus pluvialis*. *Applied microbiology and biotechnology*. 2000;53(5):530-5.
130. Tanaka T, Makita H, Ohnishi M, Mori H, Satoh K, Hara A. Chemoprevention of rat oral carcinogenesis by naturally occurring xanthophylls, astaxanthin and canthaxanthin. *Cancer Research*. 1995;55(18):4059-64.
131. Köksal M, Isik O, Uslu L, Mutlu Y. Işık, sıcaklık, besin eksikliği ve havalandırmanın *Haematococcus pluvialis* flotow'da büyüme ve astaksantin miktarına etkisi. *Journal of FisheriesSciences com*. 2012;6(4):297.
132. Fábregas J, Otero A, Maseda A, Domínguez A. Two-stage cultures for the production of astaxanthin from *Haematococcus pluvialis*. *Journal of Biotechnology*. 2001;89(1):65-71.
133. Kistler A, Liechti H, Pichard L, Wolz E, Oesterheld G, Hayes A, et al. Metabolism and CYP-inducer properties of astaxanthin in man and primary human hepatocytes. *Archives of toxicology*. 2002;75(11-12):665-75.
134. Boussiba S, Vonshak A, Cohen Z, Richmond A. Procedure for large-scale production of astaxanthin from *Haematococcus*. Google Patents; 2000.
135. Vonshak A, Torzillo G, editors. *Biotechnology for algal mass cultivation. International Workshop and Training Course on Photobioreactors Handbook*; 2003.
136. Erel O. A novel automated method to measure total antioxidant response against potent free radical reactions. *Clinical biochemistry*. 2004;37(2):112-9.
137. Koracevic D, Koracevic G, Djordjevic V, Andrejevic S, Cosic V. Method for the measurement of antioxidant activity in human fluids. *Journal of clinical pathology*. 2001;54(5):356-61.
138. Ghiselli A, Serafini M, Natella F, Scaccini C. Total antioxidant capacity as a tool to assess redox status: critical view and experimental data. *Free Radical Biology and Medicine*. 2000;29(11):1106-14.

139. Harma M, Harma M, Erel O. Oxidative stress in women with preeclampsia. *American journal of obstetrics and gynecology*. 2005;192(2):656-7.
140. Öztürk K, Ozyurt H, Somay A, Karaca C. The effects of nitric oxide donor molsidomine on skeletal muscle damage in a rat hind limb model of ischemia-reperfusion. *European Surgical Research*. 2009;42(2):71.
141. Duru S, Koca U, Öztekin S, Olguner C, Kar A, Coker C, et al. Antithrombin III pretreatment reduces neutrophil recruitment into the lung and skeletal muscle tissues in the rat model of bilateral lower limb ischemia and reperfusion: a pilot study. *Acta anaesthesiologica scandinavica*. 2005;49(8):1142-8.
142. Armstrong DMFdO, Armstrong AdC, Figueiredo RCBQ, Florentino JE, Saad PF, Fox-Talbot K, et al. Sildenafil citrate protects skeletal muscle of ischemia-reperfusion injury: immunohistochemical study in rat model. *Acta Cirurgica Brasileira*. 2013;28(4):282-7.
143. Erturk E, Cekic B, Geze S, Kosucu M, Coskun I, Eroglu A, et al. Comparison of the effect of propofol and N-acetyl cysteine in preventing ischaemia–reperfusion injury. *European Journal of Anaesthesiology (EJA)*. 2009;26(4):279-84.
144. Koca K, Yurttas Y, Yildiz C, Cayci T, Uysal B, Korkmaz A. Effect of hyperbaric oxygen and ozone preconditioning on oxidative/nitrosative stress induced by tourniquet ischemia/reperfusion in rat skeletal muscle. *Acta Orthop Traumatol Turc*. 2010;44(6):476-83.
145. Gurbuz H, Calpur OU, Yamak E, Huseyinova G, Akgun A. Investigation of the effects of alpha-D tocopherol use in reperfusion trauma by histochemical and ultrastructural methods. *Acta Orthop Traumatol Turc*. 2004;29(2):153-6.
146. Qiu X, Fu K, Zhao X, Zhang Y, Yuan Y, Zhang S, et al. Protective effects of astaxanthin against ischemia/reperfusion induced renal injury in mice. *Journal of translational medicine*. 2015;13(1):28.
147. Otsuka T, Shimazawa M, Inoue Y, Nakano Y, Ojino K, Izawa H, et al. Astaxanthin Protects Against Retinal Damage: Evidence from In Vivo and In Vitro Retinal Ischemia and Reperfusion Models. *Current eye research*. 2016;41(11):1465-72.
148. Li J, Wang F, Xia Y, Dai W, Chen K, Li S, et al. Astaxanthin pretreatment attenuates hepatic ischemia reperfusion-induced apoptosis and autophagy via the ROS/MAPK pathway in mice. *Marine drugs*. 2015;13(6):3368-87.
149. Alam MN, Hossain MM, Rahman MM, Subhan N, Mamun MAA, Ulla A, et al. Astaxanthin Prevented Oxidative Stress in Heart and Kidneys of Isoproterenol-Administered Aged Rats. *Journal of Dietary Supplements*. 2017:1-13.

