



**T.C.
GAZİ ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

**YÜKSEK
LİSANS
TEZİ**

**TIBBİ SÜLÜK UYGULAMASININ ALT EKSTREMİTEDE
İSKEMİ-REPERFÜZYON HASARI ÜZERİNE ETKİSİ**

BAŞAK SAMUR

TIBBİ BİYOKİMYA ANA BİLİM DALI

ARALIK 2025



**TIBBİ SÜLÜK UYGULAMASININ ALT EKSTREMİTEDE İSKEMİ-
REPERFÜZYON HASARI ÜZERİNE ETKİSİ**

Başak SAMUR

**YÜKSEK LİSANS TEZİ
TIBBİ BİYOKİMYA ANA BİLİM DALI**

**GAZİ ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

ARALIK 2025

ETİK BEYAN

Gazi Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Tez Yazım Kurallarına uygun olarak hazırladığım bu tez çalışmada;

- Tez içinde sunduğum verileri, bilgileri ve dokümanları akademik ve etik kurallar çerçevesinde elde ettiğimi,
- Tüm bilgi, belge, değerlendirme ve sonuçları bilimsel etik ve ahlak kurallarına uygun olarak sunduğumu,
- Tez çalışmada yararlandığım eserlerin tümüne uygun atıfta bulunarak kaynak gösterdiğimi,
- Kullanılan verilerde herhangi bir değişiklik yapmadığımı,
- Bu tezde sunduğum çalışmanın özgün olduğunu,

bildirir, aksi bir durumda aleyhime doğabilecek tüm hak kayıplarını kabullendiğimi beyan ederim.

Başak SAMUR

22/12/2025

TIBBİ SÜLÜK UYGULAMASININ ALT EKSTREMİTEDE İSKEMİ/REPERFÜZYON HASARI ÜZERİNE ETKİSİ

(Yüksek Lisans Tezi)

Başak SAMUR

GAZİ ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

Aralık 2025

ÖZET

Çalışmada, alt ekstremitede deneysel iskemi oluşturulmuş ratlarda tıbbi sülük uygulamasının iskemi/reperfüzyon (I/R) hasarı üzerindeki tedavi edici ve önleyici etkileri araştırıldı. Bu sebeple I/R modelinden önce tıbbi sülük uygulaması ile I/R modelinden sonra tıbbi sülük uygulamasının üstünlüklerini karşılaştırmalı olarak değerlendirildi. 24 dişi Wistar Albino rat çalışmaya dâhil edildi. Tedavi+I/R (n:6), I/R+Tedavi (n:6), I/R (n:6) ve Sham (n:6) olmak üzere 4 grup oluşturuldu. Alt ekstremitte I/R modeli; femoral arter klemplenerek oluşturuldu. Tıbbi sülük tedavisi uygulanan gruplara (I/R öncesi ve sonrası) her bir ratın gastrocnemius kas bölgesine 1 adet Hirudo verbana cinsi sülük uygulandı. Çalışma sonunda tüm ratlardan alınan serum ve gastrocnemius kas doku örneklerinde; SOD, TNF- α , IL-6, NO, CGRP, GPx, IMA, HIF-1 α , CAT ve EDN-1 parametreleri ELISA ile analiz edildi. Ayrıca kas dokusunda ödem, dejenerasyon, nekroz ve inflamasyon histopatolojik olarak değerlendirildi. Serum TNF- α düzeyi; I/R grubunda (81,18 $\pm$ 75,91 ng/L) Tedavi+I/R (293,83 $\pm$ 82,55 ng/L), I/R+Tedavi (328,43 $\pm$ 70,07 ng/L) ve Sham grubuna (332,53 $\pm$ 41,79 ng/L) göre istatistiksel olarak anlamlı düzeyde düşük belirlendi (p=0,047). Diğer serum parametreleri açısından gruplar arasında anlamlı farklılık gözlemlenmedi. Doku IL-6 düzeyi; I/R grubunda (0,81 $\pm$ 0,46 ng/g doku) Sham grubuna (2,57 $\pm$ 0,29 ng/g doku) göre istatistiksel olarak anlamlı düzeyde düşük belirlendi, (p=0,038). Doku CAT düzeyi, Tedavi+I/R grubunda (1,00 $\pm$ 0,06 μ g/g doku) I/R+Tedavi grubuna (1,28 $\pm$ 0,06 μ g/g doku) göre anlamlı düşük belirlendi (p=0,011). Diğer doku parametreleri açısından gruplar arasında anlamlı farklılık gözlemlenmedi. Tedavi+I/R grubu ve I/R+Tedavi grubunda histolojik olarak değerlendirilen ödem, dejenerasyon, nekroz ve inflamasyon skoru I/R grubuna göre anlamlı düzeyde düşük belirlendi (p=0.001). Çalışmamızın sonuçlarına göre hem I/R sonrası hem de I/R öncesi yapılan tıbbi sülük tedavisinin iskemiye azaltmada etkin bir tedavi yöntemi olduğu düşünülmektedir. Bu çalışma alt ekstremitte I/R hasarının tedavisinde tıbbi sülük uygulamasının kullanılabileceğini ve gelecekte bu alanda yapılacak yeni çalışmalara ışık tutabileceğini bildirmektedir.

Bilim Kodu : 1090
Anahtar Kelimeler : Tıbbi sülük, iskemi/reperfüzyon, oksidatif stres, inflamasyon, hipoksi
Sayfa Adedi : 106
Danışman : Doç. Dr. Kübranur ÜNAL

EFFECT OF MEDICINAL LEECH APPLICATION ON ISCHEMIA/REPERFUSION INJURY IN THE LOWER LIMB EXTREMITY

(M. Sc. Thesis)

Başak SAMUR

GAZİ UNIVERSITY

GRADUATE SCHOOL OF HEALTH SCIENCES

December 2025

ABSTRACT

In this study, the therapeutic and preventive effects of medical leech application on ischemia/reperfusion (I/R) injury in rats with experimentally induced lower extremity ischemia were investigated. For this purpose, the superiority of medical leech application performed before the I/R model and after the I/R model was comparatively evaluated. Twenty-four female Wistar Albino rats were included in the study. The animals were divided into four groups: Treatment+I/R (n=6), I/R+Treatment (n=6), I/R (n=6), and Sham (n=6). The lower extremity I/R model was established by clamping the femoral artery. In the groups that received medical leech therapy (before and after I/R), one *Hirudo verbana* leech was applied to the gastrocnemius muscle region of each rat. At the end of the study, serum and gastrocnemius muscle tissue samples were collected from all rats. The levels of SOD, TNF- α , IL-6, NO, CGRP, GPx, IMA, HIF-1 α , CAT and EDN-1 were analyzed using the ELISA method. In addition, edema, degeneration, necrosis, and inflammation in muscle tissue were evaluated histopathologically. The serum TNF- α level in the I/R group (81.18 ± 75.91 ng/L) was found to be significantly lower than those in the Treatment+I/R (293.83 ± 82.55 ng/L), I/R+Treatment (328.43 ± 70.07 ng/L), and Sham (332.53 ± 41.79 ng/L) groups ($p=0.047$). No statistically significant differences were observed among the groups in terms of other serum parameters. The tissue IL-6 level in the I/R group (0.81 ± 0.46 ng/g tissue) was found to be significantly lower than that in the Sham group (2.57 ± 0.29 ng/g tissue) ($p=0.038$). The tissue CAT level in the Treatment+I/R group (1.00 ± 0.06 μ g/g tissue) was significantly lower than that in the I/R+Treatment group (1.28 ± 0.06 μ g/g tissue) ($p=0.011$). No significant differences were observed among the groups in other tissue parameters. Histopathological evaluation revealed that edema, degeneration, necrosis and inflammation scores were significantly lower in both the Treatment+I/R and I/R+Treatment groups compared to the I/R group ($p=0.001$). Our study further demonstrates that both pre- and post-I/R treatment are effective in reducing ischemia. This study suggests that leeches can be used to treat lower extremity I/R injuries and may shed light on future new procedures in this area.

Science Code : 1090

Key Words : Medicinal leech, ischemia/reperfusion, oxidative stress, inflammation, hypoxia

Page Number : 106

Supervisor : Assoc. Prof. Dr. Kübranur ÜNAL

TEŞEKKÜR

Tez çalışmam süresince bilgi, deneyim ve akademik rehberliğiyle bana yol gösteren, desteğini hiçbir zaman esirgemeyen ve çalışmamın her aşamasında katkı sunan değerli danışmanım Sayın Doç. Dr. Kübranur ÜNAL'a en derin saygı ve şükranlarımı sunarım.

Akademik gelişimime katkı sağlayan ve eğitim hayatım boyunca bilgi ve tecrübeleriyle beni destekleyen Gazi Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Tıbbi Biyokimya Anabilim Dalı öğretim üyelerine teşekkür ederim.

THD-2025-9774 no.lu proje ile tezimi destekleyen Gazi Üniversitesi, Bilimsel Araştırma Projeleri Yönetim Birimi Başkanlığı'na teşekkür ederim.

Tez çalışmam boyunca laboratuvar çalışmalarında ve teknik süreçlerde bilgi ve desteğinden faydalandığım, sayın Dr. Leyla İBRAHİMKHANLI'ya ve uzman biyolog Mehmet Emre EROL'a teşekkürlerimi sunarım.

Bu akademik sürecin her aşamasında manevi desteğini esirgemeyen ve bana da IMA moral kaynağı olan aileme en derin şükranlarımı sunarım. Özellikle, eğitimim boyunca her daim yanımda olan, maddi ve manevi katkılarıyla bu sürecin her aşamasında desteklerini esirgemeyen kıymetli babam Seyit SAMUR'a ve annem Züleyha SAMUR'a ve kız kardeşim Burcu SAMUR'a minnettarlığımı ifade ederim. Onların özverili desteği ve teşvikleri, bu çalışmanın hayata geçirilmesine önemli ölçüde katkı sağlamıştır.

İÇİNDEKİLER

	Sayfa
ÖZET	iv
ABSTRACT.....	v
TEŞEKKÜR.....	vi
İÇİNDEKİLER	vii
ÇİZELGELERİN LİSTESİ.....	x
ŞEKİLLERİN LİSTESİ	xi
RESİMLERİN LİSTESİ	xiii
SİMGELER VE KISALTMALAR.....	xiv
1. GİRİŞ.....	1
2. GENEL BİLGİLER	5
2.1. İskemi/Reperfüzyon (I/R) Hasarı	5
2.1.1. İskemi.....	5
2.1.2. Reperfüzyon	5
2.1.3. İskemi/reperfüzyon (I/R) hasarının fizyopatolojisi.....	6
2.1.4. Alt ekstremitte iskemisi.....	12
2.2. Antioksidanlar	13
2.2.1. Antioksidanların sınıflandırılması.....	13
2.3. İnflamatuvar Belirteçler	15
2.3.1. IL-6.....	15
2.3.2. CGRP	16
2.3.3. Nitrik oksit (NO).....	17
2.3.4. TNF- α	17
2.3.5. HIF-1 α	18
2.3.6. İskemi modifiye albümin (IMA).....	18

	Sayfa
2.3.7. Endotelin-1 (EDN1).....	19
2.4. Tıbbi Sülüklerin Genel Özellikleri ve Biyolojisi	19
2.4.1. Tıbbi sülük tedavisinin tarihçesi	23
2.4.2. Tıbbi sülük salgısının bileşenleri ve özellikleri	27
2.4.3. Tıbbi sülük tedavisinin endikasyonları	31
2.4.6. Tıbbi sülük tedavisinin komplikasyonları.....	33
3. GEREÇ VE YÖNTEMLER	35
3.1. Deney Hayvanlarının Temini ve Laboratuvar Koşulları.....	35
3.2. Cerrahi Yöntem.....	35
3.3. Deney Grupları.....	37
3.4. Tıbbi Sülüklerin Temini ve Tıbbi Sülük Uygulaması.....	41
3.5. Diseksiyon ve Doku Örneklerinin Alınması	42
3.6. Dokuların Homojenizasyonu	42
3.7. Biyokimyasal İşlemler	42
3.7.1. Standartların hazırlanması.....	44
3.7.2. Testin yapılışı.....	50
3.8. Histolojik İncelemeler.....	52
3.9. İstatistiksel Yöntem.....	53
4. BULGULAR	55
4.1. Biyokimyasal Bulgular.....	55
4.1.1. Doku örneklerine ait bulgular	55
4.1.2. Serum örneklerine ait bulgular.....	62
4.2. Histolojik Bulgular.....	70
4.2.1. Ödem.....	70
4.2.2. Dejenerasyon.....	71
4.2.3. Nekroz	72

	Sayfa
4.2.4. İnflamasyon.....	72
5. TARTIŞMA	75
6. SONUÇ VE ÖNERİLER	87
6.1. Sonuçlar.....	87
6.1.1. Serum örneklerine ait sonuçlar.....	87
6.1.2. Doku örneklerine ait sonuçlar	88
6.1.3. Histoloji örneklerine ait sonuçlar	89
KAYNAKLAR	91
EKLER.....	103
ÖZGEÇMİŞ	106

ÇİZELGELERİN LİSTESİ

Çizelge	Sayfa
Çizelge 2.1. Radikal ve radikal olmayan bileşikler	10
Çizelge 2.2. Başlıca enzimatik ve non-enzimatik endojen antioksidanlar.....	13
Çizelge 2.3. Başlıca eksojen kaynaklı antioksidanlar	15
Çizelge 2.4. Hirudinea alt-sınıfına ait tıbbi sülük türleri	19
Çizelge 2.5. Sülük salgısında bulunan bazı biyoaktif maddeler	28
Çizelge 4.1. Deney grupları arasında doku örneklerine ait biyokimyasal sonuçların dağılımı	55
Çizelge 4.2. Deney grupları arasında serum örneklerine ait biyokimyasal sonuçların dağılımı	62
Çizelge 4.3. Deney grupları arasında kas doku örneklerine ait histolojik sonuçların dağılımı	70

ŞEKİLLERİN LİSTESİ

Şekil	Sayfa
Şekil 2.1. İskemi-Reperfüzyon Hasarında Ksantin Oksidaz Yolağı.....	8
Şekil 3.2. Deney grupları	37
Şekil 3.3. SOD standart grafiği	44
Şekil 3.4. TNF- α standart grafiği	45
Şekil 3.5. IL-6 standart grafiği	46
Şekil 3.6. NO standart grafiği	46
Şekil 3.7. CGRP standart grafiği.....	47
Şekil 3.8. GPX standart grafiği	47
Şekil 3.10. HIF-1 α standart grafiği	49
Şekil 3.11. CAT standart grafiği	49
Şekil 3.12. EDN-1 standart grafiği	50
Şekil 3.13. ELISA analizi aşamaları	52
Şekil 4.1. Deney grupları arasında doku SOD konsantrasyonlarının dağılımı	56
Şekil 4.2. Deney grupları arasında doku TNF- α konsantrasyonlarının dağılımı	57
Şekil 4.3. Deney grupları arasında doku IL-6 konsantrasyonlarının dağılımı	57
Şekil 4.4. Deney grupları arasında doku NO konsantrasyonlarının dağılımı	58
Şekil 4.5. Deney grupları arasında doku CGRP konsantrasyonlarının dağılımı.....	59
Şekil 4.6. Deney grupları arasında doku GPx konsantrasyonlarının dağılımı	59
Şekil 4.7. Deney grupları arasında doku IMA konsantrasyonlarının dağılımı	60
Şekil 4.8. Deney grupları arasında doku HIF-1 α konsantrasyonlarının dağılımı	61
Şekil 4.9. Deney grupları arasında doku CAT konsantrasyonlarının dağılımı	61
Şekil 4.10. Deney grupları arasında doku EDN-1 konsantrasyonlarının dağılımı	62
Şekil 4.11. Deney grupları arasında serum SOD konsantrasyonlarının dağılımı	63
Şekil 4.12. Deney grupları arasında serum TNF- α konsantrasyonlarının dağılımı	64
Şekil 4.13. Deney grupları arasında serum IL-6 konsantrasyonlarının dağılımı	65

Şekil	Sayfa
Şekil 4.14. Deney grupları arasında serum NO konsantrasyonlarının dağılımı	65
Şekil 4.15. Deney grupları arasında serum CGRP konsantrasyonlarının dağılımı.....	66
Şekil 4.16. Deney grupları arasında serum GPx konsantrasyonlarının dağılımı	67
Şekil 4.17. Deney grupları arasında serum IMA konsantrasyonlarının dağılımı	67
Şekil 4.18. Deney grupları arasında serum CAT konsantrasyonlarının dağılımı	68
Şekil 4.19. Deney grupları arasında serum HIF-1 α konsantrasyonlarının dağılımı	69
Şekil 4.20. Deney grupları arasında serum EDN-1 konsantrasyonlarının dağılımı.....	69
Şekil 4.21. Deney grupları arasında ödem sonuçlarının dağılımı.....	71
Şekil 4.22. Deney grupları arasında dejenerasyon sonuçlarının dağılımı.....	71
Şekil 4.23. Deney grupları arasında nekroz sonuçlarının dağılımı	72
Şekil 4.24. Deney grupları arasında inflamasyon sonuçlarının dağılımı	73
Şekil 4.25. H&E boyama yöntemi uygulanan gastroknemius kas doku örneklerinin görünümü.	73

RESİMLERİN LİSTESİ

Resim	Sayfa
Resim 2.1. <i>Hirudo verbana</i> türündeki tıbbi sülükler	19
Resim 2.2. <i>Hirudo verbana</i> 'nın çekmenlerinin görünüşü A) Anterior çekmen, B) Posterior çekmen.....	20
Resim 2.3. <i>Hirudo verbana</i> 'nın görünüşü, A) dorsal B) ventral	21
Resim 3.1. Deneysel aşamada kullanılan malzemeler	36
Resim 3.2. Deneysel aşamalarını gösteren resimler, A: Femoral damar sinir paketinin görülmesi, B: Femoral arterin klempelenmesi, C: Basit dikiş ile sağ alt ekstremitte insizyonunun kapatılması.....	36
Resim 3.3. I/R öncesi sağ alt ekstremitteye tıbbi sülük uygulaması	38
Resim 3.4. I/R sonrası tıbbi sülük uygulaması	39
Resim 3.5. Alt ekstremitte I/R modeli	40
Resim 3.6. Sham grubuna ait görsel	40
Resim 3.7. Deney aşamasında kullanılan tıbbi sülükler	41

SİMGELER VE KISALTMALAR

Bu çalışmada kullanılmış simgeler ve kısaltmalar, açıklamaları ile birlikte aşağıda sunulmuştur.

Simgeler	Açıklamalar
%	Yüzde
°C	Santigrat derece
μL	Mikrolitre
μmol	Mikromol
dk	Dakika
gr	Gram
H&E	Hematoksilen & Eozin
i.p.	İntraperitoneal
kg	Kilogram
L	Litre
mg	Miligram
ml	Mililitre
ng	Nanogram
pg	Pikogram
rpm	Dakikadaki devir
Unm	Nanometre

Kısaltmalar	Açıklamalar
ADP	Adenozin difosfat
AMP	Adenozin monofosfat
ATP	Adenozin trifosfat
C5a	Kompleman faktör 5a
C5b-9	Kompleman 5b ve Kompleman 9'un birleşiminden oluşan kompleks
Ca²⁺	Kalsiyum iyonu
CAT	Katalaz

Kısaltmalar**Açıklamalar**

CD11b/18	Lökosit yüzey adezyon molekülü
CGRP	Kalsitonin Gen İlişkili Peptit
Cl⁻	Klor iyonu
CRP	C-reaktif protein
EDN	Endotelin
GM-CSF	Granülosit makrofaj uyarıcı faktör
GPx	Glutasyon peroksidaz
GR	Glutasyon redüktaz
GSSH	Okside glutasyon (glutasyon disülfür)
H₂O	Su
H₂O₂	Hidrojen peroksit
HIF-1α	Hipoksi ile İndüklenebilir Faktör 1- α
HOCl	Hipoklorik asit
ICAM-1	İnterselüler adezyon molekülü-1
IL-1	İnterlökin-1
IL-1β	İnterlökin-1 beta
IL-6	İnterlökin-6
IL-8	İnterlökin-8
IMA	İskemi Modifiye Albümin
K⁺	Potasyum iyonu
KDH	Ksantin dehidrogenaz
KO	Ksantin oksidaz
LO$\cdot$	Alkoksil radikali
LOO$\cdot$	Peroksil radikali
LOOH	Lipid hidroperoksit
LTB₄	Lökotrien B ₄
MCP-1	Monosit Kemoatraktan Protein-1
MIP-1α	Makrofaj İnflamatuvar Protein-1-Alfa
MIP-1β	Makrofaj İnflamatuvar Protein-1-Beta
MIP-2	Makrofaj İnflamatuvar Protein-2
N₂O₃	Dinitrojen trioksit
Na⁺	Sodyum iyonu

Kısaltmalar	Açıklamalar
Na⁺/Ca²⁺	Sodyum/kalsiyum deęişim sistemi
Na⁺/K⁺-ATPaz	Sodyum/potasyum ATPaz enzimi
NAD⁺	Nikotinamid adenin dinükleotidin okside formu
NADPH	Nikotinamid adenin dinükleotid fosfat
NMDA	N-metil-D-aspartat reseptörü
NO	Nitrik oksit
O₂	Moleküler oksijen
O₂⁻	Süperoksit anyonu
OH[•]	Hidroksil radikali
ONOO⁻	Peroksinitrit
PAF	Trombosit aktive edici faktör
PAH	Alt ekstremitte periferik arter hastalığı
PGE2	Prostaglandin E2
PGI2	Prostacyclin
PMNL	Polimorf nüveli lökositler
RNOS	Reaktif nitrojen oksit türleri
RNS	Reaktif nitrojen türleri
SOD	Süperoksit dismutaz
SOR	Serbest oksijen radikalleri
TNF-α	Tümör nekroz faktör-alfa
TxA2	Tromb oksan A2
VCAM-1	Vasküler Hücre Adezyon Molekülü-1

1. GİRİŞ

Dokulara gelen kan akımının azalması veya ani olarak kesilmesiyle meydana gelen metabolik son ürünlerin dolaşım tarafından dokulardan uzaklaştırılamaması durumuna iskemi adı verilmektedir. Reperfüzyon ise dokuya tekrar kan akımının sağlanması olayıdır. İskemi durumunda dokuya yeniden yeterli dolaşımın sağlanması yani reperfüzyon ile birlikte doku hasarının başlaması iskemi/reperfüzyon (I/R) olarak ifade edilmektedir [1].

İskemiye maruz kalan hücre ve dokularda aerobik metabolizma işlevini sürdüremez. Bu yüzden anaerobik metabolizma yoluna başvururlar. Anaerobik metabolizma sonucunda oluşan metabolitler, yetersiz doku perfüzyonu nedeniyle hücrelerde birikir. Kan akışının yeniden sağlanmasıyla birlikte bu birikmiş metabolitler okside olur ve oluşan yan ürünler sistemik dolaşıma geçer [2].

İskemi sonucunda oluşan hasarın ve metabolik yükün şiddeti iskeminin süresi ve şiddeti ile orantılı olup, hücrenin tipine, hücre kökenine, kan ihtiyacı ve metabolizmasına göre farklılıklar göstermektedir. İskelet kasının ekstremitelerde iskemiye en duyarlı doku olduğu gösterilmiştir. Bu yüzden ekstremitte I/R hasarının en önemli kısmını kasların iskemiye verdiği cevap oluşturur [3].

Alt ekstremitte periferik arter hastalığı (PAH) dünya çapında >230 milyon yetişkini etkilemekte ve koroner kalp hastalığı ve inme gibi diğer kardiyovasküler hastalıklar ve amputasyon ile sonuçlanan ekstremitte sorunları gibi çeşitli olumsuz klinik sonuçların riskinde artış ile ilişkilidir. Eskiden sağlık uzmanları ve hastalar tarafından yeterince takdir edilmemesine rağmen günümüzde PAH yaygınlığı ve klinik önemi sebebiyle bilim dünyasının ilgisini çekmiştir [4].

I/R mekanizması çok faktörlüdür ve farklı biyolojik mekanizmaları içerir. Bunlar mikrosirkülasyon değişiklikleri, lokal ve sistemik bağışıklık aktivasyonu, iyon birikimi, serbest radikaller olarak da bilinen reaktif oksijen türlerinin dolaşıma katılmasıdır. Serbest oksijen radikalleri (SOR), reperfüzyon hasarında anahtar moleküller olarak kabul edilir [5].

I/R mekanizmasının kabul gören fizyopatolojisi, iskemi süresi boyunca anaerobik kalan dokunun tekrar kanlandırılması ile oksijen (O₂)’den zengin arteriyel kana maruz kalan dokuda ağırlıklı olarak aktifleşen nötrofillerden salınan SOR’ların oluşumudur [6].

Endotel hücreleri, SOR’ların hem hedefi hem de başlıca üretim kaynağıdır. Ayrıca endotel, mikrovasküler homeostazın sürdürülmesinde rol oynayan endotelin (EDN) ve nitrik oksit (NO) sentezinin temel merkezidir. SOR etkisi ile endotel hücreleri EDN, NO, hipoksi ile indüklenebilir faktör 1-alfa (HIF-1 α), Kalsitonin gen ilişkili peptit (CGRP) gibi faktörleri salgılar [7, 8].

Ayrıca iskemi durumunda inflamatuvar Tümör nekroz faktör-alfa (TNF- α) ve interlökin-6 (IL-6) gibi kompleman sistemine ait biyomoleküllerin üretimi uyarılarak inflamatuvar yanıt artırılır.

Tıbbi sülükler; halkalı solucanlar olarak bilinen ve 15.000’den fazla türü bulunan Annelida filumu, Clitellata sınıfı ve Hirudinea alt sınıfında yer alan, kan emerek veya predatör olarak beslenen omurgasız canlılardır [9].

Hirudoterapi veya tıbbi sülük tedavisi, yüzyıllar boyunca hastalıkları tedavi etmek amacıyla tıbbi sülükler kullanılarak yapılan destekleyici ve tamamlayıcı bir tedavi yöntemidir ve insan hastalıklarının tedavisinde omurgasızların kullanımına dair birkaç örnekten biridir [10].

Hirudoterapi, yüzyıllar boyunca çeşitli kültürlerde ve coğrafyalarda varlığını devam ettirmektedir. Antik Yunan, Çin, Avrupa, Pers, Hint, Mısır, Arap ve Anadolu medeniyetlerinin eski yazıtlarında hirudoterapiye rastlanmıştır. Hirudoterapi, Osmanlılar tarafından da uygulanmış ve bu konuda yazılı eserler hazırlandığına dair bilgiler bulunmaktadır [11].

Hirudoterapide tıbbi sülüklerin çeşitli biyolojik özelliklerinden yararlanılmaktadır. Bu çeşitli biyolojik özellikler arasında en yaygın bilinenleri, flebotomik özellik olan sülüklerin konakçılarının kanı ile beslenmeleri ve bu esnada tükürükleri ile birlikte başta anti-enflamatuvar, antikoagülan ve anesteziye olmak üzere pek çok biyoaktif maddeyi salgıvermeleridir. Bu biyoaktif bileşikler sayesinde tıbbi sülük tedavisi hipoksiyi düzeltmede, mikrosirkülasyon bozukluklarında, organ ve dokuların hasarlı vasküler permeabilitesinde,

kan basıncını düzenlemede, immunitiyi arttırmada ve ağrı olaylarını gidermede görev alabilmektedir [9].

Bu çalışmada, deneysel olarak oluşturulan alt ekstremité I/R hasarında tıbbi sülük uygulaması etkisinin değeriendirmesi amaçlandı. Ayrıca deneysel I/R modelinden önce tıbbi sülük uygulaması ile I/R modelinden sonra tıbbi sülük uygulamasının üstünlüklerini karşılaştırmalı olarak değeriendirilmek istendi. Böylece alt ekstremitéde deneysel iskemi oluşturulmuş ratlarda tıbbi sülük uygulamasının I/R hasarı üzerindeki tedavi edici ve önleyici etkileri incelendi.



2. GENEL BİLGİLER

2.1. İskemi/Reperfüzyon (I/R) Hasarı

2.1.1. İskemi

İskemi, belirli bir doku veya organa giden kan akışının azalması ya da tamamen kesilmesi sonucunda, metabolik süreçler sonucu oluşan atık ürünlerin dolaşımına uzaklaştırılamaması durumudur [12].

Kan akımındaki bu azalma, iskemik doku ve organlarda farklı derecelerde hasara neden olur. İskemik hasarın şiddeti, kan akışındaki azalmanın süresi ve derecesi ile doğrudan ilişkili olup, bu durum etkilenen hücrelerin kökenine, metabolik özelliklerine, kanlanma gereksinimlerine ve türlerine göre değişkenlik göstermektedir [13].

2.1.2. Reperfüzyon

Reperfüzyon, iskemiye yol açan nedenin ortadan kaldırılmasıyla, iskemi sürecinde azalan ya da duran kan akımının yeniden normale dönmesi durumudur.

Reperfüzyon, iskemik dokuda enerji ihtiyacının karşılanması ve biriken toksik metabolitlerin uzaklaştırılması açısından iki önemli yararlı etkiye sahiptir. Bu nedenle, iskemik hasarın giderilmesi ve doku fonksiyonlarının yeniden kazanılması için gerekli bir süreç olarak kabul edilir. Ancak, kan akımının normale dönmesi her zaman tam bir fonksiyonel iyileşme sağlamaz; çünkü oksijen açısından zengin kanın yeniden dokuya ulaşması, oksidatif stresin artmasına ve yeni bir hücrel hasar sürecinin başlamasına neden olabilir. Bu duruma “reperfüzyon hasarı” adı verilir ve oluşumu reaktif oksijen türleri (SOR), endotel kaynaklı faktörler ve nötrofillerin etkileşimini içeren karmaşık bir mekanizma sonucunda gerçekleşir.

Süperoksit anyonu (O_2^-), hidrojen peroksit (H_2O_2) ve hidroksil radikali ($OH\cdot$), en yaygın bilinen reaktif oksijen türleridir (SOR). Bu moleküllerin oluşumunda nikotinamid adenin dinükleotid fosfat (NADPH) oksidaz sistemi ve ksantin oksidaz (XO) sistemi temel rol

oynamaktadır. Sonuç olarak, dokularda iskemik süreçten çok daha büyük bir hasar oluşur. Hasarı asıl tetikleyen faktörün, endotel hücrelerindeki zedelenme olduğu düşünülmektedir.

İskemi sonrası dönemde serbest radikal üretiminin temel kaynağı, ksantin oksidaz (KO) enzimidir. Bu enzim, hem dehidrogenaz hem de oksidaz aktivitesine sahip iki farklı formda bulunur. Hipoksantin ve ksantin oksidasyonu sırasında reaktif oksijen türleri açığa çıkar ve bu süreç, dokularda iskemik dönemin kendisinden daha şiddetli bir hasarın gelişmesine yol açar [14, 15].

Reperfüzyon, polimorfonükleer lökositlerin (PMNL) aktivasyonu ve adezyonu, proinflatuar maddelerin salınımı ve serbest radikallerin (SOR'lar ve reaktif nitrojen türleri (RNS)) oluşmasına yol açar. İskemik dokunun reoksijenizasyonu sonrasında oluşan lokal hasara, reaktif oksijen türlerinin etkisiyle dolaşıma salınan enflamatuar sitokinler ve buna bağlı sistemik enflamasyon ile uzak organ hasarı eşlik eder [16].

I/R sonrasında doku veya organlarda meydana gelen hasar, I/R hasarı olarak adlandırılmaktadır [17].

2.1.3. İskemi/reperfüzyon (I/R) hasarının fizyopatolojisi

Dokunun iskekiye maruz kaldığı süre ve dokuya giden kan akışındaki azalma miktarı, iskemik hasarın şiddetini belirler [1].

Normal koşullarda, hücresel fonksiyonlar yüksek enerjili fosfat bağları aracılığıyla ve oksijen varlığında aerobik mekanizma ile gerçekleştirilir. Oksijenin yetersiz olduğu durumlarda ise hücresel fonksiyonlar anaerobik mekanizma ile yerine getirilir [18].

Yani, iskemi öncelikli olarak hücredeki aerobik mekanizmayı olumsuz yönde etkiler. İskemi sonucu oluşan bu hipoksi durumu, hücredeki oksijenli solunumu engelleyerek Adenozin 5'Trifosfat (ATP) seviyesinin azalmasına neden olur [1]. ATP'nin azalmasıyla birlikte adenozin monofosfat (AMP) artar ve bu da glikojenden ATP üretimi ve anaerobik glikoliz hızının artmasına neden olur. Glikojenin tüketimiyle birlikte inorganik fosfat ve laktik asit birikiminde artış meydana gelir. Buna bağlı olarak hücre içi asidoz meydana gelir ve protein sentezinin azalmasıyla mitokondriyal fonksiyonlar bozulur. İskemik süreçte asit

seviyelerinin artması sonucunda normal enzim kinetiği de değişir. Bu olaylar, hücredeki ATP üretimiyle bağlantılı birçok hücresel fonksiyonun azalmasına yol açar ve sonrasında çeşitli yapısal bozukluklar meydana gelir. Hücre içi dengenin korunması için gerekli enerjiden hücre yoksun kalır. Ayrıca, bu dengenin korunması için gerekli olan hücresel ATP'nin azalması sonucu, ATP bağımlı iyon taşınmasında çeşitli aksaklıklar meydana gelir. ATP bağımlı Sodyum/Potasyum-ATPaz (Na^+/K^+ -ATPaz) pompasının aktivitesi bozulur. Potasyum iyonları (K^+) hücre dışına çıkarken, sodyum (Na^+) ve klor (Cl^-) iyonları da hücre içine geçer. ATP üretimi, anaerobik glikoliz yoluyla sağlanmaya çalışılır [18, 19].

ATP ile çalışan bir diğer pompa ise, ekstrasellüler ve intrasellüler kalsiyum (Ca^{2+}) dengesini sağlayan pompadır. İntrasellüler Ca^{2+} düzeyinin artmasıyla, proteolitik enzimler ve fosfolipazlar aktive edilir. Fosfolipaz A₂'nin aktifleşmesiyle membran fosfolipidleri bozulmaya başlar, plazma ve mitokondriyal membranların geçirgenliği ile biyoenerjetik özellikleri de değişime uğrar. Fosfolipazın aktifleşmesi, araşidonik asit senteziyle sonuçlanır. Araşidonik asit, doğrudan etkiyle mitokondriyal enzimleri inhibe eder ve serbest radikal oluşumunu artırır [20].

