T.C.
GAZİ ÜNİVERSİTESİ TIP FAKÜLTESİ
KALP VE DAMAR CERRAHİSİ ANABİLİM DALI

VASKÜLER ENDOTELİYAL BÜYÜME FAKTÖRÜ VE ADRENOMEDULLİNİN RATLARDA İSKELET KASI İSKEMİ REPERFÜZYON HASARINA KORUYUCU ETKİSİ

UZMANLIK TEZİ

DR.MEHMET KİRİŞCİ

TEZ DANIŞMANI

DOÇ.DR. GÜRSEL LEVENT OKTAR

ANKARA 2012

TEŞEKKÜR

Uzmanlık eğitimim süresince, bilgi ve tecrübeleriyle eğitimimde büyük katkı ve emekleri olan, her konuda destek ve yardımlarını gördüğüm sayın hocalarım; Prof. Dr. Ali YENER, Prof. Dr. Mehmet Emin ÖZDOĞAN, Prof. Dr. Levent GÖKGÖZ, Prof. Dr. Halim SONCUL, Prof. Dr. Velit HALİT, Prof. Dr. Volkan SİNCİ, Doç. Dr. Erkan İRİZ, Doç. Dr. Dilek ERER, Yrd. Doç. Dr. Mustafa Hakan ZOR ve Öğr. Gör. Dr. Tolga TATAR'a

Tez çalışmamın hazırlık aşaması ve hayata geçirilmesi sürecinde ihtiyaç duyduğum her an yardımlarını esirgemeyen, yol gösteren, bilgisi ve deneyimini benimle paylaşan, desteğini her zaman yanımda hissettiğim saygı değer tez danışmanım, hocam ve abim Doç. Dr. Gürsel Levent OKTAR'a

Varlığı ile hayatımızda büyük yer eden, aramızdan ayrılarak kalbimizde derin bir yara bırakan, bugün bu sayfaları okusaydı en az benim kadar mutlu olacağına inandığım, her zaman kalbimde yaşatacağım ve anacağım abim Doç. Dr. Veli Yıldırım İMREN'e

Tez çalışmamın hazırlanması, tamamlanması ve yazımı aşamalarında, gerek vermiş oldukları destek ve gerekse de değerli yardımlarından dolayı Prof. Dr. Hatice PAŞAOĞLU, Prof. Dr. Eser Öz OYAR, Prof. Dr. Candan ÖZOĞUL, Doç. Dr. Yusuf ÜNAL, Yrd. Doç. Dr. Mustafa ARSLAN ve Öğr. Gör. Canan DEMİRTAŞ'a

Asistanlık döneminin heyecanını, stresini ve güzelliklerini birlikte yaşadığımız tüm asistan arkadaşlarıma,

Ameliyathane, yoğun bakım ünitesi hemşire ve personeline, anestezi teknikerlerine, bölüm sekreterlerine ve tanıma fırsatı bulduğum tüm hastane çalışanlarına,

Yaşamımın her anında sevgi ve dualarını esirgemeyen anne, baba ve kardeşlerim'e

Gördüğüm ilk günden beri kalbimde olan, eğitimim süresince her ihtiyaç duyduğumda desteğini esirgemeyen ve bugünü yaşamamda en büyük katkısı olan sevgili eşim Özlem KİRİŞCİ' ye

Hayatıma girdiği andan itibaren sevgisiyle neşe kaynağım kızım Berra'ya

Sonsuz sevgi ve saygılarımı sunar, teşekkür ederim.

