T.C.
ESKİŞEHİR OSMANGAZİ ÜNİVERSİTESİ
TIP FAKÜLTESİ

ANTİOKSİDAN ÖZELLİKTEKİ ASTAKSANTİN'İN SIÇANLARDA YAPILAN İNTESTİNAL İSKEMİ REPERFÜZYON HASARINA ETKİSİ

Dr. Arda Şakir YILMAZ

Genel Cerrahi Anabilim Dalı
TIPTA UZMANLIK TEZİ

ESKİŞEHİR
2021

T.C.
ESKİŞEHİR OSMANGAZİ ÜNİVERSİTESİ
TIP FAKÜLTESİ

ANTİOKSİDAN ÖZELLİKTEKİ ASTAKSANTİN'İN SIÇANLARDA YAPILAN İNTESTİNAL İSKEMİ REPERFÜZYON HASARINA ETKİSİ

Dr. Arda Şakir YILMAZ

Genel Cerrahi Anabilim Dalı
TIPTA UZMANLIK TEZİ

TEZ DANIŞMANI
Dr. Öğr. Üyesi Bartu BADAK

ESKİŞEHİR
2021

TEZ KABUL VE ONAY SAYFASI

T.C.
ESKİŞEHİR OSMANGAZİ ÜNİVERSİTESİ
TIP FAKÜLTESİ DEKANLIĞINA,

Dr. Arda Şakir YILMAZ'a ait "Antioksidan Özellikteki Astaksantin'in Sıçanlarda Yapılan İntestinal İskemi Reperfüzyon Hasarına Etkisi" adlı çalışma jürimiz tarafından Genel Cerrahi Anabilim Dalında Tıpta Uzmanlık Tezi olarak oy birliği ile kabul edilmiştir.

Tarih:

Üye	Dr. Öğr. Üyesi Bartu BADAK Genel Cerrahi Anabilim Dalı
Jüri Başkanı	Prof. Dr. Adnan ŞAHİN Genel Cerrahi Anabilim Dalı
Üye	Prof. Dr. Mustafa Cem ALGIN Kütahya Sağlık Bil. Ünv. Genel Cerrahi Anabilim Dalı

Eskişehir Osmangazi Üniversitesi Tıp Fakültesi Fakülte Kurulu'nun…… Tarih ve…….. Sayılı Kararıyla onaylanmıştır.

Prof. Dr. İ. Özkan ALATAŞ
Dekan

TEŞEKKÜR

Eskişehir Osmangazi Üniversitesi Genel Cerrahi Anabilim Dalında yapmış olduğum uzmanlık eğitimim süresince bilgi ve deneyimleri ile yol gösteren, tezimin hazırlanmasında büyük emeği olan sayın danışman hocam Dr. Öğr. Üyesi Bartu BADAK'a Genel Cerrahideki eğitimim süresince bilgi ve deneyimleri ile yol gösteren değerli hocalarıma, tüm eğitim hayatım boyunca ve asistanlık sürecimde maddi ve manevi desteklerini hissettiğim kıymetli aileme ve eşime teşekkür ederim.

ÖZET

Yılmaz AŞ, Antioksidan Özellikteki Astaksantin'in Sıçanlarda Yapılan İntestinal İskemi Reperfüzyon Hasarına Etkisi. Eskişehir Osmangazi Üniversitesi Tıp Fakültesi Genel Cerrahi Anabilim Dalı Tıpta Uzmanlık Tezi Eskişehir 2021. Mezenter iskemi, cerrahi kliniklerinde sıkça rastlanılan, tanı konulması oldukça zor ve tedavi edilemezse oldukça mortal seyreden bir hastalıktır. Yapılan çalışmalar hastalığın bu denli şiddetli oluşunun, iskeminin ağırlığından daha çok reperfüzyon sonrası gelişen bir takım biyokimyasal olaylar zinciri nedeniyle olduğunu vurgulamaktadır. Biz de çalışmamızda güçlü antioksidan özelliği tanımlanmış ve aynı zamanda anti-inflamatuar olduğu bilinen astaksantinin iskemi reperfüzyon (I/R) hasarına etkisini araştırdık. Çalışmamızda Wistar Albino cinsi sağlıklı ve dişi toplamda 32 adet denek kullanıldı. Denekler rastgele ve eşit olarak, kontrol (sadece laparotomi yapılan grup), I/R (sadece geçici mezenter iskemi yapılan grup), geçici iskemi öncesi 1 mg/kg ve 10 mg/kg dozlarında verilen astaksantin olmak üzere 4 gruba ayrıldı. Geçici iskemi süresi 60 dakika, reperfüzyon süresi 120 dakika olarak belirlendi. Reperfüzyon sonrası intrakardiyak kan ve terminal ileumdan doku örnekleri alındı. Kan örneklerinden SOD, CAT, MDA; terminal ileumdan IL-1, IL-6, TNFα, Kaspaz-3, P53 testleri çalışıldı. Doku örnekleri ayrıca histopatolojik değerlendirmeye alındı. Çalışma sonunda astaksantinin CAT, MDA ve SOD enzim aktivitelerini her iki dozda da önemli ölçüde azalttığı, fakat yüksek doz astaksantinin bu enzim aktivitelerini anlamlı düzeyde düşürdüğü tespit edildi. Ayrıca TNFα, IL-1, IL-6 gibi sitokinleri yüksek dozda daha anlamlı olmasının yanında her iki dozda da inhibe ettiği bulundu. Kaspaz-3 aktivitesini azaltması, apoptozisi inhibe etmesi nedeniyle P53 ve DNA kırıklarını azalttığı görüldü. Sonuç olarak, güçlü antioksidan ve anti-inflamatuar özellikteki astaksantin, özellikle 10 mg/kg dozunda kullanıldığında iskemi reperfüzyon hasarını anlamlı ölçüde azaltmaktadır. Bu verilerin daha geniş hayvan serilerinde ve klinik çalışmalarla desteklenmesi gerekmektedir.

Anahtar Kelimeler: İntestinal iskemi reperfüzyon hasarı, astaksantin, antioksidan etki, karotenoid

ABSTRACT

Yılmaz AS, The Effect of Antioxidant Astaxanthin on Intestinal Ischemia Reperfusion Injury in Rats. Eskişehir Osmangazi University Faculty of Medicine Department of General Surgery Thesis Eskişehir 2021. Mesenteric ischemia is a frequently encountered disease in surgical clinics, difficult to diagnose, and very mortal if not treated. Studies emphasize that the severity of the disease is due to a chain of biochemical events that develop after reperfusion rather than the severity of ischemia. In our study, we investigated the effects of astaxanthin, which is known to have strong antioxidant properties and is also known to be anti-inflammatory on ischemia reperfusion (I/R) damage. A total of 32 healthy and female Wistar Albino subjects were used in our study. The subjects were randomly and equally divided into 4 groups as control (only laparotomy group), I/R (only transient mesenteric ischemia group), astaxanthin administered at doses of 1mg/kg and 10mg/kg before transient ischemia. The transient ischemia time was 60 minutes and the reperfusion time was 120 minutes. Tissue samples were taken from intracardiac blood and terminal ileum after reperfusion. SOD, CAT, MDA from blood samples, IL-1, IL-6, TNFα, Caspase-3, P53 tests from terminal ileum were studied. Tissue samples were also taken for histopathological evaluation. At the end of the study, it was determined that astaxanthin significantly decreased CAT, MDA and SOD enzyme activities in both doses, but high dose astaxanthin significantly decreased it. In addition, it was found that cytokines such as TNFα, IL-1, IL-6 were inhibited at both doses of astaxanthin but significantly only at high dose. It was observed that it decreased Caspase-3 activity and decreased P53 and DNA fragments due to inhibition of apoptosis. As a result, astaxanthin, which has strong antioxidant and anti-inflammatory properties, significantly reduces ischemia and reperfusion damage, especially when used at a dose of 10mg/kg. These data need to be supported by larger animal series and clinical studies.

Key Words: Intestinal ischemia reperfusion injury, astaxanthin, antioxidant effect, carotenoid

İÇİNDEKİLER

	Sayfa
TEZ KABUL VE ONAY SAYFASI	iii
TEŞEKKÜR	iv
ÖZET	v
ABSTRACT	vi
İÇİNDEKİLER	vii
SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ	ix
ŞEKİLLER DİZİNİ	xii
TABLOLAR DİZİNİ	xiii
RESİMLER DİZİNİ	xiv
GRAFİKLER DİZİNİ	xv
1.GİRİŞ	1
1.1. Hipotez	2
1.2. Amaç	2
2. GENEL BİLGİLER	3
2.1. İnce Bağırsak Embriyolojisi	3
2.2. Histoloji	4
2.3. Anatomi	6
2.3.1. İnce bağırsak anatomisi	7
2.3.2. İnce Bağırsağın Nörovasküler ve Lenfatik Kaynağı	11
2.4. Mezenter iskemi	12
2.4.1. İskemi Reperfüzyon Hasarı	13
2.4.2. İskemi Reperfüzyon Hasarının Patofizyolojisi	14
2.5. Antioksidanlar	22
2.5.1. Total Antioksidan Kapasite	23
2.6. Çalışmamızda Kullandığımız Antioksidan Astaksantin	23
2.6.1. Astaksantinin biyosentezi	24

Sayfa

2.6.2. Astaksantinin Yapısı 26
2.6.3. Astaksantinin etki mekanizması 26
2.6.4. Astaksantinin Faydaları 28
2.6.5. Astaksantin Kullanım Alanları 28
2.6.6. Astaksantin Pazarı 29
3.GEREÇ VE YÖNTEM 30
3.1. Deney hayvanları ve ortam 30
3.2. Araştırma tipi 30
3.3. Deney Gruplarının Oluşturulması 31
3.4. Ameliyat Prosedürü 32
3.5. Biyokimyasal ve histopatolojik analizler 37
3.5.1. ELİSA Yöntemi ile Kan Plazmasından SOD, CAT VE MDA İncelenmesi 37
3.5.2. PCR Yöntemi ile Dokuda Kaspaz-3, p53, TNFα, IL-1, IL-6 Ölçümü 38
3.5.3. Histopatolojik inceleme 40
3.6. İstatistiksel analiz 42
4. BULGULAR 43
4.1. Plazmada ölçülen SOD, CAT ve MDA Değerleri 43
4.2. PCR yöntemi ile Dokudan Ölçülen Kaspaz-3, p53, IL-1, IL-6, TNFα Değerleri 46
4.3. Histopatolojik bulgular 51
4.3.1. Hematoksilen Eozin Boyama 51
4.3.2. Kaspaz-3 İmmunoreaktivitesi 52
4.3.3. PAS Boyama 53
4.3.4. TUNEL Boyama 54
5. TARTIŞMA 55
6. SONUÇ VE ÖNERİLER 63
KAYNAKLAR 64

SİMGELER VE KISALTMALAR

ATP	Adenozin trifosfat
BKT	β-karoten ketolaz
°C	Santigrat derece
CAT	Katalaz
cDNA	Tamamlayıcı Deoksiribonükleik asit
CH	Karotenoid hidroksilaz
cGMP	Siklik guanozin monofosfat
cm	Santimetre
CT	Kantifikasyon
C_{5A}	Kompleman 5A
dk	Dakika
DMSO	Dimetil sülfoksit
DNA	Deoksiribonükleik asit
EDTA	Etilendiamin tetraasetik asit
FDA	U.S. Food and drug administration (ABD Gıda ve İlaç İdaresi)
gr	Gram
HPLC	Yüksek Performanslı Sıvı Kromatografisi
H_2O_2	Hidrojen peroksit
H&E	Hematoxylen-Eosin
IFNγ	İnterferon gama
IL	İnterlökin
IM	İntramusküler
I/R	İskemi/reperfüzyonu
kDa	Kilodalton
kg	Kilogram
L	Lumbal
LTB4	Lökotrien B4

MDA	Malondialdehit
mg	Miligram
ml	Mililitre
MPO.	Miyeloperoksidaz
mRNA	Mesajcı Ribonükleik asit
NADPH	Nikotinamid adenin dinükleotit fosfat
nmol	Nanomol
NO	Nitrik oksit
NOMI	Non-oklüsiv mezenterik iskemi
O^2	Oksijen
ONOOH	Peroksinitrit
PAF	Platelet aktive edici faktör
PAS	Periodic Asid Schift
PBS	Phosphate Buffered Saline
PCR	Polymerase Chain Reaction
PDS	Fitoen desatüraz
PG	Prostaglandin
PGE_2	Prostaglandin E2
PGI_2	Prostaglandin I2
Ph	Power of hydrogen
PMNL	Polimorfonükleer lökositler
PSY	Fitoen sentaz
rpm	Revolutions per minute
SMA	Superior mezenterik arter
SMV	Superior mezenterik ven
sn	Saniye
SOD	Süperoksit dismutaz
TBA	Tiyobarbitürik asit

TICAM	Tıbbi ve Cerrahi Deney Hayvanları Uygulama ve Araştırma Merkezi
TNF	Tümör nekroz faktörü
TxA2	Tromboksan A2
U	Ünite
µm	Mikrometre
ZDS	Z-karoten desatüraz
XD	Ksantin dehidrojenaz
XO	Ksantin oksidaz
ΔΔCT	Relatif kantifikasyon

ŞEKİLLER

Sayfa

2.1. İnce bağırsağın tabakaları 4
2.2. İnce bağırsak mukozasının histolojik organizasyonunun şematik diyagramı 5
2.3. İnce bağırsağın damarsal yapılanması 7
2.4. Duodenumun arteriel kanlanması ve arteriyel komşulukları 9
2.5. İleoçekal anatominin gösterilmesi 10
2.6. Mezenterin yerleşimi 11
2.7. İskemi reperfüzyon hasarı mekanizması 14
2.8. İskemi reperfüzyon hasarında hücresel değişimler 17
2.9. İskemi reperfüzyon hasarında yer alan olaylar dizini 19
2.10. Astaksantinin kimyasal yapısı 24
2.11. Astaksantinin biyosentezi 25
2.12. Astaksantinin üç boyutlu yapısı 26
2.13. Astaksantinin hücre zarındaki durumu 27
4.1. Bağırsak dokusunun hematoksilen eozin boyama sonucu histolojik görünümü 51
4.2. Bağırsak dokusunun Kaspaz-3 imunoreaktivitesinin histolojik görünümü 52
4.3. Bağırsak dokusunun PAS boyama sonucu histolojik görünümü 53
4.4. Bağırsak dokusunun TUNEL boyama sonucu histolojik görünümü 54

TABLOLAR

Sayfa

3.1. Deney hayvanlarının gruplandırılması 31

RESİMLER

Sayfa

3.1. Sıçanların supin pozisyonuna alınması ve ekstremitelerinden sabitlenmesi 32
3.2. Deneklerin cildinin tıraşlanması 33
3.3. Deneklerin cilt asepsisi 33
3.4. Batının açılması 33
3.5. Kolonik ansların batın dışına alınması 34
3.6. SMA izolasyonu 34
3.7. Operasyon sırasında açık olan batının nemli spanç ile üzerinin örtülmesi 34
3.8. Operasyon sonrası prolen ile kapatılan batın görünümü 35
3.9. SMA'ya konulan bulldog klemp görünümü 35

GRAFİKLER

Sayfa

4.1. Plazmada CAT değerlerinin grafik üzerinde gösterilmesi 43

4.2. Plazmada SOD değerlerinin grafik üzerinde gösterilmesi 44

4.3. Plazmada MDA değerlerinin grafik üzerinde gösterilmesi 45

4.4. PCR yöntemi ile dokudan ölçülen Kaspaz-3 değerleri 46

4.5. PCR yöntemi ile dokudan ölçülen IL-1 değerleri 47

4.6. PCR yöntemi ile dokudan ölçülen IL-6 değerleri 48

4.7. PCR yöntemi ile dokudan ölçülen p53 değerleri 49

4.8. PCR yöntemi ile dokudan ölçülen TNFα değerleri 50

1. GİRİŞ

İskemi, organa ait arteriyel veya venöz kan akımının kesilmesine bağlı olarak, dokunun yetersiz perfüzyonu sonucu gelişen doku hipoksisine bağlı, hücresel enerji depolarının boşalması ve toksik metabolitlerin birikmesi sonrasında hücre ölümüne yol açan bir durumdur. Bu toksik metabolitlerin temizlenmesi ve dokunun yenilenmesi için yeni kan akımına ihtiyaç vardır. Fakat iskemik dokuya yeniden gelen kan akımı, iskemi ile oluşan hasardan daha fazla bir hasara yol açmaktadır (1-3). Oluşan bu hasardan, doku asfiksisi ile başlayan ve sonrasında iskemik dokuya gelen arteriyel kan akımı ile oluşan serbest oksijen radikallerinin sorumlu olduğu bilinmektedir (4, 5). Bu nedenle bağırsak transplantasyonu, volvulus, nekrotizan enterokolit ve iskemik bağırsak hastalığı gibi klinik durumlarda iskemi reperfüzyon hasar mekanizmalarını anlamak ve reperfüzyon hasarına karşı korunmak oldukça önem arz etmektedir. Bağırsak kan akışını tehlikeye atan bu durumlar, primer bağırsak hastalığından uzak organ yetmezliğine ve genel sistemik hastalığa ikincil süreçlere kadar giden sonuçlara neden olabilmektedir (6).

İskemik dokudaki ilk anormallik, organ iyileşmesi için adenozin trifosfat (ATP) üretiminde, özellikle hücresel mitokondri üzerinde tespit edilmiştir (7). Bununla birlikte; oksijensiz radikal oluşumu, demir depolarının serbest bırakılması, iskemi reperfüzyon organlarının mikrovaskülaritesinin hasar görmesi, hasarlı sitokinlerde kompleman aktivasyonu ve bölgedeki nötrofil göçü gibi çok sayıda olayla birlikte yaralanma dramatik bir şekilde büyüyebilmektedir (8). Ayrıca sepsis, endotoksemi, hemorajik şok ve travma gibi durumlarda da enterositin artmış miktarda sitokin ürettiği ve artan sitokinlerin de hasara yol açtığı gösterilmiştir (9). Serbest radikallerin ve diğer oksijen türlerinin reaksiyonları ile gelişen metabolitlerin karşısında, antioksidan moleküller bu süreçleri önlemeli veya yavaşlatmalı ve dokunun ömrünü uzatmalıdırlar (10). Bu varsayım temelinde, endojen antioksidanların seviyesinin ve/veya ekzojen antioksidanların yaşlanma ve yaşa bağlı süreçleri, hastalıklar üzerindeki etkisini tahmin etmeyi amaçlayan çok sayıda çalışma yapılmıştır. Bu nedenle, reperfüzyon hasarına karşı korunmak için önerilen terapötik müdahalelerde oksidan ve nötrofil aktivasyonunun inhibisyonu hedeflenmektedir (11).

Astaksantin, çeşitli deniz otu ve mikroorganizmalar tarafından üretilebilen bir ksantofil karotenoid olup deniz ürünleri ana kaynaktır (12). Astaksantin insanlar tarafından sentezlenemez ve diyetle dışardan alınması gerekmektedir (13, 14). Diğer karotenoidler gibi tekli oksijeni ve serbest radikalleri temizleyebilen ve güçlü antioksidan özelliklere sahip olan astaksantin, bu özelliği ile anti-inflamatuar ve immüno-modülatör rol oynamakta, hücreye yaşlanma karşıtı hücre zarı peroksidasyonunu inhibe etme kabiliyeti kazandırmaktadır. Astaksantinin antioksidan aktivitesi, zeaksantin, lutein, cantaksantin ve β-karoteninkinden 10 kat, E vitamininden 600 kat, C vitamininden ise 6000 kat daha büyüktür (15-17). Artan kanıtlar, astaksantinin oksidatif stresle ilişkili hastalıkların ve mitokondriyal disfonksiyonun gelişimini engellediğini göstermektedir (18). Astaksantin birçok mekanizma ile hücreleri korumaktadır. Bunlar arasında; tekli oksijeni uzaklaştırma ve ısı olarak enerjiyi dağıtma, zincir reaksiyonlarını önleme veya sonlandırmak için radikallerin uzaklaştırılması ya da membran lipid peroksidasyonunu inhibe ederek membran yapısını koruma gibi fonksiyonlar yer almaktadır (19). Bu nedenle intestinal iskemi gelişmiş vakalarda, reperfüzyon hasarını önlemek ve/veya azaltmak için antioksidan ilaçların klinik kullanımını geliştirmek halen araştırma konusu olmaya devam etmektedir.

1.1. Hipotez

Mezenter iskemi oluşturulup reperfüzyon hasarı yapılan sıçanlarda, antioksidan ve anti-inflamatuar özellikteki astaksantin, reperfüzyon hasarını azaltmaktadır.

1.2. Amaç

Sıçanlarda intestinal iskemi reperfüzyon modeli yaratarak antioksidan özellikteki astaksantinin, biyokimyasal, histolojik ve patolojik değerlendirme ile biyoetkisini göstermeyi amaçladık.

2. GENEL BİLGİLER

İnce bağırsaklar alınan besinlerin; mideyi terk ettikten sonra sindirildiği, sindirilen besinlerin emildiği ve birçok endokrin salgının yapıldığı organlardır (20). Tüm bu olaylar zinciri; çok sayıda yapısal, fizyolojik, endokrin ve kimyasal faktöre bağlıdır. Karaciğer ve pankreastan gelen ekzokrin salgılar, gıda maddelerinin tamamen sindirilmesini sağlar. İnce bağırsak mukozasının genişlemiş yüzey alanı daha sonra bu besinleri emer. İnce bağırsak, sindirim ve emilimdeki rolü dışında vücuttaki en büyük endokrin organdır ve bağışıklık fonksiyonunun en önemli organlarından biridir. Temel rolü ve karmaşıklığı göz önüne alındığında, ince bağırsak hastalıklarının diğer organlara nazaran daha nadir olması şaşırtıcıdır.

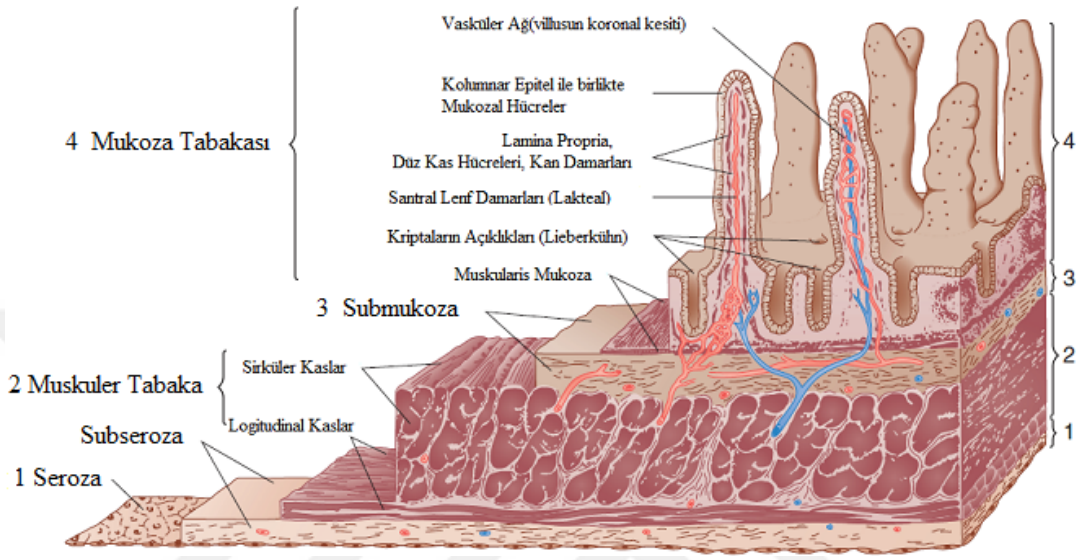
2.1. İnce Bağırsak Embriyolojisi

İlkel bağırsak, gebeliğin 4. haftasında oluşur (21, 22). Sindirim kanalı epiteli endoderm tarafından, musküler tabaka dahil diğer tüm katmanlar ise splanknik mezoderm tarafından oluşur. İnce bağırsaklar, duodenum hariç ilkel bağırsağın bir bölümü olan orta bağırsaktan gelişir. “Midgut” olarak da adlandırılan orta bağırsak Kraniyal ve Kaudal kısım olmak üzere iki kısımdan oluşur. Kraniyal bacaktan distal duodenum, jejunum ve proksimal ileum gelişirken, kaudal bacaktan ise distal ileum, apendiks, asendan kolon ve transvers kolon proksimali gelişir. Kraniyal ve kaudal kısımların birleştiği yer, aynı zamanda “Vitellin Kanalı” ile “Yolk Sak’ın” birleşim yeridir. Bu kanal yapısı normalde doğumdan önce yok olur, ancak popülasyonun yaklaşık %2'sinde “Meckel divertikülü” olarak kalabilir (23).

Kript oluşumu, gebeliğin 10-12. haftalarında başlar. İnce bağırsağın kript tabakası, hücrenin sürekli yenilenme ve çoğalma bölgesidir. Hücreler kript-villus eksenine yükseldikçe proliferasyon durur ve hücreler dört ana hücre tipinden birine farklılaşır; intestinal hücre popülasyonunun yaklaşık %95'ini oluşturan emici enterositler, goblet hücreleri, Paneth hücreleri ve enteroendokrin hücreler (24, 25). Hücreler sonunda bağırsak lümenine ekstrude edilir. Şaşırtıcı bir şekilde, bağırsak katmanlarının tamamen yenilenmesi sürecinin tamamı, insanlarda bir haftadan daha kısa bir sürede gerçekleşir.

2.2. Histoloji

Bağırsak duvarı dıştan içe dört ana tabakadan oluşur; tunika seroza, tunika muskularis, tunika submukoza, tunika mukoza.



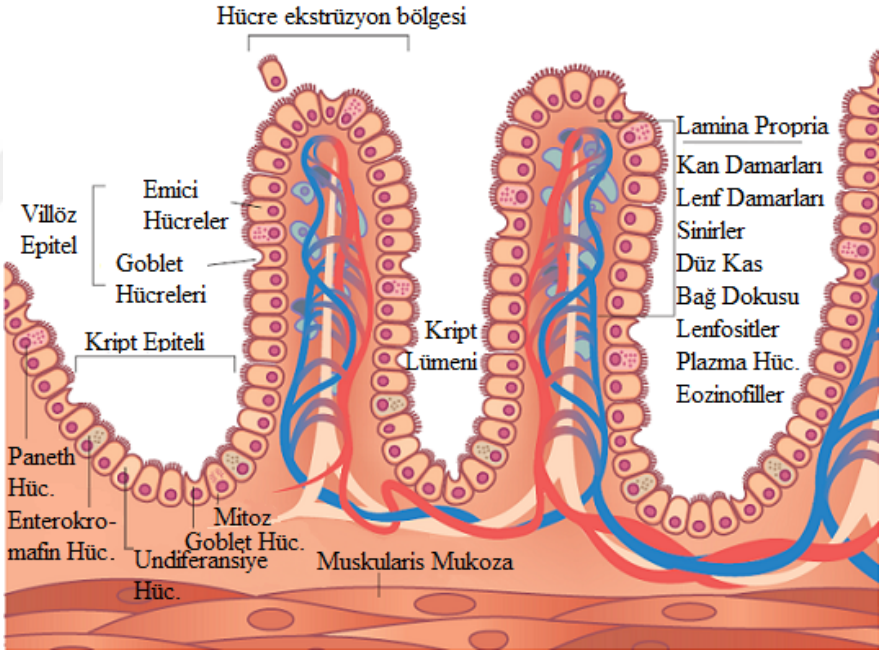
Şekil 2.1. İnce bağırsağın tabakaları -Sobotta ve ark. (26)'ndan alınmıştır.