Bu durum, ATP'ye bağımlı Na^+/K^+ -ATPaz pompasının işlevini bozar. Na^+ iyonu hücre içinde birikir. Bunu, K^+ iyonunun hücre dışına çıkışı takip eder. Bu maddelerin birikimine ek olarak, izo-ozmotik su birikiminin etkisiyle akut hücresel şişme gelişir. Hücre içinde biriken Na^+ iyonunu hücre dışına çıkarabilmek için $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ antiporter sistemi hızlanır. $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ antiporter sistemi, hücre içindeki artan Na^+ iyonunu dışarı çıkarırken, hücre içine Ca^{2+} iyonu taşır. Na^+/K^+ -ATPaz pompasının bozulması, hücreye daha fazla Ca^{2+} , Na^+ ve su (H_2O) girişi ile K^+ çıkışına yol açar. Hücre içindeki Na^+ konsantrasyonu, membrandaki Na^+/K^+ -ATPaz pompası aracılığıyla düşük tutulur. Ancak ATP seviyesindeki azalma, bu pompanın etkinliğini düşürür ve bunun sonucunda hücre içindeki Na^+ konsantrasyonu yükselir. Hücredeki artmış Na^+ , $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ taşıyıcı proteini aracılığıyla hücre dışına atılırken, bu durum hücre içindeki Ca^{2+} konsantrasyonunun yükselmesine neden olur. Hücre içindeki Ca^{2+} konsantrasyonundaki artış, yalnızca hücre dışından içeriye Ca^{2+} geçişiyle değil, aynı zamanda mitokondri ve endoplazmik retikulum gibi hücre içi organellerden salınan Ca^{2+} ile de ilişkilidir. İntrasellüler Ca^{2+} artışı, hücre için sitotoksik etki gösterir [15]. Artan Ca^{2+} fosfolipaz, proteaz, ATPaz ve endonükleaz gibi birçok enzimi aktive ederek doku hasarına yol açar [21]. İskemik dönemde ATP üretimi durma aşamasına gelir, ancak dokulardaki ATP depoları tüketilmeye devam eder, bu da yüksek enerjili ATP'nin fosfat bağlarının kopmasıyla

dışarı atarak tolere eder. Ancak enerjinin yetersiz olduğu durumlarda, pompa ve sekestrasyon mekanizmaları işlevini yerine getiremez ve hücre içinden atılamayan Ca^{2+} iyon birikimi, ani bir artışa yol açar. Bu artış, lipazları, proteazları ve endonükleazları aktive eder, serbest radikal ve NO oluşumunu artırarak nöronal ölümü tetikleyebilir.

Serbest radikal oluşumu, kalsiyumun hücre dışına atılmasını engelleyerek bir kısır döngü oluşturur. Ayrıca, mitokondrilerdeki Ca^{2+} iyon yükünün artmasının, hasar görmüş mitokondriyal membranı daha fazla bozacağı ve enerji eksikliğini artırarak serbest radikal oluşumunu tetikleyeceği öne sürülmektedir [25].

I/R hasarında fizyopatolojik değişikliklere sebep olan faktörler aşağıda belirtilmiştir

- a) SOR
- b) PMNL
- c) Kompleman sistemi
- d) Endotel hücreleri

Serbest oksijen radikalleri (SOR)

Dış orbitalinde yalnızca bir elektron bulunan atom veya molekül serbest radikal olarak tanımlanır. Dış orbitalinde, ikiye tamamlanamayan elektron taşıyan moleküller, reaktif özellik gösterir. Serbest radikaller, kararlı değildir ve bu nedenle ömürleri kısa olur. Elektriksel yükleri negatif, nötr veya pozitif olabilir. Serbest radikaller, fizyolojik koşullarda ve organizmayı dış etkilere karşı savunmak için belirli bir düzeyde rol oynar; organizma ise çeşitli savunma mekanizmalarıyla bu radikallerin olası zararlı etkilerini engellemeye çalışır. Serbest radikaller, organizmanın savunmasında ve dış faktörlere karşı belirli oranlarda kullanılır ve organizma, bu radikallerin potansiyel zararlarını önlemek için çeşitli mekanizmalarla korunur. Biyolojik sistemlerde meydana gelen serbest radikallerin endojen kaynakları arasında oksijen, NO, aktive olmuş nötrofiller, mitokondriyel elektron taşıma sistemi, endoplazmik retikulum, peroksizom ve hücre zarları sayılabilir [26].

Aerobik organizmalarda serbest radikallerin başlıca kaynağı O_2 'dir. Normal metabolik süreçler sırasında, O_2 'nin yaklaşık %98'i suya (H_2O) indirgenirken, geri kalan %2'lik kısmı ise O_2^- ve OH^- radikallerine dönüşür. O_2^- ve OH^- anyonları, biyolojik sistemlerdeki en

temel reaktif oksijen türleridir. Biyolojik ortamlarda, H_2O_2 , çoğunlukla O_2^- radikal oluşumu aracılığıyla meydana gelir. Bu reaksiyon sırasında, iki süperoksit molekülü, iki hidrojen (H^+) iyonu ile etkileşerek H_2O_2 ve O_2 üretir. H_2O_2 , eşleşmemiş elektron barındırmadığından radikal özellik göstermez [27].

Çizelge 2.1. Radikal ve radikal olmayan bileşikler

Radikal ve Radikal Olmayan Bileşikler		
Radikaller	Radikal Olmayanlar	
Süperoksit Radikali (O_2^-) Hidroksil Radikali (OH^-) Alkoksil Radikali (LO^-) Peroksil Radikali (LOO^-)	Hidrojen Peroksit (H_2O_2) Lipid Hidroperoksit ($LOOH$) Hipoklorik Asit ($HOCL$)	Singlet Oksijen

Serbest oksijen radikallerinin toksik etkileri [28]

- Serbest oksijen radikalleri, hücre organelleri ile zarlarındaki lipid ve protein yapılarına zarar verir.
- Hücre içindeki yararlı enzimlerin işlevlerini bozar ve onları inaktive ederler.
- DNA üzerinde hasar oluştururlar.
- Mitokondriyal aerobik solunum süreçlerini olumsuz yönde etkilerler.
- Ksantin oksidaz, triptofan dioksigenaz, indolamin dioksigenaz, elastaz, proteaz, fosfolipaz, lipooksijenaz, siklooksijenaz ve galaktoz oksidaz gibi enzimlerin aktivasyonunu tetiklerler.
- Hücrenin potasyum kaybını artırır.
- Trombosit agregasyonunu teşvik ederler.
- Dokularda fagositlerin birikmesini kolaylaştırır.
- Hücre dışındaki kollajen yapıları, savunma enzimleri ve nörotransmitterleri tahrip ederler.

İskemi reperfüzyon hasarında polimorf nüveli lökositler

Polimorf nüveli lökositler, mikrovasküler geçirgenlikte artıştan sorumlu ana hücreler olup iskemi-reperfüzyon hasarı sonrasında aktif hale gelen ilk hücrelerdir [29-31]. Lökositler ve endotel hücre yüzeylerinin, adezyon moleküllerinin oluşumunu arttırması ile kemotaksi, lökosit diapedezi ve lökosit aktivasyonu ile sonuçlanan kaskad aktive olur [32]. Bu aktivasyon sonrası meydana getirdikleri hasar, IL-6, TNF- α ve IL-1 gibi sitokinlerin ve

sitotoksik enzimlerin salınmasına, SOR salınımına ve vasküler geçirgenlikte artış ile mikrovasküler oklüzyon oluşturmalarına bağlıdır. Nötrofiller aktive olduklarında iskemik doku endoteline yapışarak interstisyel alana göç ederler [7, 33]. Polimorf nüveli lökositlerin dokuya geçebilmesi için önce endotel hücrelerine adezyonları gerekir. Nötrofillerin aktivasyonu ve göçü; aktive olmuş endotel hücreleri arasında oluşan E-selektin, P-selektin ve L-selektin adı verilen adezyon molekülleri ile lökositler aracılığı ile gerçekleşir. Adezyona uğrayan bu lökositler; interlökin-8 (IL-8), kompleman faktör 5a (C5a), trombosit aktive edici faktör (PAF) ve lökotrien B4 (LTB4) ile aktive edilmeleri ile birlikte yüzeylerinde CD11b/18 molekülleri belirir. CD11b/18 ve interselüler adezyon molekülü-1 (ICAM-1) etkinliği sonucu daha önce oluşan adezyonun güçlenmesi ile kan damarının iç yüzeyindeki endotel hücrelerinin arasından geçerek damarın dışına çıkma olayı (transendotelyal migrasyon) meydana gelir. Lökositler, Endotel hücreleri arasından geçerek hedef dokuya doğru hareket ederler. Temel olarak, lökosit göçü venöz kılcal damar aracılığı ile meydana gelir. Hasar gören dokuya yönelik lökosit kemotaksisi; IL-8, C5a ve LTB-4 gibi moleküller aracılığıyla sağlanır. I/R sırasında meydana gelen TNF- α , IL-1beta, kompleman sistemi ve PAF gibi inflamatuvar araçlar, nötrofil göçünü teşvik eder [30].

Hasarın meydana geldiği bölgede biriken hücre türü, inflamasyonun süresine ve uyarının niteliğine bağlı olarak değişiklik gösterir. I/R hasarına karşı gelişen inflamatuvar yanıtta ilk 6-24 saat içinde nötrofiller baskınken, 24-48 saat içinde monositlerin hâkimiyeti artar. Bu durum, nötrofillerin kanda daha fazla sayıda bulunmaları, hızlı bir şekilde aktive olabilmeleri, adezyon moleküllerine yüksek afinite ile bağlanabilmeleri ve kısa yarı ömürleriyle ilişkilidir. Bu nedenle, inflamasyonun akut fazında nötrofiller, kronik fazında ise monositler baskın hücre tipleridir [7]. Bu süreçlerin sonucunda, lökositler doku hasarının ilerlemesine katkıda bulunurlar.

Kompleman sisteminin iskemi ve reperfüzyon hasarındaki rolü

Kompleman sistemi; bir takım plazma proteini ve bu plazma proteinlerinin hücre zarı reseptörlerinden meydana gelir. Monositler, hepatositler, makrofajlar, böbreğin glomerüler ve tübüler hücreleri; kompleman sisteminin bileşenlerinin sentez yeridir. Kompleman sistemi aktive olduğunda, proinflamatuvar bileşenler (C3a, C5a, iC3b ve C5b-9) meydana gelir. C3a ve C5a, anaflatoxin olarak görev yapar ve lökosit aktivasyonunu sağlarlar. C5a; Makrofaj İnflamatuvar Protein-2 (MIP-2), Makrofaj İnflamatuvar Protein-Alfa (MIP-1-

Alfa), Makrofaj İnflamatuvar Protein-1-Beta (MIP-1 β), Monosit Kemoatraktan Protein-1 (MCP-1), TNF- α , IL-1 ve IL-6 üretimini tetikleyerek inflamatuvar yanıtı artırır. Vasküler Hücre Adezyon Molekülü-1 (VCAM-1), ICAM-1, E-selektin ve P-selektin; kompleman sistemi tarafından sentezi uyarılan lökosit adezyon molekülleridir. Kompleman 5b ve Kompleman 9 birleşimiyle oluşan C5b-9 kompleksi, endotel hücrelerinde IL-8, IL-1 α ve MCP-1 salınımını tetikleyerek lökosit aktivasyonunu ve kemotaksisi artırır. Ayrıca, endotel bağımlı vazodilatasyonu inhibe eder ve endotelde siklik guanozin monofosfat (cGMP) düzeylerini düşürerek vasküler tonusu bozar [8].

İskemi reperfüzyon hasarında endotel hücresinin rolü

Endotel hücreleri, SOR'lar için hedef bölge olmakla birlikte SOR'ların üretildiği kaynaktır. Endotel, kan ve dokular arasında tek sıra dizili hücrelerden meydana gelen bir bariyer görevindedir. Endotel hücreleri, damar fonksiyonlarının sürdürülmesinde rol oynar ve seçici geçirgenliği sayesinde kan ile dokular arasında madde alışverişini düzenler. Endotel hücresi, nitrik oksit (NO) ve mikrovasküler homeostazdan sorumlu endotelinin (ET) ana kaynağıdır. Endotel hücrelerinde meydana gelen oksidatif stres kompleman sistemin aktive olmasına neden olur. Kompleman sistemin aktive olması ile lökosit adezyon moleküllerinin üretimi artar. Endotel hücreleri, selektif oksijen radikalleri etkisi ile PAF, tromboksan A2 (TxA2), IL-1, NO, granülosit-makrofaj uyarıcı faktör (GM-CSF), Prostaglandinler (PGI2, PGE2), ET ve büyüme faktörlerini salgılar. Endotel hücreleri aktive oldukları zaman bazal membranlarını sindiren kollajenleri salgılar [7, 8].

2.1.4. Alt ekstremité iskemisi

Alt ekstremité periferik arter hastalığı (PAH) dünya çapında >230 milyon yetişkini etkilemekte ve koroner kalp hastalığı ve inme gibi diğer kardiyovasküler hastalıklar ve amputasyon ile sonuçlanan ekstremité sorunları gibi çeşitli olumsuz klinik sonuçların riskinde artış ile ilişkilidir. Eskiden sağlık uzmanları ve hastalar tarafından yeterince takdir edilmemesine rağmen günümüzde PAH yaygınlığı ve klinik önemi sebebiyle bilim dünyasının ilgisini çekmiştir [4].

2.2. Antioksidanlar

Canlı organizmalar, serbest radikallerin yol açtığı hasarlara karşı koruyucu bir savunma mekanizması geliştirmiştir. Bu zararlı molekülleri etkisiz hale getiren veya oluşumlarını engelleyen bileşikler ise “antioksidan” olarak tanımlanmaktadır [34]. Antioksidanlar, serbest radikalleri etkisiz hale getirerek onların neden olduğu zincirleme reaksiyonları durdurabilir; bu sayede hücrelerdeki oksidatif stresin önüne geçerler. Bu moleküller, reaksiyon hızını yavaşlatarak baskılayıcı bir etki oluşturur, hasar gören biyolojik moleküllerin onarımına katkı sağlar. Hem enzimatik hem de enzimatik olmayan antioksidan savunma sistemlerinin üretimini destekleyerek organizmada koruyucu rol üstlenirler [35].

2.2.1. Antioksidanların sınıflandırılması

Antioksidanlar, kökenlerine göre endojen (vücut içi) ve eksojen (vücut dışı) olmak üzere iki temel gruba ayrılır. Bu iki grup, oksidan ve antioksidan arasındaki dengeyi korumada önemli rol oynar; serbest radikalleri nötralize ederek organizmayı bu zararlı moleküllerin etkilerinden korumak amacıyla görev yaparlar [36].

Endojen kaynaklı antioksidanlar

Vücut tarafından doğal olarak üretilen endojen antioksidanlar, iki ana grupta sınıflandırılır: bunlardan biri enzim yapısında olan antioksidanlar, diğeri ise enzim içermeyen (non-enzimatik) antioksidan bileşiklerdir [34, 36].

Çizelge 2.2. Başlıca enzimatik ve non-enzimatik endojen antioksidanlar

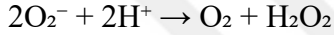
ENDOJEN KAYNAKLI ANTİOKSİDANLAR	
Enzimatik Antioksidanlar	Nonenzimatik Antioksidanlar
Katalaz (CAT) Glutasyon Peroksidaz (GPx) Süperoksit Dismutaz (SOD) Glutasyon Redüktaz (GR)	Glutasyon Ürik asit Melatonin Koenzim Q 10 Bilirubin Selenyum Albümin Transferrin Seruloplazmin α -lipoik asit

Enzimatik antioksidanlar

Süperoksit Dismutaz (SOD)

SOD, süperoksit radikalini parçalayarak onu moleküler oksijen (O_2) ve hidrojen peroksit (H_2O_2) dönüştüren bir kimyasal tepkimeyi hızlandıran bir enzimdir [35].

Hücre içinde farklı bölgelerde yer alan SOD enzim izoformları, görev yaptıkları yerlere göre sınıflandırılmaktadır. Bakır-çinko içeren SOD1 formu sitozolde yer alırken, manganez içeren SOD2 mitokondri içinde bulunur. SOD3 olarak adlandırılan ekstraselüler form ise hücre dışı ortamlarda görev yapar.



Glutasyon peroksidaz (GPx)

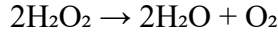
Hidrojen peroksit (H_2O_2) ile büyük moleküllü lipid hidroperoksitleri indirger ve bunları suya (H_2O) dönüştürür. Özellikle eritrositlerde, oksidatif strese karşı en güçlü etki gösteren antioksidan enzimdir [35].

GPx, ortamda yüksek miktarda H_2O_2 bulunduğunda, glutasyonu (GSH) okside glutasyon (glutasyon disülfür, GSSH) formuna dönüştüren reaksiyonu katalizlerken, aynı zamanda H_2O_2 'yi suya (H_2O) indirger. Glutasyon peroksidaz enzimi, selenyuma bağımlı ve bağımsız olmak üzere iki farklı formda bulunur.

Katalaz (CAT)

CAT, demir içeren bir hemoprotein olup esas olarak peroksizomlarda, daha az miktarda ise sitoplazmada ve mikrozomal yapılarda bulunur. Dört hem grubu taşıyan bu enzim, hidrojen peroksiti (H_2O_2) su (H_2O) ve oksijene (O_2) ayrıştırarak toksik etkilerini azaltır. Bu işlevi sayesinde, hidrojen peroksitin hidroksil radikaline ($OH\bullet$) dönüşmesini engellemiş olur. CAT'ın temel görevi, H_2O_2 'yi parçalayarak hücreyi oksidatif stresten korumaktır. SOD ve glutasyon peroksidaz (GSH-Px) gibi enzimlerle benzer işlev gösterir; aktivitesi oksidatif özellik taşıyan tip I kas liflerinde yüksek, hızlı kasılan tip II liflerde ise daha düşüktür. Ancak

H₂O₂, geçiş metalleri ile etkileşime girerse Fenton reaksiyonu yoluyla zararlı OH• radikallerine dönüşebilir [15, 37].



Nonenzimatik antioksidanlar

Enzimatik olmayan antioksidanlar arasında glutatyon, melatonin, ürik asit, bilirubin, albümin, koenzim Q10, selenyum, α-lipoik asit, seruloplazmin ve transferrin gibi maddeler yer almaktadır [27, 36, 38].

Eksojen kaynaklı antioksidanlar

Eksojen kaynaklı antioksidanları, vitamin eksojen antioksidanlar ve ilaç olarak kullanılan eksojen antioksidanlar olmak üzere iki grupta sınıflandırabiliriz [39].

Çizelge 2.3. Başlıca eksojen kaynaklı antioksidanlar

EKSOJEN KAYNAKLI ANTİOKSİDANLAR	
Vitamin Eksojen Antioksidanlar	İlaç Olarak Kullanılan Eksojen Antioksidanlar
β-karoten (Vitamin A) Folik asit (Vitamin B9) Askorbik asit (Vitamin C) α-Tokoferol (Vitamin E)	Sitokinler (TNF ve IL-1) Barbitüratlar Demir şelatörleri Nonenzimatik serbest radikal toplayıcılar (mannitol, albümin) Demir redoks döngüsü inhibitörleri (desferroksamin) Endojen antioksidan aktiviteyi artıranlar (GPx aktivitesini artıran ebselen ve asetilsistein) Rekombinant süperoksit dismutaz Trolox-C (vitamin E analogu) NADPH oksidaz inhibitörleri (adenozin, lokal anestezikler, kalsiyum kanal blokerleri, nonsteroid antiinflamatuvar ilaçlar) Ksantin oksidaz inhibitörleri (allopürinol, oksipürinol, pterin aldehit, tungsten)

2.3. İnflamatuvar Belirteçler

2.3.1. IL-6

IL-6, proinflamatuvar, anti-inflamatuvar, akut faz reaktanlarını uyarıcı, nöroprotektif ve nörotropik aktivitelere sahip multifonksiyonel bir sitokindir [40]. IL-6, bağışıklık sistemi hücreleri tarafından üretilen ve inflamasyon süreçlerinde önemli rol oynayan bir sitokindir.

Vücutta enfeksiyon, doku hasarı veya inflamatuvar durumlara yanıt olarak salınarak çok çeşitli biyolojik süreçleri düzenler. Özellikle inflamasyonun başlatılması ve sürdürülmesinde kilit bir görev üstlenir; diğer proinflamatuvar sitokinlerin salınımını teşvik ederek bağışıklık hücrelerinin aktivasyonunu artırır. Bunun yanı sıra IL-6, akut faz yanıtında da önemli bir rol oynar. IL-6, hücre büyümesi ve farklılaşmasını düzenleyerek bağışıklık hücrelerinin olgunlaşmasını ve işlevselliğini destekler. Bu çok yönlü etkileri nedeniyle IL-6, hem enfeksiyonlara karşı savunmada hem de inflamatuvar ve otoimmün hastalıkların gelişiminde önemli bir biyolojik düzenleyici olarak kabul edilmektedir [41, 42].

2.3.2. CGRP

CGRP, merkezi ve periferik sinir sisteminde yaygın olarak bulunan ve çeşitli fizyolojik süreçlerde kritik roller üstlenen bir nöropeptittir. Başlıca trigeminal sinir sistemi nöronlarından salınan CGRP, özellikle nörovasküler ve nöroinflamatuvar mekanizmalarda önemli bir düzenleyici molekül olarak görev yapar. CGRP'nin biyolojik etkileri, vasküler tonusun kontrolünden ağrı modülasyonuna ve inflamasyon süreçlerinin düzenlenmesine kadar geniş bir yelpazeyi kapsar [39].

CGRP'nin en belirgin işlevlerinden biri vasküler düzenlemedir. Güçlü bir vazodilatör olan CGRP, damar düz kas hücrelerine etki ederek damarların genişlemesini sağlar. Bu etkisi, özellikle migren patofizyolojisinde önemli bir rol oynar. Migren atağı sırasında trigeminal sinir uçlarından salınan CGRP'nin, kraniyal damarları genişleterek ağrının şiddetlenmesine neden olduğu düşünülmektedir. Bu mekanizma doğrultusunda, CGRP antagonisti ilaçlar migren tedavisinde yeni bir hedef olarak geliştirilmiştir ve etkili bir terapötik seçenek olarak klinik kullanıma girmiştir [43].

Ağrı modülasyonu, CGRP'nin bir diğer önemli fonksiyonudur. Nöropatik ve inflamatuvar ağrı süreçlerinde duyarlılığı artırarak ağrı algısını etkiler. Periferik sinir uçlarından salınan CGRP, nosiseptif sinyallerin merkezi sinir sistemine iletimini güçlendirir ve bu durum ağrının şiddetini artırabilir [44]. Bu özelliği nedeniyle CGRP, kronik ağrı sendromlarının ve özellikle migrenin tedavisinde farmakolojik hedeflerden biri haline gelmiştir.

2.3.3. Nitrik oksit (NO)

NO, azot monoksit olarak da bilinen ve hücresele düzeyde çeşitli biyolojik süreçlerde kritik rol üstlenen küçük ve reaktif bir gaz molekülüdür [45]. İskemi reperfüzyon hasarı şiddeti endotelden salınan NO düzeyi ile doğrudan ilişkilidir. NO, L-argininin terminal guanido nitrojen atomundan NOS aracılığı ile sentezlenir. NOS üç izoformu tanımlanmıştır. Endotelial NOS, indüklenebilir NOS ve nöronal NOS. i-NOS inflamasyon ve çeşitli uyarılarla aktive olurken e-NOS dokularda belli bir miktarda ama devamlı olarak üretilir ancak e-NOS bazı durumlarda uyarılabilirken, i-NOS da bazı dokularda devamlı olarak eksprese edilir [46, 47]. İskemi ve reperfüzyon süreçleri, hücresele hasar ve inflamasyona neden olan patofizyolojik olaylardır. İskemi sırasında, dokulara oksijen temininin azalması nedeniyle NO sentezi azalır ve bu durum damar daralması ile kan akışının daha da kısıtlanmasına yol açabilir [48]. Reperfüzyon sürecinde ise oksijenin yeniden sağlanması, NO üretiminde artışa neden olabilir. Ancak bu artış, aşırı reaktif oksijen türleri (ROS) ile birleşerek nitrozatif strese ve hücresele hasarın daha da derinleşmesine yol açabilir [49].

2.3.4. TNF- α

TNF- α , bağışıklık sisteminin düzenlenmesi ve inflamasyonun kontrolünde kritik rol oynayan güçlü bir proinflamatuvar sitokindir. Monositler, makrofajlar ve T lenfositleri gibi bağışıklık hücreleri tarafından enfeksiyon, doku hasarı ve diğer patolojik durumlara yanıt olarak üretilir [50]. TNF- α , inflamatuvar yanıtı başlatarak diğer proinflamatuvar sitokinlerin ve adezyon moleküllerinin üretimini tetikler, böylece bağışıklık hücrelerinin inflamasyon bölgesine göçünü kolaylaştırır. Bununla birlikte, TNF- α 'nın aşırı üretimi romatoid artrit ve inflamatuvar bağırsak hastalığı gibi kronik inflamatuvar hastalıkların gelişimine katkıda bulunabilir. Ayrıca TNF- α , enfekte veya hasar görmüş hücrelerin programlı hücre ölümü olan apoptoz sürecini başlatarak hücresele dengeyi sağlar. Antijen sunan hücrelerin ve T hücrelerinin aktivasyonunu artırarak bağışıklık yanıtını güçlendirir ve patojenlere karşı etkili bir savunma oluşturur [41, 51, 52].

TNF- α 'nın aşırı aktivasyonu kronik inflamasyon ve otoimmün hastalıkların gelişiminde önemli rol oynadığı için, anti-TNF- α tedavileri romatoid artrit ve inflamatuvar bağırsak hastalığı gibi hastalıklarda etkili bir tedavi seçeneği sunar. Bu yönleriyle TNF- α ,

inflamasyon, hücre ölümü ve bağışıklık yanıtlarının kontrolünde hayati bir düzenleyici olarak öne çıkmaktadır.

2.3.5. HIF-1 α

Hipoksi ile indüklenebilir faktör (HIF), oksijene duyarlı bir faktör olup HIF-1 α ve HIF-1 β olmak üzere iki alt birimden oluşur. HIF-1, hipoksiye tepki elemanlarına bağlanır ve hedef genlerin transkripsiyonunu aktive eder [53]. HIF-1 α , oksijensiz ortamda hücrel yanıt, damar gelişimi, glikoz metabolizması, yangı, eritropoez ve hücre ile ilgili genlerin gen ifadesinde yer alır [54, 55].

2.3.6. İskemi modifiye albümin (IMA)

IMA ve prolidaz, oksidatif stresin iskemik ayırıcıları arasında bulunur [56]. Albümin, kanda bol miktarda bulunan, 585 amino asitten oluşan ve karaciğerde sentezlenen çok işlevli bir proteindir. Moleküler ağırlığı 6,5 kDa olan albüminin yarı ömrü yaklaşık 19–20 gündür [57, 58]. Albümin, dolaşımda hem endojen hem de ekzojen kaynaklı toksik maddelerin taşınmasında görev alan bir taşıyıcı ajandır. Molekölün amino ucu (N-terminal), özellikle aspartil-alanil-histidil-lizin dizilimindeki amino asitler, kobalt (Co²⁺), nikel (Ni²⁺) ve bakır (Cu²⁺) gibi geçiş metal iyonlarının primer bağlanma sitesini oluşturur [59]. Serbest radikal hasarı, enerjiye bağlı membran bozuklukları, serbest demir ve bakır maruziyeti, asidoz ve hipoksi gibi durumlarda, albüminin N-terminal ucu modifiye olur ve böylece kobalt (Co²⁺), nikel (Ni²⁺) ve bakır (Cu²⁺) gibi geçiş metalleri bağlama kapasitesi azalır [59-61]. Albüminin bu modifiye edilmiş formu, IMA olarak adlandırılır [62].

IMA'nın fizyolojik rolü yalnızca iskemik durumlarla sınırlı olmayıp, aynı zamanda reperfüzyon hasarında da önemli bir artış göstermektedir. Reperfüzyon, kan ve oksijenin iskemiye uğrayan dokulara yeniden ulaşmasını ifade eder; ancak bu süreçte meydana gelen artmış oksidatif stres, hücrel düzeyde ek doku zedelenmesine yol açabilir. Bu da IMA seviyelerinde daha fazla yükselmeye neden olur [63, 64].

Bu nedenle IMA, hem iskeminin erken evrelerinde ortaya çıkan hücrel hasarı hem de reperfüzyon sırasında oluşan oksidatif stresi hassas bir biçimde yansıttığı için klinik alanda değerli bir tanı biyobelirteci olarak kabul edilmektedir.

2.3.7. Endotelin-1 (EDN1)

Endotelinler, son yıllarda bulunan en güçlü vazokonstriktör peptit gruplarıdır. EDN-1, endotelin-2 (EDN-2) ve endotelin-3 (EDN-3) olmak üzere üç farklı tipi bulunmaktadır. EDN-1, endotelial hücreler tarafından üretilir [65]. Damar endotelinden salınan ve endotel fonksiyonlarını düzenleyen maddelerden biridir [66]. EDN-1, inflamasyon ve oksidatif stres ile doğrudan ilişkilidir. İnflamatuvar süreçler ve oksidatif stres koşulları, EDN-1 sentezini artırarak damar fonksiyonlarını olumsuz yönde etkileyebilir [67].

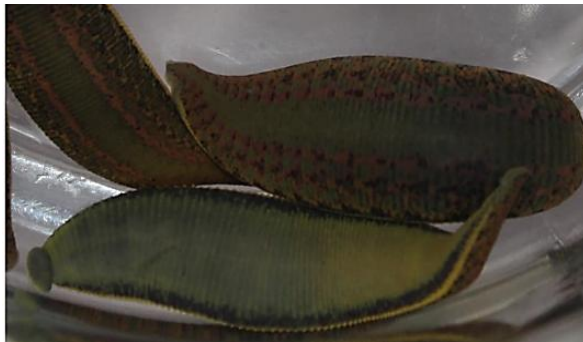
2.4. Tıbbi Sülüklerin Genel Özellikleri ve Biyolojisi

Sülükler, kan emerek beslenen, hermafrodit özellik gösteren ve parazitik bir yaşam süren omurgasız canlılardır [9, 68, 69].

Sülükler, 15.000'den fazla türe sahip olan ve halkalı solucanlar olarak bilinen Annelida filumunun bir üyesidir. Bu türlerin yaklaşık 650'si ise Hirudinea alt sınıfında yer almaktadır [9, 69].

Çizelge 2.4. Hirudinea alt-sınıfına ait tıbbi sülük türleri

<i>Hirudinea</i>	<i>Hirudo verbana</i>
	<i>Hirudo orientalis</i>
	<i>Hirudo medicinalis</i>
	<i>Hirudo sulukii</i>
	<i>Hirudo troctina</i>
	<i>Hirudo nipponia</i>



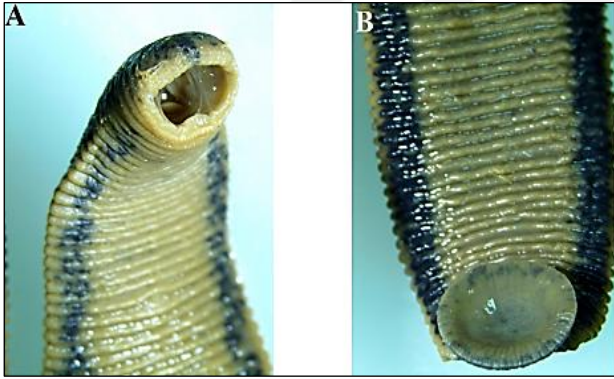
Resim 2.1. *Hirudo verbana* türündeki tıbbi sülükler

Sülüklerin vücut yapısı, genellikle dorso-ventral yönde hafifçe yassılaştırmış olup, uzunlukları 10-15 cm'ye kadar çıkabilmektedir [68, 70].

Annelida filumunun en belirgin özelliği, segmentasyon yapısına sahip olmalarıdır [71].

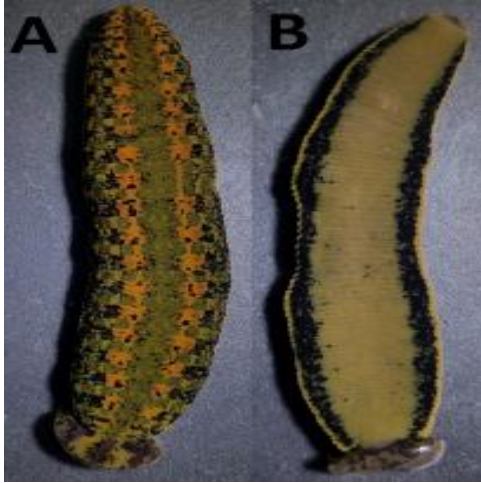
34 segment sülüklerin vücutlarında da IMA sabit sayıda bulunmaktadır [9]. Sülüklerin segment yapıları, ön (anterior) ve arka (posterior) olarak iki gruba ayrılmaktadır. Genellikle anterior segment, posterior segmentten daha küçüktür. Sülükler, her biri birer vantuz taşıyan anterior ve posterior olmak üzere iki vantuza sahiptir. Anterior vantuz, altı segmentin birleşmesiyle oluşurken, posterior vantuz sekiz segmentin birleşimiyle meydana gelir [68].

Bunun yanı sıra, posterior vantuz, disk şeklinde olup, ventral tarafa yönelmiştir [70]. Anterior segmentteki vantuz, beslenme işlevini yerine getirirken; posterior segmentteki vantuz, hareket etmeye ve yüzeylere tutunmaya yardımcı olur [72, 73].



Resim 2.2. *Hirudo verbana*'nın çekmenlerinin görünüşü A) Anterior çekmen, B) Posterior çekmen

Sülüklerin dorsal yüzeyleri, sarı, kahverengi, yeşil ve siyah gibi farklı renklerde ve desenlerde olabilir [69].



Resim 2.3. *Hirudo verbana*'nın görünüşü, A) dorsal B) ventral

Sülüklerin ön kısmı, arka ucuna kıyasla daha ince ve sivridir. Gözleri ise genellikle üst dudak bölgesinde, neredeyse görünmeyecek kadar küçük yer alır [71].

Sülüklerin sindirim kanalı, anterior vantuz tarafından çevrelenen ağızla başlar. Ağız kısmında, sıralı şekilde dizilmiş 50-100 kadar keskin dişi bulunan üç çene yer alır. Bu çenelerin yapısı, Y harfine benzeyen bir şekle sahiptir [9, 72].

Sülüklerin ağız kısmını kaslı bir farinks (yutak) takip eder. Kan emerken, sülükler tutunma organları (çekmenleri) yardımıyla canlıya sıkıca tutunur, dişlerini vücuda geçirecek şekilde yerleştirerek kesikler açar. Farinksten sonra sindirim sisteminin en büyük kısmı olan mide gelir. Mide, geniş bir tüp şeklindedir ve yan taraflarından çiftler halinde divertiküller (keseler) çıkar. Divertiküllerin sayısı, sülük türlerine göre değişiklik gösterebilir. Ayrıca, hirudin ve diğer salgıları salgılayan bezler ile kanı parçalamaya yardımcı olan simbiyotik bakteriler sindirim sürecinde önemli rol oynar. Sülükler, vücutlarının 3-10 katı kadar kan emebilirler ve bir kez beslendikten sonra yaklaşık 1 yıl boyunca beslenmeden hayatta kalabilirler. Fazla kan, midede bulunan divertiküllerde depolanır. Sindirim süreci, *Aeromonas hydrophila* ve *Pseudomonas hirudinia* gibi endosimbiyotik bakterilerin yardımıyla gerçekleşir. Bu bakteriler, sindirim için gerekli enzimleri sağlar ve kanın bozulmasını engeller. Ayrıca, *Aeromonas* bakterisi, kanla beslenen hayvanlarda vitamin B kompleksi eksikliğinin önlenmesine de katkı sağlar. Anüs, sülüğün dorsal kısmında, posterior çekmenin önünde yer alır. Sülükler tatlı su ortamlarında, akarsularda, göl ve göletlerde yaşamaktadırlar. Suyun içinde dalgalanma hareketi yaparak serbestçe yüzebilirler. Posterior çekmenlerini sabitleyip anterior çekmenlerini serbest bırakıp

vücutlarını sağa, sola, öne ve geriye doğru titreterek bu dalgalanma hareketlerini yaparlar [73].

Sülükler, vücut sıcaklıkları çevre koşullarına bağlı olarak değişen poikiloterm canlılardır. 0°C ile 30°C arasındaki sıcaklık aralığında rahatlıkla hayatta kalabilirler, ancak ani sıcaklık değişiklikleri bu canlılar için stres oluşturabilir ve ölümüne neden olabilir. Su içinde bulunan klor gibi zararlı maddeler, düşük konsantrasyonlarda bile sülüklerin ölümüne yol açabilir [74].