İÇİNDEKİLER

Sayfa

TEŞEKKÜR…… 2
İÇİNDEKİLER …….. 3
SİMGELER VE KISALTMALAR ……4
1- GİRİŞ …….7
2- GENEL BİLGİLER……11
2.1. İskemi …….11
2.2. Reperfüzyon ……...18
2.3. İskemi Reperfüzyon Sonrası Oluşan İskelet Kası Hasarı……...21
2.4. İskemi Reperfüzyon Metabolizmaları……25
2.5. Serbest Oksijen Radikalleri ……...30
2.6. Antioksidanlar ……...32
2.7. Hasar Mekanizmaları 36
2.8. Adrenomedullin ……38
2.9. Vasküler Endoteliyal Büyüme Faktörü (VEGF) ……..44
3- GEREÇ ve YÖNTEM …….49
3.1. Aortik Oklüzyon ve İskemi Reperfüzyon Modeli ……49
3.2. Deney Grupları …… 50
3.3. Biyokimyasal İşlemler …….52
3.4. Alt ekstremite İskelet Kası Doku Örneklerinin Histopatolojik Olarak Değerlendirmesi……...56
3.5. Histopatolojik Kesitler……..61
4- İSTATİSTİK……68
4.1. Histopatoloji Bulgularına Göre ……...68
4.2. Biyokimyasal Sonuçlara Göre……..71
5- TARTIŞMA ……...76
ÖZET ……..86
İNGİLİZCE ÖZET (SUMMARY) …….88
KAYNAKLAR ……...90

SİMGELER VE KISALTMALAR

AA:	Araşidonik asit
AIR:	Aortik iskemi reperfüzyon
ATP:	Adenozin trifosfat
ADM:	Adrenomedullin
cAMP:	Siklik adenozin monofosfat
cGMP:	Siklik guanozin monofosfat
CK:	Kreatin kinaz
DNA:	Deoksiribonükleik asit
ER:	Endoplazmik retikulum
FGF 7:	Fibroblast büyüme faktörü
GPO:	Glutatyon peroksidaz
HE:	Hematoksilen eosin
HIF-1:	Hipoksi indükleyici faktör – 1(Hypoxia inducable factor-1)
5-HPETE-3:	5-hidroperoksieikosatetranoik asid-3
H2O2:	Hidrojen peroksit

I-R:	İskemi-reperfüzyon
IR:	İskemi reperfüzyon
IRH:	İskemi reperfüzyon hasarı
IAA:	İnfrarenal abdominal aorta
IHC:	İmmünohistokimyasal
IL:	İnterlökin
KAT:	Katalaz
LDH:	Laktat dehidrogenaz
LFA:	Lökosit fonksiyonu ile ilgili antijen
MDA:	Malondialdehid
MODS:	Multipl organ disfonksiyon sendromu
MPO:	Miyeloperoksidaz
NADPH:	Nikotinamid adenin dinükleotid fosfat hidrojen
NF -κB:	Nükleer faktör-kappaB
NO:	Nitrik oksit
$O2^{-}$:	Süperoksit anyonu radikali
OH^{-} :	Hidroksil iyonu radikali

$ONOO^-$:	Peroksinitrit radikali
PAF:	Platelet aktive edici faktör
PAS:	per-ARNT-sim
RNA:	Ribonükleik asit
SIRS:	Sistemik inflamatuar yanıt sendromu
SR:	Serbest radikal
SOD:	Süper oksit dismutaz
SOR:	Serbest oksijen radikalleri
TGF:	Transforme edici büyüme faktörü
TNF - α:	Tümör nekroz faktör alfa
VEGF:	Vasküler endoteliyal büyüme faktörü

1.GİRİŞ

İskemi-reperfüzyon hasarı (İRH) koroner arter hastalıkları, trombolitik tedavi, balon anjiyoplasti, kardiyopulmoner bypass, oklüzif arter hastalıkları, aort / periferik arter klempleme, inme, turnike uygulaması, organ transplantasyonu, miyokütanöz doku transferi ve ampute olmuş dokunun replantasyonu gibi klinik durumlarda karşılaşılan bir durumdur (1). Hastanın morbidite ve mortalitesini iyileştirmek adına, İRH'nın önlenmesi ve/veya olumsuz sonuçlarının en aza indirilmesi için değişik tedavi araçlarının geliştirilmesi önemli bir araştırma alanı olmuştur.