Tunika seroza, ince bağırsağın en dış tabakasıdır ve jejunoileumu çevreleyen tek bir düzleştirilmiş mezoepitelyal hücre tabakası şeklindedir. Duodenumun retroperitoneal kısmı dışında visseral periton ile sarılmıştır. Seroza yaprakları arasında damarsal yapılar, sinirler, lenfatik kanallar ve yağ bulunur.

Tunika muskularis (muskularis propria), düz kas liflerinden oluşan iki kas tabakasından oluşur. Dış kısımda ince longitudinal kas tabakası, iç kısımda ise daha kalın sirküler kas tabakasından oluşur. Miyenterik (Auerbach) pleksusa ait ganglion hücreleri, kas katmanları arasında yer alır ve her iki katmana da sinir lifleri gönderir. Böylece düz kas hücreleri arasında elektriksel devamlılık sağlar ve kas tabakası boyunca iletime izin verir.

Tunika submukoza, kan damarlarını, sinirleri ve lenfatik kanalları içeren fibroelastik bağ dokusu tabakasından oluşur. Bağırsak duvarının en güçlü bileşenidir ve bu nedenle anastomoz sütürlerine dahil edilmelidir. Ayrıntılı lenfatik, arteriol, venül ağları, geniş bir sinir lifi ve ganglion hücreleri pleksusu (Meissner pleksus) içerir.

Tunika mukoza; muskularis mukoza, lamina propria ve epitel tabakaları olmak üzere üç katmana ayrılabilir. Muskularis mukoza katmanı, mukozayı submukozadan ayıran ince bir kas tabakasıdır. Lamina propria; plazma hücreleri, lenfositler, mast hücreleri, eozinofiller, makrofajlar, fibroblastlar, düz kas hücreleri ve hücresel olmayan bağ dokusu dahil olmak üzere çeşitli hücreleri içeren, epitel hücreleri ile muskularis mukoza arasında bir bağ dokusu tabakasıdır. Epitel hücrelerinin üzerinde yattığı temel olan lamina propria, zengin bir bağışıklık hücresi kaynağına ikincil olarak üstteki epitele nüfuz eden mikroorganizmalarla savaşmak için bağırsakta koruyucu bir rol oynar. Plazma hücreleri, lamina propriadaki immünoglobulinleri ve diğer immün hücreleri aktif bir şekilde sentezler ve üstteki epitelyumun çeşitli hücresel işlevlerini modüle edebilen çeşitli aracıları (sitokinler, araşidonik asit metabolitleri, histaminler) serbest bırakır (23).



Şekil.2.2. İnce bağırsak mukozasının histolojik organizasyonunun şematik diyagramı-Keljo ve ark. (27)'ndan alınmıştır.

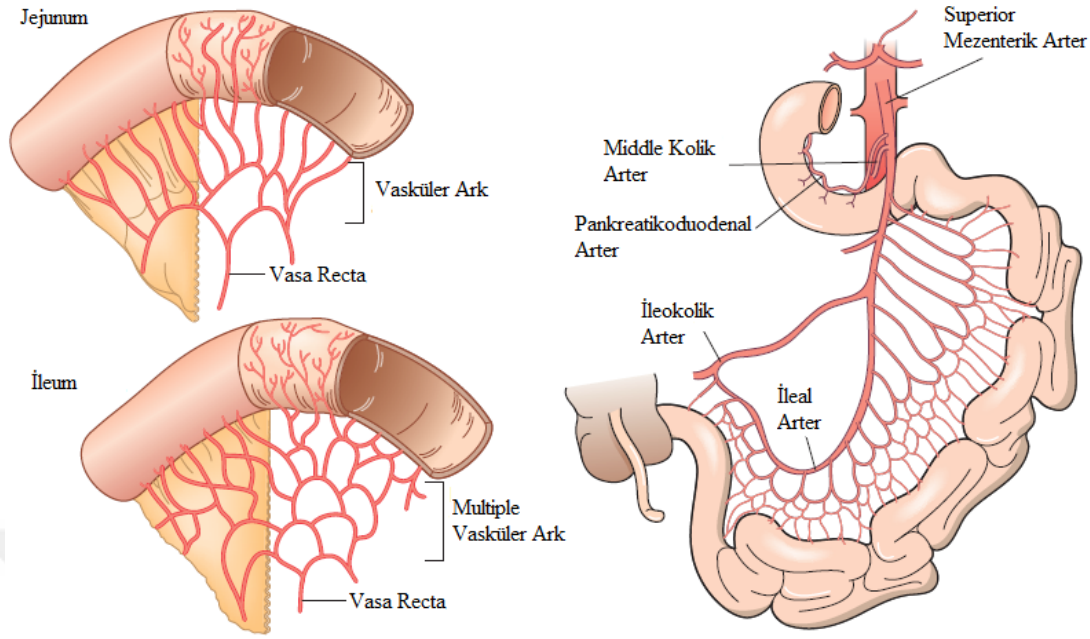
İnce bağırsak epiteli tek sıralı silindirik epiteldir. İnce bağırsak mukozası emilim yüzeyini genişletmek için "villus" adı verilen kıvrımlı bir yapıya sahiptir (28). Epitel tabakası, villusları kaplayan ve kriptleri saran sürekli bir epitel hücre

tabakasıdır. Kript epitelinin ana işlevleri; hücre yenilenmesi, ekzokrin ve endokrin salgı ile su ve iyon salgılanmasıdır. Villöz epitelin temel işlevleri ise sindirim ve emilimdir (23).

Mukozal tabakada dört ana hücre tipi bulunur; 1- Mukus salgılayan goblet hücreleri, 2- Lizozim, 3- Tümör Nekroz Faktörü (TNF) salgılayan paneth hücreleri ve 4- Enteroendokrin hücreler (23). Enteroendokrin hücre grubu içerisinde konakçı mukozal savunma sistemi ile ilişkili olduğu düşünülen lökosit defensinlerinin homologları olan kriptidinler, emici enterositler ve mide-bağırsak hormonlarını üreten 10'dan fazla farklı popülasyon bulunmaktadır.

2.3. Anatomi

Pilordan çekuma kadar uzanan ince bağırsağın tamamı yaklaşık 270-290 cm boyutlarındadır. Duodenumun uzunluğu yaklaşık 20 cm, jejunumun yaklaşık uzunluğu 100-110 cm ve ileumun uzunluğu ise yaklaşık 150-160 cm'dir (29). Jejunum, "Treitz Ligamenti" olarak bilinen duodenojejunal süspansör ligamentten başlar. Jejunum ile ileum arasında belirgin bir sınır çizgisi yoktur, fakat jejunumun genellikle ince bağırsağın proksimal beşte ikisini oluşturduğu ve ileumun ise kalan beşte üçlük kısmını kapladığı kabul edilir. Jejunum, ileuma kıyasla daha kalın bir yapıya sahiptir ve ameliyat sırasında mezenterik damarların incelenmesiyle belirlenebilir.



Şekil 2.3. İnce bağırsağın damarsal yapılanması (Jejunumda bağırsağın mezenterik kenarına uzanan bir veya iki arktan köken alan uzun vasa rectalar bulunurken, ileumun kanlanması dört veya beş arktan oluşan kısa vasa rectalardan sağlanır.)- Thompson ve ark. (30)'ndan alınmıştır.

İnce bağırsak mukozası, distal duodenum ve jejunumda daha belirgin olan plika sirkülaris ile karakterizedir (23).

İnce bağırsaklar, tümü mezenteri içerisinde seyreden zengin vasküler, nöronal ve lenfatik ağlar sayesinde sindirim sisteminin en önemli organlarından biridir. Çölyak Turuncus'un dalları tarafından beslenen proksimal duodenum hariç, ince bağırsağın tamamı Superior Mezenterik Arter'den beslenir. Superior Mezenterik Arter (SMA), pankreasın uncinat proçesinin ve duodenumun üçüncü kısmının önünde seyreder, burada pankreas, distal duodenum, tüm ince bağırsak, çıkan kolon ve transvers kolonu beslemek için dallar verir.

2.3.1. İnce Bağırsak Anatomisi

İnce bağırsak 3 bölümden oluşmaktadır.

Duodenum: İnce bağırsağın başlangıç bölümü olup, pankreas başını "C" şeklinde saran, yaklaşık 20-25 cm uzunluğundaki kısmıdır. Duodenumun başlangıç

bölümü hariç, diğer kısımları retroperitoneal olup hepatoduodenal ligament ile karaciğere bağlıdır. Bu nedenle duodenum, ince bağırsağın en geniş ve en hareketsiz kısmıdır.

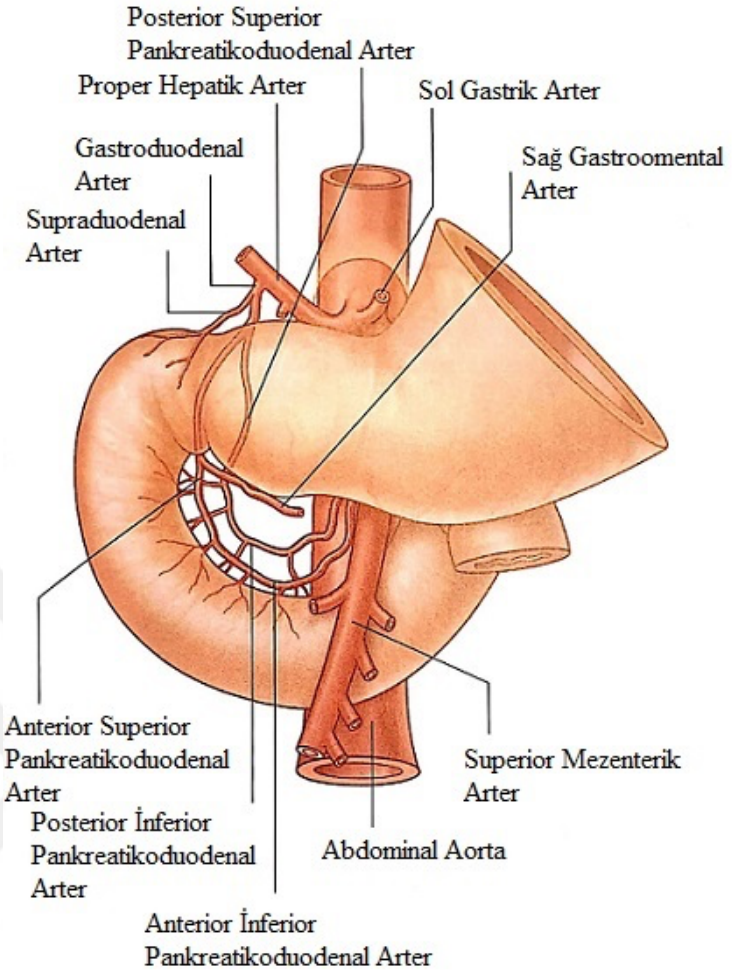
Duodenumun dört bölümü vardır.

Birinci kısım (pars superior); mide pilorundan safra kesesinin boynuna kadar uzanan, yaklaşık 5 cm uzunluğundaki ilk kısımdır. “Bulbus duodeni” adı verilen ilk 2-3 cm’lik kısmı diğer kısımlara göre daha geniştir. Duodenumun tek intraperitoneal ve en hareketli kısmıdır. Lumbal (L) 1 vertebranın sağındadır ve arkasından safra kanalı, gastroduodenal arter, portal ven ve inferior vena cava geçer. Gastroduodenal arter kanamaları bu bölümden kaynaklanması nedeniyle klinik öneme sahiptir.

İkinci kısım (pars desendens); safra kesesi boynundan başlayıp, L3 vertebra alt sınırına kadar uzanan yaklaşık 8 cm’lik kısmıdır. Önünde transvers kolon, ortasında pankreas başı ve arkasında ise sağ böbrek bulunur. Duodenumun bu bölümünde, ana pankreatik kanal (Wirsung) ve ana safra kanalının (Koledok) birleşerek duodenuma açıldığı “Papilla Duodeni Major (Ampulla Wateri)” ile aksesuar pankreatik kanalın açıldığı “Papilla Duodeni Minör (Santorini)” için girişler bulunmaktadır.

Üçüncü kısım (pars horizontalis, inferior parça); yaklaşık 5-7,5 cm uzunluğundaki duodenumun en uzun kısmıdır. Altta inferior vena cava, aort ve L4 vertebra bulunur. Ön tarafından ise superior mezenterik arter ve ven geçer.

Dördüncü kısım (pars ascendens); duodenumun son 2,5-3 cm’lik bölümüdür. Aortun önünden yukarı doğru ilerleyerek L2 vertebra üst sınırına doğru uzanır ve öne doğru dönerek duodenojejunal fleksura noktasında biter. Bu duodenojejunal açı, “Treitz ligamenti” olarak bilinen peritonal bir kıvrım tarafından desteklenir ve buradan sonra jejunum olarak devam eder (31).



Şekil 2.4. Duodenumun arteriyel kanlanması ve arteriyel komşulukları - Richard ve ark. (32)'ndan alınmıştır.

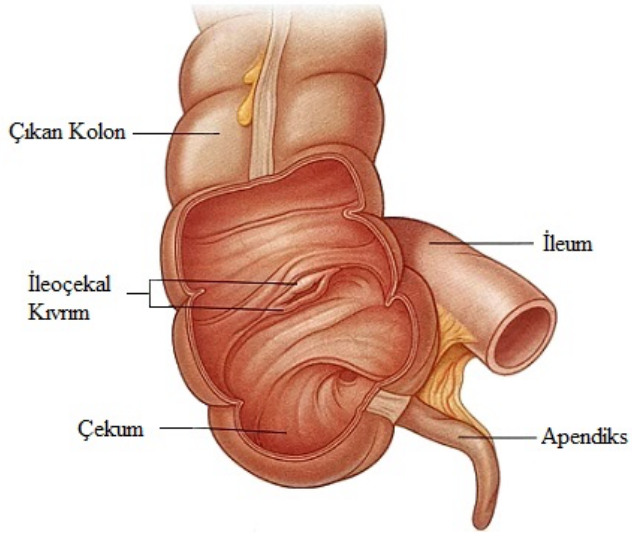
Jejunum: İnce bağırsağın beşte ikisini oluşturan ikinci kısmıdır. Çoğunlukla karnın sol üst kadranında yer alır ve ileuma göre çapı daha büyüktür. Ayrıca daha kalın bir duvara sahiptir. Bunun nedeni mukozanın yapısına katılan ve lümeni çevreleyen plika sirkülarislerin daha fazla olmasıdır. Buna ek olarak, ileuma kıyasla daha az belirgin vasküler arkların ve daha uzun vasa rectaların olması jejunumun benzersiz özelliğidir (Bkz. Şekil 2.3).

Jejunumun arteriyel beslenmesi, superior mezenterik arterin jejunal arterleri tarafından sağlanır.

İleum: İnce bağırsağın kalan beşte üçlük kısmını oluşturur ve genellikle sağ alt kadranda yerleşiktir. Jejunum ile karşılaştırıldığında, daha ince duvarlara, daha az

sayıda ve daha az belirgin mukozal kıvrımlara (plika sirkülaris), daha kısa vasa rectaya, daha fazla vasküler arka ve daha fazla mezenterik yağa sahiptir (Bkz. Şekil 2.3). Ayrıca intestinal lenf nodu grupları (Peyer plakları) jejunuma göre boyutça daha büyük ve fazla sayıdadır.

İleum, çekum ile birleştiği yerde kalın bağırsak lümenine doğru flep şeklinde mukozal bir kıvrım yaparak kalın bağırsağa açılır. İleumdan gelen kas lifleri bu flepler içerisinde devam ederek bir sfinkter oluşturur. "İleoçekal valv" adı da verilen bu sfinkterin işlevleri arasında, çekumdan ileuma reflünün önlenmesi ve içeriklerin ileumdan kana geçiş hızının düzenlenmesi yer alır (31).

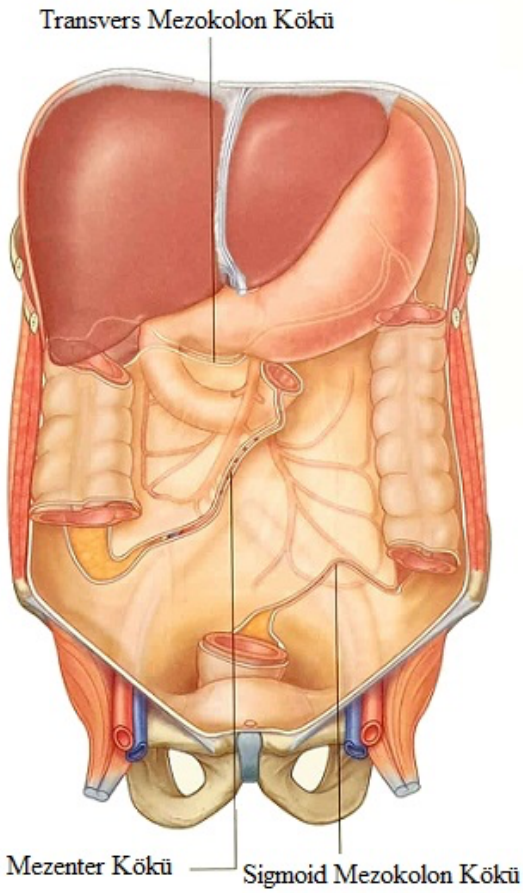


Şekil 2.5. İleoçekal anatominin gösterilmesi (İleum, çekuma açıldığı yerde mukozal bir kıvrım oluşturarak besinlerin geçişini düzenler.) - Richard ve ark. (32)'ndan alınmıştır.

İleumun arteriyel beslenmesi, superior mezenterik arterden direk dallanan ileal arterlerden ve yine superior mezenterik arterin dalı olan ileokolik arterden gelen ileal daldan olur (Bkz. Şekil 2.3).

2.3.2. İnce Bağırsağın Nörovasküler ve Lenfatik Kaynağı

Mezenter, jejunum ve ileumu karın arka duvarına bağlayan, yelpaze şeklinde, büyük ve çift katlı periton yapısıdır. Üst kısımda duodenojejunal birleşim yerinden başlayarak solundan aşağı devam eder, sağda ileoçekal bölgeye doğru oblik şekilde ilerler (Şekil 2.6). Bu çift katlı periton yaprakları arasındaki yağlı dokuda jejunum ve ileuma ait arter, ven, sinirler ve lenfatikler bulunur (31).



Şekil 2.6. Mezenterin yerleşimi (Mezenterin tabanı, lomber ikinci vertebranın solunda karın arka duvarına bağlanır, sağ sakroiliak eklemin sağına ve aşağıya doğru oblik olarak geçer.) - Richard ve ark. (32)'ndan alınmıştır.

Çölyak turuncusun dalları tarafından sağlanan proksimal duodenum haricinde, ince bağırsağın kan akışı tamamen superior mezenterik arterden gelir. Superior mezenterik arter, pankreasın unsinat parçasının ve duodenumun üçüncü

kısmının önünde seyreder ve burada pankreas, distal duodenum, tüm ince bağırsak, çıkan ve transvers kolonun bir kısmını beslemek için dallara ayrılır. Superior mezenterik arter, mezenter içerisinde dolaşan vasküler arklar sayesinde ince bağırsağa bol miktarda kan akışına neden olur (23).

İnce bağırsağın venöz drenajı arterlere paralel seyir göstererek, superior mezenterik ven (SMV) aracılığı ile, splenik ven ile birleşerek portal vene dökülür. Portal ven mideden gelen koroner venler ile birleşerek karaciğer içerisine girer. Karaciğerden hepatik ven aracılığıyla vena kava inferiora dökülür (23).

İnce bağırsağın innervasyonu otonom sinir sisteminin hem sempatik hem de parasempatik bölümleri tarafından sağlanır ve ince bağırsaklara efferent uyarım sağlar. Vagustan gelen parasempatik lifler, çölyak ganglionu geçerek salgılanmayı, hareketliliği ve ince bağırsağın aktivitesinin kontrolünü etkiler. Vagal afferent lifler de olmasına rağmen, ince bağırsakların ağrı duyusunu taşımamaktadır. Sempatik sinirlerden gelen motor lifler vasküler hareketliliği ve bağırsak salgısını düzenlemektedir. Ayrıca bağırsaktan gelen gerilmeye karşı olan ağrı duyusu, sempatik sistemdeki visseral afferent lifler aracılığı ile gerçekleşir (23).

İnce bağırsağın lenfatikleri, başlıca terminal ileum seviyesinde Peyer plaklarında belirtilmiştir. Mukozadan başlayan lenfatik drenaj, bağırsak duvarından geçerek, mezenter içerisindeki bağırsağa komşu lenf nodlarına ilerler. Buradan mezenterik arterleri takip eden lenfatikler aracılığı ile bölgesel lenf nodlarına, sonrasında da superior mezenterik arter kökündeki lenf nodu grubuna devam eder. Buradan lenfoid drenaj Sisterna Chyli'ye akar ve ardından torasik kanallara ve sonuçta boyunda bulunan venöz sisteme boşalır. İnce bağırsağın lenfatik drenajı, emilen lipidin dolaşıma taşınması için önemli bir yol oluşturur ve benzer şekilde bağışıklık savunmasında ve ayrıca bağırsak kanserlerinden kaynaklanan hücrelerin yayılmasında önemli bir rol oynar (23, 33).

2.4. Mezenter İskemi

Mezenter iskemi, bağırsaklara gelen kan akımının akut ya da kronik olarak kesilmesine bağlı olarak oluşan, bağırsakların beslenmesinin bozulması ve dokuda gelişen hasar olarak tanımlanmaktadır. Patofizyolojide dört farklı mekanizma söz

konusudur: Arteriyel emboli, arteriyel trombüs, vazospazm (NOMI-nonokluziv mezenterik iskemi) ve venöz tromboz.

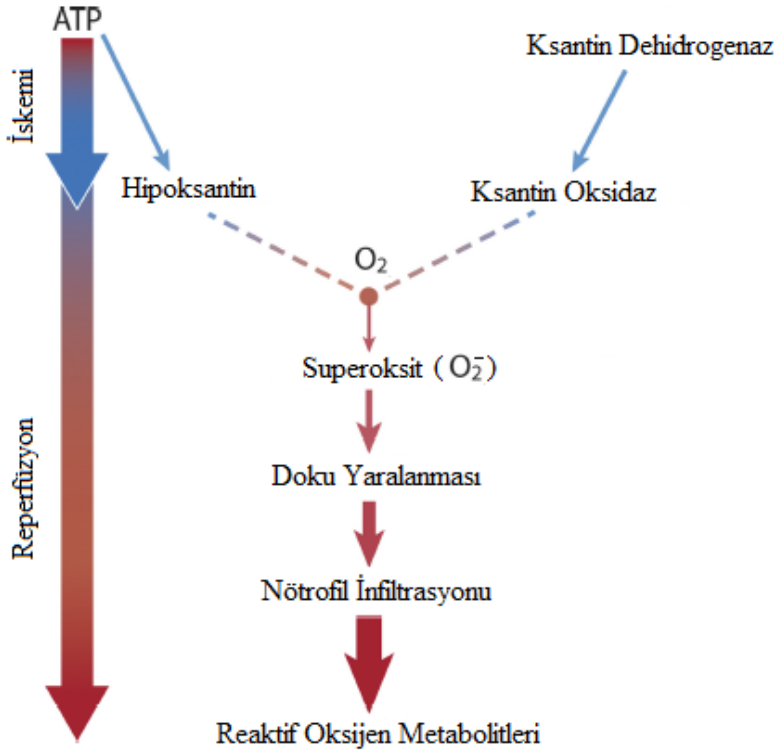
Vakaların %50'sinden fazlasından arteriyel emboli sorumludur. Bu vakaların %95'inde emboli kaynağı kardiyak hastalıklardır. Akut mezenter iskemi ile gelen hastaların çoğunda, superior mezenter arter embolisi esas patoloji olup, bu embolilerin çoğu tıkayıcıdır ve middle kolik arterin çıkış noktasının distalinde oklüzyona neden olur. Buna karşın, tromboz nedenli akut oklüzyonlar, mezenter arterlerin proksimalinde, çıkış noktalarında olmaya eğilimlidir. NOMI vazospazm sonucu gelişir, vazosupresör tedavi gerektiren kritik hastalığı olanlarda görülür (34). Mezenterik venöz tromboz, akut iskemi gelişen hastaların %5-15'i olup, genellikle superior mezenterik veni tutar (35).

Patofizyoloji ne olursa olsun, akut mezenter iskemi başlangıcından sonraki 3 saat içinde intestinal mukoza dökülmesine ve 6 saatte tam kat intestinal infarkta neden olabilir (34).

Etyoloji gözetmeksizin, fizik muayene ile orantısız şekilde karında hassasiyet olması, akut mezenter iskeminin en tipik özelliğidir. Ağrı tipik olarak kolik vasıftadır ve genellikle göbek etrafında hissedilir. İskeminin erken döneminde tipik bir fizik muayene bulgusu olmayabilir. Bağırsak infarktı sonrası abdominal distansiyon, peritonit ve kanlı dışkılama olabilir (34).

2.4.1. İskemi Reperfüzyon Hasarı

İntestinal iskemi, nadiren önlenebilen bir hastalık olması nedeniyle, bu alandaki çalışmalar, iskeminin erken tespitini ve iskemik hasarı (reperfüzyon dönemi) azaltmaya yönelik terapötik yaklaşımların geliştirilmesini amaçlamıştır. Reperfüzyon sırasında oluşan yaralanmaya esas olarak, oksidan üreten mukozal enzimlerin aktivasyonu, lipid kemoatraktanların hasar görmüş hücre zarlarından salınması ve ardından nötrofillerin infiltrasyonu ile ilişkili reaktif oksijen metabolitlerin neden olduğu düşünülmektedir (6).



Şekil.2.7. İskemi reperfüzyon hasarı mekanizması – Gonzalez ve ark. (6)'ndan alınmıştır.

Bu nedenle, reperfüzyon hasarına karşı geliştirilmeye çalışılan terapötik müdahaleler, oksidan hasarının ve nötrofil aktivasyonunun inhibisyonunu hedeflemektedir (11, 36).

2.4.2. İskemi Reperfüzyon Hasarının Patofizyolojisi

İskemi sırasındaki oksijen azlığı, oksidatif fosforilasyonu bozarak, hücrenin temel enerji kaynağı olan ATP ve fosfokreatinin yapımını azaltır (37). İskemi boyunca hücresel ATP, hipoksantine yıkılır ve ATP depolarının tükenmesi iskemik dokuda, hücre zarındaki iyon pompalarını bozar (38). Bu da potasyum ve magnezyumun hücre dışına; sodyum, kalsiyum ve suyun hücre içine difüzyonuna neden olur. Bu süreç hücre şişmesi ile sonuçlanır. Hipoksik stres ile gelişen hücre içi kalsiyum seviyelerinin artması, kalsiyum bağımlı proteazı aktive etmektedir. Bu enzim tarafından Ksantin Dehidrojenaz (XD), oksijen radikallerinin oluşmasına neden olan Ksantin Oksidaz (XO)'a dönüştürülür (Bkz. Şekil.2.7). Reperfüzyon

sırasında dokuların yeniden oksijenizasyonu ile Hipoksantin'in, ksantin oksidaz enzimi katalizörlüğünde reaksiyona girmesi sonucunda süperoksit anyonu ve hidrojen peroksit gibi serbest oksijen radikalleri üretilir (39). İskemi, endotel hücrelerinde bazı pro-inflamatuar moleküllerin (lökosit adezyon molekülü, sitokinler vb.) ve biyoaktif bileşiklerin (endotelin, tromboksan A2 vb.) sentezini artırmaktadır. Bunun yanında bazı koruyucu enzimlerin (yapısal nitrik oksit sentaz, siklooksijenaz-2) ve bu enzimlerin ürünlerinin (nitrik oksit, prostasiklin) ekspresyon ve sentezini de baskılamaktadır. Bu nedenle iskeminin yarattığı inflamatuar durum doku hasarını daha da arttırır (40).