Sülükler, üç farklı hareket türü gerçekleştirir: sürünme, yüzme ve dalgalanma. Sürünme hareketinde, posterior çekmen zemine sıkıca tutunur, ardından anterior çekmen serbest bırakılarak en uzağa kadar uzanır ve zemine yapışır. Sonra posterior segment serbest bırakılarak anterior çekmenin yakınlarına kadar çekilir ve yapıştırılır. Bu işlem tekrarlanarak sülük hareket eder. Yüzme hareketi, dorso-ventral şekilde vücut dalgalanması ile yapılır. Bu hareket, sülüğün boyuna kaslarının gelişimiyle mümkün olur. Dalgalanma hareketi ise, posterior çekmen bir noktaya sabitlenip anterior çekmen serbest bırakılarak, vücut su içinde ileri geri ve sağa sola titretilecek şekilde gerçekleştirilir [73].

Sülüklerin sinir sistemleri, vücut yapılarına özgü iletim yollarına sahiptir. Sinir düğümlerinde bulunan hücre gövdeleri, farklı foliküller içinde gruplar halinde düzenlenmiştir. Her ganglion, altı folikül meydana getirir. Sülüklerin vücudunda, özellikle beşinci ve altıncı segmentlerde, geniş bir gangliyonik sinir ağı bulunur. Bu ağ, halka şeklinde düzenlenmiş olup beyin olarak adlandırılır ve farinks (yutak) ile hortumu çevreler. Ayrıca, faringeal halka ve diğer Annelid'lerin subfaringeal ganglionları ile ilk üç ya da dördüncü segmentin ganglionları, posterior yönde ilerler. İki ventral sinir şeridi bulursa da segmental ganglia çiftleri birleşerek kaynaşır. Bu merkezi sinir sisteminin yanı sıra, periferik ve sempatik sinir sistemleri de bulunur [73].

Sülükler, hermafrodit özellik gösterirler. Ancak, kendi kendilerini dölleme yetenekleri bulunmamaktadır [71].

Sülükler, hem dişi hem de erkek üreme organlarına sahip olmaları nedeniyle çift genital açıklığa sahiptirler. Erkek genital açıklığı, dişi genital açıklığından biraz daha büyüktür.

Erkek genital açıklığı 11. segmentin b5/b6 halkaları arasında yer alırken, dişi genital açıklığı ise 12. segmentin b5/b6 halkaları arasında bulunur [71].

2.4.1. Tıbbi sülük tedavisinin tarihçesi

Sülükler, Annelida filumunun Hirudinea sınıfında yer alan, hem kan emerek hem de avcı (predatör) olarak beslenen ve yaklaşık 650'den fazla türü bulunan canlılardır [68]. “Hirudo” kelimesi Latince'de “sülük (leech)” anlamına gelmektedir. “Sülük” sözcüğü ise etimolojik olarak Latince kökenli olmayıp, eski Anglo-Saksonca “laece” kelimesinden türemiştir ve bu kelime “iyileştirmek” anlamına gelirken, zamanla “hekim” ile eş anlamlı şekilde kullanılmıştır [11, 75].

Sülükler, çok eski dönemlerden beri çeşitli hastalıkların tedavisinde kullanılmaktadır [9].

Tedavi amacıyla sülüklerin ya da sülük kaynaklı ürünlerin kullanımına Latince’de “hirudoterapi”, İngilizcede ise “leech therapy” denilmektedir [76].

Hirudoterapi, omurgasızların insan hastalıklarının tedavisinde kullanımına dair birkaç örnekten biri olarak kabul edilmektedir [71].

Tedavi edici özellikleri ile bilinen birkaç sülük türü mevcuttur ve bu türler arasında *Hirudo medicinalis* ile *Hirudo verbana* en yaygın kullanılanlardandır [77].

Macrobdella decora (Kuzey Amerika tıbbi sülüğü), *Hirudinaria manillensis* (Asya tıbbi sülüğü), *Hirudo troctina* ve *Hirudo orientalis* gibi bazı sülük türleri de tedavi amacıyla kullanılabilir. Tıbbi uygulamalarda *Hirudo* cinsine ait tüm türlerin potansiyelinden yararlanılabileceği düşünülmekle birlikte, Türkiye’de şimdiye kadar tespit edilen tıbbi sülük türleri *Hirudo sulukii*, *Hirudo verbana* ve *Hirudo medicinalis*’tir. Bunun yanında, ülkemizde görülen diğer bir tür olan *Limnatis nilotica* hakkında tıbbi kullanıma ilişkin yeterli veri henüz mevcut değildir [70, 78].

Tedavi amacıyla tıbbi sülüklerden yararlanılması, oldukça eski dönemlere dayanan bir uygulamadır [79]. Tıbbi sülük tedavisinin tam olarak ne zaman başladığına dair kesin bulgular bulunmamakla birlikte, M.Ö. 1400’lü yıllarda Antik Mısır’da kullanıldığına inanılmaktadır. M.Ö. 15. yüzyıla ait Babil kaynaklarında yazılı olarak, 14. yüzyıldan kalma

Mısır duvar resimlerinde ise görsel olarak sülûkle tedavi uygulamalarına yer verildiği görülmektedir [80]. Sülûğün tıbbi amaçlarla kullanımına dair ifadeler, Talmud, İncil ve çeşitli Yahudi el yazmalarında yer verilmiştir [81].

Sülûğün tedavi amaçlı kullanımı, Hindu mitolojisini anlatan eski bir Sanskritçe yazılı kaynakta da yer almaktadır. M.Ö. 600-100 yılları arasında oluşturulan klasik Hint tıp literatüründe ise sülûk tedavisine dair ayrıntılı bilgilere ulaşılmaktadır. Bu uygulamanın, Mezopotamya, Yunan, Maya ve Aztek uygarlıkları ile birlikte Antik Hindistan, Roma ve Arap kültürlerinde de kullanıldığı bilinmektedir. M.Ö. 200-130 yılları arasında yaşamış olan Yunan hekimi Colophon'lu Nicander, bir şiirinde sülûğün tıbbi kullanımına değinmiştir. Romalılar, 1. yüzyılda sülûğü tanımlamak için “Hirudo” terimini kullanmışlardır. 1754 yılında ise İsveçli hekim ve zoolog Linnaeus, tıbbi kullanım için yetiştirilen sülûk türlerine “Hirudo medicinalis” adını vermiştir [82, 83].

Milattan sonra dönemlerde sülûklerin kan alma amacıyla kullanımı oldukça yaygınlaşmış ve bu uygulama dünyanın birçok bölgesinde benimsenmiştir. Antik Yunan hekimleri sülûkleri özellikle kan alma işlemlerinde; romatizmal rahatsızlıklar, gut hastalığı, ateşli enfeksiyonlar ve iştihâ problemleri gibi çeşitli sağlık sorunlarının tedavisinde kullanmışlardır. Bu kullanım, Galen'in (130–201 M.S.) ve Hipokrat'ın (M.Ö. 460–370) görüşlerinden hareketle geliştirilen, vücuttaki dört temel sıvının (kan, balgam, sarı safra, kara safra) dengesizliğinin hastalıklara yol açtığı anlayışına dayanmaktadır. Galen, sülûk aracılığıyla kandan bir miktar alınmasının bu sıvı dengesini yeniden sağladığını ve dolayısıyla hastalık belirtilerinin hafiflediğini savunmuştur. Hirudoterapiyi inflamatuvar hastalıklardan ruhsal bozukluklara, hemoroid gibi çeşitli rahatsızlıklara kadar geniş bir yelpazede tavsiye etmiştir. Öte yandan Suriyeli hekim Laodice, hastalıkların kaynağını kötü ruhlarla bağlamış ve sülûkle yapılan kan alma uygulamasıyla bu ruhların vücuttan uzaklaştırılabileceğine inanmıştır [84].

Milattan sonraki ilk yüzyılın ortalarında yaygınlaşan pnömotik teoriye göre, vücutta çürüme (putrefaction) ve aşırı kan birikimi (plethora) sonucu ortaya çıkan hastalıkların tedavisinde sülûkler birincil tedavi yöntemi olarak kullanılmıştır. İbn-i Sînâ (980–1037), ünlü İslam hekimi olarak “El Kanun Fi't Tıb” (Tıbbın Kanunu) adlı eserinde, gangren, lepra, mantar enfeksiyonları ve yılan zehirlenmesi gibi çeşitli hastalıklarda sülûk kullanımına değinmiştir. Bu eser, 18. yüzyıla kadar birçok Avrupa üniversitesinde tıp eğitimi kapsamında okutulmuştur. İbn-i Sînâ, hacamatla ulaşılamayan derin damar bölgelerindeki kanın sülûk

yardımıyla çekilebildiğini ifade etmiş ve deri hastalıklarının tedavisinde sülük uygulamasını önermiştir. Ayrıca, baş kısmı iri olan; koyu siyah, yeşil ya da mavi renk tonlarında çizgilere sahip, tüylerle kaplı, yılan balığını andıran ve bukalemuna benzer şekilde renk değiştiren türlerin tıbbi amaçla kullanılmaması gerektiğini vurgulamıştır.

12. yüzyılda Abdullâtif el-Bağdadi, cerrahi müdahaleler sonrasında faydalı sülük uygulamalarına dair bilgilerini kitabında aktarmıştır. Ayrıca, İbn-i Maseeh (1233-1286 M.S.) "Umda Fi Jarahat" adlı eserinde, tıbbi sülüklerin, zehirli olanlardan renk ve şekil açısından nasıl ayırt edilebileceğine dair açıklamalarda bulunmuştur [85].

Eski Avrupa’da sülükler, ateşli hastalıklar, baş ağrıları, gut hastalığı, bel ve bacak ağrıları, artritler, sindirim sistemi sorunları, karaciğer ve dalak hastalıkları, psikoz, epilepsi ve kulak rahatsızlıkları gibi pek çok rahatsızlığın tedavisinde kullanılmıştır. Avrupa’da 18. yüzyılda, hastalıklar iki ana başlık altında daralma (constriction) ve genişleme (dilatation) sınıflandırılmaktaydı. Daralma belirtileri gösteren hastalıklar, yani sertleşme, şişme, gerilme, kızarıklık ve kramp gibi semptomların eşlik ettiği hastalıklar için sülük tedavisi yaygın şekilde uygulanıyordu. Bu dönemde Avrupa’da sülük uygulamaları, obezite ve pnömoni gibi hastalıkların tedavisinde yaygın olarak kullanılmış ve bazı vakalarda önleyici amaçla da uygulanabilmiştir.

19. yüzyılın başlarında, sülük tedavisinin pek çok hastalıkta yaygın olarak kullanılması, İngiltere ve Avrupa Kıtasında tıbbi sülüklerin sayılarının tükenme tehlikesine girmesine neden olmuştur [84, 86].

1939 yılında yayımlanan bir Almanca makalede, sülükler hakkında Almanca başta olmak üzere 2500’ün üzerinde bilimsel makalenin yayımlandığı belirtilmiştir [87].

1800’lerin sonları ile 1900’lerin başlarında sülük biyolojisi üzerine Almanca olarak yazılmış pek çok değerli kitap arşivlerde yer almaktadır. Aynı dönemde Osmanlı Devleti’nde de sülük, tedavi amaçlı yaygın bir şekilde kullanılmıştır [73]. Ancak 19. yüzyılın sonlarına doğru antibakteriyel tedavilerin gelişmesiyle birlikte sülük tedavisi geriye düşmüş ve birçok ülkede bu tedavi, sahtekârlık olarak kabul edilmeye başlanmıştır [88]. 20. yüzyılın başlarında tıptaki gelişmelerin hızlanmasıyla birlikte, sülük tedavisinin modern tıbbın ihtiyaçlarını karşılamadığı düşünülerek büyük ölçüde terk edilmiştir [84]. Buna ek olarak,

bilimsel ilgi, Haykraft'ın ilk kez tanımladığı ve “hirudin” olarak adlandırdığı sülük tükürüğündeki antikoagulan maddeyle tekrar canlanmıştır [89]. Daha sonra, Markwardt antitrombin aktivitesini tanımlamıştır [90]. Bir diğer hekim ise, koroner trombozun tedavisinde sülük kullanımının yararlı olabileceğine dair görüş bildirmiştir [91]. Ambroise Paré (1510–1590), Rönesans'ın önde gelen cerrahlarından biri olarak, “Oeuvres” adlı eserinde sülük tedavisine ayrılmış özel bir bölüm sunmuştur. Zürihli doğa bilimci Conrad Gessner, 16. yüzyıl ortalarında tıbbi sülükleri detaylı biçimde ele alarak, bunların sağlık alanındaki uygulamalarına vurgu yapmıştır. 17. yüzyıla gelindiğinde ise Gerome Negrisoni, jinekolojik rahatsızlıkların tedavisinde sülük uygulamasına ilişkin bir çalışma yayımlamıştır [91]. 1960 yılından itibaren, flep ve replantasyon ameliyatlarının yaygınlaşmasıyla birlikte plastik cerrahi alanında sülük uygulamaları yeniden gündeme gelmiş ve bu tedavi yöntemi eski değerini kazanmaya başlamıştır [92].

Son çeyrek yüzyılda, rekonstrüktif mikrocerrahi alanında sülüklerin tedavi amacıyla kullanımı artış göstermiştir. Günümüzde, tıbbi sülükler özellikle dolaşım problemleri bulunan replantasyon ve fleplerde tercih edilmektedir. Ayrıca 21. yüzyılda Almanya ve Rusya'da gerçekleştirilen çeşitli klinik araştırmalarda, ağrılı osteoartrit vakalarında sülük tedavisinin olumlu etkilerine dikkat çekilmiştir [88].

Türkiye, dünyada tıbbi sülük ihracatında önde gelen ülkelerden biridir. Avrupa'da gerçekleştirilen tedavilerde kullanılan sülüklerin önemli bir kısmı Türkiye kaynaklıdır. Bu durum, Avrupa'da yapılan çeşitli bilimsel çalışmalarda ve yayınlanan kitaplarda açıkça belirtilmektedir [93, 94].

1981 yılında, tıbbi sülük araştırmalarını ilerletmek amacıyla bir vakıf kurulmuş ve bu alandaki bilimsel çalışmalar Amerikalı biyolog Roy T. Sawyer öncülüğünde geliştirilmiştir [84].

Günümüzde bazı cerrahlar, venöz konjesyon durumlarında kanın uzaklaştırılmasını sağlamak amacıyla “mekanik sülük” olarak adlandırılan yapay bir cihaz geliştirmiştir. Bu prototipin, hastalar tarafından daha kolay kabul edilebildiği ve kullanım açısından daha elverişli olduğu öne sürülmüştür [95, 96].

19. yüzyılın başlarında, sülük tedavisinin pek çok hastalıkta yaygın olarak kullanılması, İngiltere ve Avrupa Kıtasında tıbbi sülüklerin sayılarının tükenme tehlikesine girmesine neden olmuştur [84, 86].

1939 yılında yayımlanan bir Almanca makalede, sülükler hakkında Almanca başta olmak üzere 2500'ün üzerinde bilimsel makalenin yayımlandığı belirtilmiştir [87].

1800'lerin sonları ile 1900'lerin başlarında sülük biyolojisi üzerine Almanca olarak yazılmış pek çok değerli kitap arşivlerde yer almaktadır. Aynı dönemde Osmanlı Devleti'nde de sülük, tedavi amaçlı yaygın bir şekilde kullanılmıştır [73]. Ancak 19. yüzyılın sonlarına doğru antibakteriyel tedavilerin gelişmesiyle birlikte sülük tedavisi geriye düşmüş ve birçok ülkede bu tedavi, sahtekârlık olarak kabul edilmeye başlanmıştır [88]. 20. yüzyılın başlarında tıptaki gelişmelerin hızlanmasıyla birlikte, sülük tedavisinin modern tıbbın ihtiyaçlarını karşılamadığı düşünüülerek büyük ölçüde terk edilmiştir [84].

Uzun bir durgunluk sürecinin ardından, 20. yüzyılın ortalarında sülük tedavisi; cerrahi ve rekonstrüktif işlemler, damar hastalıkları, artrit ve migren gibi çeşitli sağlık sorunlarının tedavisinde yeniden ilgi görmeye başlamıştır [85].

Sülük tedavisinin yeni kullanım alanlarının ortaya çıkması, salyasındaki biyolojik bileşenlerin ayrıştırılarak incelenmesine olan ilgiyi artırmıştır [97]. Amerikan Gıda ve İlaç Dairesi (FDA), 2004 yılında sülüğün sağlık alanında kullanımına resmi onay vermiştir [85]. Sülük tedavisinin iki ana faktöre dayandığı düşünülmektedir. İlk olarak, sülük konağı ısırığında, tükürük bezlerinde bulunan maddeleri yaraya salmaktadır. İkinci olarak ise, bu sekresyonların bir kısmı, sülüğün emdiği kanla birleşerek sıvı halde tutulur [98]. Popülasyonu aşırı tıbbi kullanımdan dolayı tehlikeye giren *Hirudo medicinalis*, Washington Yasası Ek II'ye eklenmiş ve uluslararası düzeyde CITES sözleşmesi ile korunmaya alınmıştır [9].

2.4.2. Tıbbi sülük salgısının bileşenleri ve özellikleri

Bir yetişkin sülük, tek bir beslenme sırasında ortalama 5 ile 15 ml arasında kan alabilir. Bu miktar sülüğün vücut ağırlığının yaklaşık on katına denk gelir [99]. Tıbbi sülüğün salgısında, 100'den fazla biyoaktif bileşik yer almaktadır. Bu bileşikler; anti-enflamatuvar, anti-

mikrobiyal, anti-koagulan, anti-platelet ve analjezik gibi çeşitli etkiler sergileyebilmektedir, (çizelge 2.5). Ayrıca, sülüğün ısırdığı bölgedeki kan akışını artırır ve hücre dışı matriksin parçalanmasına yol açar [100]. Sülükler, kan emme işlemi sırasında tuttıkları yüzeye, biyolojik ve farmakolojik açıdan pek çok önemli etkisi bulunan bu biyoaktif bileşiklerin oluşturduğu karmaşık bir karışım salgırlar [72]. Hirudoterapi, sülüklerin kan emerken, içinde çeşitli biyoaktif bileşenler bulunan bir salgıyı dolaşıma enjekte etmeleriyle etki gösterir [75].

Çizelge 2.5. Sülük salgısında bulunan bazı biyoaktif maddeler

Etki Yolu	Biyoaktif Bileşik
Anti-koagulan Etkiler	Hirudin Destabilaz Gelin Faktör Xa İnhibitörü
Anti-Mikrobiyal Etkiler	Kloromisetin
Anti-Platelet Etkiler	Calin Apiraz Saratin
Analjezik ve Anti Enflamatuvar Etkiler	Guamerin Piguamerin Hirustasin Bdellinler Eglinler LDTI (Sülük Türevi Triptaz İnhibitörü I) LCI (Sülük Karboksipeptidaz İnhibitörü)
Hücre Dışı Matris Degredasyonu	Kollajenaz Hyaluronidaz
Kan Akışı Üzerine Etkiler	Histamin-Benzeri Maddeler Asetilkolin

Anti-koagulan etkiler

Hirudin

Hirudin, tıbbi sülüklerin salgısında bulunan en bilinen biyoaktif bileşendir. Trombine bağlanarak, trombin aktivitesini engelleyen bir kompleks meydana getirir. Bu, kanın pıhtılaşmasını önleyerek, dolaşımın devam etmesine yardımcı olur [99, 101].

Destabilaz

Destabilaz, stabilize fibrinin çözülmesine neden olur. Kan pıhtılarını eritebilen lizozim bir enzimdir [102].

Gelin

Gelin, *Hirudinaria manillensis* türü sülüklerin salgısından izole edilir. Bu salgı, α -kimotripsin, kimaz, subtilisin, nötrofil proteinazlar, elastaz ve katepsin G enzimlerini inhibe eder [99].

Faktör xa inhibitörü

Faktör Xa İnhibitörü, *Hirudo medicinalis* türü sülüklerin salgısından izole edilmiştir. Pıhtılaşma kaskadında görev alan Faktör Xa'yı inhibe ederek antikoagülan etki sağlar [103].

Anti-mikrobiyal etkiler

Kloromisetin

Kloromisetin, bakteriyel hücre duvarını parçalayıcı etkisi nedeniyle anti-mikrobiyal etki gösterir [104].

Anti-platelet etkiler

Calin

Calin, kollajen üzerinde oldukça hızlı bir etki gösterir. Trombosit agregasyonunu inhibe eden bir maddedir ve von Willebrand faktörünün kollajene bağlanmasını engelleyerek kanın pıhtılaşmasını önler [105].

Apiraz

Apiraz, *Hirudo medicinalis* türü sülüklerin salgısından izole edilmiştir. Adenozin 5'difosfat, araşidonik asit, trombosit aktive edici faktör (PAF) ve epinefrin üzerindeki etkisi ile trombosit agregasyonunu inhibe eden bir moleküldür [100].

Saratin

Saratin, α_2 integrin alt biriminin I bölgesinin kollajene bağlanmasını engeller [106].

Analjezik ve anti enflamatuvar etkiler

Guamerin

Guamerin, *Hirudo nipponia* türü sülüklerin salgısından izole edilmiştir. Özellikle lökosit elastazını inhibe eder [107].

Piguamerin

Piguamerin, kallikrein ve tripsini güçlü bir şekilde inhibe eder [108].

Hirustasin

Hirustasin, *Hirudo medicinalis* türü sülüklerden salgılanan maddelerden izole edilmiştir. Doku kallikreini, tripsin, kimotripsin ve katepsin G enzimlerini baskılar ve reperfüzyon sürecini hızlandırır [98].

Bdellinler

Kanama süresini uzatma ve anti-enflamatuvar etki gösterme işlevinde, tripsin, plazmin ve akrosini inhibe eder [109].

Eglinler

Serin proteinazlar olan kimotripsin ve subtilisine karşı etkili bir inhibitör aktivitesi gösterir. Alfa-kimotripsin, kimaz, elastaz ve katepsin G'ye karşı inhibitör bir etkiye neden olur. Ayrıca anti-enflamatuvar özellikte gösterirler [99].

LDTI (Sülük türevi triptaz inhibitörü I)

LDTI (Sülük Kaynaklı Triptaz İnhibitörü I), aktif triptaz merkezlerine bağlanarak triptazın aktivitesini engeller [69].

LCI (Sülük karboksipeptidaz inhibitörü)

LCI (Sülük Karboksipeptidaz İnhibitörü), *Hirudo medicinalis* türü sülüklerin salgısından izole edilmiştir. Sistein açısından zengin, 66 amino asitlik bir polipeptittir. Kallikrein-kinin yolağı üzerine etkili olduğu düşünülmektedir [110, 111].

Hücre dışı matris degradasyonu

Kollajenaz

Kollajenaz, kollajenin yıkımından sorumlu bir enzimdir. Pıhtılaşma sürecinde yapışma ve platelet agregasyon reaksiyonlarını başlatan kollajen partiküllerini parçalar. Skar dokuda fibroblast oluşumunu azaltır [112].

Hyalüronidaz

Hyalüronidaz, ekstrasellüler matriksin yapısında bulunan hyalüronik asidin endoglukuronid bağlarını yıkar. Sülük salgılarındaki analjezik ve antikoagülan maddelerin penetrasyonunu ve difüzyonunu kolaylaştırmak için viskoziteyi düşürür [113].

Kan akışı üzerine etkiler

Histamin-benzeri maddeler

Histamin-Benzeri Maddeler, vazodilatör bir etki göstererek ısırık bölgesinde kan akımının artmasına neden olurlar [99].

Asetilkolin

Isırık bölgesinde kan akışını artırarak dolaşımın sürekliliğini sağlar [99].

2.4.3. Tıbbi sülük tedavisinin endikasyonları

Birçok ülkede tıbbi sülük tedavisi, hastalıkların tedavisinde tamamlayıcı ve destekleyici bir yöntem olarak kullanılmaktadır. Türkiye'de ise, Sağlık Bakanlığı'nın denetiminde ve Tarım

ve Orman Bakanlığı tarafından onaylanan tıbbi sülük çiftliklerinden temin edilen sülükler, ilgili sağlık personelleri ve doktorlar tarafından tedavi merkezlerinde kullanılmak üzere tıbbi amaçlı uygulanabilmektedir [114].

Literatürdeki farklı endikasyonlarda uygulanan tıbbi sülük tedavileri aşağıda verilmiştir:

İnflamasyon: Tıbbi sülük salgısı, içerdiği biyoaktif bileşikler sayesinde anti-enflamatuar etkiler gösterir. Bu özellik, sülüklerin inflamatuvar hastalıkların tedavisinde yaygın olarak kullanılmalarını sağlamaktadır [115].

Tromboz ve Flebit: Sülüklerin tükürüğünde bulunan anti-koagülan özellikler, kanın pıhtılaşmasını engelleyerek tromboz riskini azaltmaya yardımcı olabilir. Ayrıca, sülüklerin kan emme işlemi, venöz dolaşımı artırarak flebitin iyileşmesine katkı sağlayabilir [115].

Kutanöz Leishmaniasis: Kutanöz leishmaniasis, parazitlerin yol açtığı bir deri hastalığıdır. Sülüklerin salgıları, bu hastalığın belirtilerini hafifletmeye yardımcı olabilir [115].

Varis: Sülük tedavisi, etki mekanizmaları sayesinde venöz kan akışını artırarak, varisli damarlar içinde biriken kanın azalmasına yardımcı olmaktadır [116].

Diyabetik Ayak Ülseri ve Kronik İyileşmeyen Yaralar: Diyabetik ayak yaraları, genellikle dolaşım bozukluklarından kaynaklanır. Sülüklerin kan emme işlemi sırasında salgıladıkları anti-koagülan ve damar genişletici bileşikler, bölgedeki kan akışını artırarak yaranın iyileşmesini hızlandırabilir [117].

Migren: Sülüklerin bazı vakalarda baş bölgesine yerleştirilerek migren ataklarının sayısını ve şiddetini düşürdüğü gözlemlenmiştir. Bu, sülüklerin kan emerken salgıladıkları maddelerin migren semptomlarını hafifletme potansiyeline sahip olduğu fikrine dayanmaktadır [118].

Ağrı: Sülükler, konaklarından kan emerken salgıladıkları analjezik özelliklere sahip bileşikler sayesinde ağrıyı azaltabilirler. Bu özelliklerinden dolayı, farklı bölgelerde ağrılı alanlarda tedavi amacıyla kullanılmaktadırlar [119].

2.4.6. Tıbbi sülük tedavisinin komplikasyonları

Tıbbi sülük tedavisi, doğal ve genellikle düşük maliyetli bir destekleyici tedavi yöntemidir. Yan etkileri nadir olsa da, dikkate alınması gereken bazı ciddi durumlar bulunmaktadır. Bu sebeple, tıbbi sülük tedavisinin her bireye uygulanması uygun olmayabilir [69].

Tıbbi sülük tedavisinin yan etkileri genellikle bakteriyel enfeksiyonlar, alerjik reaksiyonlar ve kanama gibi durumları içerir. Bu tedavi sırasında bazı komplikasyonlar gelişebilir. Sülüklerin sindirim sistemlerinde bulunan bakteriler, zatürre, sepsis veya gastroenterit gibi hastalıkları tetikleyebilir. Araştırmalar, antibiyotik tedavisi uygulanmadan sülük kullanımının %20 oranında bakteriyel enfeksiyonlara yol açabileceğini göstermektedir [70].

Yapılan araştırmalar, sülük tedavisi sırasında kanamaların ciddi ve aşırı olabileceğini ortaya koymaktadır. Özellikle hirudin ve histamin benzeri bileşiklerin, uzun süreli kanamalara yol açabileceği bildirilmiştir [120].

Sülük tedavisi uygulandıktan sonra, sülüğün ısırıldığı bölgede görülen ve yaklaşık 5 dakika sürebilen ağrı, tedavi edilen kişide farklı şekillerde hissedilebilir. Başlangıçta sülüğün ısırığı sonucu hissedilen ağrı, analjezik etkiler nedeniyle yavaşça azalır. Sülük ısırığının şiddeti kişiden kişiye değişir. Ağrıyı değerlendirme ve ölçme konusundaki sübjektif yaklaşımlar, genellikle "neredeyse fark edilmeyen", "hafif" ve "eşek arısı sokması gibi" (çok nadiren şiddetli) olarak çeşitlenir. Bir kişinin sülüğe ne kadar dikkat ettiği, ağrı algısını etkileyebilir. Ayrıca, ağrının hissedilme derecesi, kişinin karakteri ve tedaviye yönelik tutumunun yanı sıra, sülüğün çene büyüklüğü, ısırığın şiddeti, emme yoğunluğu ve tükürük miktarı ve bileşimi gibi faktörlere de bağlıdır. Tıbbi sülük tedavisinin yan etkileri arasında lokal kaşıntı, düşük kan basıncı, vazovagal ataklar, kan kaybı, yara iyileşme problemleri, enfeksiyonlar, alerjik reaksiyonlar, sepsis, bulaşıcı hastalık riski, yara izleri ve sülüğün hareket etmesi gibi komplikasyonlar yer almaktadır [114].



3. GEREÇ VE YÖNTEMLER

Bu tez çalışması in vivo koşullar altında yapılmış deneysel bir çalışma olup, deneyler Özel NESA Deney Hayvanları Laboratuvarı ve Gazi Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Biyokimya Anabilim Dalı Laboratuvarlarında gerçekleştirildi.

3.1. Deney Hayvanlarının Temini ve Laboratuvar Koşulları

Çalışmada, ağırlıkları 250 ± 30 gr arasında değişen 24 adet dişi Wistar Albino (*Rattus norvegicus*) rat kullanıldı. Hayvan deneyleri, Gazi Üniversitesi Hayvan Araştırmaları Etik Kurulu tarafından G.Ü.ET-25.017 kod numarası ile alınmış olan etik kurul onayı ile; “Laboratuvar Hayvanlarının Bakımı ve Kullanımı Yönergelerine” uygun olarak yapıldı. Laboratuvarda rahat üretilmeleri, sakin olmaları ve literatürde ekstremite iskemi-reperfüzyon modellerinde kullanılmaları nedeniyle memeli bir hayvan olan ratlar tercih edildi. Ratlar her biri rastgele seçilmiş 6 rattan oluşan 4 gruba ayrıldı. Tüm ratlar çalışma başlangıcına kadar 12 saat aydınlık, 12 saat karanlık döngüye sahip bir ortamda, ortam sıcaklığı $22 \text{ }^{\circ}\text{C} \pm 4 \text{ }^{\circ}\text{C}$ ve nem oranı $\% 47 \pm 5$ olacak şekilde standart rat kafeslerde barındırılarak ortama uyumları sağlandı. Ratların laboratuvar koşullarına uyumu sınırsız miktarda standart ticari pellet yem ve içme suyu ile ad libitum olarak sağlandı.

3.2. Cerrahi Yöntem

Deneysel uygulama sırasında standart cerrahi prosedürler ve sterilizasyon kurallarına uyulmaya özen gösterilmiştir. Cerrahi prosedürün ve deneysel iskemi modelinin oluşturulmasına ilişkin basamaklar aşağıda sunulmuştur:

Ratlara ksilazin hidroklorür (5 mg/kg) ve ketamin hidroklorür (50 mg/kg) intraperitoneal (i.p.) yolla verilerek genel anestezi uygun şartlarda gerçekleştirildi.

Ratlar supin pozisyona getirildi ve ratların sağ kasık bölgesi traş edildi. Ardından traş edilen bölge povidon iodin ile temizlenip antisepsi oluşturuldu.

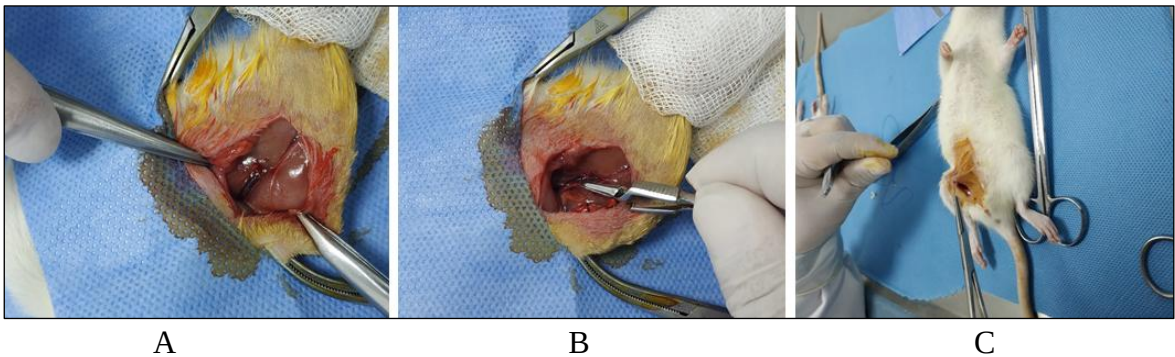
Her bir ratın kasık bölgesinde, kasık kıvrım çizgisi boyunca yaklaşık iki cm'lik oblik bir insizyon yapıldı. Ardından cilt ve cilt altı dokular geçilerek femoral damar ve sinir paketini örten yağ dokusu uzaklaştırıldı.

Femoral damar-sinir paketi açığa çıkarıldıktan sonra, femoral arter dikkatli bir şekilde femoral ven ve sinirden disseke edilerek ayrıldı. Ayrılma işlemini takiben, femoral arter üzerine atravmatik bir vasküler klemp uygulanarak sağ alt ekstremitede iki saat süreyle iskemi oluşturuldu. İskemi süresince dokuların dehidrasyonunu önlemek amacıyla belirli aralıklarla serum fizyolojik ile nemlendirme sağlandı.

İkinci saatin sonunda vasküler klemp kaldırıldı ve cilt uygun şekilde basit dikiş ile kapatıldı.