Kardiyovasküler hastalıkların tedavisinde amaç, dokuların temel gereksinimlerini karşılayabilmek için, dolaşım bütünlüğü ve sürekliliğini sağlamaktır. Dolaşımı kesintiye uğrayarak iskemik kalan canlı dokuda, dolaşım tekrar sağlandığında oluşan reperfüzyonun neden olduğu zararlı etkiler, iskemik hasardan daha geniş çaplı ve daha ciddidir. İskemik dokunun kütlesi, bir ekstremitenin tümü ya da geniş bir kısmını kapsadığında reperfüzyon yalnızca lokal doku zedelenmesine değil, aynı zamanda uzak organ hasarına da yol açabilmektedir. İskemi ve reperfüzyon sürecinde hasarın büyük bölümünün reperfüzyon periyodunda oluştuğu ve doku hasarından reaktif oksijen radikallerinin sorumlu olduğu bilinmektedir (2).

İskemiye bağlı hasarın şiddeti, hipoperfüzyonun süresi ve miktarı ile orantılı olup, hücrenin tipi, yaralanmaya karşı hassasiyeti, differansiyasyonu, kan ihtiyacı ve metabolizmasına göre farklılık gösterir. İskemiye bazı dokular (kemik ve deri) dirençliyken bazıları (iskelet kası ve barsak mukozası) ise hassastır.

Ancak uzun süreli iskemi hücrelerde şişme, asidoz, iyon dağılım değişiklikleri (hücre içi kalsiyum/sodyum oranında artış), artmış hipoksantin seviyesi, adenozin trifosfat (ATP) / fosfokreatin ve glutatyon düzeylerinde azalma, artmış adenozin sinyal aktivitesi, membran potansiyel değişiklikleri, iskelet bütünlüğü kaybı, nükleotid fosfohidrolizi (CD39 ve CD73 yoluyla) ve hipoksi indükleyici faktör 1 (hypoxia inducable factor-1 (HIF-1)) çekirdek translokasyonu / stabilizasyonu gibi hücre metabolizması ve iskelet yapısını ilgilendiren birçok değişime neden olur (3,4). Mitokondriyal disfonksiyon ve hücre zarı hasarının şiddeti, reperfüzyon sonrası iskemik doku hasarının geri dönüşümlü veya geri dönüşümsüz olduğunu belirler (5). Dolayısıyla uzun süreli iskemi reperfüzyonla şiddetlenen ciddi hücre hasarına neden olarak hücre ölümüyle sonuçlanır (6,7). Reperfüzyon hasarı ilk kez 1975 yılında Cerra tarafından tanımlanmıştır (8). İskemiye bağlı hasarın geri döndürülebilmesinde doku reperfüzyonu mutlak olmakla birlikte, paradoksal olarak, reperfüzyon sonrası sağlanan oksijen ve metabolitler doku hasarının artışına neden olur. Hücresel şişme, hücre iskeleti değişiklikleri ve seçici mikrovasküler geçirgenlik kaybı reperfüzyona bağlı hasarın karakteristik özellikleridir. Bu mekanizmalar, doku ödemi ve kapiller kan akımında azalmaya neden olur (9). IRH'na bağlı mikrovasküler disfonksiyonda; endotel hücre değişikliklerine ikincil gelişmiş, endotel bariyer disfonksiyonu, vasküler tonus değişikliği ve artmış sitokin adezyon molekül ifadesi görülür. Özellikle reperfüzyon periyoduyla birlikte; nitrik oksit (NO) biyoyararlanımdaki azalmaya bağlı arteriolar vazodilatasyon bozukluğu, inflamatuar ve adezyon molekülleri artışına bağlı arteryel kılcallarda kapanma ("no reflow") ve lökosit birikimine

(artmış oksidatif hasar) bağlı venöz kapillerlerde geçirgenlik artışı ve doku ödemi görülür (3).

Reperfüzyonla birlikte sistemik dolaşıma çıkan inflamatuar aracılar, uzak organ endotel hücre aktivasyonu ve mikrovasküler disfonksiyona neden olurlar. IRH'na bağlı uzak organ hasarında, ksantin oksidaz, lökosit-endotel etkileşimi ve inflamatuar aracılar önemli rol oynar. Yaygın uzak organ hasarı durumunda yüksek mortalite ile seyreden Multi Organ Fonksiyon Bozukluğu (multiple organ dysfunction syndrome; MODS) veya Sistemik İnflamatuar Yanıt Sendromu (systemic inflamatory response syndrome; SIRS) gelişebilir (6).