150. Xuan RR, Niu TT, Chen HM. Astaxanthin blocks preeclampsia progression by suppressing oxidative stress and inflammation. *Molecular medicine reports*. 2016;14(3):2697-704.
151. Zhang J, Zhang S, Bi J, Gu J, Deng Y, Liu C. Astaxanthin pretreatment attenuates acetaminophen-induced liver injury in mice. *International immunopharmacology*. 2017;45:26-33.
152. Al-Amin MM, Akhter S, Hasan AT, Alam T, Hasan SN, Saifullah A, et al. The antioxidant effect of astaxanthin is higher in young mice than aged: a region specific study on brain. *Metabolic brain disease*. 2015;30(5):1237-46.
153. Meng H-z, Ni X-f, Yu H-n, Wang S-s, Shen S-r. Effects of astaxanthin on oxidative stress induced by Cu²⁺ in prostate cells. *Journal of Zhejiang University-SCIENCE B*. 2017;18(2):161-71.
154. Goda AA, Naguib KM, Mohamed MM, Amra HA, Nada SA, Abdel-Ghaffar A-RB, et al. Astaxanthin and Docosahexaenoic Acid Reverse the Toxicity of the Maxi-K (BK) Channel Antagonist Mycotoxin Penitrem A. *Marine drugs*. 2016;14(11):208.
155. Turkez H, Geyikoglu F, Yousef MI, Togar B, Gürbüz H, Celik K, et al. Hepatoprotective potential of astaxanthin against 2, 3, 7, 8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin in cultured rat hepatocytes. *Toxicology and industrial health*. 2014;30(2):101-12.
156. Fang Q, Guo S, Zhou H, Han R, Wu P, Han C. Astaxanthin protects against early burn-wound progression in rats by attenuating oxidative stress-induced inflammation and mitochondria-related apoptosis. *Scientific Reports*. 2017;7.
157. Chen G, Ni Y, Nagata N, Xu L, Ota T. Micronutrient antioxidants and nonalcoholic fatty liver disease. *International journal of molecular sciences*. 2016;17(9):1379.
158. Xu L, Zhu J, Yin W, Ding X. Astaxanthin improves cognitive deficits from oxidative stress, nitric oxide synthase and inflammation through upregulation of PI3K/Akt in diabetes rat. *International journal of clinical and experimental pathology*. 2015;8(6):6083.
159. Kang H, Kim H. Astaxanthin and β -carotene in *Helicobacter pylori*-induced Gastric Inflammation: A Mini-review on Action Mechanisms. *Journal of Cancer Prevention*. 2017;22(2):57.
160. Ni X, Yu H, Wang S, Zhang C, Shen S. Astaxanthin Inhibits PC-3 Xenograft Prostate Tumor Growth in Nude Mice. *Marine drugs*. 2017;15(3):66.
161. Kim B, Farruggia C, Ku CS, Pham TX, Yang Y, Bae M, et al. Astaxanthin inhibits inflammation and fibrosis in the liver and adipose tissue of mouse models of diet-induced obesity and nonalcoholic steatohepatitis. *The Journal of Nutritional Biochemistry*. 2017;43:27-35.

162. Kuraji M, Matsuno T, Satoh T. Astaxanthin affects oxidative stress and hyposalivation in aging mice. *Journal of clinical biochemistry and nutrition*. 2016;59(2):79-85.
163. Li X, Qi Z, Zhao L, Yu Z. Astaxanthin reduces type 2 diabetic-associated cognitive decline in rats via activation of PI3K/Akt and attenuation of oxidative stress. *Molecular medicine reports*. 2016;13(1):973-9.
164. Zhang M, Cui Z, Cui H, Wang Y, Zhong C. Astaxanthin protects astrocytes against trauma-induced apoptosis through inhibition of NKCC1 expression via the NF- κ B signaling pathway. *BMC neuroscience*. 2017;18(1):42.
165. Masoudi A, Dargahi L, Abbaszadeh F, Pourgholami MH, Asgari A, Manoochehri M, et al. Neuroprotective effects of astaxanthin in a rat model of spinal cord injury. *Behavioural Brain Research*. 2017;329:104-10.
166. Jang H, Ji S, Kim Y, Lee H, Shin J, Cheong H, et al. Antioxidative Effects of Astaxanthin against Nitric Oxide-Induced Oxidative Stress on Cell Viability and Gene Expression in Bovine Oviduct Epithelial Cell and the Developmental Competence of Bovine IVM/IVF Embryos. *Reproduction in domestic animals*. 2010;45(6):967-74.
167. Camera E, Mastrofrancesco A, Fabbri C, Daubrawa F, Picardo M, Sies H, et al. Astaxanthin, canthaxanthin and β -carotene differently affect UVA-induced oxidative damage and expression of oxidative stress-responsive enzymes. *Experimental dermatology*. 2009;18(3):222-31.