Resim 3.1. Deneysel aşamada kullanılan malzemeler

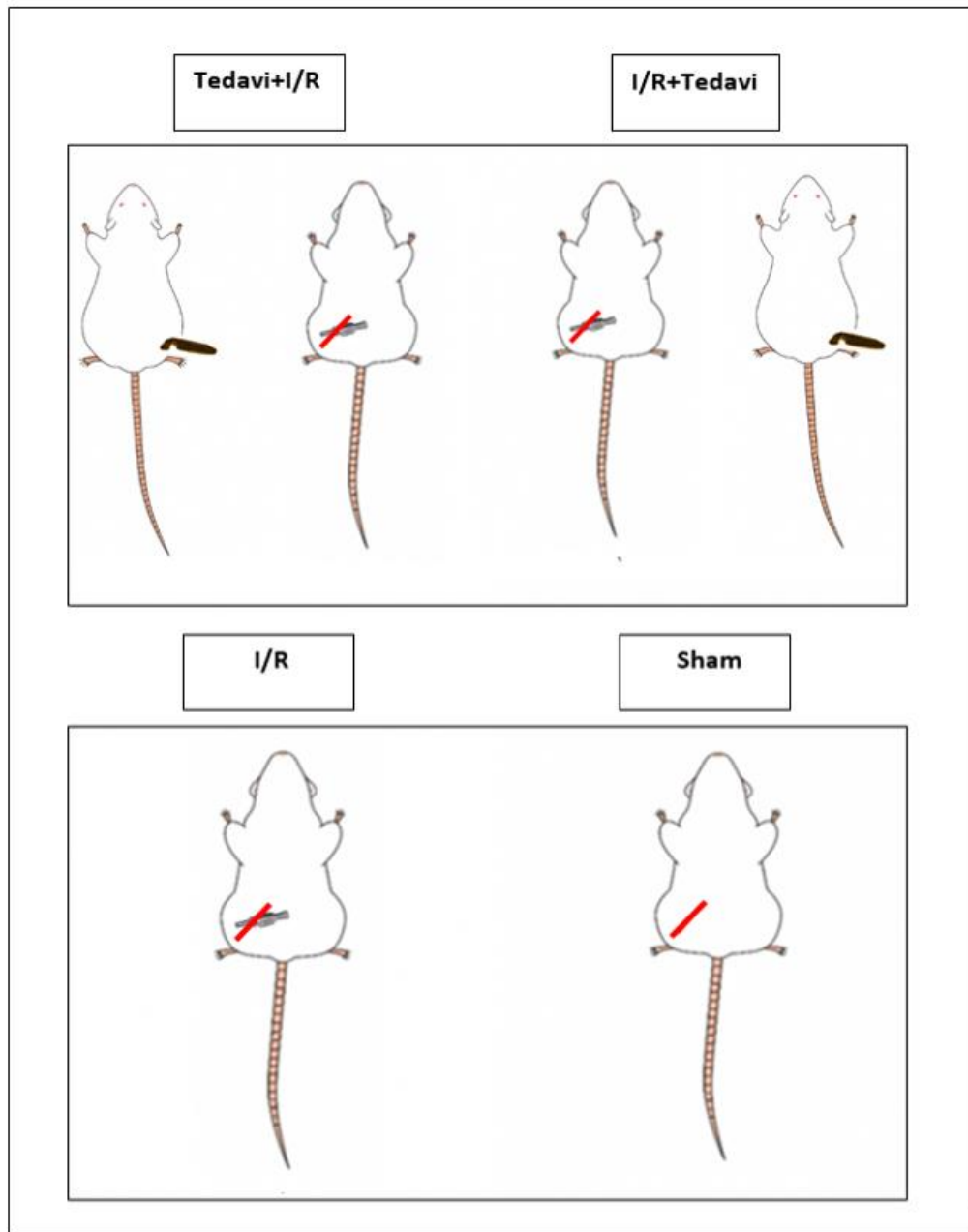


Resim 3.2. Deneysel aşamalarını gösteren resimler, A: Femoral damar sinir paketinin görülmesi, B: Femoral arterin klemplenmesi, C: Basit dikiş ile sağ alt ekstremité insizyonunun kapatılması

3.3. Deney Grupları

Deney grupları aşağıdaki şekilde belirlendi:

- Tıbbi Sülük Uygulaması-İskemi/Reperfüzyon (Tedavi+I/R), n=6
- İskemi/Reperfüzyon-Tıbbi Sülük Uygulaması (I/R+Tedavi), n=6
- Alt Ekstremité İskemi/Reperfüzyon Modeli (I/R), n=6
- Sham Grubu, n=6



Şekil 3.2. Deney grupları

Tedavi+I/R

Bu gruptaki ratlara Tıbbi Sülük uygulamasının ardından alt ekstremitte iskemi-reperfüzyon gerçekleştirildi. Gastroknemius kası üzerine her rata birer adet olmak üzere anestezi altında tıbbi sülük uygulaması yapıldı. Tıbbi sülük uygulamasının hemen ardından ratların sağ kasık bölgesi traş edildi. Her bir ratın kasık bölgesinde, kasık kıvrım çizgisi boyunca yaklaşık iki cm'lik oblik bir insizyon yapıldı. Ardından cilt ve cilt altı dokular geçilerek femoral damar ve sinir paketini örten yağ dokusu uzaklaştırıldı. Femoral arter, atravmatik mikrovasküler klemp ile oklude edilerek 2 saat iskemi periyodu oluşturuldu. İskemi süresince dokular kurumamanın engellenmesi için belirli aralıklarla serum fizyolojik ile ıslatıldı. İskemi periyodu sonrasında klempin kaldırılması ile 24 saatlik reperfüzyon periyodu sağlandı. Ardından cilt uygun şekilde dikiş ile kapatıldı.

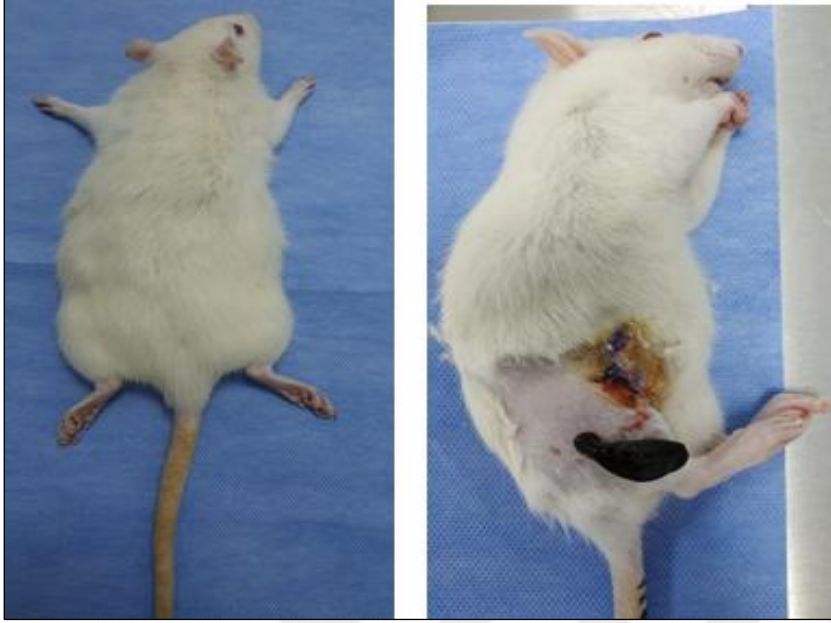


Resim 3.3. I/R öncesi sağ alt ekstremiteye tıbbi sülük uygulaması

I/R+Tedavi

Her bir ratın kasık bölgesinde, kasık kıvrım çizgisi boyunca yaklaşık iki cm'lik oblik bir insizyon yapıldı. Ardından cilt ve cilt altı dokular geçilerek femoral damar ve sinir paketini örten yağ dokusu uzaklaştırıldı. Femoral arter, atravmatik mikrovasküler klemp ile oklude edilerek 2 saat iskemi periyodu oluşturuldu. İskemi süresince dokular kurumamanın engellenmesi için belirli aralıklarla serum fizyolojik ile ıslatıldı. İskemi periyodu sonrasında klempin kaldırılması ile reperfüzyon periyodu sağlandı. Reperfüzyon süresinin başlaması ile gastroknemius kası üzerine her rata birer adet olmak üzere anestezi altında tıbbi sülük

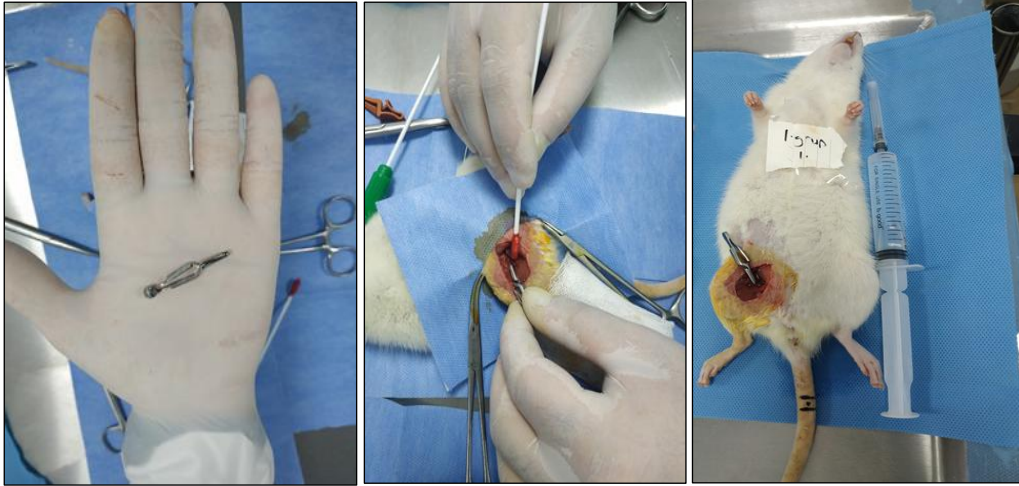
uygulaması yapıldı. 24 saatlik reperfüzyon periyodu sağlandı. Ardından cilt uygun şekilde dikiş ile kapatıldı.



Resim 3.4. I/R sonrası tıbbi sülük uygulaması

I/R

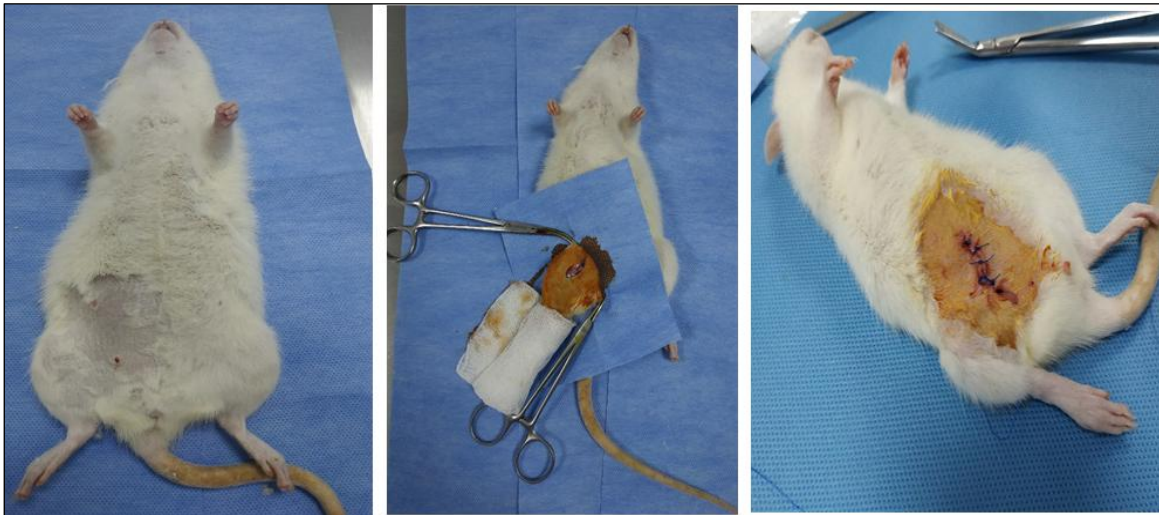
Her bir ratın kasık bölgesinde, kasık kıvrım çizgisi boyunca yaklaşık iki cm'lik oblik bir insizyon yapıldı. Ardından cilt ve cilt altı dokular geçilerek femoral damar ve sinir paketini örten yağ dokusu uzaklaştırıldı. Femoral arter, atravmatik mikrovasküler klemp ile oklude edilerek 2 saat iskemi periyodu oluşturuldu. İskemi süresince dokular kurumamanın engellenmesi için belirli aralıklarla serum fizyolojik ile ıslatıldı. İskemi periyodu sonrasında klempin kaldırılması ile reperfüzyon periyodu sağlandı. 24 saatlik reperfüzyon periyodu sağlandı. Ardından cilt uygun şekilde dikiş ile kapatıldı. Ardından cilt uygun şekilde dikiş ile kapatıldı.



Resim 3.5. Alt ekstremité I/R modeli

Sham grubu

Her bir ratın kasık bölgesinde, kasık kıvrım çizgisi boyunca yaklaşık iki cm'lik oblik bir insizyon yapıldı. Ardından cilt ve cilt altı dokular geçilerek femoral damar ve sinir paketini örten yağ dokusu uzaklaştırıldı. Bu gruptaki ratlara deneysel iskemi-reperfüzyon yapılmadı. Cilt uygun şekilde basit dikiş ile kapatıldıktan 24 saat sonra bu gruptaki tüm ratlara uygun ötanazi işlemi gerçekleştirildi.



Resim 3.6. Sham grubuna ait görsel

3.4. Tıbbi Sülüklerin Temini ve Tıbbi Sülük Uygulaması

Çalışmada Tarım ve Orman Bakanlığı tarafından uygunluk onayı alınmış, steril tıbbi sülük üretim çiftliğinden sağlanan tıbbi sülük türlerinden *Hirudo verbana* türleri “Kameralı Stereozoom Mikroskop” vasıtasıyla incelenerek tespit edildi. Sülükler, klor içermeyen suyla doldurulmuş ve iyi havalandırılan plastik kaplarda saklandı. Oda sıcaklığında tutulan plastik kaplardaki su, 2–3 günde bir değiştirilerek sülüklerin bakımları gerçekleştirildi.

Tedavi+I/R ve I/R+ Tedavi tıbbi sülük uygulaması yapılan gruplardır. Tedavi+I/R’de Tıbbi Sülük uygulamasının ardından 24 saat sonra ratlara alt ekstremité İskemi-Reperfüzyon gerçekleştirilmişken, I/R+Tedavi’de ratlara alt ekstremité I/R’sinin ardından 24 saat sonra Tıbbi Sülük uygulaması gerçekleştirildi. Her ratın gastroknemius kasına, ortalama 0,5 g ağırlığında bir adet küçük boy steril tıbbi sülük uygulandı (Resim 3.7.). Sülükler beslenmelerini tamamladıktan sonra (ortalama 0,5 mL kan emdi) uygulandıkları bölgeden kendiliğinden ayrıldı. Sülüklerin ağırlıkları, uygulama öncesi ve sonrası tartılarak kayıt altına alındı. Uygulamanın tamamlanmasının ardından tıbbi sülükler %10 etanol içeren solüsyon içerisinde tutularak imha edildi.



Resim 3.7. Deney aşamasında kullanılan tıbbi sülükler

3.5. Diseksiyon ve Doku Örneklerinin Alınması

Tüm deney gruplarındaki ratların deneysel prosedürlerinin bitmesinin ardından uygun şartlarda anestezi gerçekleştirildi. Deney hayvanları anesteziye alındıktan sonra, intrakardiyak yoldan kan alınarak ötanazi uygulandı. Kan örnekleri uygun tüplere aktarılmış ve 3000 rpm’de 15 dakika süreyle santrifüj edilerek ayrıştırılmıştır. Santrifüj sonrası kandan elde edilen serum örnekleri eppendorf tüplerine aktarıldı, ardından -80 °C’de muhafaza edildi. Gastrocnemius kas dokuları cerrahi olarak eksize edildi. Kas dokusu daha sonra ikiye bölünmüş ve bir kısmı, patolojik inceleme amacıyla %10’luk formaldehit içeren kaba konularak fikse edildi. Geriye kalan doku ise biyokimyasal analizler için sıvı azotta donduruldu ve -80 °C’de saklandı.

3.6. Dokuların Homojenizasyonu

Kas dokularından homojenat elde edebilmek amacıyla doku homojenizasyonu işlemi gerçekleştirildi.

Uygulama adımları aşağıda detaylandırılmıştır:

1. Kas dokusu, pH’sı 7.4 olan fosfat tamponlu tuz çözeltisi (PBS-Phosphate-Buffered Saline) ile yıkandı.
2. Fazla solüsyondan temizlenen kas dokusundan her bir örnek için 100 mg tartıldı ve üzerine 900 µL PBS ilave edildi.
3. Deney tüpüne aktarılan bu karışım, buz banyosu altında bıçaklı homojenizatör (Heidolph, SilentCrusher) kullanılarak homojenize edildi.
4. Homojenizatlar, 15 dakika buz üzerinde inkübe edildikten sonra +4 °C’de 3000 rpm’de 20 dakika süreyle santrifüj edildi (Nüve NF815). Santrifüj işlemi sonrasında süpernatant ivedi şekilde alikotlanarak analiz gününe kadar 20°C’de saklandı.

3.7. Biyokimyasal İşlemler

Doku homojenizasyonu ile elde edilen süpernatantlardan ve serum örneklerinden SOD, TNF- α , IL-6, NO, CGRP, GPx, IMA, HIF-1 α , CAT ve EDN-1 parametrelerinin konsantrasyon tespiti için sandwich test prensibine sahip ELISA yöntemi kullanıldı.

Bu çalışmada kullanılan SOD, TNF- α , IL-6, NO, CGRP, GPx, IMA, HIF-1 α , CAT ve EDN-1 parametrelerinin konsantrasyonlarının tespiti için aynı test prensibine ve basamaklara sahip ELISA kitleri kullanıldı. Bu çalışmada Sunred Marka Rat ELISA Araştırma Kitleri (Shanghai Sunred Biological Technology Co., Ltd, China) kullanıldı. EDN-1 parametresinin konsantrasyonunun tespiti için ise USCN marka Rat ELISA Araştırma kiti (Wuhan USCN Business Co., Ltd) kullanıldı.

Çalışma sırasında yıkama işlemleri mikropłaka yıkayıcı (Combiwash Human Diagnostic Worldwide, Almanya) ile ve absorbands okumaları 450 nm dalga boyunda mikropłate okuyucu (Elx800 UV Universal Microplate Reader, Bio-Tec. Instruments, INC) ile gerçekleştirildi.

Analizlerde kullanılan kitlerin detayları aşağıda verilmiştir:

1-Rat IL-6, Cat: 201-11-0136; Bu kitin alt ölçüm limiti 1,822 pg/ml; ölçüm aralığı 2-600 pg/ml; çalışma içi CV değeri < %9, çalışmalar arası CV değeri ise < %11'dir.

2-Rat SOD, Cat: 201-11-0169; Bu kitin alt ölçüm limiti 0,415 ng/ml; ölçüm aralığı 0,5-100 ng/ml'dir. ; çalışma içi CV değeri < %9, çalışmalar arası CV değeri ise < %11'dir.

3-Rat CGRP, Cat: 201-11-0348; Bu kitin alt ölçüm limiti 0,906 ng/L; ölçüm aralığı 1-300 ng/L'dir; çalışma içi CV değeri < %9, çalışmalar arası CV değeri ise < %11'dir.

4-Rat NO, Cat: 201-11-0704; Bu kitin alt ölçüm limiti 0,115 μ mol/L; ölçüm aralığı 1-40 μ mol/L'dir; çalışma içi CV değeri < %9, çalışmalar arası CV değeri ise < %11'dir.

5-Rat TNF- α , Cat: 201-11-0765; Bu kitin alt ölçüm limiti 5,127 ng/L; ölçüm aralığı 8-1000 ng/L; çalışma içi CV değeri < %9, çalışmalar arası CV değeri ise < %11'dir.

6-Rat HIF-1 α , Cat: 201-11-1371; Bu kitin alt ölçüm limiti 13,778 pg/ml; ölçüm aralığı 15-4200 pg/ml; çalışma içi CV değeri < %8, çalışmalar arası CV değeri ise < %11'dir.

7-Rat IMA, Cat: 201-11-1672; Bu kitin alt ölçüm limiti 1,284 U/ml; ölçüm aralığı 2-400 U/ml; çalışma içi CV değeri < %9, çalışmalar arası CV değeri ise < %11'dir.

8-Rat GPX Cat: 201-11-1705; Bu kitin alt ölçüm limiti 0,723 ng/mL; ölçüm aralığı 0,8-200 ng/mL'dir.

9-Rat CAT, Cat: 201-11-5106; Bu kitin alt ölçüm limiti 0,866 ng/ml; ölçüm aralığı 1-300 ng/ml; çalışma içi CV değeri <%8, çalışmalar arası CV değeri ise <%10'dur.

10-Rat EDN1, Lot:L231226791; Bu kitin alt ölçüm limiti 2,71 pg/mL; ölçüm aralığı 6,17-500 pg/mL; çalışma içi CV değeri < %10, çalışmalar arası CV değeri ise < %12'dir.

3.7.1. Standartların hazırlanması

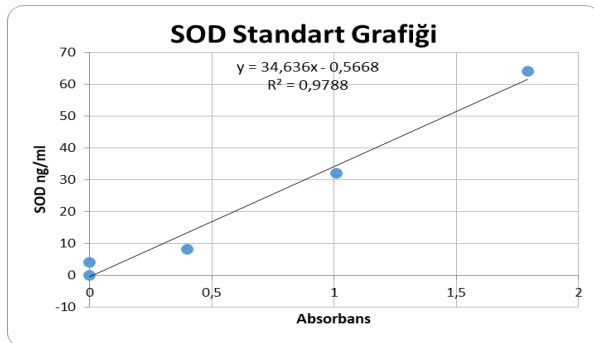
SOD, TNF- α , IL-6, NO, CGRP, GPx, IMA, HIF-1 α , CAT ve EDN-1 parametreleri için standartların hazırlanması aşağıda verildiği şekilde yapıldı:

SOD

Stok solüsyondaki (konsantrasyonu SOD için 128 ng/ml) olan standarttan, 3 mL standart seyreltici tamponu içeren 7 tüp hazırlanarak çift dilüsyon serisi oluşturmak amacıyla seyreltilmiş standart kullanıldı.

64 ng/ml, 32 ng/ml, 16 ng/ml, 8ng/ml, 4ng/ml ve son olarak, 0 ng/ mL (blank; kör) olacak şekilde yedi eppendorf tüp hazırlandı.

Standart yüksek konsantrasyondan düşük konsantrasyona dilüe edilirken, her dilüsyon için pipet ucunu değiştirildi. Son tüp, kör olarak kabul edildiği için hiçbir ekleme yapılmadı.



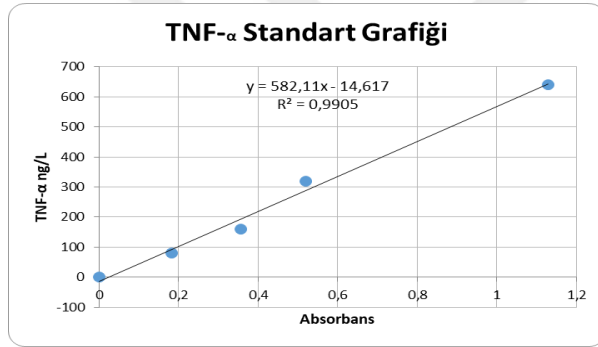
Şekil 3.3. SOD standart grafiği

TNF- α

Stok solüsyondaki (konsantrasyonu TNF- α için 1280ng/L) olan standarttan, 3 mL standart seyreltici tamponu içeren 7 tüp hazırlanarak çift dilüsyon serisi oluşturmak amacıyla seyreltilmiş standart kullanıldı.

640 ng/L, 320 ng/L, 160 ng/L, 80 ng/L, 40 ng/L ve son olarak, 0 ng/ mL (blank; kör) olacak şekilde yedi eppendorf tüp hazırlandı.

Standart yüksek konsantrasyondan düşük konsantrasyona dilüe edilirken, her dilüsyon için pipet ucunu değiştirildi. Son tüp, kör olarak kabul edildiği için hiçbir ekleme yapılmadı.



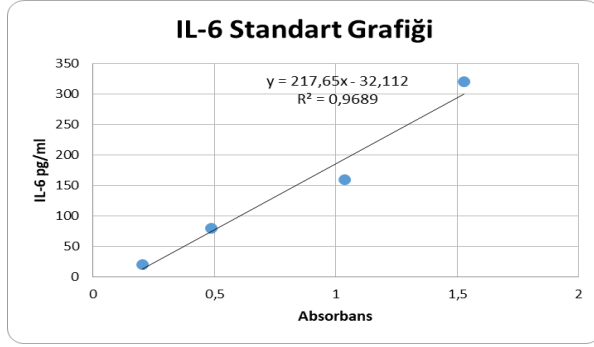
Şekil 3.4. TNF- α standart grafiği

IL-6

Stok solüsyondaki (konsantrasyonu IL-6 için 640 pg/ml) olan standarttan, 3 mL standart seyreltici tamponu içeren 7 tüp hazırlanarak çift dilüsyon serisi oluşturmak amacıyla seyreltilmiş standart kullanıldı.

320 pg/mL, 160 pg/mL, 80 pg/mL, 40 pg/mL, 20 pg/mL ve son olarak, 0 ng/ mL (blank; kör) olacak şekilde yedi eppendorf tüp hazırlandı.

Standart yüksek konsantrasyondan düşük konsantrasyona dilüe edilirken, her dilüsyon için pipet ucu değiştirildi. Son tüp, kör olarak kabul edildiği için hiçbir ekleme yapılmadı.



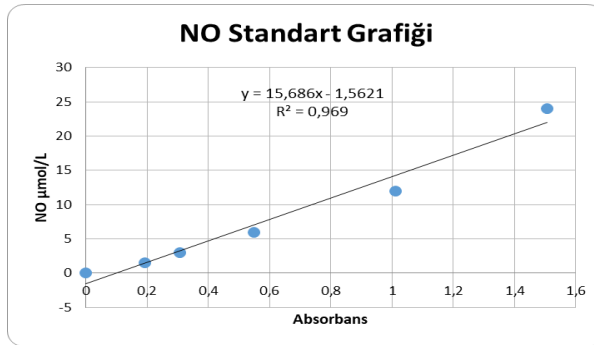
Şekil 3.5. IL-6 standart grafiği

NO

Stok solüsyondaki (konsantrasyonu NO için 48 µmol/L) olan standarttan, 3 mL standart seyreltici tamponu içeren 7 tüp hazırlanarak çift dilüsyon serisi oluşturmak amacıyla seyreltilmiş standart kullanıldı.

24µmol/L, 12µmol/L, 6µmol/L, 3µmol/L, 1.5µmol/L ve son olarak, 0 ng/ mL (blank; kör) olacak şekilde yedi eppendorf tüp hazırlandı.

Standart yüksek konsantrasyondan düşük konsantrasyona dilüe edilirken, her dilüsyon için pipet ucunu değiştirildi. Son tüp, kör olarak kabul edildiği için hiçbir ekleme yapılmadı.



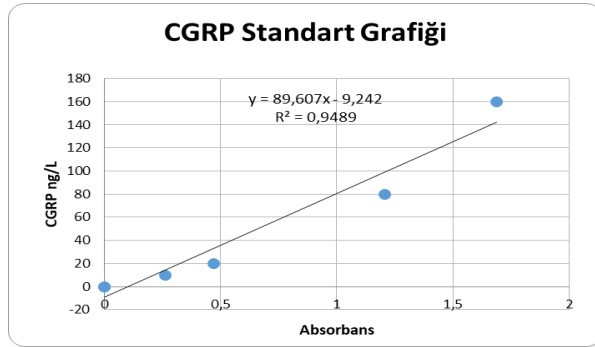
Şekil 3.6. NO standart grafiği

CGRP

Stok solüsyondaki (konsantrasyonu CGRP için 320ng/L) olan standarttan, 3 mL standart seyreltici tamponu içeren 7 tüp hazırlanarak çift dilüsyon serisi oluşturmak amacıyla seyreltilmiş standart kullanıldı.

160 ng/L, 80 ng/L, 40 ng/L, 20 ng/L, 10ng/L ve son olarak, 0 ng/ mL (blank; kör) olacak şekilde yedi eppendorf tüp hazırlandı.

Standart yüksek konsantrasyondan düşük konsantrasyona dilüe edilirken, her dilüsyon için pipet ucunu değiştirildi. Son tüp, kör olarak kabul edildiği için hiçbir ekleme yapılmadı.



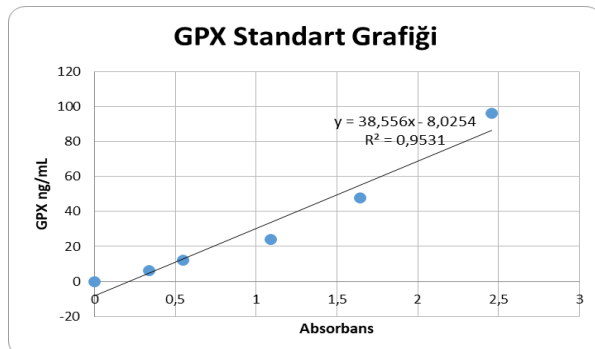
Şekil 3.7. CGRP standart grafiği

GPx

Stok solüsyondaki (konsantrasyonu GPX için 240 ng/mL) olan standarttan, 3 mL standart seyreltici tamponu içeren 7 tüp hazırlanarak çift dilüsyon serisi oluşturmak amacıyla seyreltilmiş standart kullanıldı.

120 ng/mL, 60 ng/mL, 30 ng/mL, 15 ng/mL, 7.5 ng/mL ve son olarak, 0 ng/mL (blank; kör) olacak şekilde yedi eppendorf tüp hazırlandı.

Standart yüksek konsantrasyondan düşük konsantrasyona dilüe edilirken, her dilüsyon için pipet ucunu değiştirildi. Son tüp, kör olarak kabul edildiği için hiçbir ekleme yapılmadı.



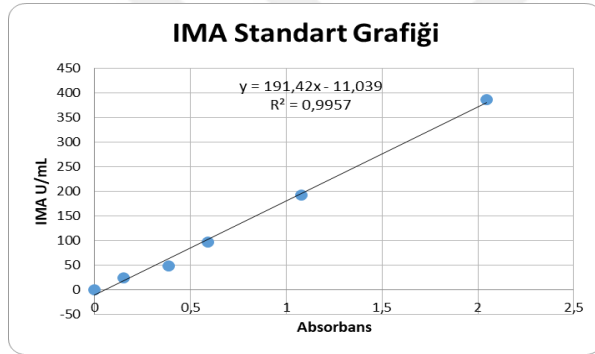
Şekil 3.8. GPX standart grafiği

IMA

Stok solüsyondaki (konsantrasyonu IMA için 480 U/ml) olan standarttan, 3 mL standart seyreltici tamponu içeren 7 tüp hazırlanarak çift dilüsyon serisi oluşturmak amacıyla seyreltilmiş standart kullanıldı.

240 U/ml, 120 U/ml, 60 U/ml, 30 U/ml, 15 U/ml ve son olarak, 0 ng/ mL (blank; kör) olacak şekilde yedi eppendorf tüp hazırlandı.

Standart yüksek konsantrasyondan düşük konsantrasyona dilüe edilirken, her dilüsyon için pipet ucunu değiştirildi. Son tüp, kör olarak kabul edildiği için hiçbir ekleme yapılmadı.



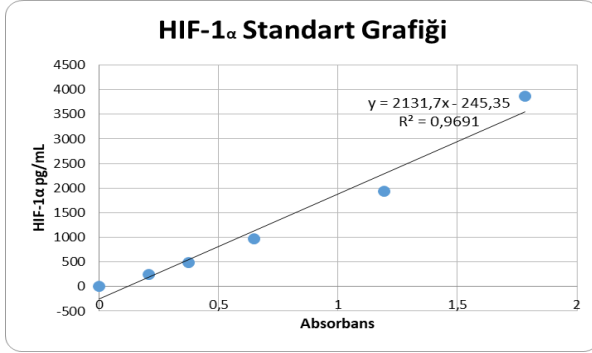
Şekil 3.9. IMA standart grafiği

HIF1-α

Stok solüsyondaki (konsantrasyonu HIF1-α için 4800 ng/L) olan standarttan, 3 mL standart seyreltici tamponu içeren 7 tüp hazırlanarak çift dilüsyon serisi oluşturmak amacıyla seyreltilmiş standart kullanıldı.

2400 ng/L 1200 ng/L 600 ng/L 300 ng/L 150 ng/L ve son olarak, 0 ng/ mL (blank; kör) olacak şekilde yedi eppendorf tüp hazırlandı.

Standart yüksek konsantrasyondan düşük konsantrasyona dilüe edilirken, her dilüsyon için pipet ucunu değiştirildi. Son tüp, kör olarak kabul edildiği için hiçbir ekleme yapılmadı.



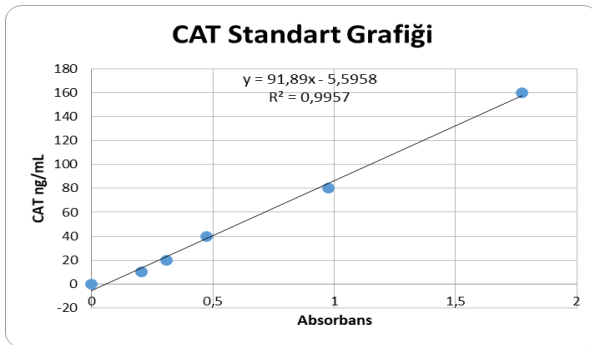
Şekil 3.10. HIF-1α standart grafiği

CAT

Stok solüsyondaki (konsantrasyonu CAT için?) olan standarttan? standart seyreltici tamponu içeren 7 tüp hazırlanarak çift dilüsyon serisi oluşturmak amacıyla seyreltilmiş standart kullanıldı.

160 ng/mL, 80 ng/mL, 40 ng/mL 20 ng/mL, 10 ng/mL ve son olarak, 0 ng/mL (blank; kör) olacak şekilde yedi eppendorf tüp hazırlandı.

Standart yüksek konsantrasyondan düşük konsantrasyona dilüe edilirken, her dilüsyon için pipet ucunu değiştirildi. Son tüp, kör olarak kabul edildiği için hiçbir ekleme yapılmadı.



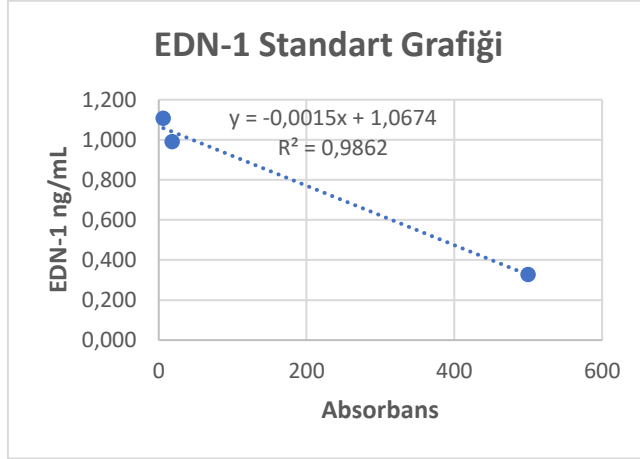
Şekil 3.11. CAT standart grafiği

EDN1

Stok solüsyondaki (konsantrasyonu HIF1-α için 320 ng/mL) olan standarttan, 3 mL standart seyreltici tamponu içeren 7 tüp hazırlanarak çift dilüsyon serisi oluşturmak amacıyla seyreltilmiş standart kullanıldı.

500 pg/mL, 166.67pg/mL, 55.56pg/mL, 18.52pg/mL, 6.17pg/mL ve son olarak, 0 ng/mL (blank; kör) olacak şekilde yedi eppendorf tüp hazırlandı.

Standart yüksek konsantrasyondan düşük konsantrasyona dilüe edilirken, her dilüsyon için pipet ucunu değiştirildi. Son tüp, kör olarak kabul edildiği için hiçbir ekleme yapılmadı.