Trombosit Kaynaklı Büyüme Faktörleri Süper Ailesi'nin üyesi olan Vasküler Endoteliyal Büyüme Faktörü (VEGF) ailesi, özellikle endotel hücreleri için özgül etkilere sahip olan multifonksiyonel bir büyüme faktörü ailesidir (10). VEGF sentezi yetişkinde; akciğerde alveolar hücrelerde, böbrek glomerüllerinde, proksimal tübüllerde, düşük seviyede de karaciğer hepatositleri ve beyinde gösterilmiştir. VEGF endotel hücresinin; proliferasyonuna, migrasyonuna differansiyasyonuna sebep olur (11). VEGF, hem gelişim sırasında, hem de yetişkinde vaskülogenez ve anjiogenez için önemli ve gereklidir (12). Hipoksi, VEGF ve reseptörlerinin yapımını indükleyerek anjiyogenezi başlatan en etkili stimuluslardan biridir. Hipoksinin yanında azalan pH ve sitokinler ile de VEGF ekspresyonu artmaktadır (13). Literatürde farklı dokularda iskemik reperfüzyon hasarının etkilerinin azaltılması amacı ile bu ajan kullanılmış ve fayda sağladığı gösterilmiştir. Bu durum, ajanın vaskülogenez ve anjiyogenez etkilerinin yanında sahip olduğu antioksidan ve vazodilatatör etkinlikleri ile açıklanmıştır.

Adrenomedullin (ADM), feokromositoma ve adrenal medulla hücrelerinden izole edilmiş, yakın bir zamanda tanımlanmış 52 aminoasitlik bir peptiddir (14). Vücut dağılımının çok geniş olduğu bilinen bu peptidin sıvı elektrolit homeostazını sağlamanın yanı sıra güçlü vazodilatatör etkisi mevcuttur. Bu etkiyi nitrik oksid tarafından indüklenen cAMP ve cGMP gibi ikincil mesajcılar üzerinden sağlamaktadır. Literatürde farklı dokularda iskemik reperfüzyon hasarının etkilerinin azaltılması amacı ile bu ajan kullanılmış ve fayda sağladığı gösterilmiştir (15,16).