Geri dönüşümsüz hücre hasarını önleyebilmek için dokuya kan akımının yeniden sağlanması gerekmektedir. Ancak reperfüzyon süreci, iskemik dokuda iskeminin oluşturduğu hasardan daha fazla hasara neden olabilmektedir. İskemi ve reperfüzyon periyodlarında oluşan etkilerin tamamı 'İskemi-Reperfüzyon (I/R) Hasarı' olarak adlandırılmaktadır. İskeminin süresine ve yoğunluğuna bağlı olarak dokulara tekrar sunulan oksijenin doku hasarını daha da arttırması nedeniyle bu duruma oksijen paradoksu adı verilmektedir (41). Parks ve ark. (42) 1986 yılında kediler üzerinde yaptığı intestinal iskemi reperfüzyon modelinde 3 saat iskemi ve 1 saat reperfüzyon ile oluşan doku hasarının, 4 saat iskemi ile oluşan doku hasarından daha fazla olduğunu göstermişlerdir.

Serbest Oksijen Radikalleri

İntestinal doku hasarını oluşturan en önemli faktörlerden biri de reperfüzyondan sonra serbest oksijen radikallerinin üretilmesidir (43). Serbest radikal; dış yörüngesinde bir ya da daha çok sayıda eşlenmemiş elektronu olan atom, molekül veya iyonlara verilen isimdir. Serbest radikaller aşırı derecede reaktif ve kararsız bileşiklerdir. Proteinler, lipidler, karbonhidratlar ve özellikle hücre membranı ve nükleik asitler ile reaksiyona girebilirler (44).

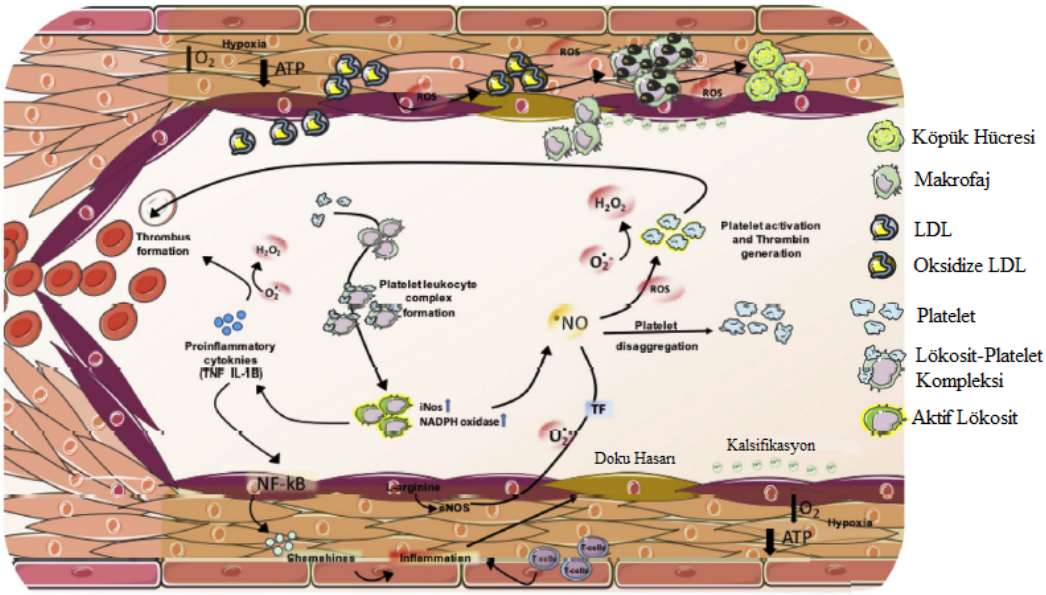
Fizyolojik koşullarda respiratuar zincirde son elektron alıcısı Nikotinamid Adenin Dinükleotit Fosfat (NADPH)'dir. Oksijen molekülü, mitokondride sitokrom sistemi tarafından indirgenerek su oluşumu sağlanmaktadır. Bu sırada %1-2 oranında oksijen bu yoldan kaçar ve tek değerli indirgenme reaksiyonu ile serbest oksijen radikalleri meydana gelir. Fizyolojik koşullarda bu radikaller endojen antioksidan

enzimler tarafından etkisiz hale getirilmektedir. Fakat reperfüzyon sürecinde ortamda aşırı miktarda oluşan serbest oksijen radikalleri, oksidatif strese ve bunun sonucunda da doku harabiyetine neden olmaktadır (45).

İskemi süresince ATP yıkımı nedeniyle hipoksantin oluşmaktadır. Hipoksantin ise normal fizyolojik koşullarda ksantin dehidrojenaz tarafından ksantine okside edilmektedir. Fakat hücre zarındaki iyon pompalarının bozulması sonucu hücre içi kalsiyum seviyesinin artması ile ksantin dehidrojenaz enzimi, ksantin oksidaza dönüşür. Bu dönüşüm derecesi iskemi süresi ile doğru orantılıdır. Bağırsak dokusunda bu dönüşüm diğer dokulardan daha hızlı gelişir, dolayısıyla intestinal iskemiyi göstermede ksantin oksidaz ölçümü güvenli bir belirteçtir (46). Reperfüzyon sırasında dokunun yeniden oksijenlenmesi sonucu hipoksantin, ksantin oksidaz enzimi ile reaksiyona girerek süperoksit anyonu oluşur (Bkz. Şekil.2.7). Demir kofaktörlüğünde süperoksit ve hidrojen peroksit Haber-Weiss ve Fenton reaksiyonu ile oldukça kararsız ve sitotoksik bir bileşik olan hidroksil radikali meydana gelir. Oluşan hidroksil radikali hücre membranında lipid peroksidasyonunu başlatır. Lipid peroksidasyonu sonucu hücre membranında oluşan değişiklikler nedeniyle lökositler endotel hücrelerine daha güçlü bağlanırlar. Bağlanan bu lökositlerden salınan proteazlar ve süperoksit ile endotelyal hücrelerde daha fazla hasar meydana getirirler (46).

Süperoksit iyonunun nitrik oksit ile reaksiyona girmesi sonucunda peroksinitrit oluşmaktadır. Peroksinitrit; hücresel hasar ile sonuçlanan lipid peroksidasyona ve Deoksiribo Nükleik Asit (DNA) düzeyinde protein değişikliklerine neden olmaktadır (47).

Hücrenin tüm bölümleri serbest oksijen radikalleri etkilerine karşı duyarlıdır. En fazla etkilenen bölümlerden biri olan hücre membranının lipid peroksidasyonuna uğraması, hücre zarının geçirgenliğinde ve yapısında değişikliklere neden olmaktadır. Sonuçta seçici geçirgenliğin kaybı ve lizozomal enzimlerin hücre içinde etkili hale gelmesi sitotoksik ürünlerin oluşumuna ve sonunda hücre ölümüne neden olur (48).



Şekil.2.8. İskemi reperfüzyon hasarında hücresel değişimler (İskemi-reperfüzyon hasarı, serbest oksijen radikalleri seviyelerini ve oksidatif stres koşullarını artırır.) - Zuluaga ve ark. (49)'ndan alınmıştır.

Endotelyal Hücreler ve Polimorfonükleer Lökositler (PMNL)

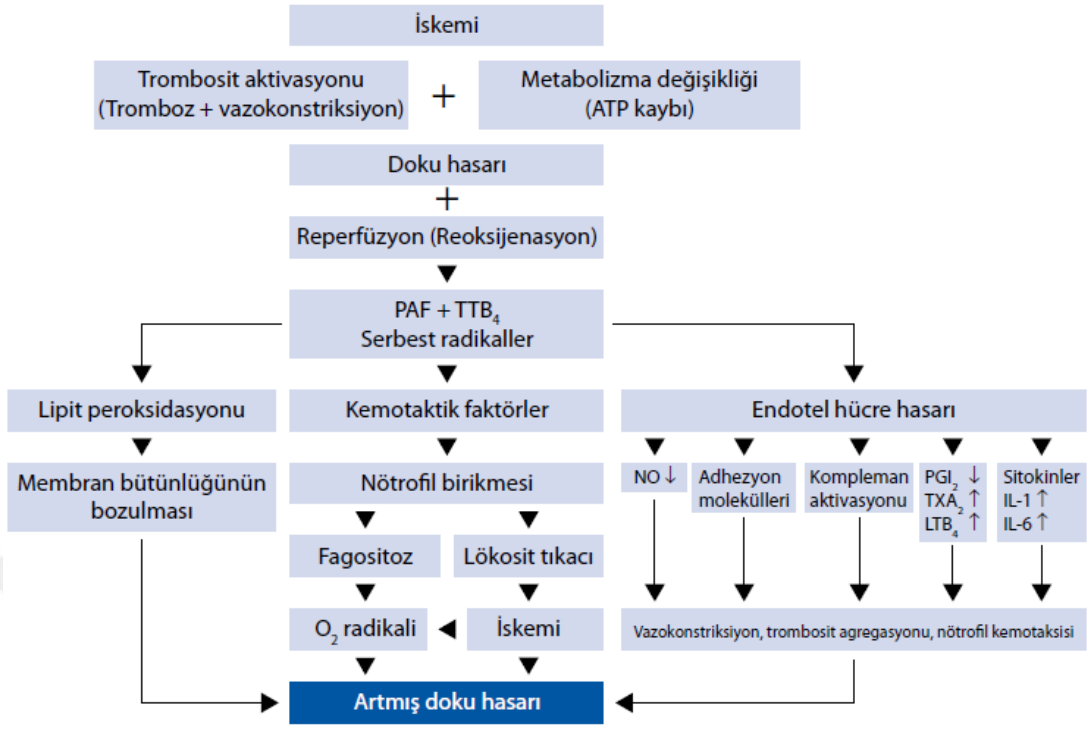
Yapılan çalışmalar I/R patofizyolojisinde iskemi sırasında dokuya gelen lökositleri sorumlu tutmaktadır (50, 51). Massberg ve ark. (52) 1998 yılında ince bağırsak transplantasyonu ile ilgili yaptığı çalışmada, iskemi reperfüzyon hasarının gelişmesinde başlıca submokozada yer alan venüllerdeki lökosit-endotelyal hücre etkileşimi olduğunu göstermiştir. Yine insan üzerinde yapılan çalışmalarda, oluşan I/R hasarının azaltılmasında lökosit filtrelemesinin faydalı olacağı gösterilmiştir (53). İskemi sonrası yeniden kanlanan dokular üzerinde hücresel düzeyde yapılan in-vivo çalışmalarda, postkapiller venüllerde lökosit adezyon ve migrasyon artışı ile karakterize akut inflamatuar cevap meydana getirdiğini gösterilmiştir (54). Hasarlı dokuya gelen lökositler ve trombositler, konak savunma sisteminin ayrılmaz bir parçası olarak doku onarımı ve yeniden düzenlenmesinden sorumludurlar. Bunun yanında inflamatuar aktivite yoluyla yarayı daha da kötüleştirebilirler. Yani serbest oksijen radikalleri üreterek yapısal matriks proteinlerinde şiddetli ve geri dönüşsüz hasara yol açabilmektedirler (55). İnflamasyon alanındaki postkapiller venüllere lökosit migrasyonu ve adezyonu üç aşamadan oluşmaktadır; yuvarlanma, yapışma ve

ekstravazasyon (56). İlk olarak endotel hücre yüzeyindeki P-selektin, E-selektin gibi adezyon moleküllerinin artışı ve lökositler tarafından yapısal olarak salgılanan L-selektin arasındaki etkileşim aracılığıyla lökositler, endotel hücre yüzeyi boyunca yuvarlanmaktadırlar (57). İskemi reperfüzyon sırasında meydana gelen kemokinler ve kemoattraktanlar (C5a, LTB4 ve PAF) lökositleri endotele zayıf bir şekilde bağlar. Kemokinler, lökosit yüzeyindeki reseptörlere bağlanarak beta-2 integrinleri (CD11a, CD11b ve CD 11c /CD18) aktive ederler. Bu aktive integrinler, endotel hücrelerinde salgılanan intersellüler adezyon molekülleri ve vasküler sellüler adezyon molekülü gibi adezyon moleküllerine bağlanırlar. Böylelikle lökositler ve endotel hücreleri arasındaki etkileşimi güçlendirerek lökositlerin dolaşım dışındaki intersitisyuma ekstravazasyonu sağlanır (57). Riaz ve ark. (58) 2002 yılında yaptığı çalışmada fare bağırsağında iskemi reperfüzyon sırasında hem P-Selektin hem de E-Selektin eksprese edildiğini göstermişlerdir. Bu nedenle tedavide Anti-P-selektin antikorlarının kullanımı, lökosit yuvarlanma ve yapışkanlığını azaltarak doku hasarını hafifletmektedir (59). Lökositler çeşitli proteolitik enzimler; elastaz, hidrolaz, myeloperoksidaz ve proteazlar salınımı ile doku hasarına ve inflamatuar cevabın aktivasyonuna neden olabilmektedir (60) (Şekil 2.9).

Akut inflamasyondaki iki ana sitokinden olan TNFα ve interlökinler (IL-1, IL-6 ve IL-8) önemli endojen adezyon moleküllerine sahiptir. TNFα tarafından indüklenen nötrofillerin degranülasyonu ile salınan kollajenaz ve elastaz gibi proteolitik enzimlerin salınımı damar endotelinde yıkıma neden olmaktadır (61). Lökositlerde bulunan myeloperoksidaz enzimi ile hidrojen peroksit ve klorürden oluşan, güçlü bir oksidan ajan olan sodyum hipoklorit meydana gelmektedir (62).

Süperoksit Dismutaz (SOD): Süper oksit radikalini H_2O_2 ve moleküler O_2'ye çevirmektedir. Bu sayede süper oksit radikalini kontrol altında tutar.

Katalaz (CAT): Katalaz enzim aktivitesi karaciğer dokusunda ve eritrositlerde yüksek miktarda iken, beyin, kalp ve iskelet kaslarında düşük miktarlarda bulunur. H_2O_2'yi moleküler O_2 'ye indirger. Bu sayede H_2O_2'nin toksik etkisini azaltmış olur (63).



Şekil.2.9. İskemi reperfüzyon hasarında yer alan olaylar dizini – Sener ve ark. (64)'ndan alınmıştır.

Lipid Peroksidasyonu: Serbest oksijen radikallerinin plazma ve organel membranlarında etkisi sonucu lipid peroksidasyonu oluşur. Hidroksil radikali, membran lipidleri ile birleşerek lipid peroksidasyon ürünleri oluşur. Bu ürünlerin başında malondialdehit gelmektedir. Eritrosit ve lipozomal membranların okside olması ile bu yapıların hem fiziksel hem de kimyasal özellikleri değişerek membranın iyon geçirgenliği bozulur. Eritrositlerde hemoliz olur. Böylece yaygın membran, organel ve hücre hasarı ortaya çıkar.

Malondialdehit (MDA): Lipid peroksidasyonu; lipid moleküllerindeki iki ansatüre bağ arasında yerleşmiş metilen grubundan bir hidrojen atomunun çıkması ile başlatılan kompleks bir yoldur. Sonuçta yeni bir karbon merkezli lipid serbest radikali oluşur. Oksijen varlığında bu yeni lipid serbest radikalinden lipid peroksitler veya hidroperoksitler oluşmaktadır. Bu son ürünler nispeten daha stabil bir son ürün olan ve lipid peroksidasyonunun markeri olarak kullanılabilen MDA'ya dönüşmektedir (65).

Proteinlerin oksidatif modifikasyonu: Serbest oksijen radikalleri; triptofan, triozin, fenilalanin, histidin, metiyonin, sistein gibi aminoasitleri etkilemektedir. Reaksiyon sonucunda özellikle karbon merkezli radikaller ve sülfür radikalleri meydana gelir. Böylece proteinlerin parçalanmasına neden olur. Proteinlerin parçalanmasıyla bazı enzimlerin disfonksiyonuna neden olur.

DNA hasarı: Serbest oksijen radikalleri, nükleer ve mitokondrial DNA yapısında bulunan timin ile reaksiyona girerek zincir kırılmalarına neden olur. DNA yapısında oluşan bu bozulma sonucunda hücrelerde apoptozis meydana gelir.

Nitrik oksit (NO) miktarının azalması: Damar endotel hücrelerinde nitrik oksit sentaz enzimi ile L-arjininden sentezlenir. Guanilat siklaz enziminin "hem" demirine bağlanır ve siklik guanozin monofosfat (cGMP) sentezini uyarır. Vazodilatasyona neden olur. Nitrik oksit, aynı zamanda tiyol gruplarını S-nitrozilasyona uğratarak protein yapısında bozukluklara ve reseptör disfonksiyonuna neden olur. Nitrik oksit, reaktif oksijen türleri ile reaksiyon vererek güçlü bir oksidan olan peroksinitrit (ONOOH) oluşturur. Bu reaksiyonun dekompozisyonu ile hidroksil radikali oluşmaktadır (66). Nitrik oksitin in-vivo çalışmalarda yarı ömrünün sadece birkaç saniye olduğu saptanmıştır. Normal fizyolojik durumlarda endojen nitrik oksit oluşumu düşüktür. Sağlıklı kişilerde plazma nitrit konsantrasyonları sıfıra yakındır. Diğer yandan, nitrik oksitin metaboliti olan nitratın plazma konsantrasyonu çeşitli yayınlarda farklılık göstermesine rağmen, ölçülebilecek düzeylerde olup, örneğin septik şokta 100 μM/L'ye kadar yükselebilmektedir. Nitrat, böbrekler yolu ile atılır. Plazmadaki yarı ömrü 5-8 saat arasındadır ve sağlıklı kişilerde plazma klerensi 20 ml/dk olarak bildirilmiştir (67).

PMNL Aktivasyonu: İskemi reperfüzyon hasarında reaktif oksijen radikalleri oluşumdan sorumlu bir diğer neden ise bölgeye gelen başta nötrofiller olmak üzere makrofajlar, endotel hücreleri ve mast hücreleri gibi inflamatuar hücreler arasındaki etkileşimlerdir. Bu hücrelerden serbest oksijen radikallerinin salgılanmasının yanında, bu hücreler tarafından salınan pro-inflamatuar mediyatörler, PMNL'lerin bölgeye migrasyonuna ve adezyonuna yol açar (68). Birçok çalışmada karaciğer, kalp, böbrek, akciğer ve beyin gibi organların iskemi reperfüzyona bağlı

hasarında nötrofillerin doku düzeyinde ve sistemik olarak artış gösterdiği görülmüştür (69-72).

Pro-inflamatuar sitokin salınımı: Reperfüzyon başlaması ile dolaşımda ve dokuda bulunan makrofajlar tarafından inflamasyon bölgesine nötrofil ve lenfositlerin çekilebilmesi için çeşitli mediatörler salgılanır. Bu mediatörler TNFα, IFNγ, IL-1, IL-6, IL-12'dir (73).

Tümör Nekroz Faktörü-alfa (TNF-α): TNFα doku travması ya da enfeksiyon nedeniyle pro-inflamatuar sitokinlerin salınımını başlatan temel sitokindir. Monositler, makrofajlar ve T hücreleri tarafından salınır (74). Akut travmalarda TNF cevabı hızlı ve kısadır. Yarılanma ömrü 15-18 dakikadır. Akut travmalarda 90 dakikada pik yaptığı ve 4 saat sonra dolaşımda ölçülemeyecek kadar düştüğü gösterilmiştir. TNFα cevabı kısa ve hızlı olmasına rağmen çeşitli sitokinlerin uyarılmasına bağlı olarak ilgili dokuda uzun bir etkiye sahiptir. Ayrıca stres sırasında kas yıkımından ve kaşeksiden sorumlu tutulmaktadır. Bunların dışında koagülasyon kaskadının aktivasyonunda, Prostaglandin E2 (PGE2) ve platelet aktive edici faktör (PAF) düzeylerinin artmasında, glukokortikoidler ve eikozanoidlerin salınımında etkilidir (75).

İnterlökin-1 (IL-1): Makrofajlardan ve endotelyal hücrelerden TNFα uyarısı ile salınır. Etkileri TNFα ile benzerlik gösterir. Pro-inflamatuar bir sitokindir. IL-1α ve IL-1ß olarak bilinen 2 türü vardır. IL-1α hücre membranına direk temas ederek etki gösterir. İlk olarak 1940 yılında lökositik pirojen olarak tanımlanmış olup, yaklaşık 10.000 dalton molekül ağırlığındadır. Deney hayvanlarına verildiğinde ateş, koloni stimülan faktör düzeyinde artış, nötrofili, iştahsızlık, uyku ve akut faz reaktanlarının sentezine yol açar. Daha yüksek dozlarda hipotansiyon ve lökopeniye neden olur.

İnterlökin-6 (IL-6): İnsanda 26 kDa molekül ağırlığında bir proteindir. IL-6 monosit, fibroblast ve endotelyal hücrelerden salınmaktadır (76). IL-6 başlangıçta B-hücre farklılaşma faktörü olarak tanımlanmıştır. Çünkü aktive B-hücreleri tarafından antikor salınımını uyarır. Son yıllarda IL-6'nın sitotoksik T-hücreleri, megakaryositler ve diğer hemopoetik hücreler üzerinde proliferasyon ve farklılaşma

sağlayıcı etkileri yanında, hepatik akut faz proteinlerinin ve plazma hücreleri tarafından immünglobulinlerin yapımının uyarımına neden olduğu bildirilmiştir. TNFα ve IL-1'in arttığı durumlarda arttığı gösterilmiştir.

2.5. Antioksidanlar

Organizmanın pro-oksidan/antioksidan dengesi sağlıklı bir yaşam sürdürebilmek için çok önemlidir. İnsan vücudunda oksidanlara karşı koyan enzimatik antioksidanlar (süperoksit dismutaz, katalaz vb.) devamlı üretilmektedir. Buna ek olarak beslenme ile dışarıdan aldığımız gıdaların antioksidan içerikleri de antioksidan savunma sistemimizin güçlenmesine ciddi katkılar yapmaktadır (77, 78).

Serbest oksijen radikallerinin oluşumunu ve meydana getirdikleri hasarları önlemek ve detoksifikasyonu sağlamak üzere organizmayı koruyan 'antioksidan savunma sistemi' dört yolla etki göstermektedir;

1.Serbest oksijen radikallerini etkileyerek onları tutar ve yok eder (süpürücü etki). Antioksidan enzimler, küçük moleküller bu yolla etki gösterirler (79, 80).

2.Serbest oksijen radikalleriyle etkileşip onlara bir hidrojen aktararak aktivitelerini azaltır veya inaktif hale dönüştürür. Vitaminler, flavanoidler de bu tarz bir etkiye sahiptirler (81).

3. Serbest oksijen radikallerini bağlayarak zincirlerini kırıp fonksiyonlarını engelleyici rolü ile zincir kırıcı etki gösterir. Hemoglobin, seruloplazmin ve mineraller "zincir kırıcı etki" gösterirler (82).

4. Serbest radikallerin oluşturdukları hasarın onarılması şeklinde "onarıcı etki" gösterirler (83).

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

Son çalışmalar, karotenoidlerle ekzojen antioksidan desteğinin kullanımının, potansiyel temizleme yetenekleri sayesinde antioksidan savunmayı artıracağını ileri sürmektedir (84-88).

2.5.1. Total Antioksidan Kapasite

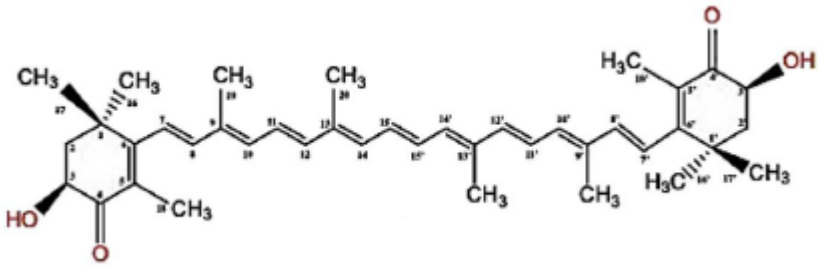
Vücudumuzda endojen ve ekzojen serbest radikallerin oluşturduğu oksidatif stresi yenmeye çalışan antioksidan savunma sistemi mevcuttur. Antioksidan savunma sistemi bu zararlı reaksiyonları önler veya inhibe eder. Plazmada antioksidanlar sürekli etkileşim halindedirler. Bu maddeler sinerjistik olarak 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 ve masraflıdır. Bundan dolayı, bir numunenin toplam antioksidan yanıtı ölçülür ve bu toplam antioksidan kapasite; toplam antioksidan aktivite, toplam antioksidan güç, toplam antioksidan durum olarak da 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 (89-91).

2.6. 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 sahiptir (92). Bazı canlılar renk pigmenti yönünden oldukça zengindirler. Astaksantin içeren “Haematococcus pluvialis” bir klorofit alg türü olup, organizmasında en yüksek düzeyde astaksantin biriktirmektedir (93). Kimyasal olarak β-karotene ve A vitaminine benzerdir.



Şekil.2.10. Astaksantinin kimyasal yapısı - Weeratunge ve ark. (94)'ndan alınmıştır.

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 (2, 3) .

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 (15-17, 95-99). Astaksantinin, in-vivo ve in-vitro sistemlerde lipid peroksidasyonu ve oksidatif strese karşı hücre zarını ve dokuyu koruyan en etkili antioksidanlardan biri olduğu gösterilmiştir. Ayrıca, in-vivo olarak iskemi reperfüzyon patolojilerinin önlenmesi ve tedavisinde astaksantin etkisi, antioksidan molekül olarak güçlü etkisini açığa çıkarmaktadır.

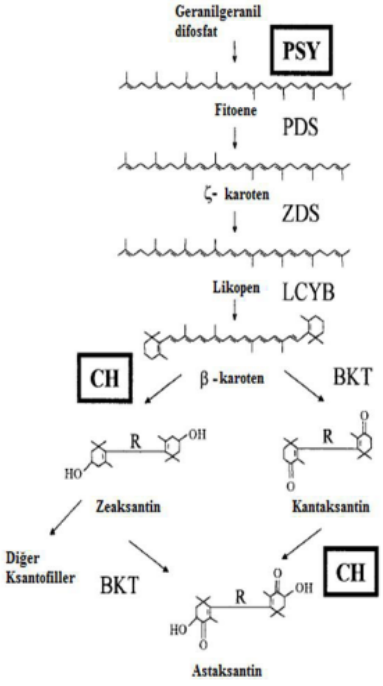
2.6.1. Astaksantinin Biyosentezi

Astaksantin sentezleyen diğer mikroorganizmalara göre en yüksek astaksantin içeriğine sahip olan canlının yeşil alg ailesinden "Haematococcus Pluvialis Flotow" olduğu bilinmektedir (100). Değerli bir pigment olan astaksantinin ticari üretiminde, kullanılmaya en uygun adayın "Haematococcus Pluvialis Flotow" olması, bu algi özel ve önemli hale getirmiştir (19).