Şekil 3.12. EDN-1 standart grafiği

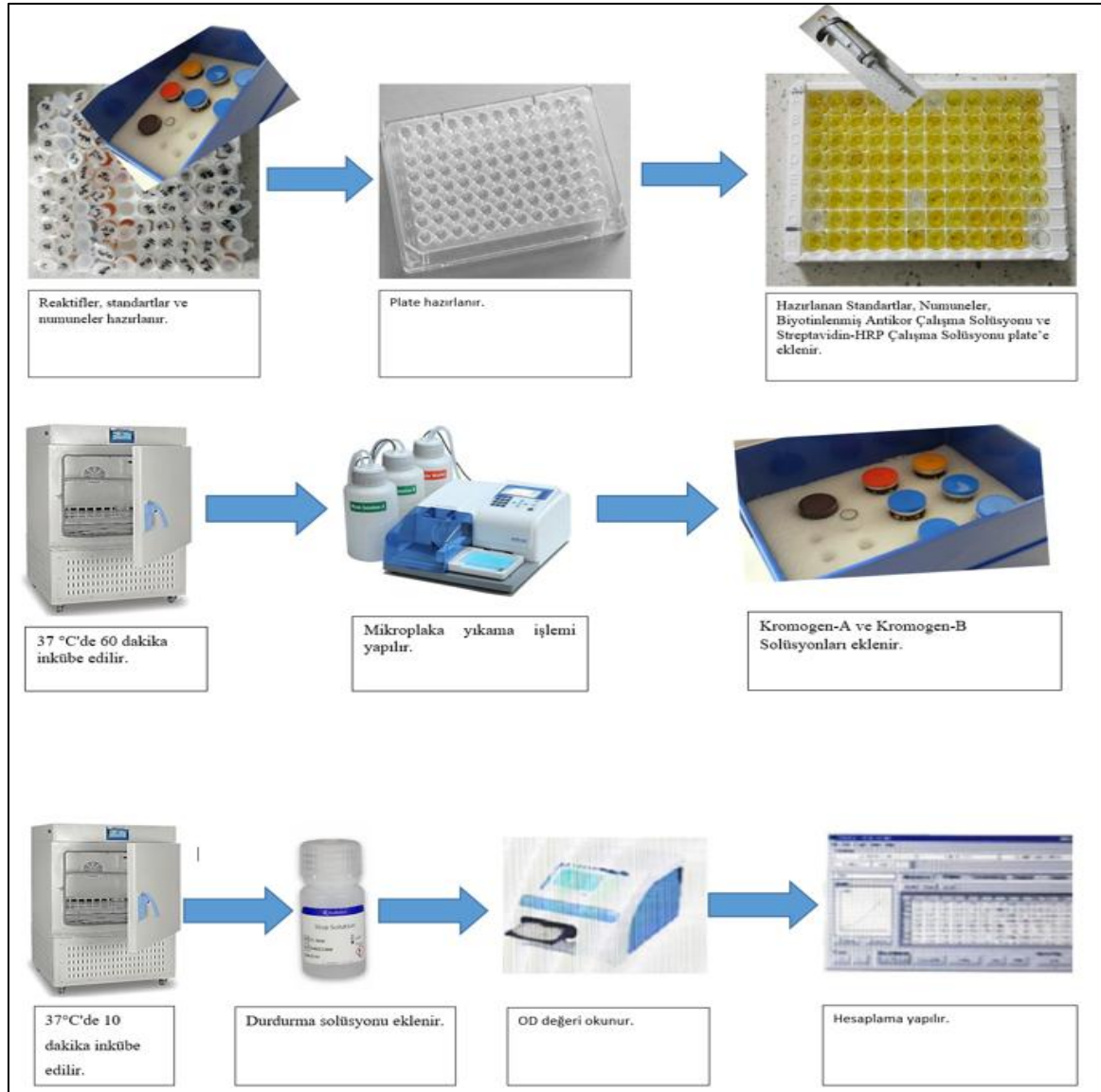
3.7.2. Testin yapılışı

Bu çalışmada kullanılan SOD, TNF- α , IL-6, NO, CGRP, GPx, IMA, HIF-1 α ve CAT ELISA kitleri aynı test prensibine ve basamaklara sahiptir.

Kas doku homojenizasyonu ile elde edilen süpernatantlar ve serumlardaki SOD, TNF- α , IL-6, NO, CGRP, GPx, IMA, HIF-1 α ve CAT konsantrasyonlarının tespiti için ELISA analizlerinin basamakları aşağıda verildiği şekilde yapıldı:

1. Kit oda sıcaklığına getirildikten sonra, standart kuyucukları olarak belirlediğimiz kuyucuklara 50 mikrolitre (μ L) olacak şekilde standart çalışma tamponu eklendi.
2. Numune kuyucukları olarak belirlediğimiz kuyucuklara 40 μ L olacak şekilde numune eklendi.
3. Numune kuyucuklarına 10 μ L Biotinlenmiş Antikor Çalışma Solüsyonu eklendi.
4. Standart ve numune kuyucuklarına 50 μ L Streptavidin-HRP Çalışma Solüsyonu eklendi. (Blank; kör kuyucukları olarak belirlediğimiz kuyucuklara Streptavidin-HRP Çalışma Solüsyonu eklenmedi).

5. 37 °C'de 60 dakika inkübe edildi.
6. Plakanın ters çevrilerek bir zemine vurulması suretiyle solüsyon uzaklaştırıldı. Her kuyucuğa 0,35 ml (350 µL) 30 × yıkama solüsyonu eklendi ve 1-2 dakika boyunca bekletildi. Mikroplaka yıkama işlemi gereksinimlerimize göre tekrarlandı.
7. Döndürerek kurutmanın ardından bütün kuyucuklara 50 µL kromajen solüsyon A eklendi. Ardından bütün kuyucuklara 50 µL kromajen solüsyon B eklendi ve karanlıkta 10 dakika 37°C'de inkübe edildi.
8. 10 dakikalık inkübasyonun akabinde bütün kuyucuklara 50 µL durdurma solüsyonu eklendi.
9. Durdurma solüsyonunun eklenmesinin ardından mikroplaka 15 dakika içinde ivedilikle 450 nm'ye ayarlanmış olan ELISA Mikroplaka Okuyucuda okutularak, optik yoğunluk (OD-Optical Density), sonuçlarının kaydedilmesi suretiyle alındı.



Şekil 3.13. ELISA analizi aşamaları

3.8. Histolojik İncelemeler

Histolojik incelemeler amacıyla ratlardan alınan kas doku örnekleri % 10'luk tamponlu formaldehitte 72 saat tespit edildi. Ardından tespit edilen kas doku örneklerini formalinden uzaklaştırmak için doku örnekleri çeşme suyu altında bir gece yıkandı. Rutin doku takibine alınan doku örnekleri suyun uzaklaştırılması (dehidratasyon) için dereceli alkol (% 50, % 75, % 96, % 100) ve parlatılmaları amacıyla ksilol serilerinden geçirilerek parafinde bloklandı. Hazırlanan bloklardan 5 µm kalınlığında kesitler Leica RM 2125 RT cihazı ile ilk üç kesit ve her onuncu kesitler lamlara alındı. Hazırlanan preparatlar alkol ve ksilol serilerinden geçirilerek Hematoksilen Eozin (H&E) yöntemi ile boyandı. Histomorfolojik

değerlendirme için skorlamalar yapıldı. Dokulardaki tüm değişiklikler (ödem, dejenerasyon, nekroz ve inflamasyon) kaydedildi ve bazı ön çalışmalardaki bulgulara göre varlığı ve şiddeti açısından derecelendirildi: 0: yok, 1: hafif, 2: orta, 3: şiddetli [121]

3.9. İstatistiksel Yöntem

Verileri SPSS (Statistical Package for Social Sciences) 25.0 paket programı aracılığıyla analiz edildi. Tanımlayıcı analizlerde sayısal veriler Mean $\pm$ SEM kullanılarak verildi. Parametrik sayısal değişkenlerin bağımsız ikiden fazla grupta dağılımı One Way ANOVA ve Welch testleri ile değerlendirildi. ANOVA testi sonucunda anlamlı farklılık saptanan gruplarda, post hoc analizi olarak Tukey veya Tamhane testi uygulandı. Verilerin grafiksel gösterimi Graphad Prism software kullanıldı. İstatistiksel anlamlılık için $p<0,05$ kabul edildi.



4. BULGULAR

4.1. Biyokimyasal Bulgular

Çalışmamızda; Tedavi+I/R, I/R+Tedavi, I/R ve Sham gruplarına ait deney hayvanlarından elde edilen serum örneklerinde ve gastroknemius kas dokusundan elde edilen homojenatlarda SOD, TNF- α , IL-6, NO, CGRP, GPx, IMA, HIF-1 α , CAT ve EDN-1 parametreleri değerlendirildi.

Çalışmada; Tedavi+I/R grubunda 5, I/R+Tedavi grubunda 6, I/R grubunda 6 ve Sham grubunda 6 olmak üzere toplam 23 rat kullanıldı.

4.1.1. Doku örneklerine ait bulgular

Çalışma grupları arasında doku örneklerinde çalışılan parametrelerin dağılımı Tablo 1’de verilmiştir.

Çizelge 4.1. Deney grupları arasında doku örneklerine ait biyokimyasal sonuçların dağılımı

Doku Sonuçları	Tedavi+I/R ^a (n=5)	I/R+Tedavi ^b (n=6)	I/R ^c (n=6)	Sham ^d (n=6)	p
SOD (ng/g doku)	351,96±96,97	280,51±89,62	452,43±18,65	214,21±95,33	0,103*
TNF- α (μ g/g doku)	3,23±1,82	5,48±1,07	5,62±1,13	2,63±1,62	0,340**
IL-6 (ng/g doku)	1,91±0,44	1,94±0,40	0,81±0,46	2,57±0,29	0,038** c-d=0,025***
NO (μ mol/g doku)	209,97±14,61	231,59±21,72	191,54±8,00	167,83±10,78	0,091*
CGRP (ng/g doku)	764,94±209,91	809,99±222,79	1001,12±87,97	778,09±156,76	0,753**
GPx (ng/g doku)	260,90±31,06	257,78±21,39	259,10±24,52	239,00±17,32	0,900**
IMA (U/g doku)	1717,00±55,17	1707,16±78,49	1641,33±76,38	1648,33±83,57	0,852**
HIF-1 α (ng/g doku)	18,34±0,64	19,76±1,41	18,45±1,07	16,19±3,26	0,612**
CAT (μ g/g doku)	1,00±0,06	1,28±0,06	1,07±0,03	1,17±0,05	0,011** a-b=0,011***
EDN-1 (pg/g doku)	172,15±48,20	96,56±36,06	62,28±18,46	112,11±32,76	0,204**

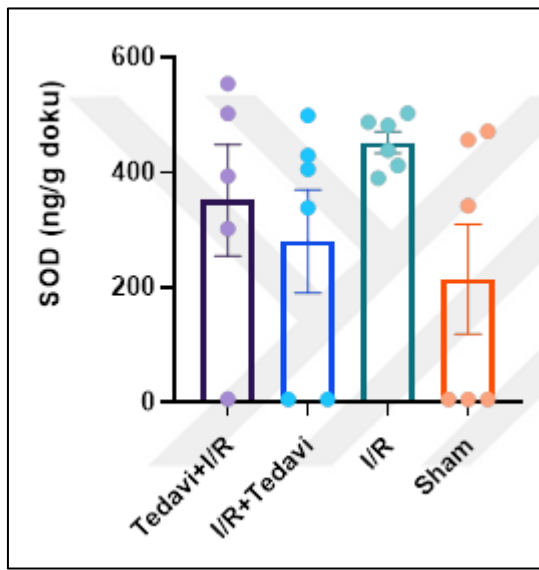
*Welch Testi

**ANOVA testi

***ANOVA testi için Tukey testi post-hoc testi

SOD

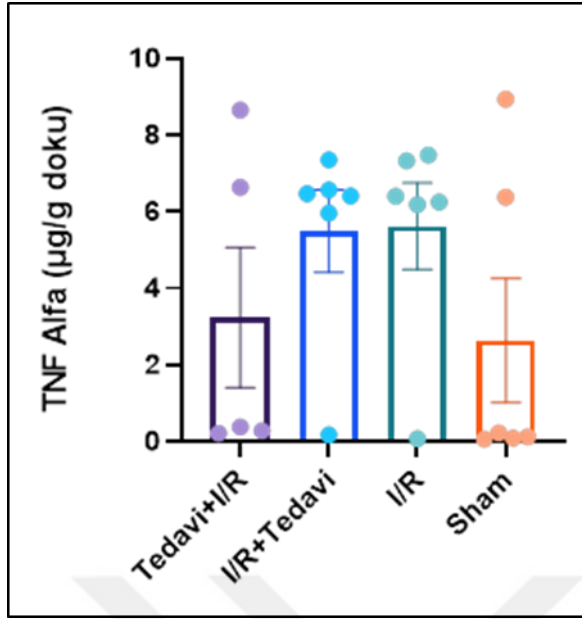
Gastroknemius kas dokusundan elde edilen homojenatlarda, deney grupları arasında SOD (ng/g doku) konsantrasyonu açısından istatistiksel olarak anlamlı bir fark görülmedi, ($p=0,103$). Deney gruplarındaki ortalama $\pm$ SEM değerleri; Tedavi+I/R grubu ($351,96 \pm 96,97$ ng/g doku), I/R+Tedavi grubu ($280,51 \pm 89,62$ ng/g doku), I/R grubu ($452,43 \pm 18,65$ ng/g doku) ve Sham grubu ($214,21 \pm 95,33$ ng/g doku) olarak tespit edildi, (Şekil 4.1.).



Şekil 4.1. Deney grupları arasında doku SOD konsantrasyonlarının dağılımı

TNF- α

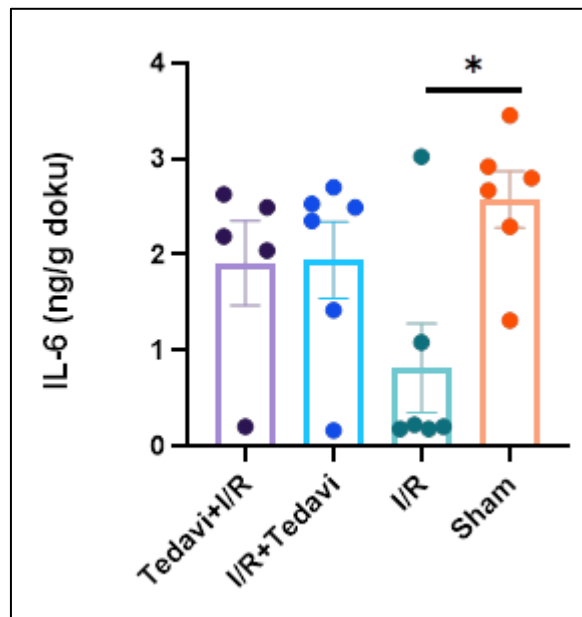
Gastroknemius kas dokusundan elde edilen homojenatlarda, deney grupları arasında TNF- α ($\mu\text{g/g}$ doku) konsantrasyonu açısından istatistiksel olarak anlamlı bir fark görülmedi, ($p=0,340$). Deney gruplarındaki ortalama $\pm$ SEM değerleri; Tedavi+I/R grubu ($1,91 \pm 0,44$ ng/g doku), I/R+Tedavi grubu ($1,94 \pm 0,40$ ng/g doku), I/R grubu ($0,81 \pm 0,46$ ng/g doku) ve Sham grubu ($2,57 \pm 0,29$ ng/g doku) olarak tespit edildi, (Şekil 4.2.).



Şekil 4.2. Deney grupları arasında doku TNF- α konsantrasyonlarının dağılımı

IL-6

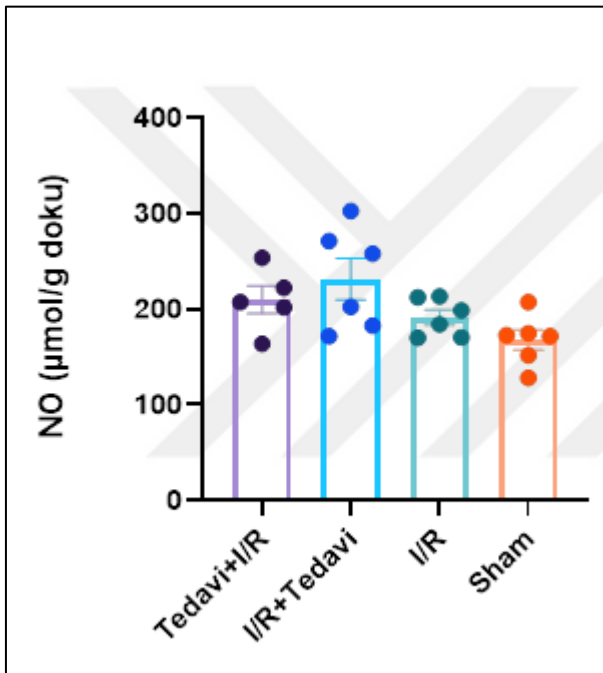
Gastroknemius kas dokusundan elde edilen homojenatlarda, deney grupları arasında IL-6 (ng/g doku) konsantrasyonu açısından istatistiksel olarak anlamlı bir fark görüldü, ($p=0,038$). Doku IL-6 düzeyi; I/R grubunda ($0,81\pm0,46$ ng/g doku) Sham grubuna ($2,57\pm0,29$ ng/g doku) göre istatistiksel olarak anlamlı düşük belirlendi ($p=0.038$) (Şekil 4.3.).



Şekil 4.3. Deney grupları arasında doku IL-6 konsantrasyonlarının dağılımı

NO

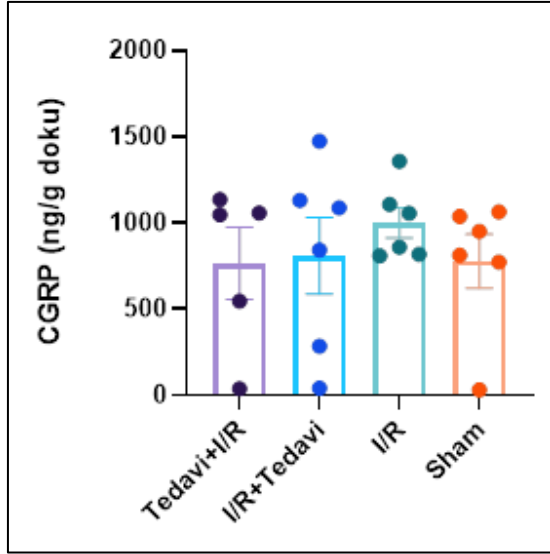
Gastroknemius kas dokusundan elde edilen homojenatlarda, deney grupları arasında NO ($\mu\text{mol/g}$ doku) konsantrasyonu açısından istatistiksel olarak anlamlı bir fark görülmedi, ($p=0,091$). Deney gruplarındaki ortalama $\pm$ SEM değerleri; Tedavi+I/R grubu ($209,97 \pm 14,61 \mu\text{mol/g}$ doku), I/R+Tedavi grubu ($231,59 \pm 21,72 \mu\text{mol/g}$ doku), I/R grubu ($191,54 \pm 8,00 \mu\text{mol/g}$ doku) ve Sham grubu ($167,83 \pm 10,78 \mu\text{mol/g}$ doku) olarak tespit edildi, (Şekil 4.4.).



Şekil 4.4. Deney grupları arasında doku NO konsantrasyonlarının dağılımı

CGRP

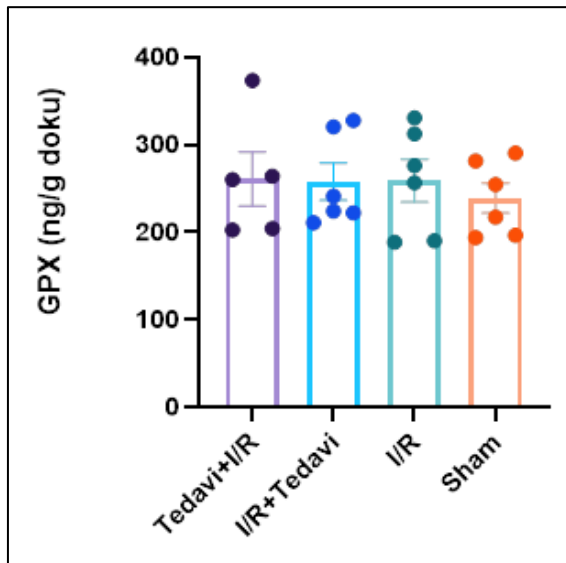
Gastroknemius kas dokusundan elde edilen homojenatlarda, deney grupları arasında CGRP (ng/g doku) konsantrasyonu açısından istatistiksel olarak anlamlı bir fark görülmedi, ($p=0,753$). Deney gruplarındaki ortalama $\pm$ SEM değerleri; Tedavi+I/R grubu ($764,94 \pm 209,91 \text{ ng/g}$ doku), I/R+Tedavi grubu ($809,99 \pm 222,79 \text{ ng/g}$ doku), I/R grubu ($1001,12 \pm 87,97 \text{ ng/g}$ doku) ve Sham grubu ($778,09 \pm 156,76 \text{ ng/g}$ doku) olarak tespit edildi, (Şekil 4.5.).



Şekil 4.5. Deney grupları arasında doku CGRP konsantrasyonlarının dağılımı

GPx

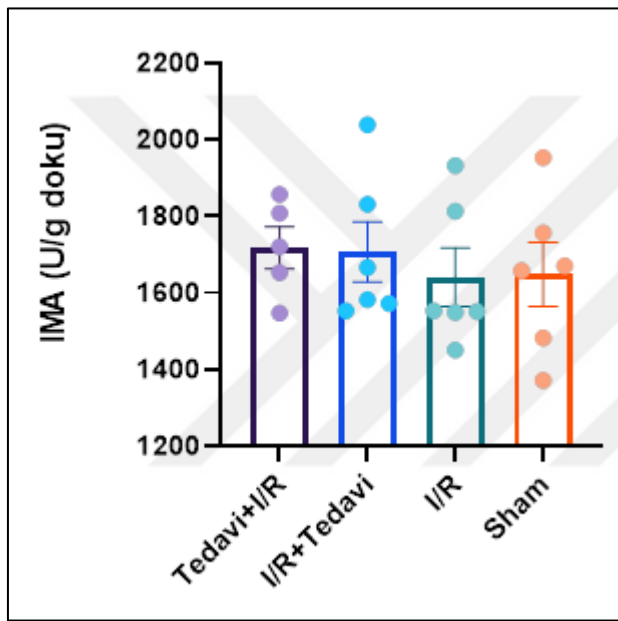
Gastroknemius kas dokusundan elde edilen homojenatlarda, deney grupları arasında GPx (ng/g doku) konsantrasyonu açısından istatistiksel olarak anlamlı bir fark görülmedi, ($p=0,900$). Deney gruplarındaki ortalama $\pm$ SEM değerleri; Tedavi+I/R grubu ($260,90 \pm 31,06$ ng/g doku), I/R+Tedavi grubu ($257,78 \pm 21,39$ ng/g doku), I/R grubu ($259,10 \pm 24,52$ ng/g doku) ve Sham grubu ($239,00 \pm 17,32$ ng/g doku) olarak tespit edildi, (Şekil 4.6.).



Şekil 4.6. Deney grupları arasında doku GPx konsantrasyonlarının dağılımı

IMA

Gastroknemius kas dokusundan elde edilen homojenatlarda, deney grupları arasında IMA (U/g doku) konsantrasyonu açısından istatistiksel olarak anlamlı bir fark görülmedi, ($p=0,852$). Deney gruplarındaki ortalama $\pm$ SEM değerleri; Tedavi+I/R grubu ($1717,00 \pm 55,17$ U/g doku), I/R+Tedavi grubu ($1707,16 \pm 78,49$ U/g doku), I/R grubu ($1641,33 \pm 76,38$ U/g doku) ve Sham grubu ($1648,33 \pm 83,57$ U/g doku) olarak tespit edildi, (Şekil 4.7.).



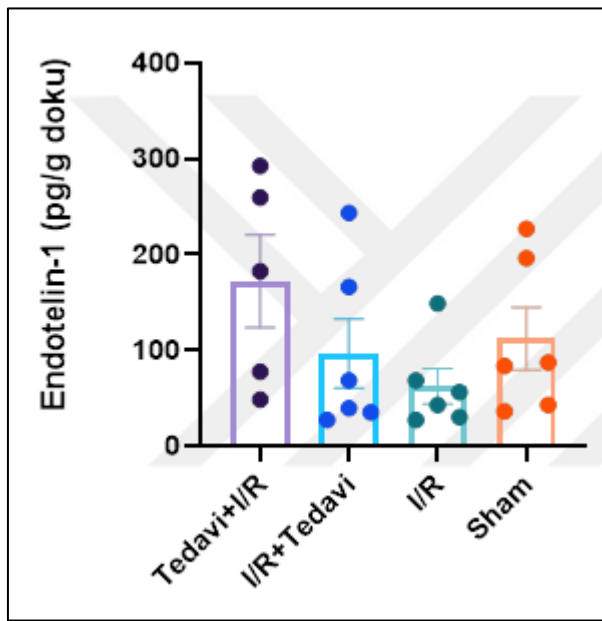
Şekil 4.7. Deney grupları arasında doku IMA konsantrasyonlarının dağılımı

HIF-1 α

Gastroknemius kas dokusundan elde edilen homojenatlarda, deney grupları arasında HIF-1 α (ng/g doku) konsantrasyonu açısından istatistiksel olarak anlamlı bir fark görülmedi, ($p=0,612$). Deney gruplarındaki ortalama $\pm$ SEM değerleri; Tedavi+I/R grubu ($18,34 \pm 0,64$ ng/g doku), I/R+Tedavi grubu ($19,76 \pm 1,41$ ng/g doku), I/R grubu ($18,45 \pm 1,07$ ng/g doku) ve Sham grubu ($16,19 \pm 3,26$ ng/g doku) olarak tespit edildi, (Şekil 4.8.).

EDN-1

Gastroknemius kas dokusundan elde edilen homojenatlarda, deney grupları arasında EDN-1 (pg/g doku) konsantrasyonu açısından istatistiksel olarak anlamlı bir fark görülmedi, ($p=0,204$). Deney gruplarındaki ortalama $\pm$ SEM değerleri; Tedavi+I/R grubu ($172,15 \pm 48,20$ pg/g doku), I/R+Tedavi grubu ($96,56 \pm 36,06$ pg/g doku), I/R grubu ($62,28 \pm 18,46$ pg/g doku) ve Sham grubu ($112,11 \pm 32,76$ pg/g doku) olarak tespit edildi, (Şekil 4.10.).



Şekil 4.10. Deney grupları arasında doku EDN-1 konsantrasyonlarının dağılımı

4.1.2. Serum örneklerine ait bulgular

Deney grupları arasında serum örneklerinde çalışılan parametrelerin dağılımı çizelge 4.2’de sunulmuştur.

Çizelge 4.2. Deney grupları arasında serum örneklerine ait biyokimyasal sonuçların dağılımı

Kan Bulguları	Tedavi+I/R ^a (n=5)	I/R+Tedavi ^b (n=6)	I/R (n=6)	Sham ^d (n=6)	p
SOD (ng/ml)	22,01 $\pm$ 3,09	23,14 $\pm$ 4,35	25,96 $\pm$ 2,95	24,47 $\pm$ 1,94	0,846*
TNF- α (ng/L)	293,83 $\pm$ 82,55	328,43 $\pm$ 70,07	81,18 $\pm$ 75,91	332,53 $\pm$ 41,79	0,047* a-c=0,045*** b-c=0,017*** d-c=0,015***

Çizelge 4.2. (devam) Deney grupları arasında serum örneklerine ait biyokimyasal sonuçların dağılımı

IL-6 (pg/ml)	63,65±19,97	48,31±20,43	58,04±19,86	87,80±4,72	0,213**
NO (μmol/L)	6,51±0,48	5,55±1,12	6,84±0,53	5,28±0,46	0,383*
CGRP (ng/L)	29,54±3,67	26,37±5,00	27,30±2,60	27,90±2,13	0,939*
GPx (ng/ml)	10,14±1,48	11,92±0,92	11,46±0,76	11,31±1,46	0,767*
IMA (U/ml)	85,70±9,28	98,55±6,24	86,68±4,66	89,90±2,63	0,414*
HIF-1 Alfa (pg/ml)	674,58±52,60	761,14±42,30	736,27±28,73	649,24±46,89	0,241*
CAT (ng/ml)	64,09±4,53	66,82±4,96	60,85±2,53	58,17±4,43	0,493*
EDN-1 (pg/ml)	14,48±3,45	13,25±2,74	9,47±2,22	14,49±2,12	0,490*

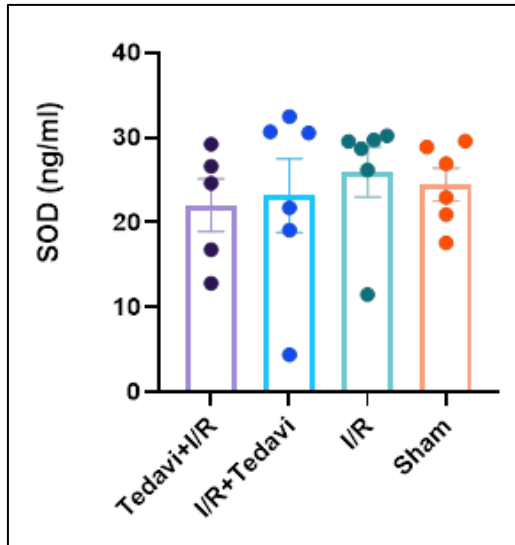
*ANOVA testi

**Welch Testi

*** ANOVA testi için Tukey testi post-hoc testi

SOD

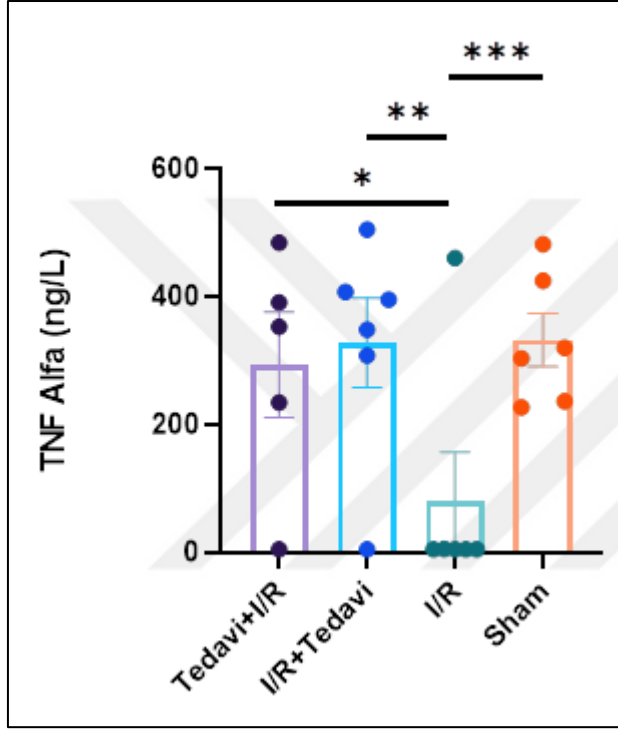
Serum örneklerinde, deney grupları arasında SOD (ng/ml) konsantrasyonu açısından istatistiksel olarak anlamlı bir fark görülmedi, ($p=0,846$). Deney gruplarındaki ortalama $\pm$ SEM değerleri; Tedavi+I/R grubu ($22,01\pm3,09$ ng/ml), I/R+Tedavi grubu ($23,14\pm4,35$ ng/ml), I/R grubu ($25,96\pm2,95$ ng/ml) ve Sham grubu ($24,47\pm1,94$ ng/ml) olarak tespit edildi, (Şekil 4.12.).



Şekil 4.11. Deney grupları arasında serum SOD konsantrasyonlarının dağılımı

TNF- α

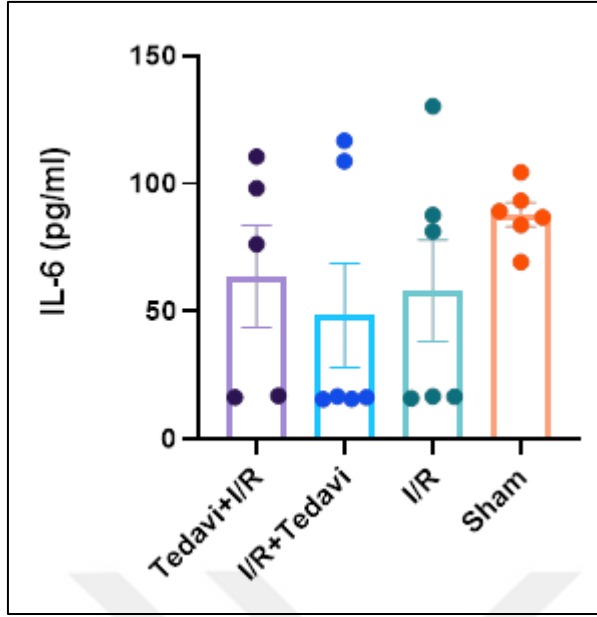
Serum örneklerinde, deney grupları arasında TNF- α (ng/L) konsantrasyonu açısından istatistiksel olarak anlamlı bir fark görüldü, ($p=0,047$). Serum TNF- α düzeyi; I/R grubunda ($81,18 \pm 75,91$), Tedavi+I/R ($293,83 \pm 82,55$), I/R+Tedavi ($328,43 \pm 70,07$) ve Sham grubuna ($332,53 \pm 41,79$) göre anlamlı düzeyde düşük belirlendi (Şekil 4.15.).



Şekil 4.12. Deney grupları arasında serum TNF- α konsantrasyonlarının dağılımı

IL-6

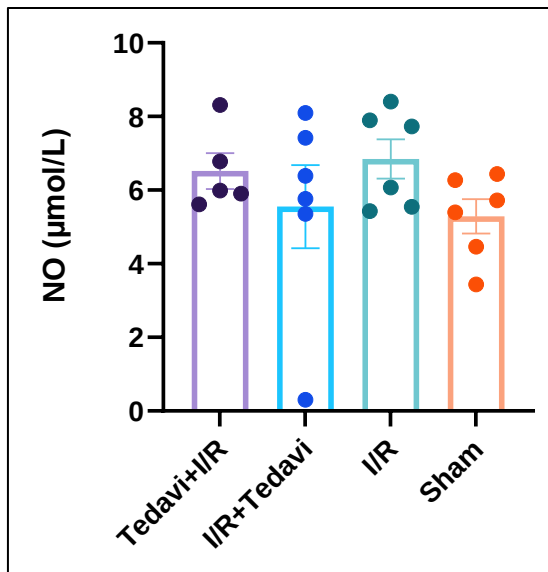
Serum örneklerinde, deney grupları arasında IL-6 (pg/ml) konsantrasyonu açısından istatistiksel olarak anlamlı bir fark görülmedi, ($p=0,213$). Deney gruplarındaki ortalama $\pm$ SEM değerleri; Tedavi+I/R grubu ($63,65 \pm 19,97$ pg/ml), I/R+Tedavi grubu ($48,31 \pm 20,43$ pg/ml), I/R grubu ($58,04 \pm 19,86$ pg/ml) ve Sham grubu ($87,80 \pm 4,72$ pg/ml) olarak tespit edildi, (Şekil 4.11.).



Şekil 4.13. Deney grupları arasında serum IL-6 konsantrasyonlarının dağılımı

NO

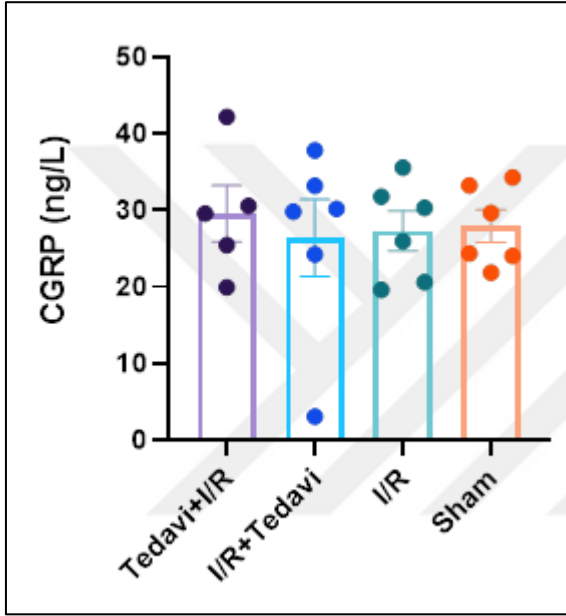
Serum örneklerinde, deney grupları arasında NO ($\mu\text{mol/L}$) konsantrasyonu açısından istatistiksel olarak anlamlı bir fark görülmedi, ($p=0,383$). Deney gruplarındaki ortalama $\pm$ SEM değerleri; Tedavi+I/R grubu ($6,51 \pm 0,48 \mu\text{mol/L}$), I/R+Tedavi grubu ($5,55 \pm 1,12 \mu\text{mol/L}$), I/R grubu ($6,84 \pm 0,53 \mu\text{mol/L}$) ve Sham grubu ($5,28 \pm 0,46 \mu\text{mol/L}$) olarak tespit edildi, (Şekil 4.14.).