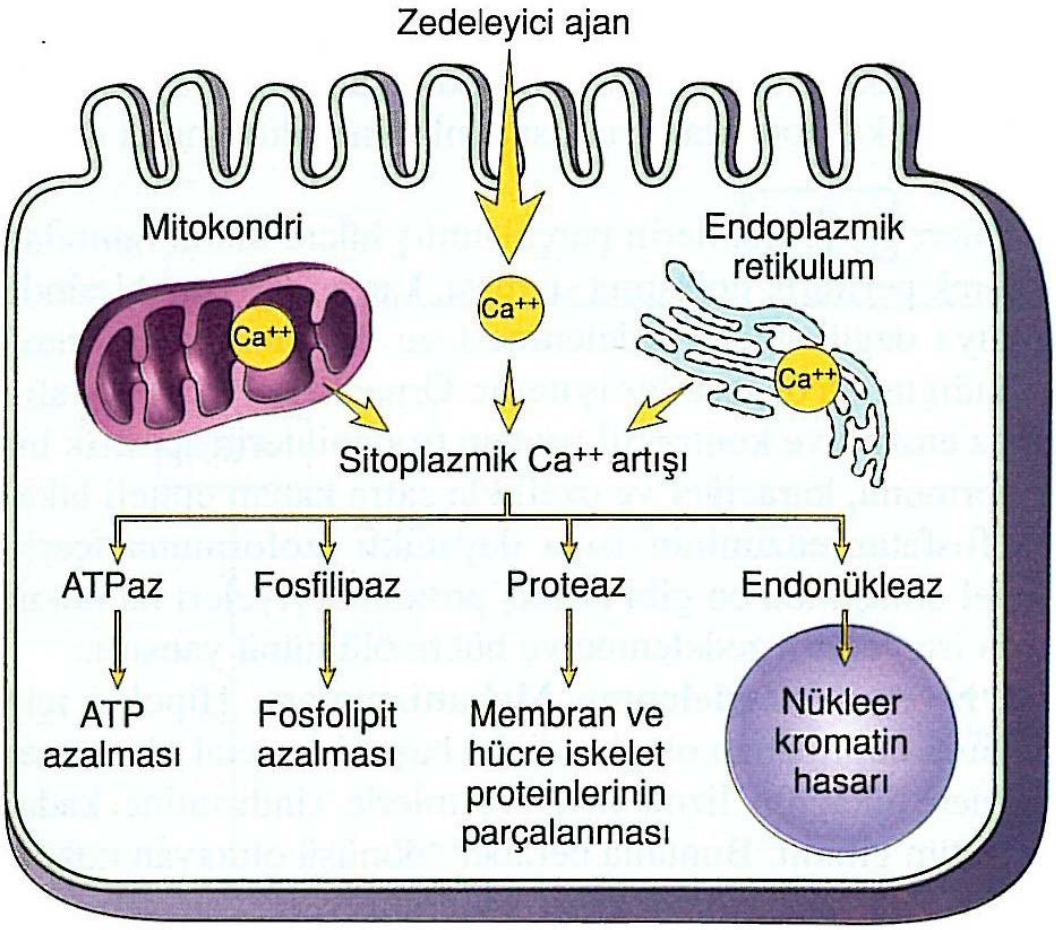
Bu çalışmanın amacı vaskülogenez ve anjiyogenez etkilerinin olduğu bilinen, bazı dokuların iskemik reperfüzyon hasarlanmasında antioksidan aktivitesi gösterilmiş bir ajan olan VEGF'ün ve güçlü bir vazodilatatör olduğu bilinen, bazı dokuların iskemik reperfüzyon hasarlanmasında da antioksidan aktivitesi yeni yeni gösterilmeye başlanmış bir ajan olan adrenomedullinin deneysel alt ekstremite iskelet kası iskemik reperfüzyon hasarı üzerindeki etkinliğini değerlendirmektir.

2.GENEL BİLGİLER

2.1. İskemi

İskemi, dokunun oksijen ve diğer metabolitlere olan gereksiniminin perfüzyon bozukluğuna bağlı dolaşım tarafından sağlanamaması ve bu süreçte oluşan atık ürünlerin yine dolaşım tarafından uzaklaştırılamaması olarak tanımlanır. Hipoksi ise dokuya yetersiz oksijen sunumu şeklinde tarif edilebilir. Hipoksinin en sık görülen nedeni iskemidir. Her iki durum da IRH'nın ilk kısmını oluşturmakta ve metabolizmanın anaerobik yöne kaymasıyla karakterizedir (17). Ancak iskemide, hem metabolit yetersizliği hem de atık ürün birikimi nedeniyle, glikoliz metabolizması hipoksiye oranla daha erken sonlanır ve hasar çok daha erken oluşur (4). Oksijen hemostazı insan fizyolojisinde hayati önem taşır. Oksidatif fosforilasyon sırasında ATP sentezi için kullanılan oksijen aynı zamanda hücresel lipid, nükleik asit ve proteinlerdeki oksidatif hasar mekanizmalarında da rol oynar. Dolayısıyla, protein sentezi ve aktivitesini kontrol eden kısa ve uzun dönem mekanizmalarla hücresel ve sistemik oksijen konsantrasyonlarının dengelenmesi oksijen biyoyararlanımı açısından önemlidir (18). İskemi, akut (akut miyokard infarktüsü) veya kronik (periferik arter hastalığı) olabilir. Soğuk iskemi ile vücut dışında oluşan doku iskemisi (donör organ) kastedilir. Sıcak iskemi ise vücut içindeki doku iskemisidir. Dokuların sıcak ve soğuk iskemiye olan yanıtları farklı olup, sıcak iskemide en çok hepatositler, soğuk iskemide ise en çok endotel ve Kupffer hücreleri etkilenir. (19). İskemiye bağlı hasarın şiddeti, hipoperfüzyonun süresi ve miktarı ile orantılı olup, hücrenin tipi, yaralanmaya karşı hassasiyeti, differansiyasyonu, kan ihtiyacı