Haematococcus pluvialis tek hücreli bir mikroalgdir ve Haematococcus'un genel iskeleti karotenoidler, yağ asitleri, proteinler, karbonhidratlar ve minerallerden oluşmaktadır (101). Aşırı ışık, yüksek sıcaklık, besin eksikliği vb. koşullarda strese

girerek astaksantin sentezini sağlar. Stres koşulları altında indüklenen hücrelerde biriken astaksantinin mono ve di esterleri, toplam karotenoidin %98'ni oluşturur ve hücre kuru ağırlığının yaklaşık %4'ü kadar astaksantin biriktirebilir (102, 103).

Astaksantinin biyosentezi geranil 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 (104, 105). Döngünün birinde β-karoten ketolaz, β-karoteni kantaksantine dönüştürür. CH de kantaksantini astaksantine dönüştürür. Döngünün diğerinde ise karotenoid hidroksilaz, β-Karoteni zeaksantine dönüştürür. BKT de zeaksantini diğer ksantofil ve astaksantine dönüştürür (106, 107).



Şekil 2.11. Astaksantinin biyosentezi - Steinbrenner ve ark. (106)'ndan alınmıştır.

2.6.2. Astaksantinin Yapısı

Astaksantinin tanımı şu şekildedir (101):

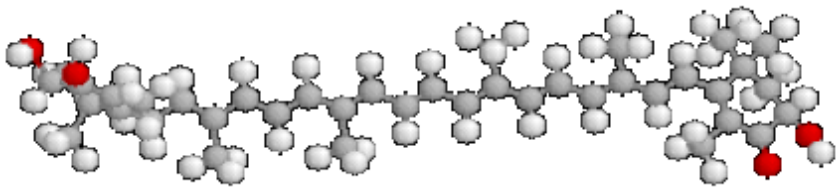
Kimyasal adı: 3,3’-dihidroksi-β, β-karoten-4,4’-dion

Moleküler formülü: C40H52O4

Moleküler ağırlığı: 596.82

CAS numarası: 472-61-7

EINECS numarası: 207-451-4

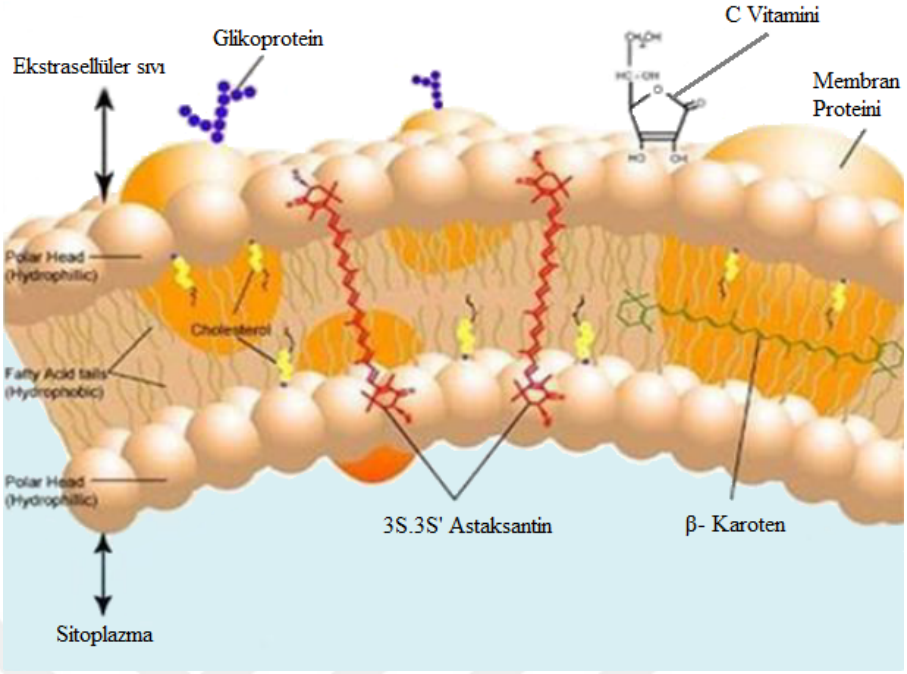


Şekil 2.12. Astaksantinin üç boyutlu yapısı - Tominaga ve ark. (108)’ndan alınmıştır.

Astaksantin kimyasal sentetik formda ve doğal formda olmak üzere iki tipte bulunmaktadır. Sentetik formda olanlar, doğal olmayan konfigurasyonda astaksantin bileşikleri içerir. Mikroorganizma kullanılarak üretilen doğal kaynaklı astaksantin formu bu nedenle daha değerlidir (96, 104).

2.6.3. Astaksantinin 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 2.13. Astaksantinin hücre zarındaki durumu - Şahin ve ark. (109)'ndan alınmıştır.

Astaksantin, karotenoid grubuna dahil bir antioksidandır. 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.

Astaksantin, keto-hidroksil gruplarını içerdiğinden hücre zarına çok iyi oryante olmakta, böylelikle hücrenin hem iç ve hem de dış membranında kalıcı olmaktadır. Ayrıca astaksantin, her bir iyonon halkasında bulunan hidroksil ve keto parçaları ile benzersiz moleküler yapısı nedeniyle hücre zarının dış ve iç kısımlarındaki radikalleri temizleyebilir (110, 111). Astaksantin bu özelliği ile sadece iç veya dış membranda lokalize olabilen beta-karoten ve vitamin C'ye göre hücreyi membran peroksidasyonundan daha iyi korumaktadır.

Astaksantinin insanlar üzerindeki etkisi ile ilgili çalışmalar gün geçtikçe artmaktadır. Yapılan araştırmalarda güneş ışınlarına karşı koruyucu olduğu, Parkinson gibi nöro-dejeneratif hastalıkların önlenmesi üzerine olumlu etkileri olduğu tespit edilmiştir. Son yıllarda, iskemi reperfüzyon hasarına karşı astaksantinin antioksidan etkisine daha fazla dikkat çekilmiştir (112).

2.6.4. Astaksantinin Faydaları

Astaksantinin güçlü antioksidan özelliğinin insan vücuduna olan olumlu etkileri şu şekilde sıralanabilir;

-Anti-inflamatuar etki göstermektedir.

-Antikor sayısını arttırarak bağışıklık sistemini güçlendirmektedir (95, 113).

-Kan-beyin bariyerini geçerek nöro-dejeneratif hastalıklara karşı koruyucu etki göstermektedir.

-Vücudumuzun her yerinde olumlu antioksidan etki göstermektedir.

-Ultraviyole ışınlarının zararlı etkilerinden deriyi korumaktadır (96, 114).

-Yaşlanmadan kaynaklanan cilt dejenerasyonunu iyileştirmektedir (108).

-Alzheimer ve Parkinson hastalıklarının oluşumunu azaltmaktadır (115).

-Kanser hücrelerinin oluşumunu engellemektedir (116, 117).

-Kalp krizi riskini düşürmeye yardımcı olmaktadır.

-Kolestrol düzeyini düzenlemektedir (115).

-Hipertansiyonu önlemede yardımcıdır.

-Prostat hiperplazisini düzeltmeye yardımcıdır.

-Diyabeti önlemede önemli etkileri bulunmaktadır.

-Gözleri ve deriyi radyasyonun zararlı etkilerine karşı korumaktadır.

-Retina bariyerini geçerek retinayı oksidatif zarardan korumaktadır (118, 119).

2.6.5. Astaksantin Kullanım Alanları

Astaksantin, aqua-kültür ve gıda sanayilerinde pigment kaynağı olarak kullanılırken, kozmetik ve farmasötik sanayilerinde de yüksek antioksidan aktivitesi nedeni ile uygulama alanı bulmaktadır (95, 116). Gıda sanayisinde, insan sağlığı üzerine olumlu etkilerinden dolayı kullanımı gittikçe yaygınlaşmaktadır (120).

Astaksantinin insanlarda takviye gıda olarak kullanımı, 1987 yılında U.S. Food and Drug Administration (FDA) tarafından onaylanmıştır.

2.6.6. Astaksantin Pazarı

Astaksantinin ticari satış fiyatı yaklaşık olarak 3000 $/kg'dır. Özellikle aqua-kültür sanayisine satışta, pazarın %95'lik kısmına kimyasal sentetik formdaki astaksantin sahipken, %5'lik kısmına alglerden elde edilen doğal kaynaklı astaksantin sahiptir. Aqua-kültür sanayisindeki gelişimle birlikte 2000 yılından itibaren yılda 100 ton astaksantin talep edilmeye başlanmıştır. Bu potansiyel talep mikrobiyal kaynaklı astaksantin üretimi için büyük pazarların açılmasına neden olabilmektedir. Birkaç araştırma grubu tarafından mikrobiyal kaynaklı astaksantinin büyük çaplı üretiminin kurulmasına yönelik girişimler yürütülmektedir (121).

Aqua-kültür 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 dolarlık bir satış rakamına ulaşmıştır.

İlk olarak doğal kaynaklı astaksantin üretimi Hawai'de iki farklı firma olan Cyanotech ve Aquasearch tarafından başlatılmıştır. Her iki firma da 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 iş birliğine gidilmiştir. Üretimi arttırmayı hedefleyen bu birleşme medyaya da yansımış, ancak bu girişimler başarıya ulaşmamış ve istenen sonuçlar elde edilememiştir (115, 122).

Haematococcus'dan astaksantin üretimi için ticari en son girişim İsrail'de Negev Çölü'nün 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 (122).

3.GEREÇ VE YÖNTEM

3.1. Deney Hayvanları ve Ortam

Bu deneysel çalışma Eskişehir Osmangazi Üniversitesi Tıp Fakültesi Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu tarafından 23.06.2020 tarihinde etik kurul yönergelerine uygun görülerek 792-1/2020 kayıt numarası ile onaylanmıştır. Deney hayvanlarının üretilmesi, yetiştirilmesi KOBAY firması tarafından yapılmış olup, deney boyunca bakım ve operasyon odasının temini Eskişehir Osmangazi Üniversitesi Tıp Fakültesi TICAM (Tıbbi ve Cerrahi Deney Hayvanları Uygulama ve Araştırma Merkezi) tarafından yapılmıştır.

3.2. Araştırma Tipi

Deney protokolü, Eskişehir Osmangazi Üniversitesi Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu onayı sonrasında Araştırma Kurulu tarafından 2020-3171 proje kodu ile desteklendi. Deneysel çalışmalar, Eskişehir Osmangazi Üniversitesi Tıbbi ve Cerrahi Deney Hayvanları Uygulama ve Araştırma Merkezi'nde "National Institutes of Health, Guide for the Care and Use of Laboratory Animals" kurallarına uygun olarak gerçekleştirildi.

Çalışmada 3-4 ay arasında, yaklaşık 250-300 gr ağırlığında Wistar Albino cinsi sağlıklı ve dişi toplamda 32 adet sıçan denek olarak kullanıldı. Denekler rastgele her grupta 8 hayvan olacak şekilde 4 gruba ayrıldı. Sıçanlar, deney öncesi tel kafeslerde, her kafeste 4 hayvan olarak rastgele gruplandı. Ortam sıcaklığı 20-25 °C olacak şekilde, 12 saat aydınlık 12 saat karanlık odada tutuldu. Sıçanlar, standart sıçan yemiyle serbest olarak beslendi. Suluktan serbestçe su içmeleri sağlandı.

Çalışmada kullanılan kimyasal maddeler aşağıda sıralanmıştır;

a) %10 povidone iodine solüsyonu (Merkez San. Ltd. Şti. İstanbul, Türkiye)

b) Ketamin Hidroklorür (Ketalar, Eczacıbaşı Warner-Lambert İlaç Sanayi, Levent, İstanbul) 60 mg/kg dozunda intramusküler (İM) kullanıldı.

c) Xylazine Hidroklorit (Rompun, Bayer Şişli. İstanbul) 10 mg/kg dozunda İM kullanıldı.

d) Astaksantin (≥97% (HPLC) (SML0982) 50 mg/100 ml) (Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen, Germany) 3. ve 4. gruba sırasıyla 1 mg/kg ve 10 mg/kg

dozunda DMSO (Dimetil sülfoksit) içerisinde çözülerek reperfüzyona başlarken intraperitoneal olarak kullanıldı**.**

3.3. Deney Gruplarının Oluşturulması

32 adet sıçan, her birinde 8 adet hayvan olacak şekilde 4 gruba randomize şekilde ayrıldı.

Tablo.3.1 Deney hayvanlarının gruplandırılması

Deney ve kontrol grupları	Grup başına hayvan adedi
Grup 1 (Normal grup-Kontrol grubu)	8
Grup 2 (İskemi/ Reperfüzyon + DMSO)	8
Grup 3 (I/R + Astaksantin 0,3 mg doz)	8
Grup 4 (I/R + Astaksantin 3 mg doz)	8
Toplam	32

Grup 1 (Normal grup-Kontrol grubu): Bu gruptaki hayvanlara laparotomi ve sonrasında SMA diseksiyonu yapıldı, iskemi reperfüzyon modeli oluşturulmadı.

Grup 2 (İskemi/Reperfüzyon + DMSO): Bu gruptaki hayvanlara laparotomi sonrası SMA diseksiyonu yapıldı. Ardından 60 dakika boyunca SMA klemplenerek iskemi sağlandı ve klemp açıldıktan sonra 120 dakikalık reperfüzyona başlarken intraperitoneal DMSO solüsyonu (10 ml) verildi.

Grup 3 (İskemi/Reperfüzyon + Astaksantin 0,3 mg doz): Bu gruptaki hayvanlara laparotomi sonrası SMA diseksiyonu yapıldı. Ardından 60 dakika boyunca klemplenerek iskemi sağlandı ve klemp açıldıktan sonra 120 dakikalık reperfüzyona başlarken intraperitoneal 1 mg/kg dozunda 0,3 mg (10 ml DMSO'da çözünmüş halde) astaksantin verildi (123).

Grup 4 (İskemi/Reperfüzyon + Astaksantin 3mg doz): Bu gruptaki hayvanlara laparotomi sonrası SMA diseksiyonu yapıldı. Ardından 60 dakika boyunca klemplenerek iskemi sağlandı ve klemp açıldıktan sonra 120 dakikalık reperfüzyona başlarken intraperitoneal 10 mg/kg dozunda 3 mg (10 ml DMSO'da çözünmüş halde) astaksantin verildi (123).

3.4. Ameliyat Prosedürü

Deneyde kullanılan tüm sıçanlara, bir gecelik açlığı takiben (sadece su içmelerine izin verilerek), Xylazine (10mg/kg) ve Ketamine (60mg/kg) karışımı, aseptik şartlarda intramusküler yolla uygulanarak genel anestezileri sağlandı. Anestezi altında uyutulan sıçanlar deney masasına alındı. Isı kaybını azaltmak ve vücut sıcaklıklarının 37 °C civarında tutulabilmesi için ameliyat masası üzerinde ısıtıcı lamba kullanıldı. Supin pozisyona alındı ve ayaklarından sabitlendi.



Resim 3.1. Sıçanlar supin pozisyonuna alınması ve ekstremitelerinden sabitlenmesi

Karın bölgesi tıraş edildikten sonra %10 povidone iyodür solüsyonuyla iki kez silinerek, asepsi kurallarına uyularak steril aletler ile operasyona başlandı.

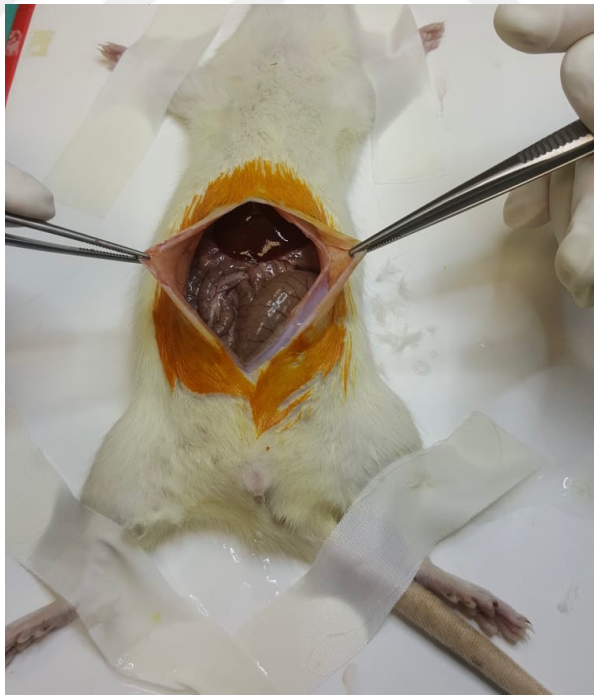


Resim 3.2. Deneklerin cildinin tıraşlanması



Resim 3.3. Deneklerin cilt asepsisi

Ksifoidin altından yapılan yaklaşık 3 cm'lik orta hat insizyonla peritoneal kavite açılarak batına girildi.



Resim 3.4. Batının açılması

Cerrahi bölgede rahat manipülasyon sağlamak amacıyla kolonik anslar batın dışarısına alındı. İnce bağırsak mezenter yapılarının proksimalinde SMA izole edildi. Aort ile SMA birleşim noktası görüldü.

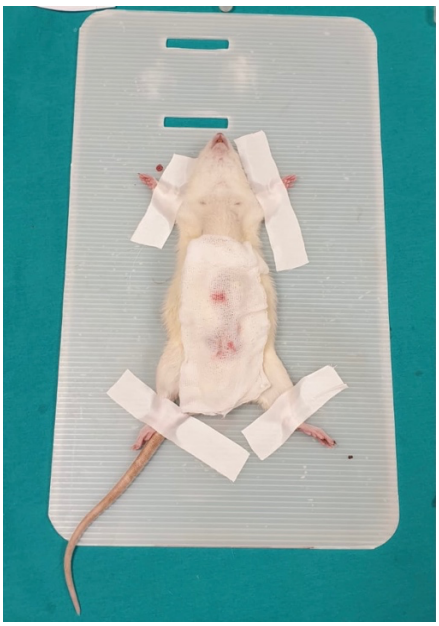


Resim 3.5. Kolonik ansların batın dışına alınması



Resim 3.6. SMA izolasyonu

Grup 1 (Normal grup-Kontrol grubu): SMA izole edilen denekler 1 saat batın açık olacak şekilde operasyon masasında tutuldu. Operasyon sırasında açık olan batın, sıvı ve ısı kaybını azaltmak için steril nemli spanç ile örtüldü.



Resim 3.7. Operasyon sırasında açık olan batının nemli spanç ile üzerin örtülmesi

1 saat beklendikten sonra, batın insizyonları 4/0 polypropylene sütürler ile (Prolene®; Ethicon, USA) kapatıldı.



Resim 3.8. Operasyon sonrası prolen ile kapatılan batın görünümü

Grup 2 (İskemi/Reperfüzyon + DMSO): SMA izole edilen deneklerin SMA'sı arteriyel bulldog klemp (Vascustatts, Scanlan, USA) yardımı ile 1 saat süreyle klemplendi.



Resim 3.9. SMA'ya konulan bulldog klemp görünümü

İnce bağırsak arter pulsasyonlarının kaybolduğu ve bağırsak renginin soluklaştığı görüldü. Operasyon sırasında açık olan batın, sıvı ve ısı kaybını azaltmak için nemli spanç ile örtüldü. 1 saat sonrasında vasküler klemp açıldı. İnce bağırsak arter pulsasyonlarının yeniden sağlandığı ve bağırsak renginin koyulaştığı görülerek, reperfüzyonun sağlandığından emin olundu. Klemp açıldıktan sonra 120 dakikalık reperfüzyona başlarken intraperitoneal DMSO solüsyonu verildi. Ardından batın insizyonları 4/0 polypropylene sütürler ile (Prolene®; Ethicon, USA) kapatıldı.

Grup 3 (İskemi/Reperfüzyon + Astaksantin 0,3 mg doz): SMA izole edilen deneklerin SMA'sı arteriyel bulldog klemp (Vascustatts, Scanlan, USA) yardımı ile 1 saat süreyle klemplendi. İnce bağırsak arter pulsasyonlarının kaybolduğu ve bağırsak renginin soluklaştığı görüldü. Operasyon sırasında açık olan batın, sıvı ve ısı kaybını azaltmak için nemli spanç ile örtüldü. 1 saat sonrasında vasküler klemp açıldı. İnce bağırsak arter pulsasyonlarının yeniden sağlandığı ve bağırsak renginin koyulaştığı görülerek reperfüzyonun sağlandığından emin olundu. Klemp açıldıktan sonra 120 dakikalık reperfüzyona başlarken intraperitoneal 1 mg/kg dozunda 0,3 mg (10 ml DMSO'da çözünmüş halde) astaksantin verildi. Ardından batın insizyonları 4/0 polypropylene sütürler ile (Prolene®; Ethicon, USA) kapatıldı.

Grup 4 (İskemi/Reperfüzyon + Astaksantin 3mg doz): SMA izole edilen deneklerin SMA'sı arteriyel bulldog klemp (Vascustatts, Scanlan, USA) yardımı ile 1 saat süreyle klemplendi. İnce bağırsak arter pulsasyonlarının kaybolduğu ve bağırsak renginin soluklaştığı görüldü. Operasyon sırasında açık olan batın, sıvı ve ısı kaybını azaltmak için nemli spanç ile örtüldü. 1 saat sonrasında vasküler klemp açıldı. İnce bağırsak arter pulsasyonlarının yeniden sağlandığı ve bağırsak renginin koyulaştığı görülerek reperfüzyonun sağlandığından emin olundu. Klemp açıldıktan sonra 120 dakikalık reperfüzyona başlarken intraperitoneal 10 mg/kg dozunda 3 mg (10 ml DMSO'da çözünmüş halde) astaksantin verildi. Ardından batın insizyonları 4/0 polypropylene sütürler ile (Prolene®; Ethicon, USA) kapatıldı.

120 dakika reperfüzyon sağlandıktan sonra tüm deneklere intramusküler Ketamin ve Xylazine anestezisi yeniden verildi. Eski insizyon hattı üzerindeki sütürler alınarak batın açıldı. Ardından intrakardiyak 5 ml kan alındı. Daha sonra tüm denekler servikal dislokasyon uygulanarak sakrifiye edildi. Sakrifikasyonun hemen

sonrasında terminal ileumun proksimalinden 5 cm ileum çıkarılıp, çıkarılan bağırsak lümeni soğuk %0,9 NaCl ile yıkandı. Çıkarılan ileum dokusunun 2 cm'lik parçası histopatolojik inceleme için %10 formaldehit içerisine konuldu. Kalan ileum dokusu cerrahi tampon ile kurulandıktan sonra diğer işlemler için iki eşit parçaya bölünüp mikro santrifüj (eppendorf) tüplerine yerleştirildi ve inceleme yapılıncaya kadar -80 °C'de derin dondurucu içinde saklandı.

3.5. Biyokimyasal ve Histopatolojik Analizler

Çalışmada kullanılan tüm deneklerden, plazma SOD, CAT, MDA çalışılması için kan ve doku; Kaspaz-3, P53, TNFα, IL-1, IL-6 çalışılması ve histopatolojik değerlendirme için terminal ileumdan doku örnekleri alındı.

3.5.1 ELİSA Yöntemi ile Kan Plazmasından SOD, CAT ve MDA İncelenmesi

Uygulanan işlemler sonrasında tüm ratlardan intrakardiyak kan örnekleri alındı. Alınan kan örnekleri EDTA'lı (Etilendiamin tetraasetik asit) tüplere konuldu. Tüpler 4100 G devirde 15 dk santrifüj edildi. Üst fazda kalan plazmalar bir pipet aracılığıyla steril tüplere alındı. Daha sonra deneyin yapılacağı güne kadar -80 ºC'de saklandı. Deney günü plazmalar oda ısısında erimeleri beklendi. Vorteks yardımı ile karıştırıldı. Serum örneklerinde SOD, CAT ve MDA düzeyi ölçüldü.

Süperoksit dismutaz (SOD) aktivitesi ölçümü (U/ml): Süperoksit dismutazın rolü, oksidatif enerji süreçleri sırasında üretilen toksik radikalin hidrojen peroksit ve moleküler oksijene dismutasyonunu hızlandırmaktır. Bu yöntem, kırmızı bir formazan boyası oluşturmak üzere 2-(4-iyodofenil)-3-(4-nitrofenol)-5-feniltetrazolyum klorür ile reaksiyona giren süperoksit radikalleri üretmek için ksantin ve ksantin oksidaz kullanıldı. Sonuçlar U/ml olarak verildi (Relassay, Türkiye).

Malondialdehit (MDA) ölçümü (nmol/L): Doku MDA seviyesi, 90-100 ºC'de tiyobarbitürik asit (TBA) ile reaksiyona dayalı bir yöntemle belirlendi. TBA test reaksiyonunda, MDA veya MDA benzeri maddeler ve TBA, 532 nm'de maksimum absorbsiyon ile pembe bir pigment üretimi ile reaksiyona girmekte olup, reaksiyon

pH 2-3'te 90 ºC'de 15 dakika boyunca gerçekleştirildi. Numune, proteinin çökelmesi için iki hacim soğuk %10 trikloroasetik asit ile karıştırıldı. Çökelti santrifüjleme ile topak haline getirildi ve süpernatantdan bir kısım eşit hacimde %0,67 (a/h) TBA ile 10 dk kaynar su banyosunda reaksiyona sokuldu. Soğutulduktan sonra absorbans 532 nm'de okundu. Sonuçlar nmol/L olarak verildi (Relassay, Türkiye).

Katalaz (CAT) aktivitesi ölçümü (U/ml): Bu kalorimetrik tahlil iki adım içermektedir. Numune önce bilinen miktarda hidrojen peroksit ile inkübe edildi. Örnek hidrojen peroksiti su ve oksijene dönüştürdü. Oran, katalaz konsantrasyonu ile orantılı idi. Enzim durduruldu ve sabit bir inkübasyon periyodunun ardından kalan hidrojen peroksit bir kromojen kullanılarak belirlendi. Elde edilen absorbans 405 nm'de ölçüldü ve elde edilen sonuçlar U/ml olarak ifade edildi (Relassay, Türkiye).