8. EKLER

8.1. Etik Kurul Onay Belgesi

T.C.

ABANT İZZET BAYSAL ÜNİVERSİTESİ

Hayvan Araştırmaları Yerel Etik Kurulu

Sayı : 44

02/03/2017

Konu : Kararlar

BAŞVURU BİLGİLERİ (APPLICATION INFORMATION)	ARAŞTIRMANIN ADI (TITLE OF THE PROJECT)	Ratlarda oluşturulan iskemi reperfüzyon modellerinde astaksantin etkisinin biyokimyasal ve histopatolojik bulgular ile değerlendirilmesi.
	SORUMLU ARAŞTIRMACI (PRINCIPAL INVESTIGATOR)	Doç. Dr. Kutay Engin ÖZTÜKAN
	DİĞER ARAŞTIRMACILAR (OTHER INVESTIGATORS)	Araş. Gör. Dr. Yasin Durukan, Prof. Dr. Güler BUĞDAYCI, Yrd. Doç. Dr. Tülin FIRAT, Araş. Gör. Dr. Abdullah Alper ŞAHİN
	ARAŞTIRMA MERKEZİ (RESEARCH CENTER)	AİBÜ Deney Hayvanlar Uygulama ve Araştırma Merkezi

KARAR (DECISION)	Karar no (Decision No): 2017/13	Tarih (Date): 22.02.2017
	Doç. Dr. Kutay Engin ÖZTÜKAN'ın sorumluluğunda yapılması tasarlanan ve yukarıda başvuru bilgileri verilen araştırma dosyası ve ilgili belgelerin incelenmesi sonucunda araştırmanın gerçekleştirilmesinde etik yönden sakınca olmadığına mevcut oy birliği/oy çokluğu ile karar verilmiştir.	

Üyeler	Uzmanlık Alanı	Kurumu	İmza
Prof. Dr. Aysel KÜKNER (Başkan)	Histoloji ve Embriyoloji AD. Öğretim Üyesi	AİBÜ Tıp Fakültesi	
Prof. Dr. Erol AYAZ (Üye)	Tabii Parazitoloji AD Öğretim Üyesi	AİBÜ Tıp Fakültesi	
Prof. Dr. Hamit COŞKUN (Üye)	Psikoloji Bölümü Öğretim Üyesi	AİBÜ Fen Edebiyat Fakültesi	
Prof. Dr. Neriman ŞENGÜL (Invivo Üye)	Genel Cer. AD Öğretim Üyesi	AİBÜ Tıp Fakültesi	
Doç. Dr. Ali Rıza GEZİCİ (Üye)	Beyin Cer. AD Öğretim Üyesi	AİBÜ Tıp Fakültesi	
Doç. Dr. Fatih ULAŞ (Üye)	Göz Hastalıkları AD Öğretim Üyesi	AİBÜ Tıp Fakültesi	
Doç. Dr. Mustafa ŞİT (Üye)	Genel Cer. AD Öğretim Üyesi	AİBÜ Tıp Fakültesi	
Doç. Dr. Orçun TOPTAŞ (Üye)	Cerrahi AD Öğretim Üyesi	AİBÜ Diş Hek. Fakültesi	
Doç. Dr. Yeşim YENER (Üye)	İlköğretim Bölümü Öğretim Üyesi	AİBÜ Eğitim Fakültesi	
Yrd. Doç. Dr. Eray KEMAHLI (Üye)	Üroloji AD Öğretim Üyesi	AİBÜ Tıp Fakültesi	
Yrd. Doç. Dr. Serdar GÖZÜTOK (Üye)	Yaban Hayatı ve Ekolojisi Bölümü Öğretim Üyesi	AİBÜ Ziraat ve Doğa Bilimleri Fakültesi	
Yrd. Doç. Dr. Hayriye ORALLAR (Üye)	Kanatlı Hayvan Yetiştiriciliği Bölümü	AİBÜ Ziraat ve Doğa Bilimleri Fakültesi	
Vet. Hek. Ayhan ÇETİNKAYA (Sorumlu Veteriner Hekim)	Veteriner Hekim	AİBÜ Deney Hayvanları Uygulama ve Araştırma Merkezi	
Vet. Hek. Orhan BULUT (TC Üyesi)	Veteriner Hekim	BOLCA Hindi /BOLU	
Av. Cihan KARAGÖZ (Sivil Toplum Kuruluşu üyesi)	Avukat	Tabaklar Mahallesi Hürriyet cad. No.47/7 Merkez/ BOLU	