ve metabolizmasına göre farklılık gösterir (4). Sonuç olarak, hücresel enerji depolarındaki azalma ve toksik metabolit birikimi hücre ölümüne yol açar (6,7). Hipoksik dokunun çeşitli moleküler mekanizmalarla yetersiz oksijenasyona fizyolojik reaksiyonlar oluşturabilmesi, VEGF sentezini kontrol edebilmesiyle oluşur. VEGF, anjiogenezde önemli rol oynar. Hipokside, yeterli doku perfüzyonu sağlanabilmesi için, hem VEGF sentezi (transkripsiyonel mekanizma) artar hem de VEGF yıkımı (mRNA stabilizasyonu) azalarak doku VEGF mRNA düzeyi artar. Hipoksik doku hasarında diğer tüm protein sentezleri azalırken, VEGF mRNA translokasyonu devam etmektedir (20). VEGF mRNA transkripsiyonu, HIF-1'in insan VEGF geni 5I-transkripsiyonel bölümüyle etkileşime girmesi sonucu aktive olur (21). HIF-1, basit bir heliks-halka-heliks per-ARNT-sim (PAS) protein olup, HIF-1 alfa ve HIF-1 beta alt ünitelerinden oluşur. Hipoksi durumunda, HIF-1 protein seviyesi hızlı şekilde artarken, doku iskemisi ortadan kaldırıldığında, hücreler tarafından sentezi baskılanır. Dolayısıyla hipokside, hücre çekirdeği HIF-1 alfa proteini birikerek HIF-1 beta protein ile dimerleşir ve çekirdek deoksiribonükleik asit (DNA) 5I CGTG 3I sırasına bağlanarak VEGF transkripsiyonunu aktive eder (22). Sonuç olarak, uzun süreli doku iskemisinde; hücresel şişme, asidoz, iyon dağılım değişiklikleri (hücre içi kalsiyum/sodyum oranında artış), hipoksantin seviyesi artışı, adenozin trifosfat (ATP) / fosfokreatin ve glutation düzeyi azalması, adenozin sinyal aktivitesi artışı, membran potansiyel değişiklikleri, iskelet bütünlüğü kaybı, nükleotid fosfohidrolizi (CD39 ve CD73 yoluyla) ve HIF-1 çekirdek translokasyonu ile stabilizasyonu gibi hücre metabolizması ve iskelet yapısını ilgilendiren birçok değişim meydana gelir (3,4).



Şekil 1: Hücre zedelenmesinde sitoplazmik kalsiyum artışının kaynakları ve sonuçları. (23)

Geri Dönüşümlü Zedelenme

Hipoksi, öncelikle mitokondrilerdeki oksidatif fosforilasyonu etkileyerek, ATP ve fosfokreatin depolarında azalmaya neden olur. Mevcut ATP sırasıyla adenozindifosfat, adenozinmonofosfat, inozin ve hipoksantin'e yıkılır. Oluşan ve biriken bu metabolitler fosfofruktokinaz enzimini uyararak hücresel