3.5.2. PCR Yöntemi ile Dokuda Kaspaz-3, P53, TNFα, IL-1, IL-6 Ölçümü

Uygulanan işlemler sonrası Kaspaz-3, P53, TNFα, IL-1, IL-6 ölçümü için tüm ratların terminal ileum dokusundan örnekler alındı. Alınan örnekler eppendorf tüpü içinde çalışma yapılacağı güne kadar -80 ºC'de saklandı. Çalışılan materyal doku örneği; 100 mg doku bistüri ile küçük parçalara ayrılarak homojenize edildi ve üzerine 1 ml RiboEx (GeneAll,301-001) eklenerek vortekslendi. Çalışılan materyal kültür hücresi örneği ise; $1x10^7$ kültür hücresi üzerine 1 ml RiboEx (GeneAll,301-001) eklenerek karışması sağlandı. Oda ısısında 5 dk inkübe edildi. Karışım 11.000 rpm, 10 dk, +4 °C koşullarında santrifüj yapıldı ve süpernatant başka bir tüpe aktarıldı. Karışım üzerine 200 µL kloroform eklenerek karıştırıldı ve 2 dk süre ile inkübe edildi. +4 °C de 12.000xg'de 15 dk santrifüj yapıldı. Süpernatant temiz bir tüpe alındı. Süpernatantın hacmi kadar RB1 Buffer eklendi eklenerek karıştırıldı. 700 µL karışım dokuya aktarıldı. 10.000xg'de 30 sn santrifüj yapıldı. Collection tüp yenisi ile değiştirildi. Karışımdan kalan miktar olması durumunda 7-8 kez işlemler tekrarlandı. Doku üzerine 500 µL SW1 Buffer eklendi. 10.000xg de 30 sn santrifüj yapıldı. Collection tüp yenisi ile değiştirildi. Doku üzerine 500 µL RNW Buffer eklendi. 10.000xg de 30 sn santrifüj yapıldı. Collection tüp yenisi ile değiştirildi. Doku içinde kalan yıkama solüsyonlarını uzaklaştırmak için 10.000xg de 1 dk santrifüj yapıldı. Daha sonra doku temiz bir tüpe alındı. Doku üzerine 50 µL RNase-

saf su eklendi ve 1dk oda sıcaklığında bekletildi. Sonra 10.000xg de 1 dk santrifüj yapılarak elde edilen mRNA örnekleri -80 °C sıcaklıkta donduruldu.

mRNA izolasyonu sonrasında cDNA sentezi aşamasına geçildi. cDNA sentezi için HyperScriptTM First strand synthesis kit (GeneALL, 601-005) kullanıldı. cDNA mastermix hazırlandıktan sonra 65 °C sıcaklıkta 5 dk inkübe edildi. İnkübasyon sonrasında karışım buz üzerine alındı. cDNA sentezi için mastermix hazırlandıktan sonra reverse transkripsiyon reaksiyonuna geçildi. cDNA sentezi için kullanılan reverse transkripsiyon reaksiyonu iki aşamalı olarak gerçekleştirildi. Elde edilen cDNA örnekleri Real-Time PCR aşamasına kadar -80 °C sıcaklıkta donduruldu.

cDNA elde edildikten sonra Real-Time qPCR aşamasına geçildi. Real-Time qPCR için RealAmpTM SYBR qPCR Master mix (GeneALL, 801-051) adlı kit kullanıldı. Mastermix hazırlandıktan sonra Real-Time qPCR reaksiyonuna geçildi. Real-Time qPCR reaksiyon koşulları sağlandıktan sonra Real-Time qPCR reaksiyonu Applied BiosystemsTM 7500 Fast Real-Time PCR cihazında gerçekleştirildi.

mRNA ekspresyonları kantitasyonu ACTB transkripti referans olarak kullanılıp kontrol gurubuna göre normalize edildi. Relatif kantifikasyon hesaplamasında "ΔΔCt Yöntemi" kullanıldı. ΔΔCt hesaplaması aşağı açıklandığı şekilde gerçekleştirildi.

Hem hedef grupta hem de referans grupta her bir örneğin hem hedef mRNA hem de referans mRNA için Real-Time PCR sonucunda Ct değerleri elde edildi. Teknik tekrarlı çalışmalarda Ct değerlerinin ortalaması alınarak hesaplamaya devam edildi. Hedef grupta hedef mRNA Ct değerinden referans RNA Ct değeri çıkarılarak hedef grup ΔCt değerleri elde edildi. Referans grupta hedef mRNA Ct değerinden referans RNA Ct değeri çıkarılarak referans grup ΔCt değerleri elde edildi. Hedef grup ΔCt değerlerinden referans grup ΔCt değerleri çıkarılarak ΔΔCt değerleri elde edildi. ΔΔCt değerleri $2^{-\Delta\Delta Ct}$ şeklinde işleme alınarak kat değişimi (Fold Change) hesaplanması yapıldı. Fold Change değeri 1'in üzerinde çıkması durumunda hedef grubu mRNA ekspresyonunun referans grubun mRNA ekspresyonuna göre relatif olarak artış gösterdiği şeklinde yorumlandı. Fold Change değeri 1'in altında çıkması

durumunda ise hedef grubu mRNA ekspresyonunun referans grubun mRNA ekspresyonuna göre relatif olarak azalış gösterdiği şeklinde yorumlandı.

3.5.3. Histopatolojik İnceleme

Bağırsak doku örnekleri ışık mikroskobik inceleme için ilk olarak %4 paraformaldehit solüsyonunda tespit edildi. Tespit işleminden sonra doku örnekleri kasetlere konularak akar su altında 2 saat süresince yıkandı. Suyun uzaklaştırılması için dokular artan derecelerde alkol serilerinden (%60, %70, %80, %90, %96 %100) geçirildiler. Sonrasında dokular parlatılmaları amacıyla ksilolden geçirildi ve ardından parafine gömüldüler.

Hematoksilen-Eozin (H&E)

Deney gruplarından alınan kesitler 60 °C etüvde 60 dk bekletildikten sonra 3x5 dk ksilole alınarak parafinden arındırılmaları sağlandı. Daha sonra lamlar sırasıyla azalan alkol serilerinden geçirilip (%100, %96, %90, %70) 1 dakika akar suda yıkandıktan sonra, Harris Hematoksilen'de 2 dakika boyandı ve 2x2 dk akar suda yıkandı. %1 Amonyak-Su karışımına batırılıp tekrar 1 dakika akar suda yıkandı. Lamlar 2 dakika Eozinde bekletilip artan dereceli alkol serilerinden geçirilerek (%70, %80, %96, %100), 2x1 dk ksilole alındı ve entellan ile kapatıldı. Daha sonra kesitler Olympus BX 51 marka ışık mikroskobunda görüntülendi. Ardından bulgular Chiu skoruna göre skorlanarak değerlendirildi.

Chiu Histolojik Skorlaması

Grade 0: Sağlıklı mukozal villuslar.
Grade 1: Lamina propriyada nötrofil yoğunluğu.
Grade 2: Goblet hücresi kaybı ve genellikle mukozal villus apeksinde kapiller konjesyon gözlenir.
Grade 3: Lamina propriada dilate kapillerlerin görülmesi. Bazen lamina propriada artmış nötrofil yoğunluğu görülür.
Grade 4: Lamina proprianin sindirimi ve parçalanması. Beraberinde hemoraji de görülür.

İmmunhistokimyasal Boyama Yöntemi

Bağırsak dokusu parafin bloklarından lamlara 3 µm kalınlığında kesitler alındı. Kesitler 60 °C etüvde 1 saat bekletildikten sonra, 15 dk ksilole alınarak deparifinizasyonları sağlandı. Daha sonra lamlar sırasıyla azalan alkol serilerinden geçirilip rehidrate (%100, %96, %80, %70) edildi. Kesitleri alkolden arındırmak amacıyla iki kez birer dakika distile sudan geçirildi. Antigen maskesini kaldırmak için 1/10 dilue Citrat Buffer (pH:6) (AP-9003-999 ThermoScientific) PT Modülü (A80400012 LabVision) ile uygulandı**.** IHC Boyama cihazında rack yuvalarına lamlar coverplate ile birlikte takıldı. PBS (Phosphate Buffered Saline) ile 5 dk yıkama yapıldı. 10 dk %3'lük hidrojen peroksit (TA-125-HP ThermoScientific) ile endojen peroksidaz aktivitesi bloke edildi. PBS ile yıkanan dokular 10 dk Protein Bloke (TA-125-PBQ ThermoScientific) ile muamele edildi. Anti-Caspase-3 antıbody (ab208161 Abcam) 1/100 oranında dilüe edilerek 2 saat inkübe edildi. PBS ile 5 dk yıkama yapıldı. AmplifierQuanto (TL-125-QPB ThermoScientific) 20 dk bekletildi. HRP PolymerQuanto (TL-125-QPH ThermoScientific) 30 dk bekletildi. Her aşamada PBS ile yıkama yapıldı. Pozitif hücreleri belirleyebilmek için DAB Chromogen (TA-125-HA ThermoScientific) ile boyama yapıldı. Zemin boyaması için 30 sn süreyle Hematoksilen (HHS32Sigma) uygulandı. Distile su ile 2 dk yıkandı. Lamlar artan dereceli alkol serilerinden geçirilerek (%70, %80, %96, %100), 2 dk ksilole alındı ve entellan ile kapatıldı. Daha sonra kesitler Olympus BX 51 marka ışık mikroskobunda görüntülendi.

TUNEL Boyama Yöntemi

Bağırsak dokusu parafin bloklarından lamlara 3 µm kalınlığında kesitler alındı. Kesitler 60 °C etüvde 1 saat bekletildikten sonra, 15 dk ksilole alınarak deparifinizasyonları sağlandı. Daha sonra lamlar sırasıyla azalan alkol serilerinden geçirilip rehidrate (%100, %96, %80, %70) edildi. Kesitleri alkolden arındırmak amacıyla iki kez birer dakika distile sudan geçirildi. Proteinase K enzym (37 °C etüv içinde) 15 dk uygulandı. 5 dakika %3'lük hidrojen peroksit ile endojen peroksidaz aktivitesi bloke edildi. PBS ile yıkandı. 3 dk Equilibration Buffer ile muamele edildi. TdT enzym çalışma solüsyonunda, 37 °C etüv içinde 60 dk bekletildi. Working

Stop/Washbuffer solüsyonunda 10 dk yıkandı. Digoxigenin peroxidaz ile 30 dk muamele edildi. PBS ile yıkandı. Pozitif hücreleri belirleyebilmek için DAB Chromogen ile boyama yapıldı. Zemin boyaması için 1 dk süreyle Methylene Green (H-3402-500 Vector) uygulandı. Distile su ile 2 dk yıkandı. Lamlar artan dereceli alkol serilerinden geçirilerek (%70, %80, %96, %100), 2 dk ksilole alındı ve entellan ile kapatıldı. Daha sonra kesitler Olympus BX 51 marka ışık mikroskobunda görüntülendi.

PAS Boyama Yöntemi

Bağırsak dokusu parafin bloklarından lamlara 3 µm kalınlığında kesitler alındı. Kesitler 60 °C etüvde 1 saat bekletildikten sonra, 15 dakika ksilole alınarak deparifinizasyonları sağlandı. Daha sonra lamlar sırasıyla azalan alkol serilerinden geçirilip Rehidrate (%100, %96, %80, %70) edildi. Kesitleri alkolden arındırmak amacıyla iki kez birer dakika distile sudan geçirildi. Periodic Acid solüsyonunda 5 dk bekletildi. Lamlar distile suda yıkandı. Schiff reagent solüsyonunda 20 dk bekletildi. Lamlar distile suda 5 dk yıkandı. Harris Hematoksilen'de 1 dk bekletildi. Lamlar distile suda yıkandı. Bluing Reagent 5 sn bekletildikten sonra, 1 dk akar suda yıkandı. Lamlar artan dereceli alkol serilerinden geçirilerek (%70, %80, %96, %100), 2 dakika ksilole alındı ve entellan ile kapatıldı. Daha sonra kesitler Olympus BX 51 marka ışık mikroskobunda görüntülendi.

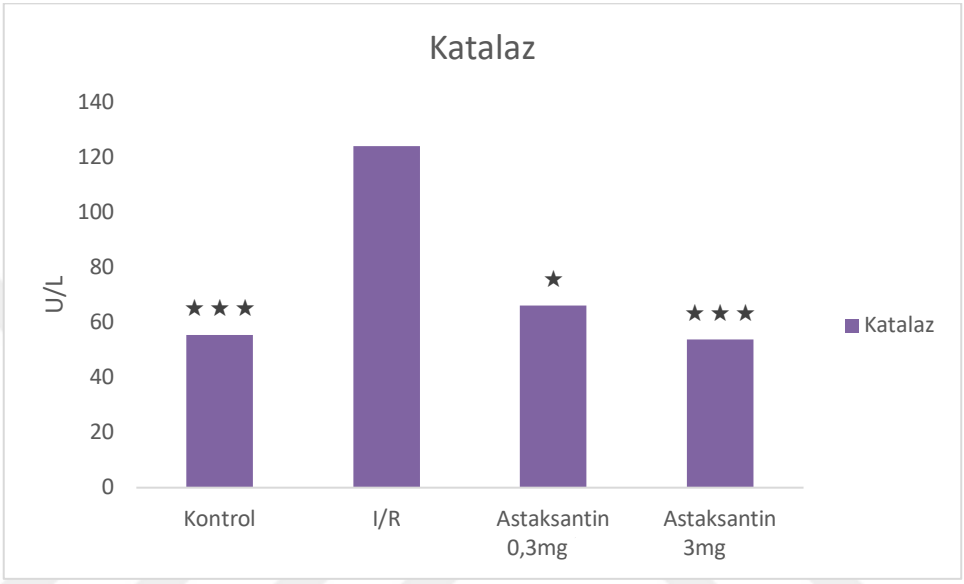
3.6. İstatistiksel Analiz

İstatistiksel değerlendirme için IBM SPSS Statistics 22 programı kullanıldı. Gruplar ilk önce normal dağılım gösterip göstermediklerini belirlemek için Kolmogorov-Smirnov ve Shapiro-Wilk normallik testi kullanılarak analiz edildi. Tüm parametreler normal dağılım göstermedi. Gruplar arasındaki farklılıklar Kruskal-Wallis testi ile değerlendirildi. Çoklu karşılaştırma testi olarak da Dunn testi kullanıldı. P değerinin 0,05'ten küçük olması anlamlı kabul edildi. Histopatolojik incelemeler için One-way ANOVA testi kullanıldı.

4.BULGULAR

4.1. Plazmada ölçülen SOD,CAT ve MDA Değerleri

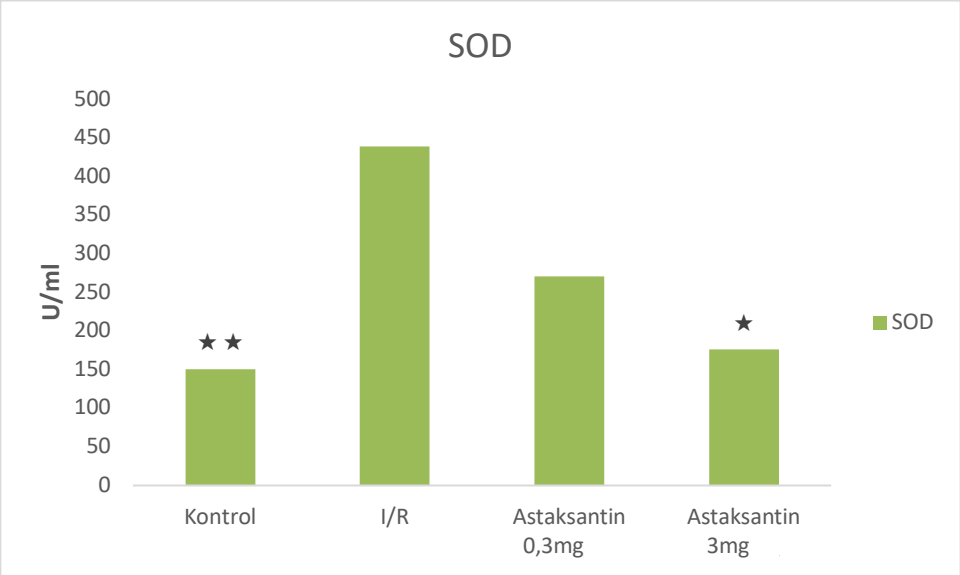
CAT



Grafik 4.1. Plazmada CAT değerlerinin grafik üzerinde gösterilmesi (Tüm gruplar I/R grubu ile karşılaştırıldı ve p<0,001 ★★★, p<0,01 ★★, p<0,05 ★ şeklinde gösterildi.)

CAT değerleri istatistiksel olarak karşılaştırıldığında gruplar arasında anlamlı fark olduğu görüldü (p<0,001). Kontrol grubu ile I/R grubu arasında istatistiksel olarak anlamlı fark saptandı (p<0,001). I/R grubu ile 3 mg astaksantin verilen iskemi reperfüzyon grubu arasında anlamlı fark saptandı (p<0,001). I/R grubu ile düşük doz astaksantin verilen grup arasında anlamlı fark saptandı (p=0,021). Fakat kontrol grubu ile 0,3 mg astaksantin verilen grup arasında anlamlı fark saptanmadı (p=0,567). Yine düşük doz astaksantin ile yüksek doz astaksantin verilen grup arasında anlamlı fark saptanmadı (p=1,00). Ayrıca kontrol grubu ile yüksek doz astaksantin verilen grup ile anlamlı fark bulunmadı (p=1,00)

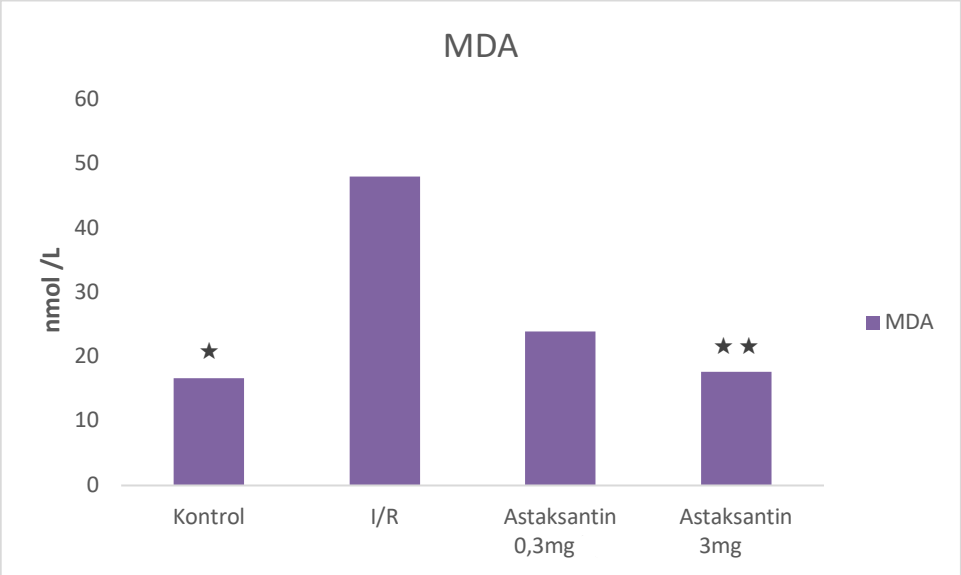
SOD



Grafik 4.2. Plazmada SOD değerlerinin grafik üzerinde gösterilmesi (Tüm gruplar I/R grubu ile karşılaştırıldı ve p<0,01 ★★, p<0,05 ★ şeklinde gösterildi.)

SOD değerleri istatistiksel olarak karşılaştırıldığında gruplar arasında anlamlı fark olduğu görüldü (p<0,001). Kontrol grubu ile I/R grubu arasında istatistiksel olarak anlamlı fark saptandı (p=0,002). I/R grubu ile 3 mg astaksantin verilen iskemi reperfüzyon grubu arasında anlamlı fark saptandı (p=0,029). Kontrol grubu ile 0,3 mg astaksantin verilen grup arasında anlamlı fark saptandı (p=0,018). Fakat I/R grubu ile düşük doz astaksantin verilen grup arasında anlamlı fark saptanmadı (p=1,00). Yine düşük doz astaksantin ile yüksek doz astaksantin verilen grup arasında anlamlı fark saptanmadı (p=0,179). Ayrıca kontrol grubu ile yüksek doz astaksantin verilen grup ile anlamlı fark bulunmadı (p=1,00)

MDA

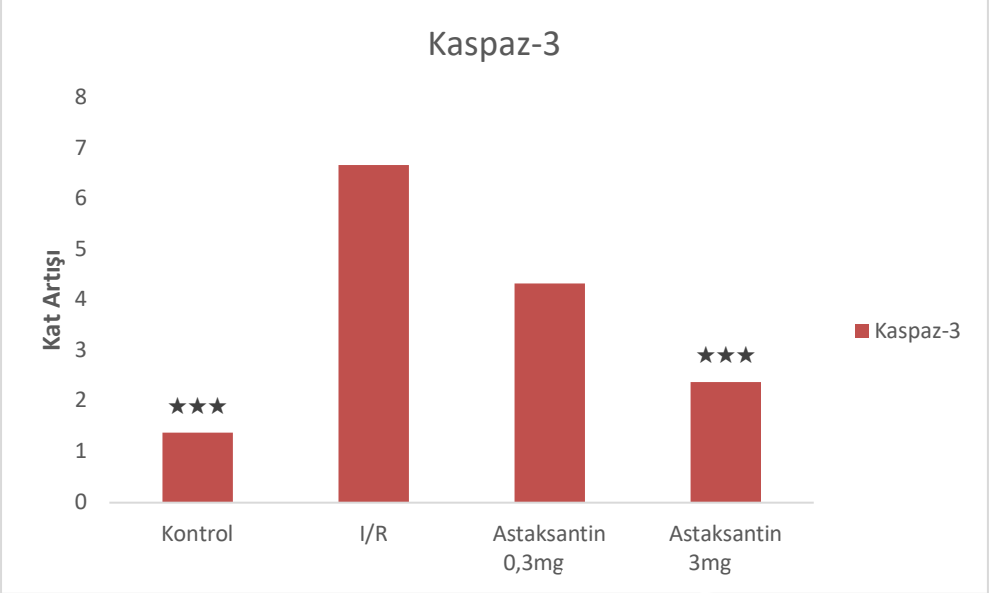


Grafik 4.3. Plazmada MDA değerlerinin grafik üzerinde gösterilmesi (Tüm gruplar I/R grubu ile karşılaştırıldı ve $p<0,01$ ★★, $p<0,05$ ★ şeklinde gösterildi.)

MDA değerleri istatistiksel olarak karşılaştırıldığında gruplar arasında anlamlı fark olduğu görüldü ($p<0,001$). Kontrol grubu ile I/R grubu arasında istatistiksel olarak anlamlı fark saptandı ($p=0,042$). I/R grubu ile 3 mg astaksantin verilen iskemi reperfüzyon grubu arasında anlamlı fark saptandı ($p=0,009$). Düşük doz astaksantin ile yüksek doz astaksantin verilen grup arasında anlamlı fark saptandı ($p=0,017$). Fakat kontrol grubu ile 0,3 mg astaksantin verilen grup arasında anlamlı fark saptanmadı ($p=0,071$). I/R grubu ile düşük doz astaksantin verilen grup arasında anlamlı fark saptanmadı ($p=1,00$). Ayrıca kontrol grubu ile yüksek doz astaksantin verilen grup ile anlamlı fark bulunmadı ($p=1,00$)

4.2. PCR yöntemi ile Dokudan Ölçülen Kaspaz-3, P53, IL-1, IL-6, TNFα Değerleri

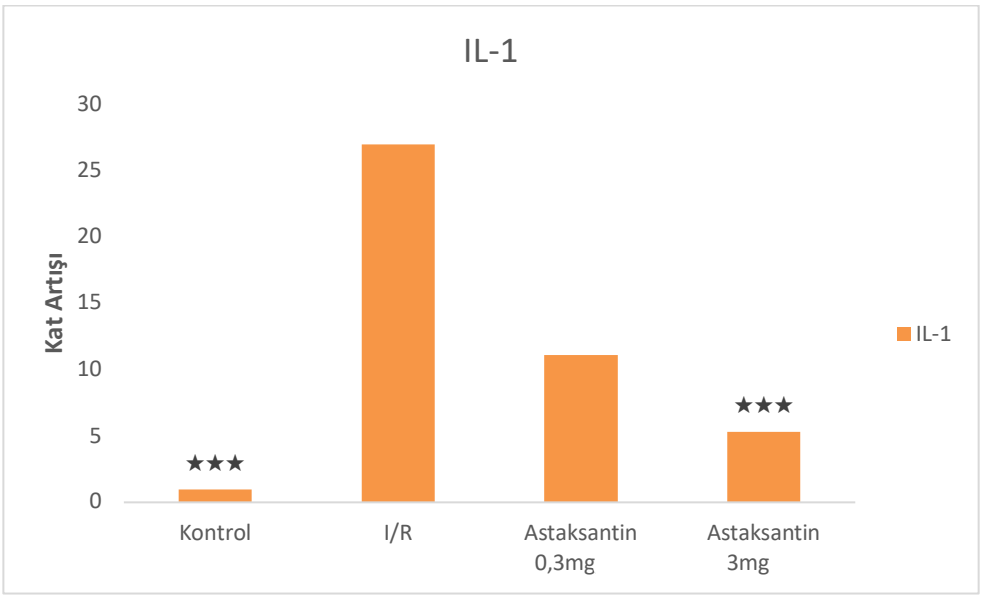
Kaspaz-3



Grafik 4.4. PCR yöntemi ile dokudan ölçülen Kaspaz-3 değerleri
(Tüm gruplar I/R grubu ile karşılaştırıldı ve p<0,001 ★★★ şeklinde gösterildi.)

Kaspaz-3 değerleri, istatistiksel olarak karşılaştırıldığında gruplar arasında anlamlı fark olduğu görüldü (p<0,001). Kontrol grubu ile I/R grubu arasında anlamlı fark görüldü (p<0,001). Kontrol grubu ile 0,3 mg astaksantin verilen grup arasında anlamlı fark saptandı (p=0,003). I/R grubu ile 3 mg astaksantin verilen grup arasında anlamlı fark bulundu (p<0,001). Fakat kontrol grubu ile yüksek doz astaksantin verilen grup arasında anlamlı fark saptanmadı (p=0,461). Düşük doz astaksantin verilen grup ile yüksek doz astaksantin verilen grup arasında yine anlamlı fark saptanmadı (p=0,402). I/R grubu ile düşük doz astaksantin verilen grup arasında anlamlı fark saptanmadı (p=0,351).

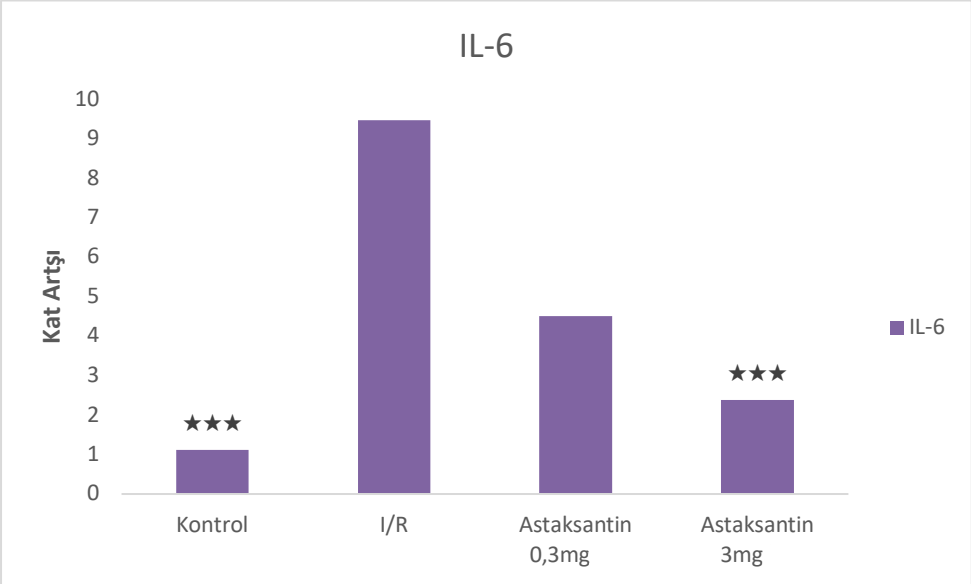
IL-1



Grafik 4.5. PCR yöntemi ile dokudan ölçülen IL-1 değerleri
(Tüm gruplar I/R grubu ile karşılaştırıldı ve $p<0,001$ ★★★ şeklinde gösterildi.)