Şekil 4.14. Deney grupları arasında serum NO konsantrasyonlarının dağılımı

CGRP

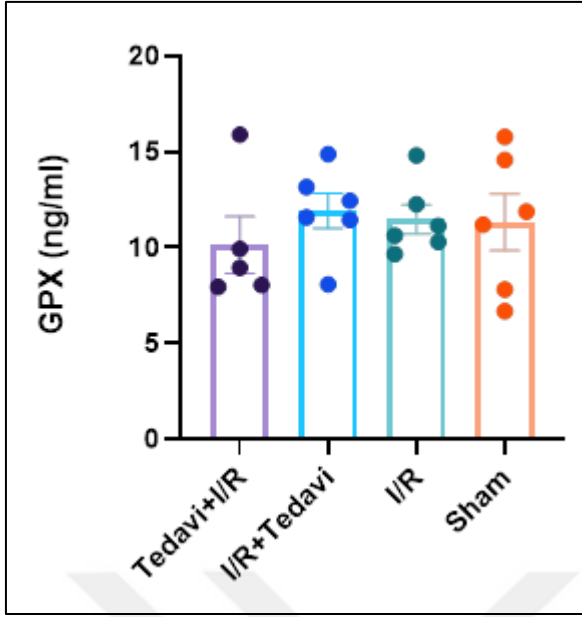
Serum örneklerinde, deney grupları arasında CGRP (ng/L) konsantrasyonu açısından istatistiksel olarak anlamlı bir fark görülmedi, ($p=0,939$). Deney gruplarındaki ortalama $\pm$ SEM değerleri; Tedavi+I/R grubu ($29,54 \pm 3,67$ ng/L), I/R+Tedavi grubu ($26,37 \pm 5,00$ ng/L), I/R grubu ($27,30 \pm 2,60$ ng/L) ve Sham grubu ($27,90 \pm 2,13$ ng/L) olarak tespit edildi, (Şekil 4.13.).



Şekil 4.15. Deney grupları arasında serum CGRP konsantrasyonlarının dağılımı

GPx

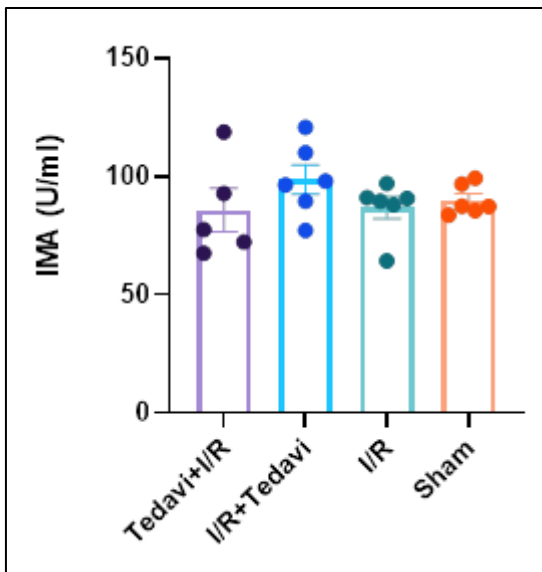
Serum örneklerinde, deney grupları arasında GPx (ng/ml) konsantrasyonu açısından istatistiksel olarak anlamlı bir fark görülmedi, ($p=0,767$). Deney gruplarındaki ortalama $\pm$ SEM değerleri; Tedavi+I/R grubu ($10,14 \pm 1,48$ ng/ml), I/R+Tedavi grubu ($11,92 \pm 0,92$ ng/ml), I/R grubu ($11,46 \pm 0,76$ ng/ml) ve Sham grubu ($11,31 \pm 1,46$ ng/ml) olarak tespit edildi, (Şekil 4.18.).



Şekil 4.16. Deney grupları arasında serum GPx konsantrasyonlarının dağılımı

IMA

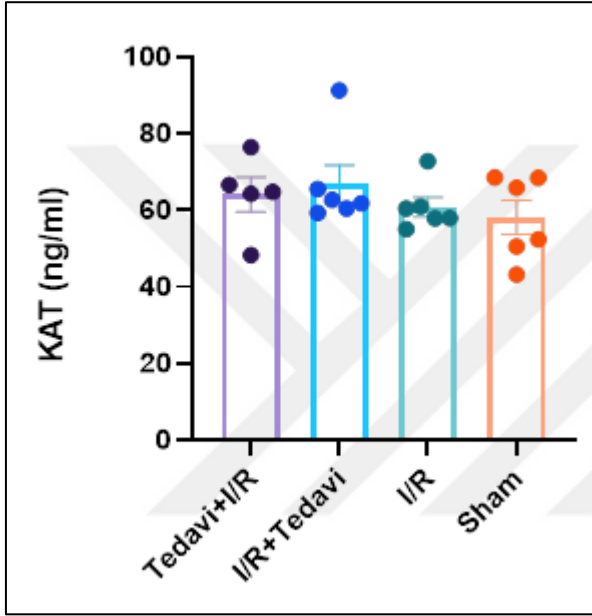
Serum örneklerinde, deney grupları arasında IMA (U/mL) konsantrasyonu açısından istatistiksel olarak anlamlı bir fark görülmedi, ($p=0,414$). Deney gruplarındaki ortalama $\pm$ SEM değerleri; Tedavi+I/R grubu ($85,70 \pm 9,28$ U/ml), I/R+Tedavi grubu ($98,55 \pm 6,24$ U/ml), I/R grubu ($86,68 \pm 4,66$ U/ml) ve Sham grubu ($89,90 \pm 2,63$ U/ml) olarak tespit edildi, (Şekil 4.17.).



Şekil 4.17. Deney grupları arasında serum IMA konsantrasyonlarının dağılımı

CAT

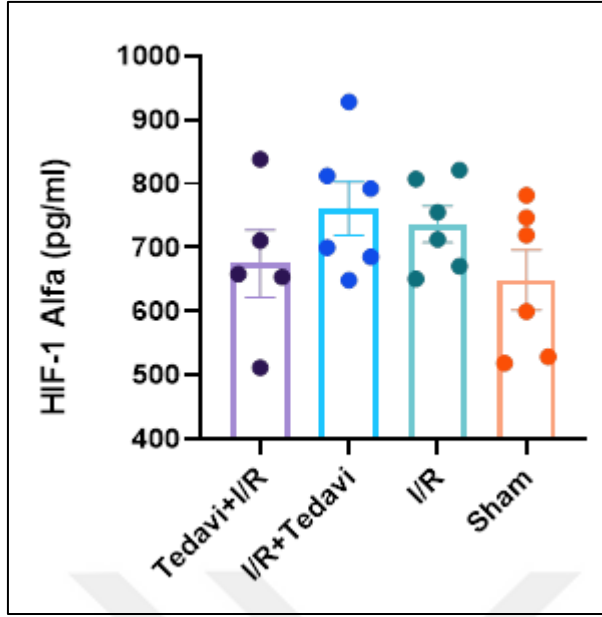
Serum örneklerinde, deney grupları arasında CAT (ng/ml) konsantrasyonu açısından istatistiksel olarak anlamlı bir fark görülmedi, ($p=0,493$). Deney gruplarındaki ortalama $\pm$ SEM değerleri; Tedavi+I/R grubu ($64,09 \pm 4,53$ ng/ml), I/R+Tedavi grubu ($66,82 \pm 4,96$ ng/ml), I/R grubu ($60,85 \pm 2,53$ ng/ml) ve Sham grubu ($58,17 \pm 4,43$ ng/ml) olarak tespit edildi, (Şekil 4.19.).



Şekil 4.18. Deney grupları arasında serum CAT konsantrasyonlarının dağılımı

HIF-1 α

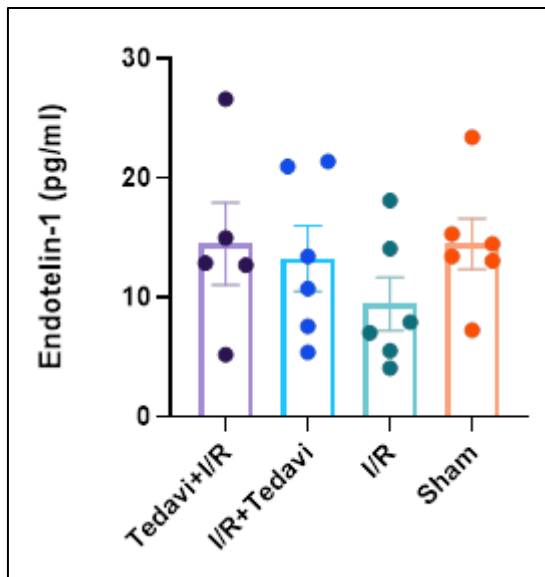
Serum örneklerinde, deney grupları arasında HIF-1 α (pg/ml) konsantrasyonu açısından istatistiksel olarak anlamlı bir fark görülmedi, ($p=0,241$). Deney gruplarındaki ortalama $\pm$ SEM değerleri; Tedavi+I/R grubu ($674,58 \pm 52,60$ pg/ml), I/R+Tedavi grubu ($761,14 \pm 42,30$ pg/ml), I/R grubu ($736,27 \pm 28,73$ pg/ml) ve Sham grubu ($649,24 \pm 46,89$ pg/ml) olarak tespit edildi (Şekil 4.16.).



Şekil 4.19. Deney grupları arasında serum HIF-1 α konsantrasyonlarının dağılımı

EDN-1

Serum örneklerinde, deney grupları arasında EDN-1 (pg/ml) konsantrasyonu açısından istatistiksel olarak anlamlı bir fark görülmedi, ($p=0,490$). Deney gruplarındaki ortalama $\pm$ SEM değerleri; Tedavi+I/R grubu ($14,48 \pm 3,45$ pg/ml), I/R+Tedavi grubu ($13,25 \pm 2,74$ pg/ml), I/R grubu ($9,47 \pm 2,22$ pg/ml) ve Sham grubu ($14,49 \pm 2,12$ pg/ml) olarak tespit edildi (Şekil 4.20.)



Şekil 4.20. Deney grupları arasında serum EDN-1 konsantrasyonlarının dağılımı

4.2. Histolojik Bulgular

Gastroknemius kas dokusunda ödem, dejenerasyon, nekroz ve inflamasyon histolojik olarak değerlendirildi ve skorlamalar yapıldı.

Çizelge 4.3. Deney grupları arasında kas doku örneklerine ait histolojik sonuçların dağılımı

Histolojik Sonuçlar	Tedavi+I/R ^a (n=5)	I/R+Tedavi ^b (n=6)	I/R ^c (n=6)	Sham ^d (n=6)	p
Ödem	0,00±0,00	0,66±0,21	1,33±0,33	0,00±0,00	<0,001* a-c=0,001** b-c=0,030**
Dejenerasyon	0,60±0,24	2,00±0,00	3,00±0,00	0,00±0,00	<0,001* a-c=<0,001** b-c=<0,001** a-b=<0,001**
Nekroz	0,40±0,24	1,33±0,21	2,00±0,00	0,00±0,00	<0,001* a-c=<0,001** b-c=0,024** a-b=0,002**
İnflamasyon	0,20±0,20	0,33±0,21	3,00±0,00	0,00±0,00	<0,001* a-c=<0,001** b-c=<0,001**

*: One Way ANOVA Testi

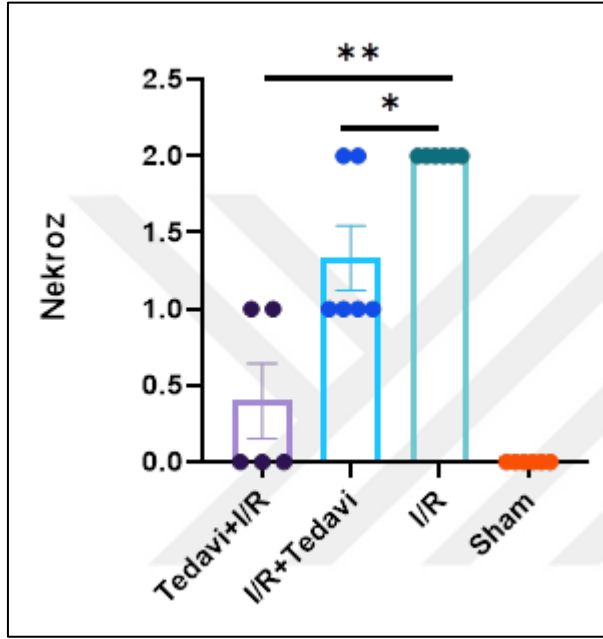
**: ANOVA post-hoc testi için Tukey testi

4.2.1. Ödem

Deney grupları arasında ödem skorunun dağılımında istatistiksel olarak anlamlı bir fark görüldü, ($p < 0,001$). Ödem skoru; Tedavi+I/R ($0,00 \pm 0,00$), I/R+Tedavi ($0,66 \pm 0,21$) ve Sham ($0,00 \pm 0,00$) grubunda I/R grubuna ($1,33 \pm 0,33$) göre anlamlı düzeyde düşük belirlendi ($p=0,001, 0,030, 0,001$ sırasıyla) (Şekil 4.21.)

4.2.3. Nekroz

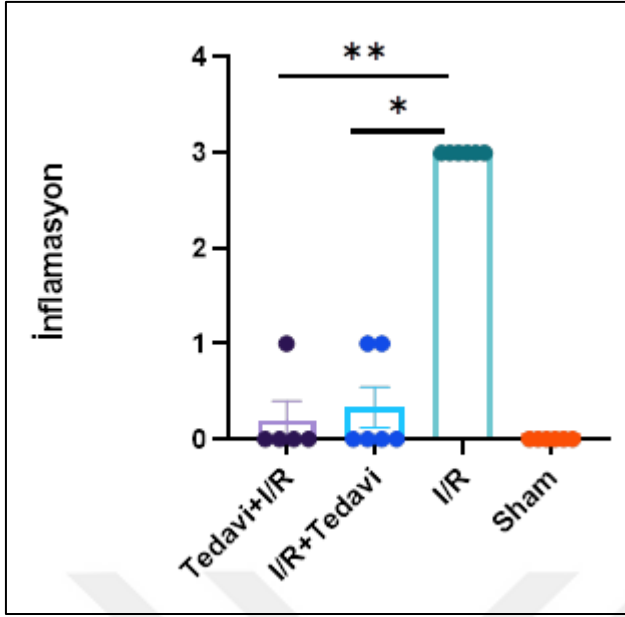
Deney grupları arasında nekroz skorunun dağılımında istatistiksel olarak anlamlı bir fark görüldü, ($p<0,001$). Nekroz skoru; Tedavi+I/R ($0,40\pm0,24$), I/R+Tedavi ($1,33\pm0,21$) ve Sham ($0,00\pm0,00$) grubunda I/R grubuna ($2,00\pm0,00$) göre anlamlı düzeyde düşük belirlendi ($<0,001$, 0,024, 0,001 sırasıyla) (Şekil 4.23.).



Şekil 4.23. Deney grupları arasında nekroz sonuçlarının dağılımı

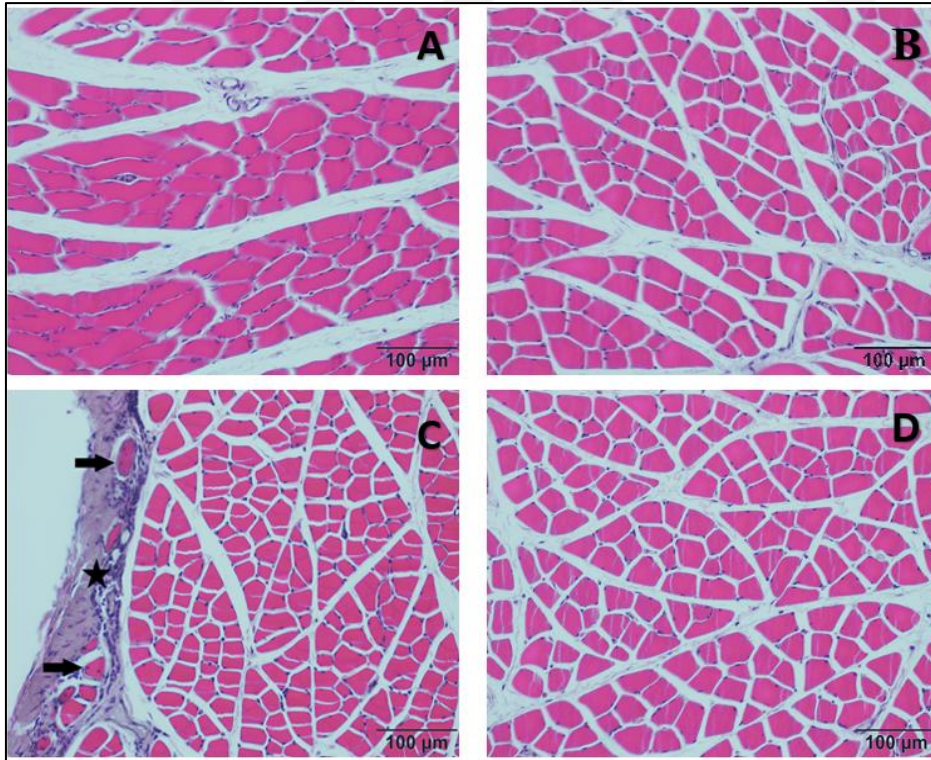
4.2.4. İnflamasyon

Deney grupları arasında inflamasyon skorunun dağılımında istatistiksel olarak anlamlı bir fark görüldü, ($p<0,001$). İnflamasyon skoru; Tedavi+I/R ($0,20\pm0,20$), I/R+Tedavi ($0,33\pm0,21$) ve Sham ($0,00\pm0,00$) grubunda I/R grubuna ($3,00\pm0,00$) göre anlamlı düzeyde düşük belirlendi ($p= < 0,001$ bütün gruplarda) (Şekil 4.24.).



Şekil 4.24. Deney grupları arasında inflamasyon sonuçlarının dağılımı

H&E boyama yöntemi uygulanan gastrocnemius kas doku örneklerinin ışık mikroskobu altındaki görünüşleri Şekil 4.25’de sunulmuştur.



Şekil 4.25. H&E boyama yöntemi uygulanan gastrocnemius kas doku örneklerinin görünümü.

(A) Tedavi+I/R, (B) I/R+Tedavi, (C) I/R grubu, (D) Sham grubu

İnflamasyon+ödem: ★

Dejenerasyon/nekrotik kas hücresi: ➡



5. TARTIŞMA

Günümüzde tıbbi sülük tedavisi hem Türkiye’de hem de dünya genelinde uygulanmaktadır. İçeriğinde 100’den fazla biyoaktif bileşik bulunan tıbbi sülük salgısının etki mekanizmaları hâlen tam olarak aydınlatılamamış olup, tıbbi sülükler ve salgıları üzerine çeşitli bilimsel çalışmalar yürütülmektedir [114, 122-125].

İskelet kasındaki I/R hasarı damar ve kas travmalarına yol açar. Bu sebeple zaman kaybetmeden tedavi prosedürlerin ve cerrahi işlemlerin uygulanmasını gerektirir [126].

Kas I/R hasarını tedavi etmeye yardımcı olacak çeşitli yöntemler tüm dünyada araştırılmaktadır.

Bu tez çalışması kapsamında, deneysel olarak oluşturulan alt ekstremitte I/R hasarında tıbbi sülük uygulaması etkisinin değerlendirilmesi amaçlandı. Ayrıca deneysel I/R modelinden önce tıbbi sülük uygulaması ile deneysel I/R modelinden sonra tıbbi sülük uygulamasının etkileri hem biyokimyasal hem de histopatolojik parametreler üzerinden karşılaştırmalı olarak değerlendirildi. Çalışma kapsamında ratlardan alınan serum örnekleri ve gastroknemius kas dokudan doku homojenatları elde edildi. Tüm bu örneklerden SOD, TNF- α , IL-6, NO, CGRP, GPx, IMA, HIF-1 α , CAT ve EDN-1 parametreleri ELISA ile analiz edildi. Ayrıca kas dokusu örneklerinde histopatolojik incelemeler yapılmıştır.

I/R oluşumunda canlının verdiği ilk tepki mekanizması çeşitlilik gösterir. Bunlardan biri antioksidan savunma mekanizmasıdır. Bu savunma mekanizması gereği reaktif oksijen türleri daha az reaktif türlere dönüştürülür. Bu mekanizmada görevli olan enzimler SOD, GPx ve CAT gibi enzimlerdir. SOD, hücrelerin oksidatif stresle mücadelesinde kritik bir rol oynayan güçlü bir antioksidan enzimdir. SOD, bu zararlı süperoksit radikallerini daha az reaktif olan hidrojen peroksit ve oksijen moleküllerine dönüştürerek oksidatif hasarı azaltır ve hücrel dengeyi korur [41, 127].

CAT, hücrelerin oksidatif stresle başa çıkmasında kritik rol oynayan önemli bir antioksidan enzimdir. Hücresel metabolizma süreçleri sırasında oluşan hidrojen peroksit (H_2O_2), potansiyel olarak zararlı bir reaktif oksijen türüdür ve yüksek konsantrasyonlarda hücresel yapıları tahrip edebilir. CAT, H_2O_2 'yi hızla H_2O ve oksijene O_2 'ye dönüştürerek bu zararlı etkileri nötralize eder ve hücreyi oksidatif hasardan korur [127].

GPx, hücrelerin oksidatif stresle mücadelesinde kritik rol oynayan güçlü bir antioksidan enzimdir. Hücresel metabolizma sırasında ortaya çıkan zararlı reaktif oksijen türlerinin (ROS) etkisiz hale getirilmesinde önemli bir görev üstlenir. GPx, özellikle H_2O_2 ve organik hidroperoksitleri H_2O ve alkol gibi zararsız bileşiklere dönüştürerek oksidatif hasarın önlenmesine katkı sağlar [127, 128]. Bizim çalışmamızda antioksidan parametreler incelendiğinde serum örneklerinde CAT, SOD ve GPx açısından herhangi bir değişiklik gözlemlenmemiştir. Ancak, doku örneklerinde CAT düzeyi; Tedavi+I/R grubunda I/R+Tedavi grubuna göre düşük belirlenmiştir. SOD ve GPx açısından doku örneklerinde anlamlı bir farklılık gözlemlenmemiştir.

Liang ve ark.'nın tavşanlar üzerinde yaptığı çalışmada, iskelet kasında I/R modeli ek olarak IP (ischemia post-conditioning) modelide oluşturulmuş ve kas dokusunda malondialdehit (MDA), SOD, CAT ve GPx enzim aktiviteleri analiz edilmiştir. Tavşanlar rastgele sham, I/R ve IP olmak üzere 3 gruba ayrılmıştır. Çalışmanın sonucunda, I/R grubunda iskelet kası MDA düzeyi anlamlı şekilde artarken, SOD, CAT ve GPx enzim aktiviteleri sham gruba kıyasla anlamlı şekilde azalmıştır. IP uygulaması ise, I/R grubuna göre iskelet kasındaki MDA düzeyini belirgin biçimde azaltmış ve SOD, CAT ile GPx aktivitelerini artırmıştır. Bu bulgular, IP uygulamasının IR kaynaklı iskelet kası hasarına karşı koruyucu etkisinin karmaşık bir moleküler mekanizma ile gerçekleştiğini ortaya koymaktadır [126].

Kocabeyoğlu ve diğerleri, yaptıkları çalışmada; serebral I/R modeli hasarında memantinin etkilerini incelemişlerdir. Ratları; kontrol grubu, iskemi grubu, I/R grubu, memantin grubu olmak üzere 4 gruba ayırmışlardır. Serum SOD düzeyi iskemi grubu ve I/R grubunda; kontrol grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı yüksek saptanmıştır. CAT düzeyi; I/R grubunda, kontrol grubuna göre istatistiksel olarak yüksek; memantin grubunda ise I/R grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı düşük tespit edilmiştir. Çalışmanın sonucunda; global serebral iskemide memantin uygulamasının I/R hasarına karşı koruyucu olabileceğini saptamışlardır [129].

Literatürde farklı I/R modellerinde oksidatif stres biyomarkerları incelenmiştir.

Sehitoglu ve diğerleri, yaptıkları hayvan çalışmasında; abdominal aort I/R modeli oluşturularak Aloe vera (AV)'nın etkinliğini araştırmışlardır. Ratları sham, I/R ve I/R + AV grubu olmak üzere üç gruba ayırmışlardır. Tedavi grubu olarak, iskemi uygulanmadan önce bir ay boyunca her gün 30 mg/kg aloe vera gastrik lavaj yolu ile verilmiş, karaciğer dokusunda MDA, CAT, SOD ve GPx aktiviteleri analiz edilmiştir. I/R + AV grubundaki SOD, CAT ve GPx düzeyleri, sham grubu ile karşılaştırıldığında anlamlı fark görülmemiştir. Ancak, I/R grubuna kıyasla anlamlı derecede daha yüksek bulunmuştur. Karaciğer dokusundaki MDA düzeyleri, I/R + AV grubunda I/R grubuna göre anlamlı olarak daha düşük gözlenmiştir. Çalışmanın sonucunda; aloe vera'nın, I/R hasarına karşı karaciğeri koruyucu etki gösterebileceğini saptamışlardır [130].

Oksidatif stres mekanizmasında önemli olan bir diğer molekül IMA'dır. IMA'nın iskemi sırasında albüminin metal bağlanma bölgelerini değiştiren ROS üretimi ile ilişkili bir marker olduğu düşünülmektedir [131]. Bu nedenle, IMA özellikle hücrel hasar ve oksidatif stresin belirlenmesinde kritik bir rol oynar [57]. Bizim tez çalışmamızda serum ve doku IMA değerlerinde herhangi bir değişiklik gözlemlenmemiştir.

Literatürde farklı I/R modellerinde IMA seviyeleri incelenmiştir. Ates ve diğerleri, yaptıkları çalışmada, renal I/R hasarında oksidatif stres göstergelerini araştırmışlardır. Ratları; sham, 20 dk I/R, 30 dk I/R, 40 dk I/R ve 60 dk I/R olmak üzere 5 gruba ayırmışlardır. IMA ve toplam antioksidan kapasite (TAS), toplam oksidan kapasitesi (TOS) hem serum hem de dokuda incelemişlerdir. Çalışmanın sonucunda; reperfüzyon sonrası doku ve serum örneklerinde IMA, TOS ve TAS değerleri açısından gruplar arasında anlamlı farklılık gözlenmemiştir. Ancak, I/R sonrası böbrek dokusunun histopatolojik incelemesinde tübüler hasar ile iskemi süresi arasında anlamlı bir korelasyon gözlenmiştir. Sonuç olarak, bu çalışmas serum IMA değerlerinin iskemi süresi ile paralel olarak arttığını ve bu artışın histopatolojik hasar bulgularını desteklediğini göstermiştir [132].

Organizmada inflamatuvar ve immünolojik olaylarda sitokinler önemli bir yer tutar. Bu protein ailesi organizma tarafından kontrollü bir şekilde sentezlenir ve organizmanın

karşılaştığı herhangi bir enfeksiyon, yaralanma ve doku hasarı gibi durumlarda lokal veya sistemik inflamatuvar cevap oluşturur [133].

IL-6, bağışıklık sistemi hücreleri tarafından üretilen ve inflamasyon süreçlerinde önemli rol oynayan bir sitokindir. Özellikle inflamasyonun başlatılması ve sürdürülmesinde kilit bir görev üstlenir; diğer proinflamatuvar sitokinlerin salınımını teşvik ederek bağışıklık hücrelerinin aktivasyonunu artırır [41, 42]. Bizim çalışmamızda IL-6 ratlardan elde edilen serum örneklerinde deney grupları arasında istatistiksel olarak anlamlı bir değişiklik gözlemlenmezken, kas doku örneklerinde IL-6 seviyeleri, I/R grubunda Sham grubuna göre anlamlı düzeyde düşük belirlenmiştir, ($p=0,025$). TNF- α , bağışıklık sisteminin düzenlenmesi ve inflamasyonun kontrolünde kritik rol oynayan güçlü bir proinflamatuvar sitokindir [50]. TNF- α , inflamatuvar yanıtı başlatarak diğer proinflamatuvar sitokinlerin ve adezyon moleküllerinin üretimini tetikler, böylece bağışıklık hücrelerinin inflamasyon bölgesine göçünü kolaylaştırır [41, 51, 52]. Bizim çalışmamızda doku örneklerinde TNF- α açısından gruplar arasında herhangi bir değişiklik gözlemlenmemişken, I/R grubunda; Tedavi+I/R, I/R+Tedavi ve sham grubuna göre serum TNF- α seviyeleri anlamlı düzeyde düşük belirlenmiştir. IL-6 molekülü, I/R sırasında kas dokusunda meydana gelen hipoksi ve oksidatif strese bağlı lokal bir proinflamatuvar yanıt başlatır. Bu nedenle dokuda tespiti daha kolaydır. TNF- α ise sistemik inflamatuvar yanıtın güçlü bir tetikleyicisi olup üretildikten sonra direk kana karışır ve kanda yüksek oranda tespit edilebilir [134].

I/R'un başlamasıyla birlikte inflamatuvar yanıtın tetiklenmesi ve sitokin düzeylerinde artış görülmesi beklenir. Ancak çalışmamızda, I/R grubunda doku IL-6 seviyelerinin sham grubuna kıyasla anlamlı derecede düşük bulunması ve serum TNF- α düzeylerinin de diğer gruplara göre anlamlı şekilde azalması, beklenen yanıtın tersi bir durumu göstermektedir. Literatürde ise iskemi döneminde sitokin düzeylerine ilişkin farklı ve yer yer çelişkili sonuçlar bildiren çalışmalar bulunmaktadır.

Börklüce ve diğerleri, yaptıkları çalışmada; ratlarda renal I/R hasarı modelinde iskemi öncesinde uygulanan non-selektif nikotinik asetilkolin reseptör agonisti olan epibatidinin (E) böbrek üzerine koruyucu etkilerini incelemişlerdir. Ratları; sham, I/R, I/R-E, E olmak üzere 4 gruba ayırmışlardır. Çalışmada serum TNF- α düzeyleri ELISA yöntemi ile analiz edilirken IL-6 düzeyleri; Elektrokemilüminesans immünolojik (ECLIA) yöntemi ile analiz edilmiştir. Serum TNF- α ve IL-6 düzeyleri, sham grubu ile karşılaştırıldığında I/R grubunda istatistiksel

olarak anlamlı düzeyde yüksek bulunmuştur. Ancak I/R grubu ile karşılaştırıldığında ise I/R+E ve E gruplarında TNF- α ve IL-6 seviyeleri istatistiksel olarak anlamlı şekilde daha düşük saptanmıştır. Bu çalışmada, I/R grubunda pro-inflamatuar sitokinlerden TNF- α ve IL-6 düzeylerinin yükselmiş olduğunu ve epibatidin uygulamasıyla bu sitokinlerin düzeylerinin gerilediğini gözlemlemişlerdir [135].

NO, azot monoksit olarak da bilinen ve hücresel düzeyde çeşitli biyolojik süreçlerde kritik rol üstlenen küçük ve reaktif bir gaz moleküldür [136]. NO, başlıca endotel hücreleri tarafından sentezlenir ve damar genişlemesini sağlayarak kan akışını düzenler. İskemi sırasında, dokulara oksijen temininin azalması nedeniyle NO sentezi azalır ve bu durum damar daralması ile kan akışının daha da kısıtlanmasına yol açabilir [48]. Reperfüzyon sürecinde ise oksijenin yeniden sağlanması, NO üretiminde artışa neden olabilir. Ancak bu artış, aşırı reaktif oksijen türleri (ROS) ile birleşerek nitrozatif strese ve hücresel hasarın daha da derinleşmesine yol açabilir [18, 49]. Vazodilatasyon sağlayan bu molekül I/R oluşumunda hem koruyucu hem de fazla üretildiğinde zarara yol açan çift yönlü moleküldür. Bizim çalışmamızda, serum ve doku örneklerinde deney grupları arasında NO düzeyleri açısından farklılık gözlemlenmemiştir.

Schneider ve diğerleri, yaptıkları çalışmada, l-Arg takviyesinin iskemik akut böbrek hasarında renal fonksiyon ve biyokimyasal parametreler üzerindeki etkilerini incelemişlerdir. Dişi Sprague-Dawley ratları; iskemi, l-Arg grubu, sham grubu ve kontrol grubu olmak üzere 4 gruba ayırmışlardır. Bu çalışmada böbrek iskemi modelinde l-Arg takviyesi verilen grupta iskemi grubuna göre endotelial NO sentaz (eNOS) düzeylerinde önemli bir artış gözlemlenmiştir. Bu da oluşturulan böbrek iskemisinde l-Arg takviyesinin iyileşme sürecinde etkisi olduğunu göstermektedir [137]. Çalışmamızda NO düzeyleri ölçülmüş, ancak NO sentezinden sorumlu enzimler değerlendirilmemiştir. Bu nedenle, NO seviyelerinde gözlenen değişiklik olmaması, enzim aktivitesinin başlamamış olduğunu göstermemektedir.

EDN-1, güçlü vazokonstriktör etkisi ve hücresel büyümeyi düzenleyici özellikleriyle öne çıkan bir peptid hormondur. EDN-1, inflamasyon ve oksidatif stres ile doğrudan ilişkilidir. İnflamatuar süreçler ve oksidatif stres koşulları, EDN-1 sentezini artırarak damar fonksiyonlarını olumsuz yönde etkileyebilir [67].

Luyt ve diğeri, yaptıkları çalışmada, Bosentan gibi ET reseptör antagonistlerinin alt ekstremitte iske mi patogene zindeki rolü vekoruyucu etkisinin olup olmadığını araştırmışlardır. Sıçanlarda alt ekstremitte iske mi modeli; femoral arterin devre dışı bırakılması ve kollateral damarların embolizasyonu ile oluşturulmuştur. Çalışmada iske miyi takiben endotelin sistemine ait bileşenler, farklı zamanlarda hem plazma hem de kas dokusunda analiz edilmiştir. Ayrıca hayvanlar; tedavi almayan iske mi grubu, Bosentan verilen iske mi grup ve sham olarak ayrılmıştır. Plazma ET-1 seviyelerinin iske mi grubunda 5 saat sonra 3 ila 4 kat arttı, ardından 1. günde başlangıç seviyesinin iki katına düştü ve sonrasında stabil kaldığı gözlemlenmiştir. Bosentan ile tedavi edilen grupta Plazma ET-1 seviyelerinin kinetiği iske mi grubu ile benzerdi. Doku ET-1 seviyeleri ise 5. günde iske mi grubunda sham grubuna göre anlamlı şekilde artarak 10 kat yükseldiği tespit edilmiştir. Bu bulgular doğrultusunda, endotelin sisteminin kritik iske mi sırasında aktive olduğunu ve ET reseptör antagonistlerinin kas dokusu üzerine kısmi bir koruyucu etki sağlayabileceğini belirtmişlerdir [138]. Bu çalışmada, iske mi modeli sonrasında 5 günlük süreç boyunca yalnızca ET-1 seviyeleri değil, aynı zamanda bu moleküllerin gen ekspresyonları da değerlendirilmiştir. Bizim çalışmamızda ise serum ve doku örneklerinde EDN-1 seviyeleri açısından gruplar arasında herhangi bir farklılık gözlemlenmemiştir. Çalışmamız I/R sonrası 24 saatlik süreyi kapsadığı için, molekülün sentezi için gerekli gen ekspresyonlarının oluşması için yeterli zaman sağlanmamış olabilir [139].