metabolizmanın anaerobik yöne kaymasına neden olur. Bu metabolik değişim, daha fazla glikojen kullanımı ve daha az ATP üretimi (aerobik solunumla elde edilen miktarın yaklaşık %7'si) ile sonuçlanır (24). Dolayısıyla doku glikojen depoları hızla tükenir. İskeminin devam etmesi, hipoksantin ve anaerobik glikoliz ürünlerinin (laktik asit, hidrojen iyonu, inorganik fosfatlar) hücre içinde birikimi, asidozda artış ve dolayısıyla enzim ve protein hasarıyla sonuçlanır (25). ATP depolarındaki azalma, ATP bağımlı hücre zarı pompalarında fonksiyon bozukluğuna neden olarak, hücre dışı potasyum kaybı ve hücre içi ani sodyum kalsiyum-klorür artışına ikincil hücresel şişmeyle sonuçlanır. Bu hidropik değişiklik, inorganik fosfatlar, laktik asit ve pürin nükleotidleri gibi metabolitlerin birikimi sonucu artan osmotik yükle daha da belirginleşir (26). Hücresel şişme, makroskopik olarak organ renginde solma ve ağırlığında artışla, mikroskopik olarak ise sitoplazmada berrak vakuoller oluşumuyla (hidropik değişiklik/vakuoler dejenerasyon) kendini gösterir (4). Sonrasında, ribozomların granüllü endoplazmik retikulumdan ayrılması ve polizomlardan monozomların oluşumu ile protein sentezinde azalma oluşur. Hipoksi düzelmez ise mitokondri fonksiyonunda kötüleşme ve membran geçirgenliğinde artışa bağlı hücresel şişme ve fosfolipidden zengin dansiteler ile karakterize morfolojik bozulma görülür. Hücresel iskelet; mikrovillus gibi yapısal özelliklerin kaybı, hücreler arasındaki bağların gevşemesi ve hücre yüzeyinde kabarcıkların oluşumu ile bozulur. Hücre çekirdeği granüler ve fibriller elemanlarında dağılma meydana gelir. Osmotik regülasyon kaybı sonucunda mitokondri, endoplazmik retikulum ve hemen hemen tüm hücre organellerinde hidropik değişiklikler oluşur (4). Doku iskemisi

sırasında başka birçok mekanizma daha aktive olur. Nükleer faktör-kappa B (NF-κB) aktivasyonuyla, iltihabi aracıların ve adezyon moleküllerinin (özellikle ICAM-1 ve E-selektin) sentezinde artış olur. Adezyon moleküllerindeki bu artış, iltihabi iskemik alan lökosit adezyonunu arttırır. Endotel tarafından sentezlenen NO inaktivasyonu vazokonstriksiyona neden olur. Araşidonik asit kaskadında dengenin prostasiklin aleyhine dönmesi ise hem vazokonstriksiyon hem de platelet aktivasyonuyla sonuçlanır. Oksijen NO sentezi için de gerekli olup, iskemik dokuda NO seviyesinde azalma görülür. Bunlara ek olarak kompleman sistem aktivasyonu ve Platelet Aktive Edici Faktör (PAF) sentez artışı gerçekleşir. Dolayısıyla iskemi, dokuyu reperfüzyon hasarına karşı daha hassas bir duruma getirir. Eğer doku perfüzyonu düzelirse tüm bu değişimler geri dönüşümlü olup iskeminin devamı durumunda geri dönüşümsüz zedelenme ile sonuçlanır (27).

Geri Dönüşümsüz Zedelenme

Kritik iskemi zamanı, doku canlılığının sürdürülebildiği maksimum iskemi süresi olarak tarif edilir. Ortalama kritik iskemi süresi ise, %50 doku kaybına neden olan iskemik zaman dönemidir. Hücrenin metabolik aktivitesi ve adaptasyon mekanizmalarına göre kritik iskemi süresi farklılık göstermekle birlikte uzun süreli iskemide geri dönüşümsüz hasar ve nekroz kaçınılmazdır (3,17). Hipoksi sonucunda gelişen mitokondri fonksiyon bozukluğu (oksidatif fosforilasyon yetersizliğine bağlı ATP depolarında azalma) ve hücre zarı hasarının doku oksijenasyonunun yeniden sağlanmasına rağmen düzeltilememesi geri dönüşümsüz hasarın en önemli göstergesidir (5,28).