IL-1 değerleri, istatistiksel olarak karşılaştırıldığında gruplar arasında anlamlı fark olduğu görüldü ($p<0,001$). Kontrol grubu ile I/R grubu arasında anlamlı fark bulundu ($p<0,001$). Kontrol grubu ile 0,3 mg astaksantin verilen grup arasında anlamlı fark saptandı ($p=0,003$). I/R grubu ile 3 mg astaksantin verilen grup arasında anlamlı fark bulundu ($p<0,001$). Fakat kontrol grubu ile yüksek doz astaksantin verilen grup arasında anlamlı fark saptanmadı ($p=0,666$). Düşük doz astaksantin verilen grup ile yüksek doz astaksantin verilen grup arasında yine anlamlı fark saptanmadı ($p=0,285$). I/R grubu ile düşük doz astaksantin verilen grup arasında anlamlı fark saptanmadı ($p=0,241$).

IL-6

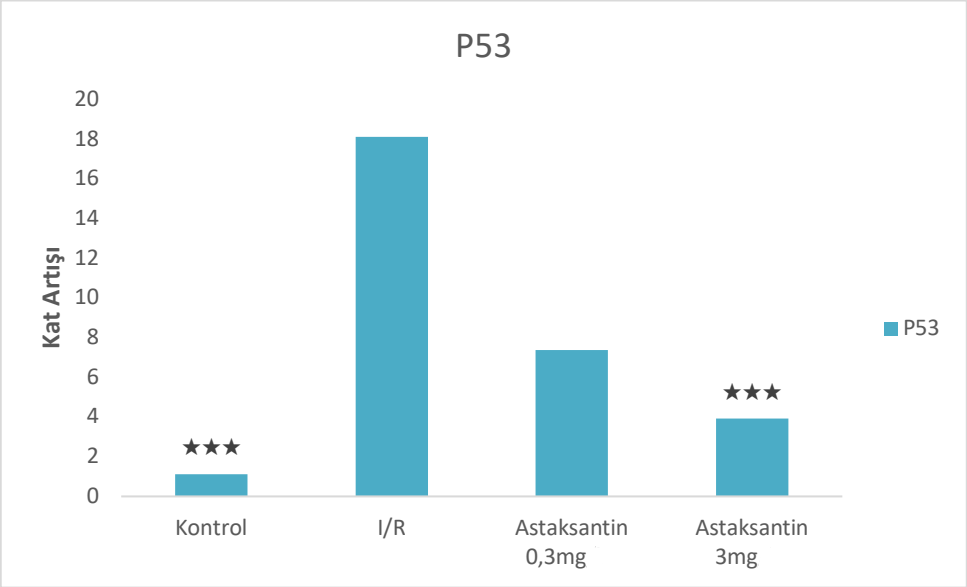


Grafik 4.6. PCR yöntemi ile dokudan ölçülen IL-6 değerleri

(Tüm gruplar I/R grubu ile karşılaştırıldı ve p<0,001 ★★★ şeklinde gösterildi.)

IL-6 değerleri, istatistiksel olarak karşılaştırıldığında gruplar arasında anlamlı fark olduğu görüldü (p<0,001). Kontrol grubu ile I/R grubu arasında anlamlı fark bulundu (p<0,001). Kontrol grubu ile 0,3 mg astaksantin verilen grup arasında anlamlı fark saptandı (p=0,009). I/R grubu ile 3 mg astaksantin verilen grup arasında anlamlı fark bulundu (p=0,001). Fakat kontrol grubu ile yüksek doz astaksantin verilen grup arasında anlamlı fark saptanmadı (p=0,692). Düşük doz astaksantin verilen grup ile yüksek doz astaksantin verilen grup arasında yine anlamlı fark saptanmadı (p=0,534). I/R grubu ile düşük doz astaksantin verilen grup arasında anlamlı fark saptanmadı (p=0,213).

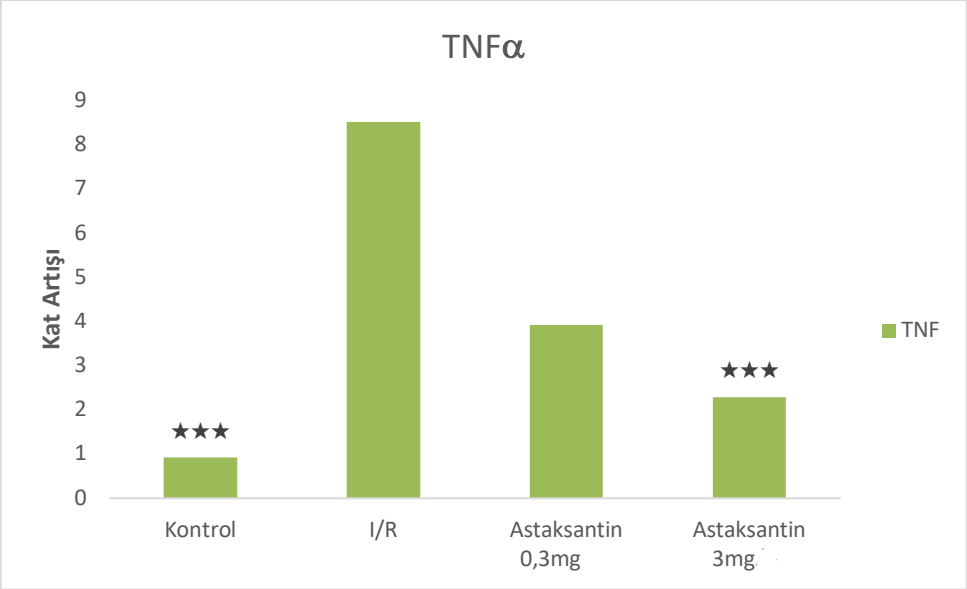
P53



Grafik 4.7. PCR yöntemi ile dokudan ölçülen p53 değerleri
(Tüm gruplar I/R grubu ile karşılaştırıldı ve p<0,001 ★★★ şeklinde gösterildi.)

P53 değerleri, istatistiksel olarak karşılaştırıldığında gruplar arasında anlamlı fark olduğu görüldü (p<0,001). Kontrol grubu ile I/R grubu arasında anlamlı fark bulundu (p<0,001). Kontrol grubu ile 0,3 mg astaksantin verilen grup arasında anlamlı fark saptandı (p=0,004). I/R grubu ile 3 mg astaksantin verilen grup arasında anlamlı fark bulundu (p=0,001). Fakat kontrol grubu ile yüksek doz astaksantin verilen grup arasında anlamlı fark saptanmadı (p=0,347). Düşük doz astaksantin verilen grup ile yüksek doz astaksantin verilen grup arasında yine anlamlı fark saptanmadı (p=0,645). I/R grubu ile düşük doz astaksantin verilen grup arasında anlamlı fark saptanmadı (p=0,161).

TNFα



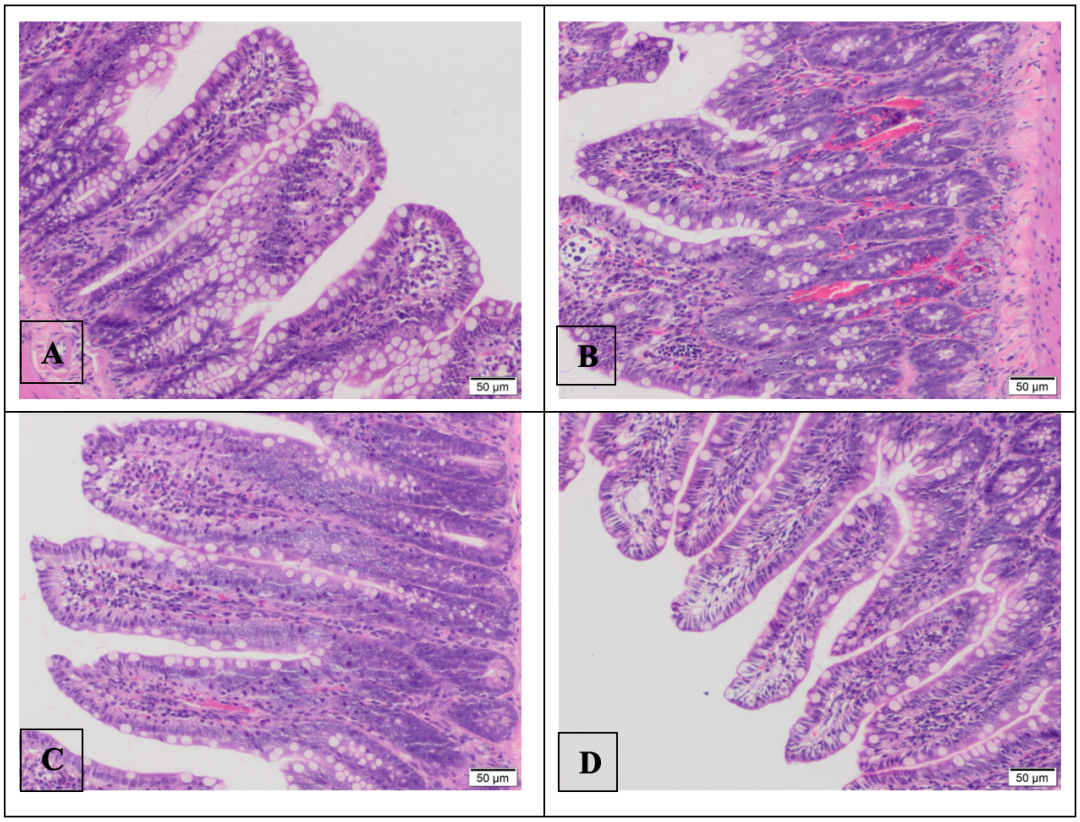
Grafik 4.7. PCR yöntemi ile dokudan ölçülen TNFα değerleri

(Tüm gruplar I/R grubu ile karşılaştırıldı ve p<0,001 ★★★ şeklinde gösterildi.)

TNFα değerleri, istatistiksel olarak karşılaştırıldığında gruplar arasında anlamlı fark olduğu görüldü (p<0,001). Kontrol grubu ile I/R grubu arasında anlamlı fark bulundu (p<0,001). Kontrol grubu ile 0,3 mg astaksantin verilen grup arasında anlamlı fark saptandı (p=0,005). I/R grubu ile 3 mg astaksantin verilen grup arasında anlamlı fark bulundu (p=0,001). Fakat kontrol grubu ile yüksek doz astaksantin verilen grup arasında anlamlı fark saptanmadı (p=0,447). Düşük doz astaksantin verilen grup ile yüksek doz astaksantin verilen grup arasında yine anlamlı fark saptanmadı (p=0,619). I/R grubu ile düşük doz astaksantin verilen grup arasında anlamlı fark saptanmadı (p=0,188).

4.3. Histopatolojik Bulgular

4.3.1. Hematoksilen Eozin Boyama

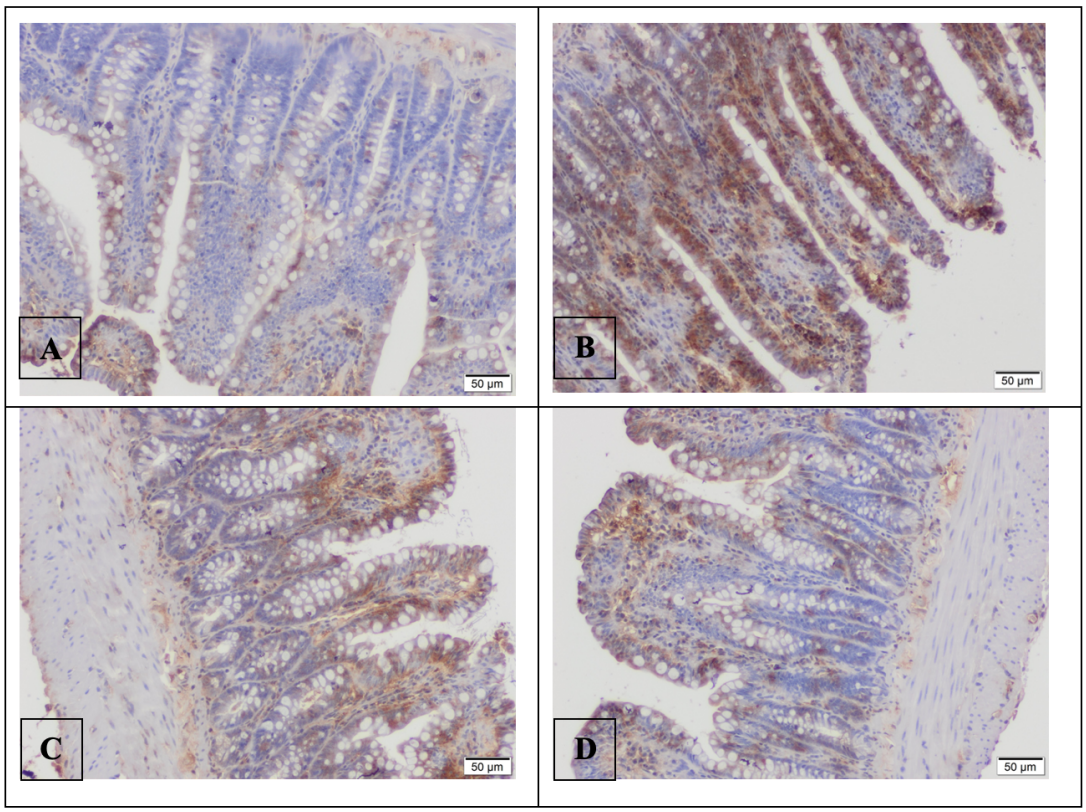


Şekil 4.1. Bağırsak dokusunun hematoksilen eozin boyama sonucu histolojik görünümü (A. Kontrol grubu, B. I/R grubu, C. 0,3 mg Astaksantin grubu, D. 3 mg Astaksantin grubu)

Her bir grup histopatolojik olarak hematoksilen eozin boyama ile boyandıktan sonra ışık mikroskobunda ayrıntılı incelendi. Kontrol grubunda sağlıklı mukozal villusların varlığı gözlendi. I/R grubunda lamina propriyada ülserasyon ve villus içeresinde hemarojik alanların olduğu gözlendi. 0,3 mg astaksantin verilen grupta subepitelyal konjesyon ve villusların apeksinde ülserasyon gözlendi. 3 mg astaksantin verilen grupta ise bazı villusların tabanında konjesyon ve goblet hücre sayısında normale kıyasla azalma olduğu görülmüştür. Bu bulgular doğrultusunda her bir grup için Chiu skoru hesaplandı ve gruplar arasında Chiu skorlarına göre istatistiksel olarak karşılaştırıldığında gruplar arasında anlamlı fark olduğu görüldü

(p<0,001). Kontrol grubu ile I/R grubu karşılaştırıldığında Chiu skorlarında anlamlı ölçüde artış olduğu görüldü (p<0,001). Ayrıca hem düşük doz astaksantin verilen hem de yüksek doz astaksantin verilen grupta I/R grubuna göre anlamlı farklılıklar görüldü (p<0,001, p<0,001).

4.3.2. Kaspaz-3 İmmunoreaktivitesi

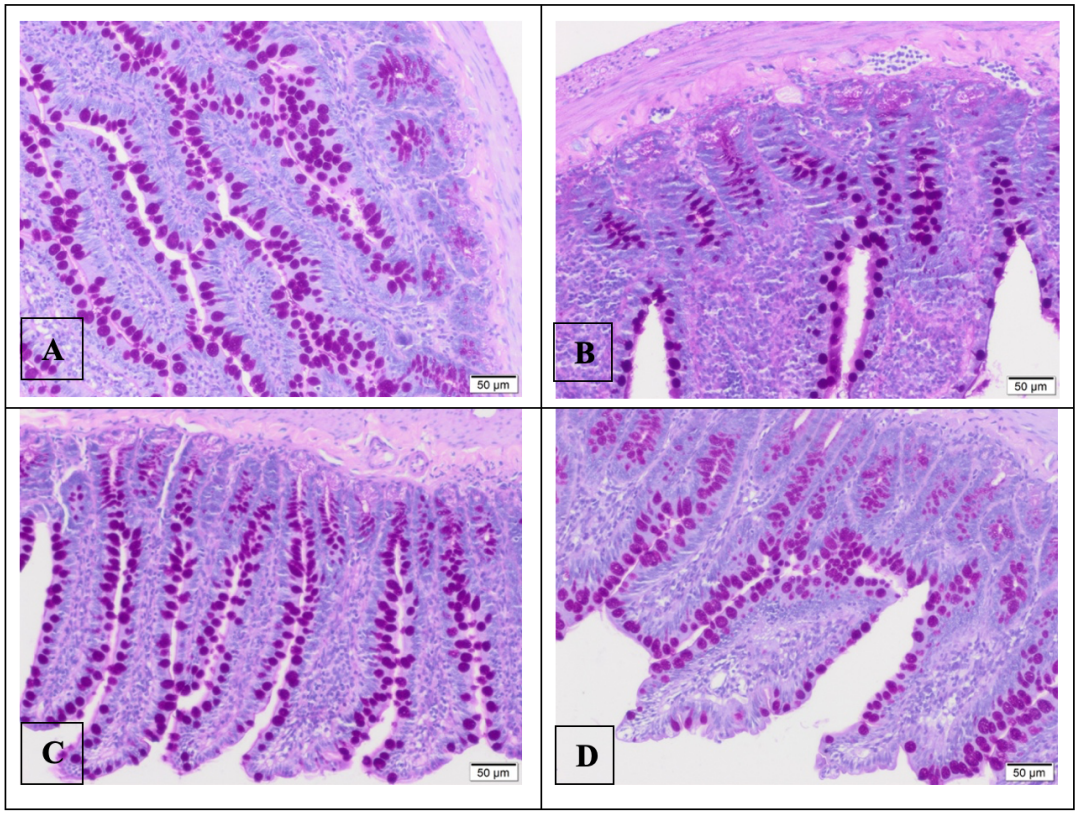


Şekil 4.2. Bağırsak dokusunun Kaspaz-3 immunoreaktivitesinin histolojik görünümü (A. Kontrol grubu, B. I/R grubu, C. 0,3 mg Astaksantin grubu, D. 3 mg Astaksantin grubu)

Her bir grup için Kaspaz-3 immunoreaktivitesi istatistiksel olarak kıyaslandığında gruplar arasında anlamlı farklılıklar olduğu gözlendi (p<0,001). Kontrol grubu ile I/R grubu karşılaştırıldığında Kaspaz-3 immunoreaktivitesinin anlamlı ölçüde yüksek olduğu bulunmuştur (p<0,001). Astaksantin verilen gruplar ile I/R grubu karşılaştırıldığında astaksaninin artan dozları ile orantılı şekilde Kaspaz-3

immunoreaktivitesinin azaldığı ve istatistiksel olarak da anlamlı farklılıklar olduğu görüldü ($p<0,001$, $p<0,001$).

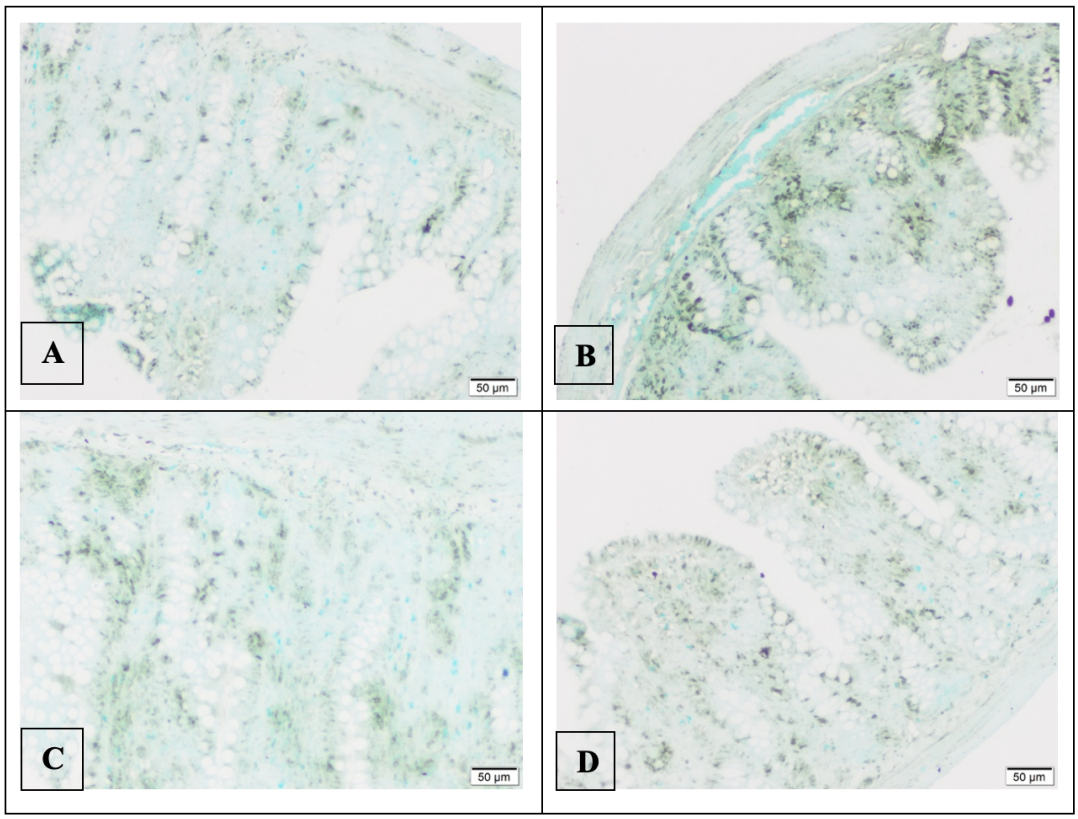
4.3.3. PAS Boyama



Şekil 4.3. Bağırsak dokusunun PAS boyama sonucu histolojik görünümü (A. Kontrol grubu, B. I/R grubu, C. 0,3 mg Astaksantin grubu, D. 3 mg Astaksantin grubu)

Pas boyama sonrası her bir grup için goblet hücre sayısı ayrı ayrı incelendi. Goblet hücre sayısının en az I/R grubunda olduğu gözlendi. Astaksantinin artan dozları uygulanması sonrasında goblet hücre sayısının da arttığı tespit edildi.

4.3.4. TUNEL Boyama



Şekil 4.4. Bağırsak dokusunun TUNEL boyama sonucu histolojik görünümü (A. Kontrol grubu, B. I/R grubu, C. 0,3 mg Astaksantin grubu, D. 3 mg Astaksantin grubu)

TUNEL boyama ile in-situ saptanan DNA kırıkları gruplar arasında istatistiksel olarak değerlendirildi ve gruplar arasında anlamlı farklılıklar olduğu görüldü ($p<0,001$). I/R grubu ile kontrol grubu karşılaştırıldığında I/R grubundaki DNA kırıklarının anlamlı ölçüde yüksek olduğu gözlendi ($p<0,001$). Artan dozlarda astaksantin verilen gruplar ile I/R grubu istatistiksel olarak kıyaslandığında her bir grup ile arasında anlamlı farklılıklar olduğu tespit edildi ($p<0,001$, $p<0,001$). Ayrıca 3 mg astaksantin verilen grup ile kontrol ile karşılaştırıldığında istatistiksel olarak farklılık saptansa da değersel olarak yakın sonuçlar elde edildi ($p<0,05$).

5. TARTIŞMA

İntestinal iskemi; geçirilmiş kardiyovasküler girişimler, majör travma, intestinal transplantasyon, abdominal aort cerrahisi, sepsis ve şok gibi çeşitli klinik durumlarda ortaya çıkan, hayatı tehdit eden akut bir patolojidir (124-126). Tanı ve klinik vakadaki zorluklar nedeniyle yüksek morbidite ve mortaliteye sahiptir (127). İskemi; tek başına kapiller geçirgenliğin artmasına, nekroza ve mukozal bariyer yıkımına yol açabilmektedir. Ancak dokuda reaktif oksijen türlerinin hızlı üretimi ciddi hücresel hasara neden olabilmektedir. Bu hasarlar çoğu zaman geri döndürülemez olabilir. İskemi sonrası dokuya kan akışının yeniden sağlanması moleküler oksijenin dokuya girmesini sağlar (8). İskemi reperfüzyon hasarı sırasında oksijen ve ATP miktarında azalma, enerji üretiminin anaerobik metabolizma yoluyla sağlanması, laktik asitin artmasına bağlı hücre içi pH'ın azalması ve reaktif oksijen türlerinin oluşumu gibi çok sayıda patofizyolojik mekanizma rol oynamaktadır (128, 129). Bunun yanı sıra yaygın inflamasyon ve serbest radikal oluşumu sonucunda oksidan-antioksidan dengesi bozulur. Oluşan oksidatif stres organ disfonksiyonuna neden olur (8, 130). Bunun nedeni iskemi reperfüzyon sırasında dokuya gelen yetersiz kan temini nedeniyle hücre dışına göç eden nötrofiller olduğu düşünülmektedir. Nötrofillerden salınan miyeloperoksidaz (MPO) enzimi, kapiller boşluğunun genişlemesine yol açar. Ayrıca hipoksi sonucunda ksantin dehidrojenaz, reperfüzyon sırasında serbest oksijen radikallerinin üretiminde yer alan ksantin oksidaza dönüşür. Bağırsak dokusu en çok ksantin oksidaz içeren dokulardan biridir ve aynı zamanda I/R hasar başlatıcısı olarak serbest oksijen radikallerinin ana kaynağıdır (54, 131). Serbest oksijen radikalleri, hücre zarının lipid yapısını bozan ve doku hasarına neden olan lipid peroksidasyonunu başlatır (132, 133). Lipid peroksidasyonu, serbest radikaller tarafından tetiklenen, membran fosfolipidlerinde çoklu doymamış yağ asitlerinin oksidasyonu ile sonuçlanan, böylece membran lipid yapısını değiştiren ve hücre yapısını ve fonksiyonunu bozan kimyasal bir eylemdir (134-136). Lipid peroksidasyonunun son ürünü olan MDA, reaktif oksijen türlerinin durumunu yansıtır. I/R hasarı sürecinde aktive nötrofiller inflamasyon bölgesine doğru göç eder, reaktif oksijen türlerinin oluşumu ve MPO gibi bazı toksik enzimlerin salınımı ile doku hasarının şiddetini arttırır (128). SOD, süperoksit radikalini hidrojen peroksite çeviren, dismutasyon reaksiyonunda etkili,

metalloprotein yapılı bir enzimdir (135). Vücutta serbest oksijen radikallerinin neden olduğu hasarlara karşı dokuları koruyan endojen bir antioksidan savunma sistemi vardır (135, 137, 138). Bu sistemin en önemli bileşenleri SOD, glutatyon peroksidaz, katalaz enzimleri ile A, C ve E vitaminleridir. Ancak bu sistem, reperfüzyon fazı sırasında oluşan yüksek miktardaki serbest oksijen radikallerini ortadan kaldıramaz. Bu nedenle, I/R yaralanmasının tedavisinde çeşitli antioksidanlar test edilmiştir. Bağırsak I/R hasarını hafifletmek için çok sayıda ajan kullanılmıştır (139, 140).