HIF-1 α hücrelerin oksijen düzeylerindeki değişimlere duyarlı olarak aktive olan kritik bir transkripsiyon faktörüdür [55]. HIF-1 α 'nın temel işlevi, hücrelerde oksijen seviyelerinin azalması durumunda adaptif yanıtları koordine ederek hücre sel hayatta kalmayı desteklemektir [140]. Bizim çalışmamızda serum ve doku örneklerinde HIF-1 α seviyesi açısından gruplar arasında anlamlı bir farklılık gözlemlenmemiştir. Bu durum deneysel süreçte iske mi süresinin kısa tutulması veya reperfüzyonun hızlı başlatılması nedeniyle olmuş olabilir [141].

Cursio ve diğeri, yaptıkları çalışmada, ratlarda karaciğer I/R hasarı modelinin HIF-1 α gen ekspresyon düzeyleri ve apoptoz üzerindeki etkisini incelemişlerdir. HIF-1 α düzeyleri, reperfüzyondan 1 ila 3 saat sonra iske miye uğramış karaciğer loblarında, iske miye uğramamış loblara göre üç kat artış göstermiştir. Reperfüzyondan 6 saat sonra ise HIF-1 α düzeyleri azalmış ve iske miye uğramış ile iske miye uğramamış karaciğer lobları arasında

anlamalı bir fark gözlemlenmemiştir. Çalışmanın sonucunda, karaciğer I/R, karaciğerde HIF-1 α ekspresyonu ve apoptozda artışa neden olduğunu saptamışlardır [142].

CGRP, merkezi ve periferik sinir sisteminde yaygın olarak bulunan ve çeşitli fizyolojik süreçlerde kritik roller üstlenen bir nöropeptittir. Başlıca trigeminal sinir sistemi nöronlarından salınan CGRP, özellikle nörovasküler ve nöroinflamatuvar mekanizmalarda önemli bir düzenleyici molekül olarak görev yapar [143]. CGRP ayrıca, kardiyovasküler fonksiyonun düzenlenmesinde bir aktiviteye sahiptir. CGRP, kan damarlarının çevresinde yoğun bir perivasküler sinir ağı içerisinde olup birçok doku ve organda tanımlanmıştır [144]. Bizim çalışmamızda CGRP düzeyi açısından gruplar arasında anlamlı farklılık gözlemlenmedi.

I/R modeli uygulanan çalışmalarda meydana gelen hücre ve doku düzeyindeki değişiklikler histopatolojik incelemelerle gösterilebilir ve biyokimyasal sonuçlarla paralellik arz edebilir. İskemi oluşan dokuda meydana gelen hasar, reperfüzyon oluşumu ile şiddetlenir. Bu da perfüzyonun iskeminin kendisinden daha zararlı olmasına yol açar [145]. I/R hasarında ödem gelişimi; hücre içi iyon dengesizliği, oksidatif stres, endotel disfonksiyonu ve inflamatuvar hücrelerin aktivasyonunun ortak etkisiyle ortaya çıkar. Bu mekanizmalar, lokal doku hasarının yanı sıra uzak organlarda da (örneğin akciğer, böbrek) ikincil ödem oluşumuna neden olabilir [146]. I/R hasarında dejenerasyon; enerji kaybı, oksidatif stres, kalsiyum yüklenmesi, inflamatuvar mediatörlerin etkisi ve mitokondriyal bozulmanın birlikte yol açtığı hücresel yıkımın bir göstergesidir. Bu mekanizma hem lokal doku hasarında hem de uzak organ etkilenmelerinde belirgin rol oynar [12]. Dejenerasyon hücrelerin oksidatif stres ve inflamasyonla fonksiyonlarını kaybetmesi sonrasında meydana gelir. Canlının antioksidan enzim mekanizmaları veya albümin gibi protein moleküllerinin değişiklik göstermesi sonucunda oluşur. Bu da antioksidan enzim mekanizmalarının dejenerasyon önemli olduğunu göstermektedir [147]. I/R hasarında nekroz; oksijen eksikliğine bağlı ATP azalması, reaktif oksijen türlerinin birikimi, kalsiyum dengesizliği, lizozomal enzim aktivasyonu ve inflamatuvar yanıtın bir araya gelmesiyle ortaya çıkar. Bu süreç hücre membranı bütünlüğünün bozulması, çekirdek piknozu, sitoplazmik eozinofili ve doku düzeyinde koagülatif nekroz olarak gözlenir [12, 18]. Hücre metabolizması sonucunda meydana gelen membran ve organel hasarları hücre ve dolayısıyla doku hasarına ve sonucunda ölümüne (nekroz) yol açmıştır. I/R hasarında inflamasyon, dokunun oksijensiz kalmasının ardından yeniden kanlanmasıyla birlikte gelişen kompleks bir immün yanıtın

sonucudur. İskemi döneminde hücrelerden salınan hasarla ilişkili moleküler paternler (DAMPs) ve reperfüzyonla artan reaktif oksijen türleri (ROS), endotelial hücre aktivasyonunu tetikleyerek E-selektin, ICAM-1 ve VCAM-1 gibi adezyon moleküllerinin ekspresyonunu artırır. Bu durum nötrofillerin endotele tutunmasına ve dokuda birikmesine yol açar. Nötrofillerden salınan miyeloperoksidaz (MPO), proteazlar ve serbest radikaller dokuda ek hasar oluşturur. Aynı zamanda TNF- α , IL-1 β ve IL-6 gibi proinflamatuvar sitokinlerin artışı, inflamatuvar yanıtı hem lokal hem de sistemik düzeyde şiddetlendirir. Bu mekanizmalar sonucunda, reperfüzyon döneminde gelişen inflamasyon, doku hasarının derinleşmesine ve hücre ölümünün artmasına neden olur [148, 149].

Bizim çalışmamızda deneysel olarak oluşturulan alt ekstremité I/R hasarında tıbbi sülük uygulaması etkisi doku örneklerinde histopatolojik olarak da incelenmiştir. Ödem, dejenerasyon, nekroz ve inflamasyon skorlarının tümü Tedavi+I/R ve I/R+Tedavi grubunda I/R grubuna göre anlamlı düzeyde düşük belirlendi. Bunun sebebi, tıbbi sülük tedavisinin I/R üzerine etkisi olarak düşünmekteyiz. Tıbbi sülük salgısında bulunan anti-enflamatuvar, anti-mikrobiyal, anti-koagülan, anti-platelet ve analjezik gibi çeşitli etkilere sahip maddelerin etkisi ile iskemi azalmış, ve sonuç olarak ödem, dejenerasyon, nekroz ve inflamasyon azalmış; böylece tıbbi sülük tedavisinin doku hasarını sınırlayıcı ve iyileşmeyi destekleyici etkileri histopatolojik bulgularla da doğrulanmıştır.

Literatürde farklı I/R modelinde sülük tedavisi ve farklı alternatif tedavi yöntemlerinin incelendiği hayvan çalışmaları vardır.

Davoodi ve arkadaşları, sülük tedavisinin testiküler I/R hasarına karşı koruyucu mekanizmasını inceleyen kapsamlı bir çalışma gerçekleştirmiştir. Çalışmada sham grubu, torsiyon/detorsiyon grubu ve torsiyon/detorsiyon + sülük tedavisi grubu olmak üzere üç farklı deney grubu oluşturulmuştur. Plazma ve testis dokusunda GPx, CAT, TAS ve MDA düzeyleri değerlendirilmiş; ayrıca testis dokusu histopatolojik olarak incelenmiştir. Sonuçlar incelendiğinde, sülük tedavisi uygulanan grupta MDA seviyesinin anlamlı düzeyde azaldığı, GPx, TAS ve CAT seviyelerinin ise belirgin şekilde arttığı bildirilmiştir. Histopatolojik açıdan değerlendirildiğinde, I/R ile oluşan germinal hücre hasarı, koagülatif nekroz, intertübüler kanama, hiperemi, vakuolizasyon ve seminifer tübüllerde hücre dökülmesi gibi bulguların sülük tedavisi ile anlamlı derecede azaldığı gösterilmiştir. Bu sonuçlar, sülük tedavisinin antioksidan, antiinflamatuvar ve antiapoptotik etkileri sayesinde

torsiyon/detorsiyon sonrası testiküler dokudaki hasarı hafifletebileceğini ortaya koymuştur [150]. Söz konusu çalışma, bizim çalışmamızdan farklı olarak testiküler I/R modeli üzerinde ve farklı bir sülük türü olan *Hirudo medicinalis* ile gerçekleştirilmiştir. Bununla birlikte, her iki çalışmada da benzer biyokimyasal parametreler incelenmiştir. Davoodi ve arkadaşlarının çalışmasında olduğu gibi, bizim çalışmamızda da doku ve serum örneklerinde GPx ve CAT düzeyleri analiz edilmiştir. Ancak, tedavi gruplarında iskemi grubuna göre bu iki marker açısından anlamlı farklılık gözlemlenmedi. Ayrıca, bizim çalışmamızda I/R öncesi ve sonrası sülük uygulanan deney gruplarında yalnızca I/R yapılan gruba kıyasla ödem, dejenerasyon, nekroz ve inflamasyon belirgin derecede azalması histopatolojik olarak gözlemlenmiştir. Bu açıdan bakıldığında, her iki çalışmanın sonuçları birbirini tamamlar nitelikte olup, sülük tedavisinin farklı organ ve dokularda antioksidan ve doku koruyucu etkiler gösterebileceğini düşündürmektedir.

Ünal ve diğerleri, tarafından yürütülen bir çalışmada, sülük tedavisinin flep nekrozu üzerinde olumlu etkiler gösterdiğini ve bu tedavi yönteminin flep sağkalım oranını anlamlı düzeyde artırdığını ortaya koymuştur [122]. Söz konusu çalışma, sülük tedavisinin mikrosirkülasyonu iyileştirici ve inflamasyonu baskılayıcı etkilerini ortaya koyarak, doku bütünlüğünü korumadaki potansiyelini vurgulamaktadır.

Ünal ve diğerleri, yaptıkları bir çalışmada; insizyonel yara modeli oluşturulan ratlarda sülük tükürük ekstraktının ve tıbbi sülük tedavisinin yara iyileşmesi üzerindeki etkilerini araştırmıştır. Ratları kontrol grubu, tıbbi sülük tedavisi grubu (Grup II) ve sülük tükürük ekstraktı grubu (Grup III) olmak üzere üç gruba ayırmıştır. Histopatolojik incelemeler sonucunda, Grup III'te diğer gruplara kıyasla daha hızlı ve belirgin bir yara iyileşmesi gözlenmiştir. Bu grupta epitel rejenerasyonu, granülasyon dokusu kalınlığı, fibroblast proliferasyonu, neovaskülarizasyon gibi iyileşme parametrelerinde anlamlı düzeyde artış; inflamasyon düzeylerinde ise azalma tespit edilmiştir. Ayrıca VEGF pozitif hücre oranları Grup III'te en yüksek düzeyde bulunmuş; bunu Grup II izlemiş ve her iki grup da kontrol grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı derecede yüksek bulunmuştur. Bu sonuçlar, Grup III uygulamasının yara iyileşmesini epitel ve granülasyon dokusu gelişimini artırarak ve VEGF aracılı neovaskülarizasyonu güçlendirerek desteklediğini göstermektedir [151].

Sun ve diğerkleri, yaptıkları bir çalışmada, sülüklerden saflaştırılmış bir özüt olan “Shuxuetong (SXT)” enjeksiyonunun arka ekstremite iskemi modelinde anjiyogenez üzerindeki etkilerini ve bu etkilerin altında yatan moleküler mekanizmaları araştırmışlardır. Çalışmada fareler kullanılmış ve sol femoral arter ligasyonu uygulanarak arka ekstremite iskemisi oluşturulmuştur. Operasyon sonrasında hayvanlar dört hafta boyunca farklı gruplara ayrılmış; bu gruplara sırasıyla salin (kontrol), 10 mg/kg/gün cilostazol ve 37.5, 75 ile 150 mg/kg/gün dozlarında SXT enjeksiyonu verilmiştir. İskemi şiddeti lazer Doppler perfüzyon görüntüleme sistemi ile değerlendirilmiş; doku iyileşmesi ve kapiller yoğunluk ise histolojik ve immünofloresan boyamalarla incelenmiştir. Ayrıca iskemik dokulardaki vasküler endotelial büyüme faktörü-A (VEGF-A) ve trombosit kaynaklı büyüme faktörü-BB (PDGF-BB) düzeyleri RT-PCR ve ELISA yöntemleriyle ölçülmüştür. Bulgular, SXT enjeksiyonunun gastroknemius kasındaki kan akışını anlamlı ölçüde artırdığını, doku hasarını azalttığını ve kapiller yoğunluğu yükselterek anjiyogenezi desteklediğini göstermiştir. Ayrıca SXT’nin VEGF-A ve PDGF-BB düzeylerini hem mRNA hem de protein düzeyinde artırdığı belirlenmiştir. Çalışma, SXT enjeksiyonunun iskemik hastalıklarda terapötik potansiyel taşıdığını ve klinik uygulamalara yönelik önemli biyolojik mekanizma verileri sunduğunu göstermektedir [152].

Mousavian ve diğerkleri, yaptıkları bir çalışmada; serbest doku transferi sonrasında görülen önemli komplikasyonlar incelenmiş ve bu durumlarda sülük tedavisinin (hirudoterapi) etkileri değerlendirilmiştir. Hayvan deneyi yerine literatür taraması yapılmış ve özellikle venöz tıkanıklık, konjesyon, iskemi-reperfüzyon hasarı ve trombüs oluşumu gibi sorunlar ele alınmıştır. Çalışmada, sülük tedavisinin bu komplikasyonları azaltmada yardımcı olabileceği belirtilmiş; tedavinin kan akışını artırıcı ve pıhtı oluşumunu engelleyici etkilerine dikkat çekilmiştir. Ancak, bu yöntemin her hasta için uygun olmayabileceği, bazı durumlarda farklı yöntemlerin tercih edilmesi gerekebileceği de vurgulanmıştır. Sonuç olarak, sülük tedavisi serbest fleplerde destekleyici bir yöntem olarak değerlendirilmektedir [153].

Chen ve diğerkleri, yaptıkları çalışmada, iskelet kasında I/R hasarına karşı Ginkgo biloba ekstraktının (EGb761) koruyucu etkileri araştırılmıştır. Sıçanlar rastgele kontrol ve EGb761’in farklı dozlarını (25/50/100/200 mg/kg) alan deney gruplarına ayrılmıştır. İki saatlik turnike ile indüklenen iskelet kası iskemisini takiben reperfüzyon uygulanmıştır. Kan ve kas doku örneklerinde inflamatuvar belirteçler (IL-6, TNF- α), oksidatif stres göstergeleri

(NO, MDA, MPO) ve antioksidan düzeyleri (GSH) değerlendirilmiştir. EGb761 tedavisi, inflamasyon ve oksidatif stres belirteçlerinde anlamlı azalma ve histopatolojik olarak daha az doku hasarı ile sonuçlanmıştır. Bu bulgular, EGb761'in iskemik kas dokusunu koruyucu etkileri olduğunu göstermektedir [154].

Literatürde ayrıca iskemik durumlarda sülük ve farklı alternatif tedavi yöntemlerinin incelendiği insan çalışmaları da vardır.

Resch ve diğerleri, nın yaptıkları retrospektif gözlemsel çalışmada, arteriyel malperfüzyona bağlı akut ekstremitte iskemisi gelişen ve tedaviye dirençli olan pediatrik yoğun bakım hastalarında hirudoterapinin etkinliği ve sonuçları değerlendirilmiştir. Çalışmaya 7 çocuk hasta dâhil edilmiş, leech uygulamasının ortalama başlama süresi iskeminin fark edilmesinden sonra 3 gün, uygulama süresi ise ortalama 3.9 gün olarak bildirilmiştir. Beş hastada kanama nedeniyle tedavi sonlandırılmıştır. Mortalite oranı %57 olarak bildirilmiş ve tüm ölümler çoklu organ yetmezliğine bağlı gerçekleşmiştir. Sağ kalan üç hastanın dört ekstremitesinde kısmi amputasyon gerekmiştir. Leech uygulamasına bağlı kan kaybı ve transfüzyon ihtiyacı artmıştır. Bulgular, hirudoterapinin arteriyel kaynaklı ekstremitte iskemilerinde dikkatle ve belirlenmiş protokoller çerçevesinde kullanılması gerektiğini göstermektedir. Bu çalışmada elde edilen veriler, tedavinin standart hale getirilmesi için daha geniş ve prospektif çalışmalara ihtiyaç olduğunu ortaya koymaktadır [155].

Afify ve diğerleri, yaptıkları çalışmada, periferik arter hastalığı (PAD) ve ekstremitte iskemi tedavisinde hirudoterapinin etkisini incelemiştir. PAD, dünya genelinde önemli bir morbidite ve mortalite nedeni olup, ekstremitte iskemisi ciddi dinlenme ağrıları, uyuşukluk ve bacaklarda ya da ayaklarda nabız kaybı gibi belirtilere yol açmaktadır. Çalışmada, aşağı bacak amputasyonu önerilen bir hasta, tıbbi tedaviye yanıtızsızlık ve cerrahi müdahaleye rağmen kendi kendine hirudoterapi uygulayarak belirtilerinde önemli bir iyileşme gözlemiştir. Altı ay süresince devam eden tedavi sonrası ağrılarının, yanma hissinin ve uyuşukluğunun belirgin şekilde azaldığı bildirilmiştir. Bu bulgular, periferik arter hastalığı ve ekstremitte iskemisi tedavisinde alternatif bir yöntem olarak hirudoterapinin potansiyel faydalarını ortaya koymaktadır. Ancak, tedavinin etkinliği ve uzun vadeli sonuçları hakkında daha fazla veri toplamak için kapsamlı çalışmalar gereklidir [156].

Li ve diğerkleri, yaptıkları çalışmada, akut iskemik inme tedavisinde hirudinin etkisi incelenmiştir. Çalışma, orta serebral arter tıkanıklığı/reperfüzyon modelinde fareler kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Hirudin, doz bağımlı olarak serebral infarktüs alanını kısıtlamış ve 40 mg/kg dozunda hareket bozukluklarını belirgin şekilde iyileştirmiştir. Hirudin, sülüklerin tükürük bezlerinde doğal olarak bulunan, kanı antikoagülan özelliğı olan bir peptittir. Bu çalışmanın bulguları, hirudinin akut iskemik inme tedavisinde umut verici bir ajan olduğunu göstermektedir [157].

Bu tez çalışmasında I/R'nun düzeltilmesinde, alternatif tedavi yöntemi olarak tıbbi sülük tedavisinin etkinliğı alt ekstremitede incelenmiş, sülük tedavisinin I/R modelinden önce ve I/R modelinden sonra uygulanarak karşılaştırmalı biçimde değerlendirilmiştir. Böylece tedavi zamanlamasının biyokimyasal ve histopatolojik yanıtlar üzerindeki olası farklılıkları gözlenebilmiştir. Ayrıca çalışmada ayrı bir I/R modelinin olması gruplar arasında karşılaştırmayı net bir şekilde yapılabilirliğini sağlamıştır. Özellikle histopatolojik olarak yapılan incelemelerde ödem, dejenerasyon, nekroz ve inflamasyon skorlarının efektif bir şekilde düzeldiğı gözlemlenmiştir. Bilimsel literatürlerde tıbbi sülük tedavisinin iskemi üzerindeki etkinliğı araştırılmıştır, yine de farklı modellerde ve özellikle iskelet kas iskemisi hakkında sülük tedavisinin etkinliğı hakkında daha çok bilimsel çalışmaya ihtiyaç vardır.

6. SONUÇ VE ÖNERİLER

Bu deneysel çalışma ile alt ekstremite I/R hasarı sonrasında tıbbi sülük tedavisinin biyokimyasal ve histopatolojik parametreler üzerindeki etkilerini inceledik. Serum ve kas doku örneklerinde SOD, TNF- α , IL-6, NO, CGRP, GPx, İMA, HIF-1 α , CAT ve EDN-1 biyokimyasal parametreleri analiz edildi. Gastroknemius kas doku örneklerinde ödem, dejenerasyon, nekroz ve inflamasyon skorlarına ait değişiklikler histolojik analiz ile değerlendirildi.

Çalışmamız, özellikle I/R hasarını azaltma konusunda tıbbi sülük tedavisinin umut vadeden sonuçlarını ortaya koymaktadır. Çalışmamızın sonuçlarına göre hem I/R sonrası hem de I/R öncesi yapılan tıbbi sülük tedavisinin iskemiye azaltmada etkin bir tedavi yöntemi olduğu düşünülmektedir. Bu çalışma alt ekstremite I/R hasarının tedavisinde tıbbi sülük uygulamasının kullanılabileceğini ve gelecekte bu alanda yapılacak yeni çalışmalara ışık tutabileceğini bildirmektedir.

6.1. Sonuçlar

6.1.1. Serum örneklerine ait sonuçlar

1. Serum SOD parametresinin deney grupları arasında dağılımında istatistiki olarak anlamlı düzeyde fark tespit edilmemiştir, (p=0,846).
2. Serum TNF- α parametresinin deney grupları arasında dağılımında istatistiki olarak anlamlı düzeyde fark kaydedilmiştir, (p=0,047). TNF- α düzeyi; I/R grubunda Tedavi+I/R, I/R+Tedavi ve sham grubuna göre anlamlı düzeyde düşük belirlenmiştir, (p değerleri sırasıyla; p=0,045; p=0,017; p=0,015).
3. Serum IL-6 parametresinin deney grupları arasında dağılımında istatistiki olarak anlamlı düzeyde fark tespit edilmemiştir, (p=0,213).
4. Serum NO parametresinin deney grupları arasında dağılımında istatistiki olarak anlamlı düzeyde fark tespit edilmemiştir, (p=0,383).
5. Serum CGRP parametresinin deney grupları arasında dağılımında istatistiki olarak anlamlı düzeyde fark tespit edilmemiştir, (p=0,939).
6. Serum GPX parametresinin deney grupları arasında dağılımında istatistiki olarak anlamlı düzeyde fark tespit edilmemiştir, (p=0,767).

7. Serum IMA parametresinin deney grupları arasında dağılımında istatistiki olarak anlamlı düzeyde fark tespit edilememiştir, ($p=0,414$).
8. Serum HIF-1 Alfa parametresinin deney grupları arasında dağılımında istatistiki olarak anlamlı düzeyde fark tespit edilememiştir, ($p=0,241$).
9. Serum CAT parametresinin deney grupları arasında dağılımında istatistiki olarak anlamlı düzeyde fark tespit edilememiştir, ($p=0,493$).
10. Serum EDN-1 parametresinin deney grupları arasında dağılımında istatistiki olarak anlamlı düzeyde fark tespit edilememiştir, ($p=0,490$).

6.1.2. Doku örneklerine ait sonuçlar

1. Doku SOD parametresinin deney grupları arasında dağılımında istatistiki olarak anlamlı düzeyde fark tespit edilmemiştir, ($p=0,103$).
2. Doku TNF- α parametresinin deney grupları arasında dağılımında istatistiki olarak anlamlı düzeyde fark edilmemiştir, ($p=0,340$).
3. Doku IL-6 parametresinin deney grupları arasında dağılımında istatistiki fark tespit edilmiştir ($p=0,038$). IL-6 düzeyi; I/R grubunda Sham grubuna göre anlamlı düzeyde düşük belirlenmiştir, ($p=0,025$).
4. Doku NO parametresinin deney grupları arasında dağılımında istatistiki olarak anlamlı düzeyde fark tespit edilmemiştir, ($p=0,091$).
5. Doku CGRP parametresinin deney grupları arasında dağılımında istatistiki olarak anlamlı düzeyde fark tespit edilmemiştir, ($p=0,753$).
6. Doku GPX parametresinin deney grupları arasında dağılımında istatistiki olarak anlamlı düzeyde fark tespit edilmemiştir, ($p=0,900$).
7. Doku IMA parametresinin deney grupları arasında dağılımında istatistiki olarak anlamlı düzeyde fark tespit edilmemiştir, ($p=0,852$).
8. Doku HIF-1 Alfa parametresinin deney grupları arasında dağılımında istatistiki olarak anlamlı düzeyde fark tespit edilmemiştir, ($p=0,612$).
9. Doku CAT parametresinin deney grupları arasında dağılımında istatistiki olarak anlamlı düzeyde fark tespit edilmiştir, ($p=0,011$). CAT düzeyi; Tedavi+I/R grubunda I/R+Tedavi grubuna göre düşük belirlenmiştir, ($p=0,011$).
10. Doku EDN-1 parametresinin deney grupları arasında dağılımında istatistiki olarak anlamlı düzeyde fark tespit edilmemiştir, ($p=0,204$).

6.1.3. Histoloji örneklerine ait sonuçlar

1. Deney grupları arasında ödem skoru; Tedavi+I/R ($0,00\pm0,00$) ve I/R+Tedavi ($0,66\pm0,21$) grubunda I/R grubuna ($1,33\pm0,33$) göre anlamlı düzeyde düşük belirlendi ($<0,001$, $0,030$ sırasıyla).
2. Deney grupları arasında dejenerasyon skoru; Tedavi+I/R grubunda ($0,60\pm0,24$) ve I/R+Tedavi grubunda ($2,00\pm0,00$) I/R grubuna ($3,00\pm0,00$) göre anlamlı düzeyde düşük belirlendi ($<0,001$, $<0,001$ sırasıyla).
3. Deney grupları arasında nekroz skoru; Tedavi+I/R grubunda ($0,40\pm0,24$) ve I/R+Tedavi grubunda ($1,33\pm0,21$) I/R grubuna ($2,00\pm0,00$) göre anlamlı düzeyde düşük belirlendi ($<0,001$, $0,024$ sırasıyla).
4. Deney grupları arasında inflamasyon skoru; Tedavi+I/R ($0,20\pm0,20$) ve I/R+Tedavi ($0,33\pm0,21$) grubunda I/R grubuna ($3,00\pm0,00$) göre anlamlı düzeyde düşük belirlendi ($<0,001$, $<0,001$ sırasıyla).



KAYNAKLAR

1. Ozcan, O., Erdal, H. and Yonden, Z. (2015). İskemi-reperfüzyon hasarı ve oksidatif stres ilişkisine biyokimyasal bakiş. *The Medical Journal of Mustafa Kemal University*, 6(23), 27-33.
2. Siemionow, M. and Arslan, E. (2004). Ischemia/reperfusion injury: a review in relation to free tissue transfers. *Microsurgery: Official Journal of the International Microsurgical Society and the European Federation of Societies for Microsurgery*, 24(6), 468-475.
3. EE, M.-J. (2008). Factors in the pathophysiology of the liver ischemia-reperfusion injury. *Journal of Surgical Research*, 147, 153-159.
4. Criqui, M.H., Matsushita, K., Aboyans, V., Hess, C.N., Hicks, C.W., Kwan, T.W., McDermott, M.M., Misra, S. and Ujueta, F. (2021). Lower extremity peripheral artery disease: contemporary epidemiology, management gaps, and future directions: a scientific statement from the American Heart Association. *Circulation*, 144(9), e171-e191.
5. Braunersreuther, V. and Jaquet, V. (2012). Reactive oxygen species in myocardial reperfusion injury: from physiopathology to therapeutic approaches. *Current Pharmaceutical Biotechnology*, 13(1), 97-114.
6. Gökşin, İ., Akbulut, M., Baltalarlı, A., Saçar, M., Kaya, Ş., Özcan, V. and Düzcan, E. (2006). Normovolemik hemodilüsyonun alt ekstremitte iskemi-reperfüzyonu sonrası oluşan akciğer hasarı üzerine olan etkisi. *Türk Göğüs Kalp Damar Cerrahisi Dergisi*. <https://hdl.handle.net/11499/41041>
7. Desilva, R., Dunning, J., Trull, A. and Vuylsteke, A. (2003). A review of ischaemia-reperfusion injury in the cardiorespiratory system. *Annals of Cardiac Anaesthesia*, 6(2), 126-131.
8. Boğa, M. (2009). Akut ekstremitte iskemisi. *Turkish Journal of Family Practice*, 13(1), 11-15.
9. Gödekmerdan, A., Arusan, S., Bayar, B. and Sağlam, N. (2011). Tıbbi sülükler ve hirudoterapi. *Turkiye Parazitoloj Dergisi*, 35(4), 234-239.
10. Hildebrandt, J.-P. and Lemke, S. (2011). Small bite, large impact—saliva and salivary molecules in the medicinal leech, *Hirudo medicinalis*. *Naturwissenschaften*, 98(12), 995-1008.
11. Parlakpınar, H. and Polat, S. (2021). Hirudoterapi (tıbbi sülük uygulaması) tarihçesi. *Turkiye Klinikleri Traditional and Complementary Medicine-Special Topics*, 2(3), 1-6.
12. Eltzschig, H.K. and Eckle, T. (2011). Ischemia and reperfusion—from mechanism to translation. *Nature Medicine*, 17(11), 1391-1401.

13. Panisello-Roselló, A. and Roselló-Catafau, J. (2018). *Molecular mechanisms and pathophysiology of ischemia-reperfusion injury*. New York: MDPI, 4093.
14. Özkaya, F.C. and Koçdor, H. (2008). İskemi-reperfüzyon ve kanser metastazı: biyokimyasal bakış. *Dokuz Eylül Üniversitesi Tıp Fakültesi Dergisi*, 22(2), 89-98.
15. Ekinici, F.N.A. *Sıçanlarda deneysel olarak oluşturulan alt ekstremitte iskemi-reperfüzyon hasarına karşı naringin ve silymarin'in koruyucu etkilerinin araştırılması*. Doktora Tezi, Atatürk Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Erzurum, 78-85.
16. Şen, L.S. (2009). *Sıçanlarda oluşturulan deneysel ince barsak iskemi-reperfüzyon modelinde obestatinin olası anti-inflamatuar etkisi*. Yüksek Lisans Tezi, Marmara Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Enstitüsü, İstanbul, 45-52.
17. Ortadeveci, A. and Öz, S. (2017). Böbrek iskemi-reperfüzyon hasarı üzerine bir derleme. *Osmangazi Tıp Dergisi*, 39(3), 115-124.
18. Kalogeris, T., Baines, C.P., Krenz, M. and Korthuis, R.J. (2012). Cell biology of ischemia/reperfusion injury. *International Review of Cell and Molecular Biology*, 298, 229-317.
19. Bağcı, E. (2012). *Uzak iskemik önkoşullama ile birlikte kullanılan deksmedetomidinin sıçan renal iskemi reperfüzyon hasarına etkileri*. Yüksek Lisans Tezi, Dokuz Eylül Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Enstitüsü, İzmir, 66-72.
20. McMichael, M. and Moore, R.M. (2004). Ischemia-reperfusion injury pathophysiology, part I. *Journal of Veterinary Emergency and Critical Care*, 14(4), 231-241.
21. Hatanaka, N., Kamiike, W., Shimizu, S., Miyata, M., Inoue, T., Yoshida, Y., Tagawa, K. and Matsuda, H. (1995). Ca²⁺ release from mitochondria induces cytosolic enzyme leakage in anoxic liver. *Journal of Surgical Research*, 58(5), 485-490.
22. Akbari, G. (2020). Emerging roles of microRNAs in intestinal ischemia/reperfusion-induced injury: A review. *Journal of Physiology and Biochemistry*, 76(4), 525-537.
23. Silver, I. and Erecińska, M. (1990). Intracellular and extracellular changes of [Ca²⁺] in hypoxia and ischemia in rat brain in vivo. *The Journal of General Physiology*, 95(5), 837-866.
24. Zhang, L., Andou, Y., Masuda, S., Mitani, A. and Kataoka, K. (1993). Dantrolene protects against ischemic, delayed neuronal death in gerbil brain. *Neuroscience Letters*, 158(1), 105-108.
25. Singh, V., Mishra, V.N., Chaurasia, R.N., Joshi, D. and Pandey, V. (2019). Modes of calcium regulation in ischemic neuron. *Indian Journal of Clinical Biochemistry*, 34(3), 246-253.
26. Woodfin, A., Voisin, M.-B. and Nourshargh, S. (2007). PECAM-1: a multi-functional molecule in inflammation and vascular biology. *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology*, 27(12), 2514-2523.

27. Pham-Huy, L.A., He, H. and Pham-Huy, C. (2008). Free radicals, antioxidants in disease and health. *International Journal of Biomedical Science*, 4(2), 89.
28. Bâldea, I. (2022). Two theorems and important insight on how the preferred mechanism of free radical scavenging cannot be settled. comment on pandithavidana, DR; jayawardana, SB comparative study of antioxidant potential of selected dietary vitamins; computational insights. *Molecules*, 27(22), 8092.
29. Serizawa, A., Nakamura, S., Suzuki, S., Baba, S. and Nakano, M. (1996). Involvement of platelet-activating factor in cytokine production and neutrophil activation after hepatic ischemia-reperfusion. *Hepatology*, 23(6), 1656-1663.
30. Wang, Y. and Liu, Y. (2021). Neutrophil-induced liver injury and interactions between neutrophils and liver sinusoidal endothelial cells. *Inflammation*, 44(4), 1246-1262.
31. Barnig, C., Lutzweiler, G., Giannini, M., Lejay, A., Charles, A.-L., Meyer, A. and Geny, B. (2022). Resolution of inflammation after skeletal muscle ischemia–reperfusion injury: a focus on the lipid mediators lipoxins, resolvins, protectins and maresins. *Antioxidants*, 11(6), 1213.
32. Jackson, M.J., Pye, D. and Palomero, J. (2007). The production of reactive oxygen and nitrogen species by skeletal muscle. *Journal of Applied Physiology*, 102(4), 1664-1670.
33. Herrero de la Parte, B., Roa-Esparza, J., Cearra, I., Ruiz Montesinos, I., Alonso-Alconada, D., Alonso-Varona, A., Mar Medina, C., Iturrizaga Correcher, S. and García-Alonso, I. (2022). The prevention of ischemia-reperfusion injury in elderly rats after lower limb tourniquet use. *Antioxidants*, 11(10), 1936.
34. Aydemir, B. and Sarı, E.K. (2009). Antioksidanlar ve büyüme faktörleri ile ilişkisi. *Kocatepe Veterinary Journal*, 2(2), 56-60.
35. Kasapçopur Özel, G.S. and Birdane, Y.O. (2014). Antioksidanlar. *Kocatepe Veteriner Dergisi*, 7(2), 41-52.
36. Sen, S. and Chakraborty, R. (2011). The role of antioxidants in human health. In *Oxidative stress: diagnostics, prevention, and therapy*. New York: ACS Publications, 1-37.
37. Rodriguez, C., Mayo, J.C., Sainz, R.M., Antolín, I., Herrera, F., Martín, V. and Reiter, R.J. (2004). Regulation of antioxidant enzymes: a significant role for melatonin. *Journal of Pineal Research*, 36(1), 1-9.
38. Sen, S., Chakraborty, R., Sridhar, C., Reddy, Y. and De, B. (2010). Free radicals, antioxidants, diseases and phytomedicines: current status and future prospect. *International Journal of Pharmaceutical Sciences Review*, 3(1), 91-100.
39. Karabulut, H. and Gülay, M.Ş. (2016). Antioksidanlar. *Veterinary Journal of Mehmet Akif Ersoy University*, 1(1), 65-76.
40. Avcı, A.Y., Demir, A.M., Utku, U., Vural, A.Ö. and Ekuklu, G. (2018). The relationship between serum interleukin-6 levels with lesion size and early functional worsening in acute ischemic stroke. *Acta Medica Alanya*, 2(2), 102-110.