Deney hayvanlarında iskemi reperfüzyon modeli oluşturulurken iskeminin yeterli düzeyde olması ve reperfüzyon hasarı oluşabilmesi için de yeterli sürede zaman bırakılması gerekmektedir. Bu amaçla yapılan çalışmaların çoğunda iskemi oluşabilmesi için 60 dk, reperfüzyonun oluşabilmesi için ise 120 dk'nın yeterli olduğu görülmüştür (141-144). Bu nedenle biz de çalışmamızda iskemi periyodunu 60 dk, reperfüzyon periyodunu da 120 dk olarak belirledik ve uyguladık. Serbest oksijen radikali temizleyicilerinin deneysel ve klinik kullanımının etkinliğini gösteren pek çok çalışmanın ortak sonucu; antioksidanların, reperfüzyon başlamadan önce uygulanması gerektiğidir (145). Biz de çalışmamızda bu bilgiden yola çıkarak astaksantini reperfüzyona başlamadan önce intraperitoneal olarak uyguladık.

Bir metalloprotein olan, vücutta doğal olarak oluşan katalaz, I/R ile oluşan serbest oksijen radikallerinden olan Hidrojen peroksit (H_2O_2)'i su ve oksijene çevirerek yıkıcı etkisini azaltır. Zhonghui ve ark. (146) 2014 yılında yaptığı çalışmada I/R hasarını gösterirken; SOD ve katalaz değerlerinin I/R hasarında yükseldiğini saptamışlardır. Çalışmamızda katalaz değerleri istatistiksel olarak karşılaştırıldığında gruplar arası anlamlı farklıklar görülmüştür. I/R grubu ile kontrol grubu arasında oldukça anlamlı fark saptanmıştır ($p<0,001$). Yine I/R grubu ile hem yüksek doz hem de düşük doz astaksantin verilen gruplar arasında anlamlı düzeyde farklılık görülmüştür ($p<0,001$, $p<0,05$). Sonuç olarak I/R hasarında kontrol grubu ile kıyaslandığında katalaz değeri oldukça yüksek bulunmuştur. Astaksantin verilen her iki grupta da katalaz değeri I/R grubu ile kıyaslandığında düşük olarak bulunmuştur ve kontrol grubu ile arasında fark olmaması astaksantinin düşük dozlarda bile katalaz değerlerini düşürdüğünü göstermiştir.

İntestinal iskemi reperfüzyon hasarı sonucu artan serbest oksijen radikallerinin, lipid peroksidasyonunu ve protein hasarını başlatarak hücre

apoptozisine ve doku nekrozuna yol açtığı bilinmektedir (147, 148). Reaktif oksijen türlerinin neden olduğu lipid peroksidasyonu, hücresel hasar ve hücre ölümünde en kritik mekanizmalardan biridir. Birçok oksijenli bileşik, özellikle malondialdehit gibi aldehitler, serbest radikallerin membran lipoproteinlerine ve çoklu doymamış yağ asitlerine saldırısı sırasında üretilir. Hidroksil radikali, hücrelerde üretilen reaktif oksijen türlerinin en reaktif ürünüdür. Hidroksil radikalleri, güçlü bir sitotoksik etki sağlamak için DNA, proteinler ve lipitler dahil olmak üzere hücresel makromoleküllerle kolayca reaksiyona girer. Hidroksil radikalleri ve lipidlerin reaksiyonunun lipid peroksidasyonu ile sonuçlandığı iyi bilinmektedir. Bağırsak MDA seviyelerinde gözlenen artış, hayvan modellerinde bağırsak dokusundaki oksidatif hasarı da doğrulayan lipid peroksidasyonunun bir göstergesidir (149). Shen ve ark. (150) 2009 yılında yaptığı çalışmada iskemik beyin hasarını göstermek amacıyla MDA değerlerini kullanmış ve I/R hasarı oluşturulan grupta MDA düzeylerini yüksek saptamışlardır. Çalışmamızda dokulardaki serbest oksijen radikalleri oluşumunu göstermek amacıyla lipid peroksidasyonunun son ürünü olan MDA düzeyleri ölçülmüştür. Ölçülen MDA değerleri kontrol grubunda en düşük, I/R grubunda en yüksek olarak ölçüldü. Değerler istatistiksel olarak karşılaştırıldığında gruplar arasında anlamlı farklılıklar olduğu görülmüştür ($p<0,001$). Kontrol grubu ile I/R grubu kıyaslandığında MDA değerleri anlamlı oranda yüksek olarak bulunmuştur ($p<0,05$). Yine yüksek doz astaksantin verilen grup ile I/R grubu arasında fark olduğu gösterilmiştir ($p<0,01$). Fakat düşük doz astaksantin verilen grupta değersel olarak I/R grubuna göre düşük MDA değerleri bulunsa da istatiksel olarak aralarında anlamlı fark saptanmamıştır ($p>0,05$). Bu değerlere yorum olarak; yüksek doz astaksantinin lipid peroksidasyunu azaltarak serbest oksijen radikallerini azalttığı düşünülmüştür.

İskemi sonrası reperfüzyon sırasında SOD enzim aktivitesinde artış meydana gelmektedir. Bu artışın en önemli sonucu süperoksit radikallerinin yükselmesi ve böylelikle doku hasarının şiddetlenmesi ile sonuçlanır (147). Dimakakos ve ark. (151) yaptığı çalışmada abdominal aort oklüzyonu oluşturulan ratlarda SOD enzim aktivitesindeki artışı göstermişler ve antioksidan bir vitamin olan vitamin E'nin SOD aktivitesini azalttığını tespit etmişlerdir. Yine Kandemir ve ark. (147) farklı dozlarda verilen Anakinra'nın doz bağımsız olarak SOD enzim aktivitesini azaltıcı etkisi

olduğunu göstermişlerdir. Bizim çalışmamızda da I/R grubu ile kontrol grubu karşılaştırıldığında SOD enzim aktivitesinin istatistiksel olarak da anlamlı ölçüde yüksek olduğu bulunmuştur ($p<0,01$). Ayrıca yüksek doz astaksantin verilen grup ile I/R grubu karşılaştırıldığında SOD enzim aktivitesinin anlamlı ölçüde azaldığı ve kontrol grubu ile kıyaslandığında farklılığın olmadığı görülmüştür ($p<0,05$, $p>0,05$). Fakat düşük doz astaksantin verilen grup ile I/R grubu karşılaştırıldığında değersel olarak SOD enzim aktivitesinin azaldığı gözlense de istatiksel olarak anlamlı olmadığı tespit edilmiştir ($p>0,05$). Çalışmamızda yüksek doz verilen astaksantinin SOD enzim aktivitesini azalttığı fakat düşük dozlarda yeterli cevabın oluşmadığı kanaatine varılmıştır.

Apoptozun primer başlatıcısı olduğu bilinen kaspaz-3 aynı zamanda inflamasyonun da başlamasına neden olur. I/R hasarı sırasında doku kaybına yol açan en önemli mekanizmalar nekroz ve apoptozdur. İskemi sonrası dokularda tükenen ATP, dokuda ödem ve devamında dokularda nekroz gelişmesine neden olur. Bu iskemik olayların sonucunda kaspaz-3 seviyelerindeki artış, DNA fragmantasyonuna neden olur. Yapılan birçok çalışmada da kaspaz-3 aktivitesinin iskemik hastalıklarda apoptozu başlatarak hücre ölümünün yolunu açtığını göstermişlerdir (152, 153). Bizim çalışmamızda kaspaz-3 değerleri istatistiksel olarak karşılaştırılmış ve anlamlı sonuçlar elde edilmiştir ($p<0,001$). I/R grubu ile kontrol grubu karşılaştırıldığında kaspaz-3 aktivitesinin önemli ölçüde yükseldiği görülmüştür ($p<0,001$). Yine I/R grubu astaksantin verilen gruplar ile karşılaştırıldığında yüksek doz astaksantin verilen grupta anlamlı fark varken, düşük doz astaksantin verilen grupta fark saptanmamıştır ($p<0,001$, $p>0,05$). Çalışmamızda apoptozun güvenilir bir göstergesi olarak bilinen kaspaz-3 aktivitesi, yüksek doz astaksantin verilerek neredeyse normal dokudaki düzeylere kadar düşürerek apoptozu baskıladığı saptanmıştır ($p>0,05$). Ayrıca hücresel düzeyde değerlendirilen kaspaz-3 immunoreaktivitesinin ekspresyon yoğunluğu kontrol grubuna kıyasla en fazla I/R grubunda gözlenmiştir ($p<0,001$).

I/R hasarında bir başka süreç TNFα, IL-1 ve IL-6 gibi proinflamatuar sitokinlerin artışıdır (154). TNF-α, IL-1b ve IL-6'nın yükselmesi, hasarlı dokuya lökosit infiltrasyonuna neden olur (155). Pek çok deneysel çalışmada, intestinal I/R hasarını başlatan etyolojik nedenden bağımsız olarak, plazma sitokin düzeyi ve

iskemi-reperfüzyon hasarı sonrası MOF gelişimi arasında yakın ilişki olduğu gösterilmiştir. Bu yakın ilişki, sitokinlerin erken tanı belirteci olarak kullanılabilirliğini gündeme getirmiştir. Çalışmaların çoğu TNFα, IL-1 ve IL-6 üzerine yoğunlaşmış; diğer sitokinler aynı ilgiyi görmemiştir. Tüm bu çalışmaların ışığında, akut intestinal iskemi sonrası SIRS ve MOF tablolarının gelişmesinde; TNFα, IL-1 ve IL-6'nın başrolleri oynadığı gösterilmiştir. İntestinal I/R hasarı; tek başına hipoksik hasara göre, plazma sitokin düzeyinde 4 kat artışa neden olur. Reperfüzyonun 15. dakikasında plazma TNFα, IL-1 ve IL-6 düzeyleri yükselmeye başlar ve 4 saatte tepe düzeyine ulaşır (156). Hastürk ve ark. (157) tarafından 2009 yılında yapılan çalışmasında I/R oluşturulmuş deneklerde IL-1 düzeylerinin yükseldiğini tespit etmişler ve I/R hasarında IL-1'in rolü olduğunu savunmuşlardır.

Bağırsak mukozasının lamina propriasında büyük miktarlarda yerleşik makrofajlar bulunur. Bunların dışında enterositler ve Paneth hücreleri gibi diğer bazı hücreler de proinflamatuar sitokinler üretme yeteneğine sahiptir (158, 159). Böylece ince bağırsak, bu sitokinlerin önemli bir kaynağı olarak kabul edilmiştir (160). Li ve ark. (161) yaptığı karaciğer I/R hasarı çalışmasında astaksantinin serum ve dokuda TNFα, IL-1 ve IL-6 gibi inflamatuar sitokinlerin üretimini inhibe ettiğine dair güçlü kanıtlar sağlamıştır. Çalışmamızda I/R yapılan grupta TNFα, IL-1 ve IL-6'nın kontrol grubuna göre anlamlı düzeyde yükseldiği gösterilmiştir ($p<0,001$). Ayrıca yüksek doz astaksantin verilen grup ile I/R grup istatistiksel olarak karşılaştırıldığında bu sitokinlerin seviyesinin anlamlı ölçüde azaldığı, hatta kontrol grubu seviyelerine kadar yaklaştığı gözlenmiştir ($p<0,001$). Sonuç olarak bizim çalışmamızda astaksantinin anti-inflamatuar özelliği ile TNFα, IL-1 ve IL-6'nın aktivitesini azalttığı tespit edilmiştir.

I/R hasarı sonucu oluşan apoptoz, DNA hasarına genlerin yanıtıyla, hücre membranı tarafından letal sinyallerinin alınmasıyla ve hücreye proteolitik enzim girişi ile gerçekleşmektedir. Bu yolaklardan birinin aktive olması ile hücre apoptoza gitmektedir. P53 geni DNA hasarı oluştuğunda aktive olan bir tümör süpresör genidir. P53 aktivasyonu ile DNA'sı hasarlanan hücreyi G1 fazında bloke eder ve DNA onarılması için hücreye süre tanımaktadır. Onarılamayan DNA'ya sahip hücrelerde apoptoz başlar ve bununda P53 geninin Bax proteinini aktive etmesi ile başlatıldığı gösterilmiştir (162). Çalışmamızda P53'ün I/R sırasında oldukça

yükseldiği ve I/R grubuna göre hem kontrol hem de yüksek doz astaksantin verilen deney gruplarında anlamlı düzeyde farklılıklar saptanmıştır ($p<0,001$).

İç organlar arasında bağırsaklar İ/R hasarına en duyarlı organdır. Mezenterik dolaşım kalp debisinin dinlenme sırasında yaklaşık %25'ini, yemek sonrasında ise yaklaşık %35'ini almaktadır. Bu yüzden intestinal mukozal doku zengin bir damarsal ağa sahiptir ve iskemiye en duyarlı alandır (163). Kan akımının kesilmesiyle beraber oksijen miktarının azalması, ATP'nin tükenmesine neden olur ve hücresel fonksiyonlar azalarak sonuçta hücre ölümü gözlenir. Kan akımının tekrar sağlanmasıyla reperfüzyon hasarı meydana gelir (163, 164). Reperfüzyon sırasında ortama gelen aktive olmuş lökositler ve trombositlerin venüllerde birikerek tıkanıklığa yol açması mukozal hasarın artmasına neden olmaktadır (164, 165). İntestinal I/R hasarının histopatolojik sınıflandırmasında değişik skorlar kullanılmaktadır. Chiu skoru (166), Park's skoru (167), Hierholzer ve ark. (168) tarafından kullanılan skorlama sistemleri bu skorlara örnek olarak verilebilir. Chiu ve ark tarafından tanımlanan histopatolojik sınıflama basit, kullanılabilir olması, ince bağırsak doku hasarını iyi göstermesi ve literatürde deneysel intestinal I/R hasar modellerinde en çok kullanılan skor olması nedeniyle çalışmamızda da Chiu skoru kullanılmıştır.

Hematoksilen Eozin ile boyanan dokular Chiu skoruna göre gruplar histopatolojik olarak gruplar değerlendirildiğinde I/R grubuna göre tüm gruplar arasında anlamlı farklılıklar saptanmıştır ($p<0,001$). Kontrol grubunda sağlıklı mukozal villusların varlığı gözlenmiştir. I/R grubunda lamina propriyada ülserasyon ve villus içeresinde hemarojik alanların olduğu görülmüştür. 0,3 mg astaksantin verilen grupta subepitelyal konjesyon ve villusların apeksinde ülserayon gözlenmiştir. 3 mg astaksantin verilen grupta ise bazı villusların tabanında konjesyon ve goblet hücre sayısında normale kıyasla azalma olduğu görülmüştür. Sonuç olarak artan dozlarda verilen astaksantinin aynı oranda bağırsak dokusunda I/R hasarını azalttığı bulunmuştur. Yine PAS boyama yöntemi ile değerlendirildiğinde I/R grubunda goblet hücre sayısının en az olduğu ve astaksantinin artan dozları uygulanması sonrasında goblet hücre sayısının da arttığı tespit edilmiştir.

TUNEL yöntemi, apoptoz sırasında gerçekleşen DNA kırıklarını in vitro olarak tespit edilebilmesini sağlamaktadır (169-171). Çalışmamızda TUNEL yöntemi

ile saptanan DNA kırıkları I/R grubunda kontrol grubuna göre oldukça yüksek olarak bulunmuştur ($p<0,001$). Hem düşük doz hem de yüksek doz astaksantin verilen gruplar I/R grubuna göre kıyaslandığında anlamlı derecede DNA kırıklarını azalttığı saptanmıştır ($p<0,001$, $p<0,001$). Ayrıca yüksek doz astaksantin verilen grup ile kontrol grubu kıyaslandığında istatistiksel anlamlı düşük farklılıklar olduğu görülmüştür ($p<0,05$). Sonuç olarak yüksek doz astaksantin I/R hasarı sırasında oluşan apoptozisi azaltarak DNA kırıklarının oluşması engellemektedir.

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 (92). 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 (19). Shen H. ve ark. (150) 2009 yılında yaptığı çalışmada iskemik beyin hasarı modeli oluşturulan sıçanlara verilen astaksantinin in vivo olarak serbest radikal hasarına ve I/R kaynaklı nörojenerasyona karşı koruyucu etkileri olduğunu bulmuşlardır. Nishigaki ve ark. (172) 1994 yılında yaptığı çalışmada A vitamininin doğal olarak oluşan türevlerinden biri olan astaksantinin sıçan karaciğer mikrozomal sisteminde lipid peroksidasyonunu baskıladığını bulmuşlardır. Li ve ark. (173) 2017 yılında yaptığı çalışmada astaksantinin serbest oksijen radikallerini azalttığı ve inflamatuar sitokin ekspresyonu dahil olmak üzere steatotik karaciğer iskemi reperfüzyon hasarında yaralanma seviyesini azalttığını, ayrıca Kaspaz-3 ekspresyonunu da azalttığını göstermişlerdir. Çakır ve ark. (174) 2020 yılında yaptığı çalışmada serebral I/R hasarı yaratılan sıçanlarda astaksantinin beyni oksidatif hasardan koruduğunu ve I/R hasarına bağlı nöronal defisitleri azalttığını göstermişlerdir. Qui ve ark. (175) 2015 yılında yaptığı çalışmada böbrek I/R hasarı oluşturulan sıçanlarda, astaksantinin etkilerini araştırmışlardır. Astaksantinin I/R hasarı sırasında artan MDA, SOD gibi enzimleri azaltarak oksidatif strese karşı etkili olduğunu kanıtlamışlardır. Zuluaga Tamayo ve ark. (176) 2019 yılında yaptığı çalışmada femoral arter klemplenmesi sonrası kas hasarını önlemek amacıyla verilen astaksantinin etkisini incelemiş ve hasarlı kasların antioksidan savunmasını

iyileştirmede etkili olabileceğini ortaya koymuşlardır. Li ve ark. (161) 2015 yılında fareler üzerinde yaptığı çalışmada hepatik I/R hasarı modeli oluşturmuş ve hepatik I/R hasarının neden olduğu apoptoz ve otofajinin, kullanılan astaksantin tarafından serbest oksijen radikallerini ve inflamatuar sitokinlerin salınımını inhibe ederek azalttığını vurgulamışlardır. Curek ve ark. (177) 2010 yılında astaksantinin karaciğerde oluşturulan I/R hasarı üzerindeki etkilerini incelemek amacıyla yaptıkları çalışmada, I/R uygulamasından önce 14 gün boyunca astaksantin verildiğinde I/R'nin karaciğerde oluşturduğu oksidatif hasarı önlediğini göstermişlerdir. Ayrıca astaksantin tedavisinin, ksantin dehidrojenazın ksantin oksidaza dönüşümünü önemli ölçüde azalttığını ve bu da oksidatif stres seviyesini azalttığını bulmuşlardır.

Bizim çalışmamızda da literatürle uyumlu olarak, astaksantinin I/R hasarını önlemede; serbest oksijen radikallerini azalttığı, lipid peroksidasyonunu baskıladığı, apoptozisin önüne geçerek hücre ölümünü yavaşlattığı, pro-inflamatuar sitokinleri inhibe ederek anti-inflamauar etki gösterdiği saptanmıştır. Ayrıca histolojik olarak incelediğimizde goblet hücre sayısını arttırdığı ve iskemi sonrasında mukozada görülen ülserasyonları azalttığı kanıtlanmıştır. Her iki dozda da etkisi olduğunu gösterilmiş olsada, astaksantinin 10 mg/kg dozunda verildiğinde etkisinin daha güçlü ve anlamlı olduğu görülmüştür.

6. SONUÇ VE ÖNERİLER

Mezenter iskemi, cerrahi kliniklerinde sıkça rastlanan, tanı konulması oldukça zor ve tedavi edilemezse oldukça mortal seyreden bir hastalıktır. Yapılan çalışmalar hastalığın bu denli şiddetli oluşunu iskeminin ağırlığından daha çok reperfüzyon sonrası gelişen bir takım biyokimyasal olaylar zinciri nedeniyle olduğunu vurgulamaktadır. Bu nedenle birçok araştırmacı I/R hasarının önlenmesinde antioksidan ve anti-inflamatuar ajanların etkinliğini kanıtlayan çalışmalar yapmaktadır. Bizde çalışmamızda güçlü antioksidan özelliği tanımlanmış ve aynı zamanda anti-inflamatuar olduğu bilinen astaksantinin I/R hasarına etkisini araştırdık. 60 dakikalık iskemi sonrası 120 dakikalık reperfüzyona geçmeden önce 1mg/kg ve 10 mg/kg dozlarında verilen astaksantin etkileri göstermek amacıyla deney modeli oluşturuldu. Çalışma sonunda astaksantinin CAT, MDA ve SOD enzim aktivitelerini her iki dozda da önemli ölçüde azalttığı, fakat yüksek doz astaksantinin anlamlı düzeyde düşürdüğü tespit edildi. Ayrıca TNFα, IL-1, IL-6 gibi sitokinleri yüksek dozda daha anlamlı olmasının yanında her iki dozda da inhibe ettiği bulundu. Kaspaz-3 aktivitesini azalttığı, apoptozisi inhibe etmesi nedeniyle P53 ve DNA fragmantasyonunu azalttığı görüldü.

Sonuç olarak, güçlü antioksidan ve anti-inflamatuar özellikteki astaksantin, özellikle 10mg/kg dozunda kullanıldığında I/R hasarını anlamlı ölçüde azaltmaktadır. Astaksantinin iskemi reperfüzyon çalışmalarının devam etmesi halinde rutin klinikte kullanılması muhtemel bir ajan haline gelecektir.

KAYNAKLAR

1. Zimmerman BJ, Granger DN. Reperfusion injury. The surgical clinics of North America. 1992;72(1):65-83.
2. Guerin M, Huntley ME, Olaizola M. Haematococcus astaxanthin: applications for human health and nutrition. Trends in Biotechnology. 2003;21(5):210-6.
3. 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.
4. Collard CD, Gelman S. Pathophysiology, clinical manifestations, and prevention of ischemia-reperfusion injury. Anesthesiology: The Journal of the American Society of Anesthesiologists. 2001;94(6):1133-8.
5. Demiryilmaz I, Turan MI, Kisaoglu A, Gulapoglu M, Yilmaz I, Suleyman H. Protective effect of nimesulide against hepatic ischemia/reperfusion injury in rats: effects on oxidant/antioxidants, DNA mutation and COX-1/COX-2 levels. Pharmacological Reports. 2014;66(4):647-52.
6. Gonzalez LM, Moeser AJ, Blikslager AT. Animal models of ischemia-reperfusion-induced intestinal injury: progress and promise for translational research. American Journal of Physiology-Gastrointestinal and Liver Physiology. 2015;308(2):G63-G75.
7. Jassem W, Fuggle SV, Rela M, Koo DDH, Heaton ND. The role of mitochondria in ischemia/reperfusion injury. Transplantation. 2002;73(4):493-9.
8. Carden DL, Granger DN. Pathophysiology of ischaemia–reperfusion injury. The Journal of pathology. 2000;190(3):255-66.
9. Ogle CK, Mao J-X, Wu J-Z, Ogle JD, Alexander JW. The 1994 Lindberg Award: the production of tumor necrosis factor, interleukin-1, interleukin-6, and prostaglandin E2 by isolated enterocytes and gut macrophages: effect of lipopolysaccharide and thermal injury. The Journal of burn care & rehabilitation. 1994;15(6):470-7.

10. Bagi Z, Cseko C, Tóth E, Koller A. Oxidative stress-induced dysregulation of arteriolar wall shear stress and blood pressure in hyperhomocysteinemia is prevented by chronic vitamin C treatment. American Journal of Physiology-Heart and Circulatory Physiology. 2003;285(6):H2277-H83.

11. Riaz AA, Wan MX, Schäfer T, Dawson P, Menger MD, Jeppsson B, et al. Allopurinol and superoxide dismutase protect against leucocyte–endothelium interactions in a novel model of colonic ischaemia–reperfusion. British journal of surgery. 2002;89(12):1572-80.

12. Ambati RR, Phang S-M, Ravi S, Aswathanarayana RG. Astaxanthin: sources, extraction, stability, biological activities and its commercial applications-a review. Marine drugs. 2014;12(1):128-52.

13. Feil IK, Lerch HP, Schomburg D. Deletion variants of l‐hydroxyisocaproate dehydrogenase: Probing substrate specificity. European journal of biochemistry. 1994;223(3):857-63.

14. Nagao A. Absorption and metabolism of dietary carotenoids. Biofactors. 2011;37(2):83-7.

15. Lee D-H, Lee YJ, Kwon KH. Neuroprotective effects of astaxanthin in oxygen-glucose deprivation in SH-SY5Y cells and global cerebral ischemia in rat. Journal of clinical biochemistry and nutrition. 2010;47(2):121-9.

16. Nakajima Y, Inokuchi Y, Shimazawa M, Otsubo K, Ishibashi T, Hara H. Astaxanthin, a dietary carotenoid, protects retinal cells against oxidative stress in‐vitro and in mice in‐vivo. Journal of Pharmacy and Pharmacology. 2008;60(10):1365-74.

17. Yang Y, Kim B, Lee JY. Astaxanthin structure, metabolism, and health benefits. J Hum Nutr Food Sci. 2013;1(1003):1-1003.

18. Kuroki T, Ikeda S, Okada T, Maoka T, Kitamura A, Sugimoto M, et al. Astaxanthin ameliorates heat stress-induced impairment of blastocyst development In Vitro: astaxanthin colocalization with and action on mitochondria. Journal of assisted reproduction and genetics. 2013;30(5):623-31.

19. Çolak E. Testiste oluşturulan iskemi/reperfüzyon hasarı üzerine astaksantin'in koruyucu etkisi. 2014.

20. Junqueira LC. Arneiro j, Kelley RO. Basic Histology. Prentice Hall International inc London; 1995.

21. Keljo DJ, Gariepy CE. Anatomy, histology, embryology, and developmental anomalies of the small and large intestine. Sleisenger and Fordtran's Gastrointestinal and Liver Disease, 7th ed Saunders, Philadelphia. 2002:1643-63.

22. Moore KL, Persaud TVN. The Digestive System. The Developing Human Clinically Oriented Embryology. WB Saunders Company Philadelphia; 1998.

23. Townsend Courtney M. BRD, Evers B.M., Mattox K.L. Sabiston Textbook of Surgery, The Biological Basis of Modern Surgical Practice. 17. ed: Saunders; 2008.

24. Cheng H, Leblond CP. Origin, differentiation and renewal of the four main epithelial cell types in the mouse small intestine V. Unitarian theory of the origin of the four epithelial cell types. American Journal of Anatomy. 1974;141(4):537-61.

25. Simon TC, Gordon JI. Intestinal epithelial cell differentiation: new insights from mice, flies and nematodes. Current opinion in genetics & development. 1995;5(5):577-86.

26. Sobotta J FF, Hild WJ, Becher H. Atlas of human anatomy. New York1974.

27. Sleisenger MH. Sleisenger & Fordtran's gastrointestinal and liver disease: pathophysiology, diagnosis, management: Saunders; 2006.

28. Kelley RO. Basic Histology: McGraw-Hill/Appleton & Lange; 1995.

29. Hayanga AJ, Bass-Wilkins K, Bulkley GB. Current management of small-bowel obstruction. Advances in surgery. 2005;39:1-33.

30. Thompson JC. Atlas of Surgery of the Stomach, Duodenum, and Small Bowel: Mosby Incorporated; 1992.

31. Richard L. Drake AWV, Adam W. M. Mitchell. Gray's Anatomy for Students. Second Edition ed. Canada: Elsevier; 2010.

32. Veeramani R, Holla SJ. Gray's Anatomy For Students: Second South Asia Edition E-Book: Elsevier Health Sciences; 2019.

33. Kachlik D, Baca V. Macroscopic and microscopic intermesenteric communications. Biomedical Papers-Palacky University in Olomouc. 2006;150(1):121.

34. F. Charles Brunicardi DKA, Timothy R. Billiar, David L. Dunn, John G. Hunter, Jeffrey B. Matthews, Raphael E Pollock. Schwartz Cerrahinin İlkeleri. 10. Baskı ed: Güneş Tıp Kitapevleri; 2016.

35. Kumar S, Sarr MG, Kamath PS. Mesenteric venous thrombosis. New England Journal of Medicine. 2001;345(23):1683-8.

36. Shafik AN. Febuxostat improves the local and remote organ changes induced by intestinal ischemia/reperfusion in rats. Digestive diseases and sciences. 2013;58(3):650-9.

37. Matalon S, Benos DJ, Jackson RM. Biophysical and molecular properties of amiloride-inhibitable Na+ channels in alveolar epithelial cells. American Journal of Physiology-Lung Cellular and Molecular Physiology. 1996;271(1):L1-L22.

38. Younes M, Schoenberg MH, Jung H, Fredholm BB, Haglund U, Schildberg FW. Oxidative tissue damage following regional intestinal ischemia and reperfusion in the cat. Research in experimental medicine. 1984;184(4):259-64.

39. Harrison R. Structure and function of xanthine oxidoreductase: where are we now? Free Radical Biology and Medicine. 2002;33(6):774-97.

40. Davis MG. Endothelial physiology. Ischemia-reperfusion injury. 1999.

41. McCord JM. Oxygen-derived free radicals in postischemic tissue injury. New England Journal of Medicine. 1985;312(3):159-63.

42. Parks DA, Granger DN. Contributions of ischemia and reperfusion to mucosal lesion formation. American Journal of Physiology-Gastrointestinal and Liver Physiology. 1986;250(6):G749-G53.

43. Grace PA. Ischaemia‐reperfusion injury. British Journal of Surgery. 1994;81(5):637-47.

44. Bayram S. İntestinal İskemi ve Reperfüzyon. ODÜ Tıp Dergisi.2(3):166-71.

45. Yoshida WB. Radicais livres na síndrome da isquemia e reperfusäo. Cir vasc angiol. 1996:82-95.

46. 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.

47. Montalto MC, Hart ML, Jordan JE, Wada K, Stahl GL. Role for complement in mediating intestinal nitric oxide synthase-2 and superoxide dismutase expression. American Journal of Physiology-Gastrointestinal and Liver Physiology. 2003;285(1):G197-G206.

48. Ferreira ALA, Matsubara LS. Radicais livres: conceitos, doenças relacionadas, sistema de defesa e estresse oxidativo. Revista da associação médica brasileira. 1997;43(1):61-8.

49. Zuluaga M, Gueguen V, Letourneur D, Pavon-Djavid G. Astaxanthin-antioxidant impact on excessive Reactive Oxygen Species generation induced by ischemia and reperfusion injury. Chemico-biological interactions. 2018;279:145-58.

50. Hayward R, Lefer AM. Time course of endothelial-neutrophil interaction in splanchnic artery ischemia-reperfusion. American Journal of Physiology-Heart and Circulatory Physiology. 1998;275(6):H2080-H6.

51. Romson JL, Hook BG, Kunkel SL, Abrams GD, Schork MA, Lucchesi BR. Reduction of the extent of ischemic myocardial injury by neutrophil depletion in the dog. Circulation. 1983;67(5):1016-23.

52. Massberg S, Gonzalez AP, Leiderer R, Menger MD, Messmer K. In vivo assessment of the influence of cold preservation time on microvascular reperfusion injury after experimental small bowel transplantation. British journal of surgery. 1998;85(1):127-33.

53. Sisley AC, Desai T, Harig JM, Gewertz BL. Neutrophil depletion attenuates human intestinal reperfusion injury. Journal of Surgical Research. 1994;57(1):192-6.

54. Granger DN, Korthuis RJ. Physiologic mechanisms of postischemic tissue injury. Annual review of physiology. 1995;57(1):311-32.

55. Dallegri F, Goretti R, Ballestrero A, Ottonello L, Patrone F. Neutrophil-induced depletion of adenosine triphosphate in target cells; Evidence for a hypochlorous acid-mediated process. The Journal of laboratory and clinical medicine. 1988;112(6):765-72.

56. Grisham MB, Granger DN, Lefer DJ. Modulation of leukocyte–endothelial interactions by reactive metabolites of oxygen and nitrogen: relevance to ischemic heart disease. Free radical biology and medicine. 1998;25(4-5):404-33.

57. Panés J, Perry M, Granger DN. Leukocyte-endothelial cell adhesion: avenues for therapeutic intervention. British journal of pharmacology. 1999;126(3):537.

58. Riaz AA, Wan MX, Schaefer T, Schramm R, Ekberg H, Menger MD, et al. Fundamental and distinct roles of P-selectin and LFA-1 in ischemia/reperfusion-induced leukocyte-endothelium interactions in the mouse colon. Annals of surgery. 2002;236(6):777.

59. Bagge U, Amundson B, Lauritzen C. White blood cell deformability and plugging of skeletal muscle capillaries in hemorrhagic shock. Acta Physiologica Scandinavica. 1980;108(2):159-63.

60. Silveira Md, Yoshida WB. Isquemia e reperfusão em músculo esquelético: mecanismos de lesão e perspectivas de tratamento. J vasc bras. 2004;3(4):367-78.

61. Moura HVd, Pomerantzeff P, Gomes WJ. Síndrome da resposta inflamatória sistêmica na circulação extracorpórea: papel das interleucinas. Brazilian Journal of Cardiovascular Surgery. 2001;16(4):376-87.

62. Kirschner RE, Fantini GA. Role of iron and oxygen-derived free radicals in ischemia-reperfusion injury. Journal of the American College of Surgeons. 1994;179(1):103-17.

63. Catalá A. An overview of lipid peroxidation with emphasis in outer segments of photoreceptors and the chemiluminescence assay. The international journal of biochemistry & cell biology. 2006;38(9):1482-95.

64. Sener G, Sakarcan A, Yeğen BÇ. Role of garlic in the prevention of ischemia‐reperfusion injury. Molecular nutrition & food research. 2007;51(11):1345-52.

65. Delabar JM, Nicole A, Jacob Y, Sinet PM, JÉRÔMe H, D'Auriol L, et al. Cloning and sequencing of a rat CuZn superoxide dismutase cDNA: Correlation between CuZn superoxide dismutase mRNA level and enzyme activity in rat and mouse tissues. European journal of biochemistry. 1987;166(1):181-7.

66. Cochrane CG. Cellular injury by oxidants. Molecular Aspects of Inflammation: Springer; 1991. p. 177-88.

67. Wennmalm Å, Benthin G, Petersson AS. Dependence of the metabolism of nitric oxide (NO) in healthy human whole blood on the oxygenation of its red cell haemoglobin. British journal of pharmacology. 1992;106(3):507-8.

68. Serracino-Inglott F, Habib NA, Mathie RT. Hepatic ischemia-reperfusion injury. The American Journal of Surgery. 2001;181(2):160-6.

69. Dworakowski R, Walker S, Momin A, Desai J, El-Gamel A, Wendler O, et al. Reduced nicotinamide adenine dinucleotide phosphate oxidase-derived superoxide and vascular endothelial dysfunction in human heart failure. Journal of the American College of Cardiology. 2008;51(14):1349-56.

70. Hansson R, Jonsson O, Lundstam S, Pettersson S, Schersten T, Waldenström J. Effects of free radical scavengers on renal circulation after ischaemia in the rabbit. Clinical Science. 1983;65(6):605-10.

71. Pan J, Konstas A-A, Bateman B, Ortolano GA, Pile-Spellman J. Reperfusion injury following cerebral ischemia: pathophysiology, MR imaging, and potential therapies. Neuroradiology. 2007;49(2):93-102.

72. Schmid-Schönbein GW, Engler RL. Granulocytes as active participants in acute myocardial ischemia and infarction. The American journal of cardiovascular pathology. 1987;1(1):15-30.

73. Kalogeris T, Baines CP, Krenz M, Korthuis RJ. Cell biology of ischemia/reperfusion injury. International review of cell and molecular biology. 298: Elsevier; 2012. p. 229-317.

74. Homer-Vanniasinkam S, Crinnion JN, Gough MJ. Post-ischaemic organ dysfunction: a review. European journal of vascular and endovascular surgery. 1997;14(3):195-203.

75. Kücükakin B, Gögenur I, Rosenberg J. Melatonin against surgical stress. Ugeskrift for laeger. 2007;169(14):1306-8.

76. Emery P, Luqmani R. The validity of surrogate markers in rheumatic disease. Rheumatology. 1993;32:3-8.

77. Pellegrini N, Miglio C, Del Rio D, Salvatore S, Serafini M, Brighenti F. Effect of domestic cooking methods on the total antioxidant capacity of vegetables. International Journal of Food Sciences and Nutrition. 2009;60:12-22.

78. Yılmaz İ. Antioksidan içeren bazı gıdalar ve oksidatif stres. Journal of Inonu University Medical Faculty. 2010;17(2):143-53.

79. Karihtala P, Soini Y. Reactive oxygen species and antioxidant mechanisms in human tissues and their relation to malignancies. Apmis. 2007;115(2):81-103.

80. Reiter RJ. Oxidative processes and antioxidative defense mechanisms in the aging brain 1. The FASEB journal. 1995;9(7):526-33.

81. Cherubini A, Ruggiero C, Morand C, Lattanzio F, Dell'Aquila G, Zuliani G, et al. Dietary antioxidants as potential pharmacological agents for ischemic stroke. Current Medicinal Chemistry. 2008;15(12):1236-48.

82. Mickle DA, Weisel RD. Future directions of vitamin E and its analogues in minimizing myocardial ischemia-reperfusion injury. The Canadian journal of cardiology. 1993;9(1):89-93.

83. Virág L, Szabó C. The therapeutic potential of poly (ADP-ribose) polymerase inhibitors. Pharmacological reviews. 2002;54(3):375-429.

84. Fiedor J, Burda K. Potential role of carotenoids as antioxidants in human health and disease. Nutrients. 2014;6(2):466-88.

85. Pashkow FJ. Oxidative stress and inflammation in heart disease: do antioxidants have a role in treatment and/or prevention? International journal of inflammation. 2011;2011.

86. Riccioni G, D'Orazio N, Franceschelli S, Speranza L. Marine carotenoids and cardiovascular risk markers. Marine Drugs. 2011;9(7):1166-75.

87. Tapiero H. Townsend DM, Tew KD. Trace elements in human physiology and pathology Copper Biomed Pharmacother. 2003;57:386-98.

88. Zuluaga M, Gueguen V, Pavon-Djavid G, Letourneur D. Carotenoids from microalgae to block oxidative stress. BioImpacts: BI. 2017;7(1):1.

89. Erel O. A novel automated method to measure total antioxidant response against potent free radical reactions. Clinical biochemistry. 2004;37(2):112-9.

90. 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.

91. 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.

92. Gök V, Kayacıer A, Telli R. Hayvansal ve mikrobiyal kaynaklı doğal antioksidanlar. Gıda Teknolojileri Elektronik Dergisi. 2006;2:35-40.

93. Weeratunge W, Perera BGK. Formulation of a fish feed for goldfish with natural astaxanthin extracted from shrimp waste. Chemistry Central Journal. 2016;10(1):44.

94. Weeratunge W, Perera BGK. Formulation of a fish feed for goldfish with natural astaxanthin extracted from shrimp waste. Chemistry Central Journal. 2016;10(1):1-7.

95. 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.

96. 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.

97. 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.

98. Miki W. Biological functions and activities of animal carotenoids. Pure and Applied Chemistry. 1991;63(1):141-6.

99. Naguib YMA. Antioxidant activities of astaxanthin and related carotenoids. Journal of agricultural and food chemistry. 2000;48(4):1150-4.

100. Johnson EA, Schroeder WA. Biotechnology of astaxanthin production in Phaffia rhodozyma. ACS Publications; 1996.

101. Lorenz RT. A technical review of Haematococcus algae. NatuRoseTM Technical Bulletin. 1999;60:1-12.

102. Boussiba S. Carotenogenesis in the green alga Haematococcus pluvialis: cellular physiology and stress response. Physiologia Plantarum. 2000;108(2):111-7.

103. Boussiba S, Bing W, Yuan J-P, Zarka A, Chen F. Changes in pigments profile in the green alga Haeamtococcus pluvialis exposed to environmental stresses. Biotechnology Letters. 1999;21(7):601-4.

104. Margalith PZ. Production of ketocarotenoids by microalgae. Applied microbiology and biotechnology. 1999;51(4):431-8.

105. 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.

106. 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.

107. 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.

108. Tominaga K, Hongo N, Karato M, Yamashita E. Cosmetic benefits of astaxanthin on humans subjects. Acta Biochimica Polonica. 2012;59(1).

109. Şahin TC. Testiste oluşturulan iskemi reperfüzyon modelinde montelukast'ın koruyucu etkisi. 2016.

110. Goto S, Kogure K, Abe K, Kimata Y, Kitahama K, Yamashita E, et al. Efficient radical trapping at the surface and inside the phospholipid membrane is responsible for highly potent antiperoxidative activity of the carotenoid astaxanthin. Biochimica et biophysica acta (BBA)-biomembranes. 2001;1512(2):251-8.

111. Hussein G, Sankawa U, Goto H, Matsumoto K, Watanabe H. Astaxanthin, a carotenoid with potential in human health and nutrition. Journal of natural products. 2006;69(3):443-9.

112. 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.

113. 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.

114. 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.

115. O. A. Haematococcus pluvialis mikroalginden astaksantin ekstraksiyonu. Ege Üniversitesi. 2005.

116. Fábregas J, Dominguez 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.

117. 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.

118. 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.

119. Tripathi DN, Jena GB. Intervention of astaxanthin against cyclophosphamide-induced oxidative stress and DNA damage: a study in mice. Chemico-biological interactions. 2009;180(3):398-406.

120. Kistler A, Liechti H, Pichard L, Wolz E, Oesterhelt 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.

121. Boussiba S, Vonshak A, Cohen Z, Richmond A. Procedure for large-scale production of astaxanthin from Haematococcus. Google Patents; 2000.

122. Torzillo G, Vonshak A. Biotechnology of algal mass cultivation. Recent advances in marine biotechnology. 2003;9:45-77.

123. Zheng D, Li Y, He L, Tang Y, Li X, Shen Q, et al. The protective effect of astaxanthin on fetal alcohol spectrum disorder in mice. Neuropharmacology. 2014;84:13-8.

124. Chang J-X, Chen S, Ma L-P, Jiang L-Y, Chen J-W, Chang R-M, et al. Functional and morphological changes of the gut barrier during the restitution process after hemorrhagic shock. World journal of gastroenterology: WJG. 2005;11(35):5485.

125. Petrat F, Swoboda S, Groot Hd, Schmitz KJ. Quantification of ischemia-reperfusion injury to the small intestine using a macroscopic score. Journal of investigative surgery. 2010;23(4):208-17.

126. Tanyeli A, Ekinci Akdemir FN, Eraslan E, Özbek Sebin S, Gulcin İ. İntestinal İskemi/Reperfüzyon Hasarının Hafifletilmesinde p-Kumarik asit'in Rolü. Kocaeli Tıp Dergisi. 2020;9(1):166-73.

127. Grootjans J, Lenaerts K, Buurman WA, Dejong CHC, Derikx JPM. Life and death at the mucosal-luminal interface: new perspectives on human intestinal ischemia-reperfusion. World journal of gastroenterology. 2016;22(9):2760.

128. Mallick IH, Yang W, Winslet MC, Seifalian AM. Ischemia-reperfusion injury of the intestine and protective strategies against injury. Digestive diseases and sciences. 2004;49(9):1359-77.

129. Mester A, Magyar Z, Sogor V, Tanczos B, Stark Y, Cherniavsky K, et al. Intestinal ischemia-reperfusion leads to early systemic micro-rheological and multiorgan microcirculatory alterations in the rat. Clinical hemorheology and microcirculation. 2018;68(1):35-44.

130. Ross S, Foex P. Protective effects of anaesthetics in reversible and irreversible ischaemia-reperfusion injury. British journal of anaesthesia. 1999;82(4):622-32.

131. Guneli E, Cavdar Z, Islekel H, Sarioglu S, Erbayraktar S, Kiray M, et al. Erythropoietin protects the intestine against ischemia/reperfusion injury in rats. Molecular medicine. 2007;13(9):509-17.

132. Bursal E, Gülçin İ. Polyphenol contents and in vitro antioxidant activities of lyophilised aqueous extract of kiwifruit (Actinidia deliciosa). Food research international. 2011;44(5):1482-9.

133. Gülçin I. Antioxidant activity of food constituents: an overview. Archives of toxicology. 2012;86(3):345-91.

134. Grogaard B, Parks DA, Granger DN, McCord JM, Forsberg JO. Effects of ischemia and oxygen radicals on mucosal albumin clearance in intestine. American Journal of Physiology-Gastrointestinal and Liver Physiology. 1982;242(5):G448-G54.

135. Gülçin İ. Antioxidant properties of resveratrol: A structure–activity insight. Innovative food science & emerging technologies. 2010;11(1):210-8.

136. Moslen MT. Reactive oxygen species in normal physiology, cell injury and phagocytosis. Free radicals in diagnostic medicine. 1994:17-27.

137. Gülçin İ. Antioxidant and antiradical activities of L-carnitine. Life sciences. 2006;78(8):803-11.

138. Gülçin İ. Antioxidant activity of caffeic acid (3, 4-dihydroxycinnamic acid). Toxicology. 2006;217(2-3):213-20.

139. Barut I, Tarhan OR, Kapucuoglu N, Sutcu R, Akdeniz Y. Lamotrigine reduces intestinal I/R injury in the rat. Shock. 2007;28(2):202-6.

140. Yildiz Y, Kose H, Cecen S, Ergin K, Demir EM, Serter M. Protective Effects of Leflunomide on Intestinal Ischemia-Reperfusion Injury. Digestive diseases and sciences. 2010;55(2):245-52.

141. Aygün H. Deneysel intestinal iskemi reperfüzyon modelinde reperfüzyon sonrası uygulanan levosimendanın etkileri. 2011.

142. Liu L, Zhuang R, Xiao L, Chung HK, Luo J, Turner DJ, et al. HuR enhances early restitution of the intestinal epithelium by increasing Cdc42 translation. Molecular and cellular biology. 2017;37(7):e00574-16.

143. Özkaya MO. Ratlarda intestinal iskemi reperfüzyon hasarına levosimendanın etkileri. 2010.

144. Zhang W, Zhu W, Zhang J, Li N, Li J. Protective effects of glucagon‐like peptide 2 on intestinal ischemia‐reperfusion rats. Microsurgery: Official Journal of the International Microsurgical Society and the European Federation of Societies for Microsurgery. 2008;28(4):285-90.

145. Liao X-p, She Y-x, Shi C-r, Li M. Changes in body fluid markers in intestinal ischemia. Journal of pediatric surgery. 1995;30(10):1412-5.

146. Zhonghui Z, Xiaowei Z, Fang F. Ganoderma lucidum polysaccharides supplementation attenuates exercise-induced oxidative stress in skeletal muscle of mice. Saudi journal of biological sciences. 2014;21(2):119-23.

147. Kandemir M, Yaşar NF, Özkurt M, Özyurt R, Bektur NE, Erkasap N. The Role Of Anakinra In The Modulation Of Intestinal Cell Apoptosis And Inflammatory Response During Ischemia/Reperfusion. Turkish Journal of Medical Sciences. 2021.

148. Özçelik N, Dursun V, Pekmezci S. Mezenter iskemi reperfüzyon hasarının önlenmesinde Allopurinol, Süperoksit Dismutaz ve Dimetil sülfoksitin etkisi. Kolon rektum dergisi. 1993;3:10-2.

149. Zheng X, Zheng X, Mao Y, Cai J, Li Y, Liu W, et al. Hydrogen-rich saline protects against intestinal ischemia/reperfusion injury in rats. Free radical research. 2009;43(5):478-84.

150. Shen H, Kuo C-C, Chou J, Delvolve A, Jackson SN, Post J, et al. Astaxanthin reduces ischemic brain injury in adult rats. The FASEB Journal. 2009;23(6):1958-68.

151. Dimakakos PB, Kotsis T, Kondi-Pafiti A, Katsenis K. Oxygen free radicals in abdominal aortic surgery: an experimental study. Journal of Cardiovascular Surgery. 2002;43(1):77.

152. Öztürk ÖÇ, Gürer B, Kertmen H, Bozkurt H, Kasim E, Kanat MA, et al. Neuroprotective Effects of Progesterone on Ischemia/Reperfusion Injury of the Rabbit Spinal Cord.

153. Sakurai M, Nagata T, Abe K, Horinouchi T, Itoyama Y, Tabayashi K. Survival and death-promoting events after transient spinal cord ischemia in rabbits: induction of Akt and caspase3 in motor neurons. The Journal of thoracic and cardiovascular surgery. 2003;125(2):370-7.

154. Yao Y-M, Sheng Z-Y, Yu Y, Tian H-M, Wang Y-P, Lu L-R, et al. The potential etiologic role of tumor necrosis factor in mediating multiple organ dysfunction in rats following intestinal ischemia-reperfusion injury. Resuscitation. 1995;29(2):157-68.

155. Nezu Y, Nezu Y, Shigihara K, Harada Y, Yogo T, Hara Y, et al. Effects of small intestinal ischemia and reperfusion on expression of tumor necrosis factor-α and interleukin-6 messenger RNAs in the jejunum, liver, and lungs of dogs. American journal of veterinary research. 2008;69(4):512-8.

156. Karaağaç H, Zeybek N, Peker Y, Yağcı G, Şengül A, Günhan Ö, et al. Diagnostic value of plasma cytokine levels in acute mesenteric ischemia: an experimental study. Gülhane Tip Dergisi. 2007;49(4):216.

157. Altinors N. Analysis of serum pro-inflammatory cytokine levels after rat spinal cord ischemia/reperfusion injury and correlation with tissue damage. Turkish neurosurgery. 2009;19(4):353-9.

158. Keshav S, Lawson L, Chung LP, Stein M, Perry VH, Gordon S. Tumor necrosis factor mRNA localized to Paneth cells of normal murine intestinal epithelium by in situ hybridization. The Journal of experimental medicine. 1990;171(1):327-32.

159. Ogle CK, Mao J-X, Hasselgren P-O, Ogle JD, Alexander JW. Production of Cytokines and Prostaglandin E sub 2 by Subpopulations of Guinea Pig Enterocytes: Effect of Endotoxin and Thermal Injury. Journal of Trauma and Acute Care Surgery. 1996;41(2):298-305.

160. Nezu Y, Tagawa M, Sakaue Y, Hara Y, Tsuchida S, Ogawa R. Kinetics of endotoxin concentration and tumor necrosis factor-α, interleukin-1β, and interleukin-6 activities in the systemic and portal circulation during small

intestinal ischemia and reperfusion in dogs. American journal of veterinary research. 2002;63(12):1680-6.

161. 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.

162. Kiess W, Gallaher B. Hormonal control of programmed cell death/apoptosis. European Journal of Endocrinology. 1998;138(5):482-91.

163. Tóth Š, Jonecová Z, Čurgali K, Maretta M, Šoltés J, Švaňa M, et al. Quercetin attenuates the ischemia reperfusion induced COX-2 and MPO expression in the small intestine mucosa. Biomedicine & Pharmacotherapy. 2017;95:346-54.

164. Vollmar B, Menger MD. Intestinal ischemia/reperfusion: microcirculatory pathology and functional consequences. Langenbeck's archives of surgery. 2011;396(1):13-29.

165. Kalogeris T, Baines CP, Krenz M, Korthuis RJ. Ischemia/reperfusion. Compr Physiol 7: 113–170. 2016.

166. Topaloğlu Ü, Güran M, Odabaşı M, Karadağ N. İnce barsaklarda mezenter arter iskemisine bağlı iskemi-reperfüzyon hasarı üzerine PGE2'nin etkisi. Ulusal travma ve acil cerrahi dergisi. 1997;3(4):258-64.

167. Stallion A, Kou TD, Latifi SQ, Miller KA, Dahms BB, Dudgeon DL, et al. Ischemia/reperfusion: a clinically relevant model of intestinal injury yielding systemic inflammation. Journal of pediatric surgery. 2005;40(3):470-7.

168. Hierholzer C, Kalff JC, Audolfsson G, Billiar TR, Tweardy DJ, Bauer AJ. Molecular and Functıonal Contractıle Sequelae of Rat Intestınal Ischemıa/Reperfusıon Injury. Transplantation. 1999;68(9):1244-54.

169. Gavrieli Y, Sherman Y, Ben-Sasson SA. Identification of programmed cell death in situ via specific labeling of nuclear DNA fragmentation. Journal of cell Biology. 1992;119(3):493-501.

170. Kressel M, Groscurth P. Distinction of apoptotic and necrotic cell death by in situ labelling of fragmented DNA. Cell and tissue research. 1994;278(3):549-56.

171. Yılmaz İ. Erişkin ratlarda deneysel varikosel oluşturulması sonrası testislerde germ hücrelerinde apoptozis düzeylerinin yükselmesi; ve yükselmiş olan apoptozisin varikoselektomi sonrası gerileme düzeyi ve süresinin tunel yöntemi ile değerlendirilmesi. Uzmanlık Tezi. 2005.

172. Nishigaki I, Dmitrovskii AA, Miki W, Yagi K. Suppressive effect of astaxanthin on lipid peroxidation induced in rats. Journal of clinical biochemistry and nutrition. 1994;16(3):161-6.

173. Li S, Takahara T, Fujino M, Fukuhara Y, Sugiyama T, Li X-K, et al. Astaxanthin prevents ischemia-reperfusion injury of the steatotic liver in mice. PLoS One. 2017;12(11):e0187810.

174. Cakir E, Cakir U, Tayman C, Turkmenoglu TT, Gonel A, Turan IO. Favorable Effects of Astaxanthin on Brain Damage due to Ischemia-Reperfusion Injury. Combinatorial chemistry & high throughput screening. 2020;23(3):214-24.

175. 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):1-9.

176. Zuluaga Tamayo M, Choudat L, Aid-Launais R, Thibaudeau O, Louedec L, Letourneur D, et al. Astaxanthin complexes to attenuate muscle damage after in vivo femoral ischemia-reperfusion. Marine drugs. 2019;17(6):354.

177. Curek GD, Cort A, Yucel G, Demir N, Ozturk S, Elpek GO, et al. Effect of astaxanthin on hepatocellular injury following ischemia/reperfusion. Toxicology. 2010;267(1-3):147-53.