41. Kany, S., Vollrath, J.T. and Relja, B. (2019). Cytokines in inflammatory disease. *International Journal of Molecular Sciences*, 20(23), 6008.
42. Tanaka, T., Narazaki, M. and Kishimoto, T. (2014). IL-6 in inflammation, immunity, and disease. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*, 6(10), a016295.
43. Iyengar, S., Johnson, K.W., Ossipov, M.H. and Aurora, S.K. (2019). CGRP and the trigeminal system in migraine. *Headache: The Journal of Head and Face Pain*, 59(5), 659-681.
44. Iyengar, S., Ossipov, M.H. and Johnson, K.W. (2017). The role of calcitonin gene-related peptide in peripheral and central pain mechanisms including migraine. *Pain*, 158(4), 543-559.
45. DD, T. (2008). The chemical biology of nitric oxide: implications in cellular signaling. *Free Radical Biology and Medicine*, 45, 18-31.
46. Coşkun, O. (2012). *Alprostadil ve iloprostun alt ekstremitte iskemi/reperfüzyonu sonrası gelişen akciğer hasarı üzerine koruyucu etkilerinin karşılaştırılması*. Yüksek Lisans Tezi, Pamukkale Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Denizli, 78-85.
47. Ago, T., Kuroda, J., Kamouchi, M., Sadoshima, J. and Kitazono, T. (2011). Pathophysiological Roles of NADPH Oxidase/Nox Family Proteins in the Vascular System—Review and Perspective—. *Circulation Journal*, 75(8), 1791-1800.
48. Tuteja, N., Chandra, M., Tuteja, R. and Misra, M.K. (2004). Nitric oxide as a unique bioactive signaling messenger in physiology and pathophysiology. *BioMed Research International*, 2004(4), 227-237.
49. Odabaşı, M. and Özkan, E.B. (2023). The profound influence of nitric oxide on intercellular communication and health. *Demiroğlu Bilim Üniversitesi Florence Nightingale Tıp Dergisi*, 9(3), 123-132.
50. Jang, D.-i., Lee, A.-H., Shin, H.-Y., Song, H.-R., Park, J.-H., Kang, T.-B., Lee, S.-R. and Yang, S.-H. (2021). The role of tumor necrosis factor alpha (TNF- α) in autoimmune disease and current TNF- α inhibitors in therapeutics. *International Journal of Molecular Sciences*, 22(5), 2719.
51. Banno, T., Gazel, A. and Blumenberg, M. (2004). Effects of tumor necrosis factor- α (TNF α) in epidermal keratinocytes revealed using global transcriptional profiling. *Journal of Biological Chemistry*, 279(31), 32633-32642.
52. Chen, L., Deng, H., Cui, H., Fang, J., Zuo, Z., Deng, J., Li, Y., Wang, X. and Zhao, L. (2017). Inflammatory responses and inflammation-associated diseases in organs. *Oncotarget*, 9(6), 7204.
53. Semenza, G.L. (2013). Regulation of gene transcription by hypoxia-inducible factor 1. In *Encyclopedia of Biological Chemistry: Second Edition*. New York: Elsevier Inc., 67-71.
54. Kaelin, W.G. and Ratcliffe, P.J. (2008). Oxygen sensing by metazoans: the central role of the HIF hydroxylase pathway. *Molecular Cell*, 30(4), 393-402.

55. Kutlu, N.O. and Yaylın, İ. (2024). Hipoksi-indüklenebilir faktör-1 alfa'nın doğası ve insan biyolojisindeki rolü. *Yeni Yüzyıl Journal of Medical Sciences*, 5(2), 48-55.
56. Çevik, M.U., Yücel, Y., Arıkanoglu, A., Varol, S., Akıl, E., Yüksel, H. and Aluçlu, M.U. (2012). Multipl sklerozlu hastalarda serum prolidaz ve iskemi modifiye albümin düzeyleri. *Journal of Clinical and Experimental Investigations*, 3(4), 518-520.
57. Can, Ü. and Yosunkaya, Ş. (2017). İskemide yeni bir marker: iskemi modifiye albumin. *Koşuyolu Heart Journal*, 20(2), 148-152.
58. Gaze, D.C. (2009). Ischemia modified albumin: a novel biomarker for the detection of cardiac ischemia. *Drug Metabolism and Pharmacokinetics*, 24(4), 333-341.
59. Sbarouni, E., Georgiadou, P. and Voudris, V. (2011). Ischemia modified albumin changes-review and clinical implications. *Clinical Chemistry & Laboratory Medicine*, 49(2).
60. Worster, A., Devereaux, P., Heels-Ansdell, D., Guyatt, G.H., Opie, J., Mookadam, F. and Hill, S.A. (2005). Capability of ischemia-modified albumin to predict serious cardiac outcomes in the short term among patients with potential acute coronary syndrome. *CMAJ*, 172(13), 1685-1690.
61. Erdem, S.S., Yerlikaya, F.H., Çiçekler, H. and Gül, M. (2012). Association between ischemia-modified albumin, homocysteine, vitamin B 12 and folic acid in patients with severe sepsis. *Clinical Chemistry & Laboratory Medicine*, 50(8).
62. Piwowar, A., Knapik-Kordecka, M. and Warwas, M. (2008). Ischemia-Modified albumin level in type 2 diabetes mellitus—Preliminary report. *Disease Markers*, 24(6), 311-317.
63. Zoroddu, S., Zinellu, A., Carru, C. and Sotgia, S. (2024). Analytical insights into methods for measuring ischemia-modified albumin. *Molecules*, 29(19), 4636.
64. Kamal, F.Z., Lefter, R., Jaber, H., Balmus, I.-M., Ciobica, A. and Iordache, A.-C. (2023). The role of potential oxidative biomarkers in the prognosis of acute ischemic stroke and the exploration of antioxidants as possible preventive and treatment options. *International Journal of Molecular Sciences*, 24(7), 6389.
65. Deniz, O., Akçay, F. and Yılmaz, M. (1996). Akut iskemik strokta plazma endotelin-1 düzeyleri. *Atatürk Üniversitesi Tıp Fakültesi Dergisi*, 28, 205-8.
66. Günay, Ş., Sarandöl, E. and Aydınlar, A. (2021). Subklinik aterosklerozun serum endotelin-1 düzeyi ile değerlendirilmesi. *Uludağ Üniversitesi Tıp Fakültesi Dergisi*, 47(1), 63-66.
67. Galié, N., Manes, A. and Branzi, A. (2004). The endothelin system in pulmonary arterial hypertension. *Cardiovascular Research*, 61(2), 227-237.
68. Sağlam, N. (2019). Tıbbi sülük türleri *hirudo sulukii* ve *hirudo verbana*'nın iç ve dış morfolojik özellikleri. *Turkish Journal of Parasitology*, 2(1), 75-85.

69. Ünal, K. and Erol, M.E. (2022). Tıbbi sülük tedavisinin bilimsel değeri. *Anadolu Tıbbi Dergisi*, 1(3), 37-45.
70. Gödekmerdan, A., Arusan, S., Bayar, B. and Sağlam, N. (2011). Medicinal leeches and hirudotherapy. *Türkiye Parazitolojii Dergisi*, 35(4), 234.
71. Küçük, Ö. and Yaman, O. (2019). Tıbbi sülük terapisi (Hirudoterapi). *Journal of Biotechnology and Strategic Health Research*, 3, 29-46.
72. Ayhan, H. and Mollahaliloğlu, S. (2018). Tıbbi sülük tedavisi: Hirudoterapi. *Ankara Medical Journal*, 18(1), 141-148.
73. Sağlam, N. (2000). Sülük biyolojisi ve yetiştirme teknikleri. *Ticari Balık Türlerinin Biyolojisi ve Yetiştirme Teknikleri Hizmet İçi Eğitim Semineri*, 1-5.
74. Abdullah, S., Dar, L.M., Rashid, A. and Tewari, A. (2012). Hirudotherapy/leech therapy: applications and indications in surgery. *Archives of Clinical and Experimental Surgery*, 1(3), 172-180.
75. Tamam, C., Tamam, B. and Tamam, Y. (2019). Hirudoterapi komplikasyonu olarak enfeksiyon olgusu. *Bilimsel Tamamlayıcı Tıp Regülasyon ve Nöral Terapi Dergisi*, 13(1), 14-16.
76. Özkaptan, B.B. (2017). Geleneksel bir tedavi yöntemi: tıbbi sülük tedavisi (hirudoterapi). *Sağlık Bilimleri Alanında*, 1, 96.
77. Karataş, E. and Dernekbaşı, S. (2018). Tıbbi sülük (hirudo verbana carena, 1820)'ün akvaryum koşullarında kültüre alınması üzerine bir araştırma. . *Gaziosmanpaşa Bilimsel Araştırma Dergisi*, 7(2), 27-37.
78. Sağlam, N., Saunders, R., Lang, S.A. and Shain, D.H. (2016). A new species of Hirudo (Annelida: Hirudinidae): historical biogeography of Eurasian medicinal leeches. *Bmc Zoology*, 1(1), 5.
79. Işık, M. and Aksoy, F.N. (2012). Tıbbi sülük tedavisi (hirudoterapi) ve Hacamat. *Sağlık Düşüncesi ve Tıp Kültürü Dergisi*, 22, 80-84.
80. Mory, R.N., Mindell, D. and Bloom, D.A. (2000). The leech and the physician: biology, etymology, and medical practice with Hirudinea medicinalis. *World Journal of Surgery*, 24(7), 878-883.
81. Knobloch, K. (2010). Leeches in microsurgery—An evidence-based approach. In *Toxins and Hemostasis: From Bench to Bedside*. New York: Springer, 735-745.
82. Abdulkader, A., Ghawi, A., Alaama, M., Awang, M. and Merzouk, A. (2013). Leech therapeutic applications. *Indian Journal of Pharmaceutical Sciences*, 75(2), 127.
83. Lone, A.H., Ahmad, T., Anwar, M., Habib, S., Sofi, G. and Imam, H. (2011). Leech therapy-a holistic approach of treatment in unani (greeko-arab) medicine. *Ancient Science of Life*, 31(1), 31-35.

84. Whitaker, I.S., Rao, J., Izadi, D. and Butler, P. (2004). Historical Article: *Hirudo medicinalis*: ancient origins of, and trends in the use of medicinal leeches throughout history. *British Journal of Oral and Maxillofacial Surgery*, 42(2), 133-137.
85. Younis Munshi, I.A., Rafique, H. and Ahmad, Z. (2008). Leeching in the history-a review. *Pakistan Journal of Biological Sciences*, 11(13), 1650-1653.
86. Harding, W. (1910). A revision of the British leeches. *Parasitology*, 3(2), 130-201.
87. Mann, K.H. (2013). *Leeches (Hirudinea): their structure, physiology, ecology and embryology*. New York: Elsevier, 45-65.
88. Grassberger, M., Sherman, R.A., Gileva, O.S., Kim, C.M. and Mumcuoglu, K.Y. (2013). *Biotherapy—history, principles and practice*. New York: Springer, 38-39.
89. Haycraft, J.B. (1883). IV. On the action of a secretion obtained from the medicinal leech on the coagulation of the blood. *Proceedings of the Royal Society of London*, 36(228-231), 478-487.
90. Markwardt, F. (1970). [69] Hirudin as an inhibitor of thrombin. In *Methods in Enzymology*. New York: Academic Press, 924-932.
91. Upshaw, J. and O'leary, J.P. (2000). The medicinal leech: past and present. *American Surgeon*, 66(3), 85-95.
92. Deganc, M. and Zdravic, F. (1960). Venous congestion of flaps treated by application of leeches. *British Journal of Plastic Surgery*, 13, 187-192.
93. Orgill, D.P. (2007). Medicinal leech therapy. *Plastic and Reconstructive Surgery*, 120(3), 808.
94. Stange, R., Moser, C., Hopfenmueller, W., Mansmann, U., Buehring, M. and Uehleke, B. (2012). Randomised controlled trial with medical leeches for osteoarthritis of the knee. *Complementary Therapies in Medicine*, 20(1-2), 1-7.
95. Conforti, M.L., Connor, N.P., Heisey, D.M. and Hartig, G.K. (2002). Evaluation of performance characteristics of the medicinal leech (*Hirudo medicinalis*) for the treatment of venous congestion. *Plastic and Reconstructive Surgery*, 109(1), 228-235.
96. Hartig, G.K., Connor, N.P., Warner, T.F., Heisey, D.M., Sarmadi, M. and Conforti, M.L. (2003). Testing a device to replace the leech for treating venous congestion. *Archives of Facial Plastic Surgery*, 5(1), 70-77.
97. Gasic, G.J., Viner, E.D., Budzynski, A.Z. and Gasic, G.P. (1983). Inhibition of lung tumor colonization by leech salivary gland extracts from *Haementeria ghilianii*. *Cancer Research*, 43(4), 1633-1636.
98. Baskova, I. and Zavalova, L. (2001). Proteinase inhibitors from the medicinal leech *Hirudo medicinalis*. *Biochemistry (Moscow)*, 66(7), 703-714.

99. Zaidi, S., Jameel, S., Zaman, F., Jilani, S., Sultana, A. and Khan, S.A. (2011). A systematic overview of the medicinal importance of sanguivorous leeches. *Alternative Medicine Review*, 16(1), 59-65.
100. Sig, A.K., Guney, M., Guclu, A.U. and Ozmen, E. (2017). Medicinal leech therapy—an overall perspective. *Integrative Medicine Research*, 6(4), 337-343.
101. Fields, W.S. (1991). The history of leeching and hirudin. *Haemostasis*, 21(Suppl 1), 3-10.
102. Nikonov, G.I. and Titova, E.A. (1999). Destabilase complexes-natural liposome produced by medicinal leeches *Hirudo medicinalis*. *Fundamental & Clinical Pharmacology*, 13(1), 102-106.
103. Eldor, A., Orevi, M. and Rigbi, M. (1996). The role of the leech in medical therapeutics. *Blood Reviews*, 10(4), 201-209.
104. Abdisa, T. (2018). Therapeutic importance of leech and impact of leech in domestic animals. *MOJ Drug Design Development & Therapy*, 2(6), 235-242.
105. Harsfalvi, J., Stassen, J.M., Hoylaerts, M.F., Van Houtte, E., Sawyer, R.T., Vermynen, J. and Deckmyn, H. (1995). Calin from *Hirudo medicinalis*, an inhibitor of von Willebrand factor binding to collagen under static and flow conditions. *Blood*, 85(3), 705-711.
106. Gronwald, W., Bomke, J., Maurer, T., Domogalla, B., Huber, F., Schumann, F., Kremer, W., Fink, F., Rysiok, T. and Frech, M. (2008). Structure of the leech protein saratin and characterization of its binding to collagen. *Journal of Molecular Biology*, 381(4), 913-927.
107. Jung, H.I., Kim, S.I., Ha, K.-S., Joe, C.O. and Kang, K.W. (1995). Isolation and Characterization of Guamerin, a New Human Leukocyte Elastase Inhibitor from *Hirudo nipponia**. *Journal of Biological Chemistry*, 270(23), 13879-13884.
108. Kim, D.R. and Kang, K.W. (1998). Amino acid sequence of piguamerin, an antistatin-type protease inhibitor from the blood sucking leech *Hirudo nipponia*. *European Journal of Biochemistry*, 254(3), 692-697.
109. Fink, E., Rehm, H., Gippner, C., Bode, W., Eulitz, M., Machleidt, W. and Fritz, H. (1986). The primary structure of bdellin B-3 from the leech *Hirudo medicinalis*. Bdellin B-3 is a compact proteinase inhibitor of a “non-classical” Kazal type. It is present in the leech in a high molecular mass form. *Biological Chemistry*, 367(2), 1235-1242.
110. Reverter, D., Vendrell, J., Canals, F., Horstmann, J., Avilés, F.X., Fritz, H. and Sommerhoff, C.P. (1998). A carboxypeptidase inhibitor from the medical leech *Hirudo medicinalis*: Isolation, sequence analysis, cDNA cloning, recombinant expression, and characterization. *Journal of Biological Chemistry*, 273(49), 32927-32933.
111. Kashuba, E., Bailey, J., Allsup, D. and Cawkwell, L. (2013). The kinin–kallikrein system: physiological roles, pathophysiology and its relationship to cancer biomarkers. *Biomarkers*, 18(4), 279-296.

112. Orevi, M., Rigbi, M., Hy-Am, E., Matzner, Y. and Eldor, A. (1992). A potent inhibitor of platelet activating factor from the saliva of the leech *Hirudo medicinalis*. *Prostaglandins*, 43(5), 483-495.
113. Hovingh, P. and Linker, A. (1999). Hyaluronidase activity in leeches (Hirudinea). *Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Biochemistry and Molecular Biology*, 124(3), 319-326.
114. Büken, B., Isir, A.B. and Yılmaz, R. (2023). *Geleneksel ve Tamamlayıcı Tıp Uygulamalarında Tıbbi Uygulama Hataları*. Ankara: Akademisyen Kitabevi, 12-25.
115. Koeppen, D., Aurich, M., Pasalar, M. and Rampp, T. (2020). Medicinal leech therapy in venous congestion and various ulcer forms: Perspectives of Western, Persian and Indian medicine. *Journal of Traditional and complementary medicine*, 10(2), 104-109.
116. Bapat, R., Acharya, B., Juvekar, S. and Dahanukar, S. (1998). Leech therapy for complicated varicose veins. *Indian Journal of Medical Research*, 107, 281.
117. Zaidi, S.A. (2016). Unani treatment and leech therapy saved the diabetic foot of a patient from amputation. *International Wound Journal*, 13(2), 263-264.
118. Bakhshi, M., Jalalian, B., Valian, M., Shariati, S., Saeidi, T. and Ranjbar, H. (2015). Can leech therapy be used as an alternative treatment for controlling migraine headache? A Pilot Study. *Acta Facultatis Medicae Naissensis*, 32(3), 189-197.
119. Koeppen, D., Aurich, M. and Rampp, T. (2014). Medicinal leech therapy in pain syndromes: a narrative review. *Wiener Medizinische Wochenschrift*, 164(5), 95-102.
120. Kaya, B., Bat, O., Bulut, N.E., Altun, H. and Memisoglu, K. (2011). Prolonged venous bleeding due to traditional treatment with leech bite: a case report. *Journal of Medical Case Reports*, 5(1), 172.
121. Kirişçi, M., Güneri, B., Seyithanoğlu, M., Kazancı, Ü., Doğaner, A., and Güneş, H. (2020). The protective effects of lycopene on ischemia/reperfusion injury in rat hind limb muscle model. *Turkish Journal of Trauma & Emergency Surgery/Ulusal Travma ve Acil Cerrahi Dergisi*, 26(3), 351-360.
122. Ünal, K., Emre Erol, M., Dayanır, D., Deniz, E., Ayhan, H. and Fındıkçıoğlu, K. (2025). Investigating the therapeutic potential of medical leech and leech saliva extract in flap survival: an in vivo study using rats. *Journal of Complementary and Integrative Medicine*, (0).
123. Ünal, K., Erol, M. and Ayhan, H. (2023). Literature review on the effectiveness of medicinal leech therapy in the wound healing. *Ankara Medical Journal*, 23(1), 75-85.
124. Ünal, K., Tirik, N., Erol, M., İbrahimkhanli, L., Elçi, M. and Ayhan, H. (2023). The investigation of effects of medicinal leech saliva extract on the breast fibroblast cell line in vitro: an experimental study. *Geleneksel ve Tamamlayıcı Tıp Dergisi*, 6(2), 35-45.

125. Ünal, K., Tirik, N., Erol, M.E., Güngörmüş, M. and Ayhan, H. (2025). Effects of Lyophilized Leech Saliva Extract on Cell Migration and Apoptosis in MDA-MB-231 Breast Cancer and HUVEC Cell Lines. *Jordan Journal of Biological Sciences*, 18(1), 78-85.
126. Liang, H., Yu, F., Tong, Z., Yuan, B. and Wang, C. (2013). Effect of ischemia post-conditioning on skeletal muscle oxidative injury, mTOR, Bax, Bcl-2 proteins expression, and HIF-1 α / β -actin mRNA, IL-6/ β -actin mRNA and caveolin-3/ β -actin mRNA expression in ischemia–reperfusion rabbits. *Molecular Biology Reports*, 40(1), 507-514.
127. Aslankoç, R., Demirci, D., İnan, Ü., Yıldız, M., Öztürk, A., Çetin, M., Savran, E.Ş. and Yılmaz, B. (2019). Oksidatif stres durumunda antioksidan enzimlerin rolü-Süperoksit dismutaz (SOD), katalaz (CAT) ve glutatyon peroksidaz (GPX). *Medical Journal of Süleyman Demirel University*, 26(3), 362-369.
128. Lubos, E., Loscalzo, J. and Handy, D.E. (2011). Glutathione peroxidase-1 in health and disease: from molecular mechanisms to therapeutic opportunities. *Antioxidants & Redox Signaling*, 15(7), 75-85.
129. Kocabeyoğlu, G.M., Kavutçu, M. and Pampal, H.K. (2025). Ratlarda oluşturulan global serebral iskemi reperfüzyon modelinde memantin uygulamasının oluşan beyin hasarı üzerindeki etkileri. *Journal of Anesthesia/Anestezi Dergisi (JARSS)*, 33(2), 65-96.
130. Sehitoglu, M.H., Karaboga, I., Kiraz, A. and Kiraz, H.A. (2019). The hepatoprotective effect of Aloe vera on ischemia-reperfusion injury in rats. *Northern Clinics of İstanbul*, 6(3), 36-38.
131. Ali, O.S., Abdelgawad, H.M., Mohammed, M.S. and El-Awady, R.R. (2014). Ischemic heart diseases in Egypt: role of xanthine oxidase system and ischemia-modified albumin. *Heart and Vessels*, 29(5), 629-637.
132. Aytac Ates, H., Yücetaş, U., Erkan, E., Yucetas, E., Ulusoy, S., Kadihasanoglu, M., Behzatoglu, K., Culha, M.G. and Toktas, M.G. (2019). The predictive value of ischemia-modified albumin in renal ischemia-reperfusion injury. *Urologia Internationalis*, 103(4), 473-481.
133. Chaves, F., Teixeira, C.F. and Gutiérrez, J.M. (2005). Role of TNF- α , IL-1 β and IL-6 in the local tissue damage induced by Bothrops asper snake venom: an experimental assessment in mice. *Toxicon*, 45(2), 171-178.
134. Podbregar, M., Lainscak, M., Prelovsek, O. and Mars, T. (2013). Cytokine response of cultured skeletal muscle cells stimulated with proinflammatory factors depends on differentiation stage. *The Scientific World Journal*, 2013(1), 617170.
135. Börklüce, A., Emmez, G., İnan, G., Gülbahar, Ö., Kilicoglu, S.S., Gültekin, M.S., Bahadır, M., Bulut, T.S.D. and Pampal, H.K. (2024). Ratlarda oluşturulan renal iskemi reperfüzyon hasarında epibatidin etkileri. *Journal of Anesthesia/Anestezi Dergisi (JARSS)*, 32(2), 86-92.

136. Thomas, D.D., Ridnour, L.A., Isenberg, J.S., Flores-Santana, W., Switzer, C.H., Donzelli, S., Hussain, P., Vecoli, C., Paolocci, N. and Ambs, S. (2008). The chemical biology of nitric oxide: implications in cellular signaling. *Free Radical Biology and Medicine*, 45(1), 18-31.
137. Schneider, R., Raff, U., Vornberger, N., Schmidt, M., Freund, R., Reber, M., Schramm, L., Gambaryan, S., Wanner, C. and Schmidt, H.H. (2003). L-Arginine counteracts nitric oxide deficiency and improves the recovery phase of ischemic acute renal failure in rats. *Kidney international*, 64(1), 216-225.
138. Luyt, C.-E., Lepailleur-Enouf, D., Gaultier, C.-J., Valdenaire, O., Steg, G. and Michel, J.-B. (2000). Involvement of the endothelin system in experimental critical hind limb ischemia. *Molecular Medicine*, 6(11), 947-956.
139. Ayada, C., Toru, Ü., Genç, O., Akcılar, R. and Şahin, S. (2015). Balanced oxidative status by nesfatin-1 in intestinal ischemia-reperfusion. *International Journal of Clinical and Experimental Medicine*, 8(3), 3318.
140. Tepebaşı, M.Y. and Calapoğlu, N.Ş. (2016). Hipoksi ile indüklenen faktör-1 alfa (HIF-1 α) C111A gen polimorfizmi ile hemoglobin konsantrasyonu arasındaki ilişkinin araştırılması. *Medical Journal of Suleyman Demirel University*, 23(2), 25-36.
141. Koury, J., Deitch, E.A., Homma, H., Abungu, B., Gangurde, P., Condon, M.R., Lu, Q., Xu, D.-Z. and Feinman, R. (2004). Persistent HIF-1 α activation in gut ischemia/reperfusion injury: potential role of bacteria and lipopolysaccharide. *Shock*, 22(3), 270-277.
142. Cursio, R., Miele, C., Filippa, N., Van Obberghen, E. and Gugenheim, J. (Year). Liver HIF-1 alpha induction precedes apoptosis following normothermic ischemia-reperfusion in rats. Paper presented at the *Transplantation proceedings*. Type retrieved from
143. Russell, F.A., King, R., Smillie, S.-J., Kodji, X. and Brain, S. (2014). Calcitonin gene-related peptide: physiology and pathophysiology. *Physiological Reviews*, 94(4), 1099-1142.
144. Huang, R., Karve, A., Shah, I., Bowers, M.C., DiPette, D.J., Supowit, S.C. and Abela, G.S. (2008). Deletion of the mouse α -calcitonin gene-related peptide gene increases the vulnerability of the heart to ischemia-reperfusion injury. *American Journal of Physiology-Heart and Circulatory Physiology*, 294(3), H1291-H1297.
145. Elbaki, B.T.A., Sameh, H., EL-Haleem, M.R.A. and Abd-Elsattar, A.A. (2025). Possible protective effect of quercetin on lung injury induced by skeletal muscle ischemia reperfusion (IR) injury of adult male albino rats: Histological and biochemical study. *Journal of Molecular Histology*, 56(1), 48.
146. Turer, A.T. and Hill, J.A. (2010). Pathogenesis of myocardial ischemia-reperfusion injury and rationale for therapy. *The American Journal of Cardiology*, 106(3), 360-368.

147. Guneli, E., Cavdar, Z., Islekel, H., Sarioglu, S., Erbayraktar, S., Kiray, M., Sokmen, S., Yilmaz, O. and Gokmen, N. (2007). Erythropoietin protects the intestine against ischemia/reperfusion injury in rats. *Molecular Medicine*, 13(9-10), 509-517.
148. Granger, D.N. and Kvietys, P.R. (2015). Reperfusion injury and reactive oxygen species: The evolution of a concept. *Redox Biology*, 6, 524-551.
149. Meldrum, D.R. (1998). Tumor necrosis factor in the heart. *American Journal of Physiology-Regulatory, Integrative and Comparative Physiology*, 274(3), R577-R595.
150. Davoodi, F., Taheri, S., Raisi, A., Rajabzadeh, A., Zakian, A., Hablolvarid, M.H. and Ahmadvand, H. (2021). Leech therapy (*Hirudo medicinalis*) attenuates testicular damages induced by testicular ischemia/reperfusion in an animal model. *BMC Veterinary Research*, 17(1), 256.
151. Ünal, K., Khusainov, N., Erol, M. E., Doruk, M. and Dayanır, D. (2025). Leech saliva extract enhances incisional skin wound healing in rats by improving neovascularisation and tissue regeneration. *Iraqi Journal of Science*, 66(11), 4896-4909.
152. Sun, W., Zhang, L., Fang, Z., Han, L., Wang, Q., Leng, Y., Li, M., Xue, Y., Wu, Y. and Li, Z. (2022). Shuxuetong injection and its peptides enhance angiogenesis after hindlimb ischemia by activating the MYPT1/LIMK1/Cofilin pathway. *Journal of Ethnopharmacology*, 292, 115166.
153. Mousavian, A., Sabzevari, S., Parsazad, S. and Moosavian, H. (2022). Leech therapy protects free flaps against venous congestion, thrombus formation, and ischemia/reperfusion injury: benefits, complications, and contradictions. *Archives of Bone and Joint Surgery*, 10(3), 252.
154. Chen, L.Y., Tai, S.H., Hung, Y.C., Huang, S.Y., Kuo, Z.C., Lee, A.H., Hsu, H.H., Wu, T.S. and Lee, E.J. (2024). Anti-oxidative and anti-inflammatory effects of Ginkgo biloba extract (EGb761) on hindlimb skeletal muscle ischemia–reperfusion injury in rats. *Physiological Reports*, 12(11), e16050.
155. Resch, J.C., Hedstrom, R., Steiner, M.E., Said, S.M. and Somani, A. (2023). Hirudotherapy for limb ischemia in the pediatric intensive care unit: A retrospective observational cohort. *Frontiers in Pediatrics*, 10, 1011171.
156. Afify, O., Alkhouri, S. and Lauder, N. (2021). Improving symptoms of peripheral artery disease with hirudotherapy. *Cureus*, 13(7), 35-45.
157. Li, W.-Q., Qin, Z.-S., Chen, S., Cheng, D., Yang, S.-C., Choi, Y.M.M., Chu, B., Zhou, W.-H. and Zhang, Z.-J. (2022). Hirudin alleviates acute ischemic stroke by inhibiting NLRP3 inflammasome-mediated neuroinflammation: In vivo and in vitro approaches. *International Immunopharmacology*, 110, 108967.



EK-1. Etik Kurul İzni

Evrak Tarih ve Sayısı: 27.02.2025-E.1182795



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



Sayı : E-66332047-604.01-1182795
Konu : Değerlendirme ve Onay

27.02.2025

Sayın Doç. Dr. Kübranur ÜNAL
Tıbbi Biyokimya Anabilim Dalı Başkanlığı - Öğretim Üyesi

Araştırmacı grubu Kübranur ÜNAL, Başak SAMUR, Salih SALAR ve Nihat YUMUŞAK'tan oluşan, G.Ü.ET-25.017 kod numaralı ve "*Tıbbi Sülük Uygulamasının Alt Ekstremitede İskemi-Reperfüzyon Hasarı Üzerine Etkisi*" başlıklı araştırma öneriniz incelenmiş ve Gazi Üniversitesi Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurul Yönergesindeki ilkelere uygun olduğu saptanarak onaylanmasına oybirliği ile karar verilmiştir.

Bilgilerinizi rica ederim.

It is unanimously approved that the research project numbered G.Ü.ET-25.017 and entitled "*Effect of Medicinal Leech Application on Ischemia-Reperfusion Injury in The Lower Limb Extremity*" is in compliance with Gazi University Animal Experiments Local Ethics Committee regulations.

With my best regards.

Hayvan Türü : Rat Wistar Albino
Hayvan Sayısı : 24

Prof. Dr. Mustafa ARSLAN
Kurul Başkanı

Ek:1 Liste

EK-1. (devam) Etik Kurul İzni

Evrak Tarih ve Sayısı: 27.02.2025
GAZİ ÜNİVERSİTESİ
HAYVAN DENEYLERİ YEREL ETİK KURULU TOPLANTI KATILIM
LİSTESİ

TOPLANTI TARİHİ : 21/02/2025		TOPLANTI SAYISI : 02	
ADI-SOYADI		İMZA	
Prof.Dr.Mustafa ARSLAN (Başkan)			
Prof.Dr.Mürşide Ayşe DEMİREL (Başkan Yrd.)			
Prof.Dr.Mustafa KAVUTÇU			
Prof.Dr.Emin Ümit BAĞRIAÇIK			
Prof.Dr.İpek SÜNTAR			
Prof.Dr.Serkan YAVUZ			
Prof.Dr.Şule COŞKUN CEVHER			
Prof.Dr.Fatma Gökçe APAYDIN			
Prof.Dr.Elvan ANADOL			
Doç.Dr.Yeliz KILINÇ			
Doç.Dr.Zeliha Aycan ÖZDEMİRKAN			
Doç.Dr. Duygu AĞAGÜNDÜZ			
Doç.Dr. Abdullah ÖZER			
Doç.Dr. Sühan GÜRBÜZ			
Doç.Dr. Nur Banu BAL			
Dr.Öğr.Üyesi Şevki Mustafa DEMİRÖZ			
Dr.Öğr.Üyesi Zeynep YIĞMAN			
Öğr.Gör.Dr.Burcu EKİM			
Öğr.Gör.Dr. Beyza AYDOĞAN			
Vet.Hek.Burcu AVCI			
Osman İÇ			

ÖZGEÇMİŞ

Kişisel Bilgiler

Soyadı, adı : Samur, Başak
Uyruğu : T.C.
Doğum tarihi ve yeri :
Medeni hali :
Telefon
E-posta

Eğitim Derecesi	Okul/Program	Mezuniyet Yılı
Yüksek lisans	Gazi Üniversitesi/ Sağlık Bilimleri Enstitüsü/Tıbbi Biyokimya	2025
Lisans	Hacettepe Üniversitesi Fen Fakültesi Biyoloji Bölümü	2022
Lise	Gazi Çiftliği Anadolu Lisesi	2016

İş Deneyimi, Yıl	Çalıştığı Yer	Görev
2024	TENMAK-BOREN	Proje Personeli
2025	TÜBİTAK	Uzman Yardımcısı

Yabancı Dili

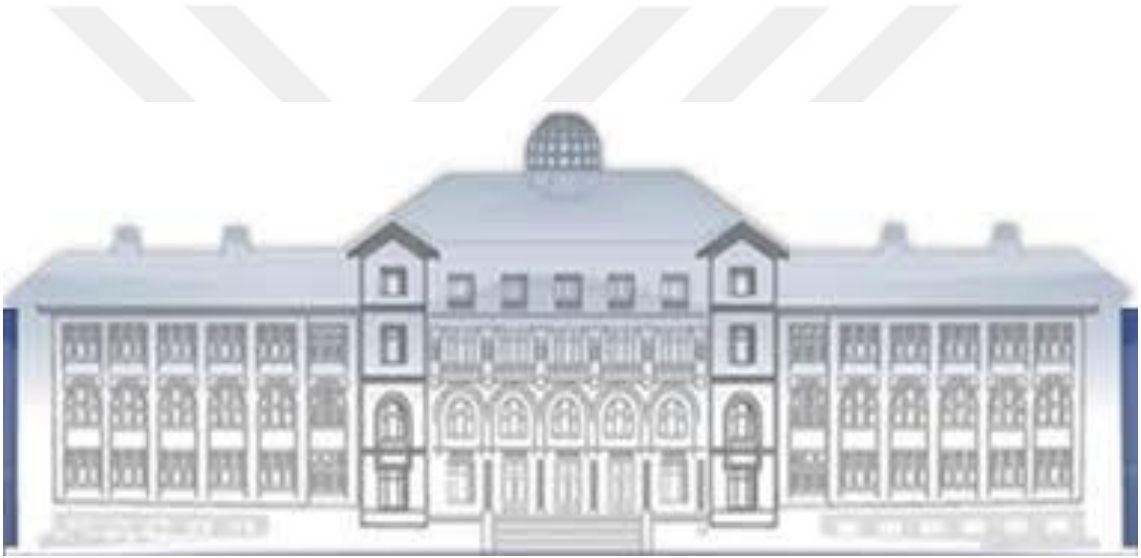
İngilizce

Yayınlar

1. Başak, S. (2025). "Tıbbi sülük uygulamasının alt ekstremitelerde iskemi-reperfüzyon hasarı üzerine etkisi". Sözlü Sunum. 1.Uluslararası İbn-İ Sina Sağlık Bilimleri Kongresi 17-20 Nisan, Naftalan/ Azerbaycan

Hobiler

Resim yapmak, müzik dinlemek, kitap okumak



GAZİLİ OLMAK AYRICALIKTIR..