Bu dönemde mitokondriyal vakuolizasyon artışı ve matriks içi kalsiyumdan zengin yoğunluk birikimi oluşur. Hücresel zarların tümünde gerçekleşen hasar; hücre organelleri ve hücrede şişme, protein, esansiyel koenzim ve ribonükleik asit kaybı, ATP sentezinde kullanılan metabolitlerin depolanamamasına bağlı yüksek enerjili fosfat depolarında azalma ve interstisyel alandaki makromoleküllerin hücre içine geçisiyle sonuçlanır. Lizozomal membran hasarı enzimlerin sitoplazma içine sızmasına yol açar. Asit hidrolazlar, düşük sitoplazmik pH'da, tüm hücresel elemanların enzimatik yıkımına neden olurlar. Lizozomol sindirim, hücre ölümü sonrası, interstisyel alanda dahi devam eder. Sonrasında ölü hücreler fosfolipid kitleler şekline dönerek "myelin şekiller" olarak tanımlanırlar. Bu fosfolipid kitleler yağ asitlerine parçalanır veya fagositoza uğrayarak ortadan uzaklaştırılır. Oluşmuş yağ asitlerinin kalsifikasyonu ise kalsiyum sabunlarının oluşumuyla sonuçlanır. Hücrelere has proteinlerin hücre zarı hasarı veya hücre ölümüyle sistemik dolaşıma geçmesi ve bunların kan serum örneklerinde gösterilmesi spesifik doku hasarı tespitinde önemlidir. Örneğin, miyokard infarktüsü tanı ve takibinde miyokard dokusuna özgü kreatin kinaz ve troponin izoformu ölçümleri önemlidir (4).

Geri Dönüşümsüz Zedelenme Mekanizmaları:

a) Membran fosfolipid kaybı: Hücre zarı membran fosfolipidleri, hem yıkım artışı (artmış hücre içi kalsiyum ile aktive olmuş fosfolipazlar) hem de sentez azalması (ATP bağımlı reaçilasyon ve sentez azalması) sonucunda azalır.

b) Hücre iskelet anormallikleri: Hücre zarının iskeletten ayrılıp yırtılması, artmış hücre içi kalsiyum ile aktifleşen proteazlar ve hücre şişmesi sonucu oluşur.

c) Toksik oksijen radikalleri

d) Lipid yıkım ürünleri

Bu zedelenme mekanizmalarıyla 4 ana sistem olan hücre zarı bütünlüğü, oksidatif fosforilasyon, protein sentezi ve hücrenin genetik aparatı etkilenir. Geri dönüşümsüz hücre zedelenmesinin en önemli unsuru artmış hücre zarı geçirgenliği olup hacim regülasyon bozukluğu, hücre içi ve dışına makromoleküllerin artmış hareketi ve hücre zarı yapısal bozukluğuna neden olur (29). Fosfolipid yıkım ürünleri membran üzerinde deterjan etkisi yaparlar. Bozulmuş oksidatif fosforilasyon ve azalmış hücre içi ATP depolarına bağlı gelişen membran iyon pompa disfonksiyonu hücre içi kalsiyum miktarında ani yükselişe neden olur. Bu yükselişe organellerden salınan kalsiyum da katkıda bulunur. Artmış hücre içi kalsiyum birçok enzimatik sistemde [fosfolipazlar (membran hasarı), proteazlar (membran ve hücre iskeleti hasarı), ATPazlar (ATP yıkımı) ve endonükleazlar (kromatin yıkımı)] aktivasyon oluşturur (30). Hücresel fonksiyonlar hücre ölümünden önce kaybolur. Hasarın morfolojik görünümü, kritik biyokimyasal sistemlerde bozukluklar oluşup geri dönüşümsüz hasar oturduktan çok sonra belirgin hale gelir. Hücre şişmesi dakikalar içinde görülebilen geri dönüşümlü bir hasardır. Geri dönüşümsüz hasar 20-60 dakika içinde ışık mikroskobunda görülebilirken, hücre ölümü ancak 10-12 saatte belirgin hale gelir (4).

Özet olarak geri dönüşümsüz zedelenme;

i) Hücre zarı hasarı sonucu protein, enzim, koenzim, ribonükleik asit ve yüksek enerjili fosfat kaybı,

ii) Mitokondri matriksinde amorf, düzensiz kalsiyum yoğunluklarının birikimi,

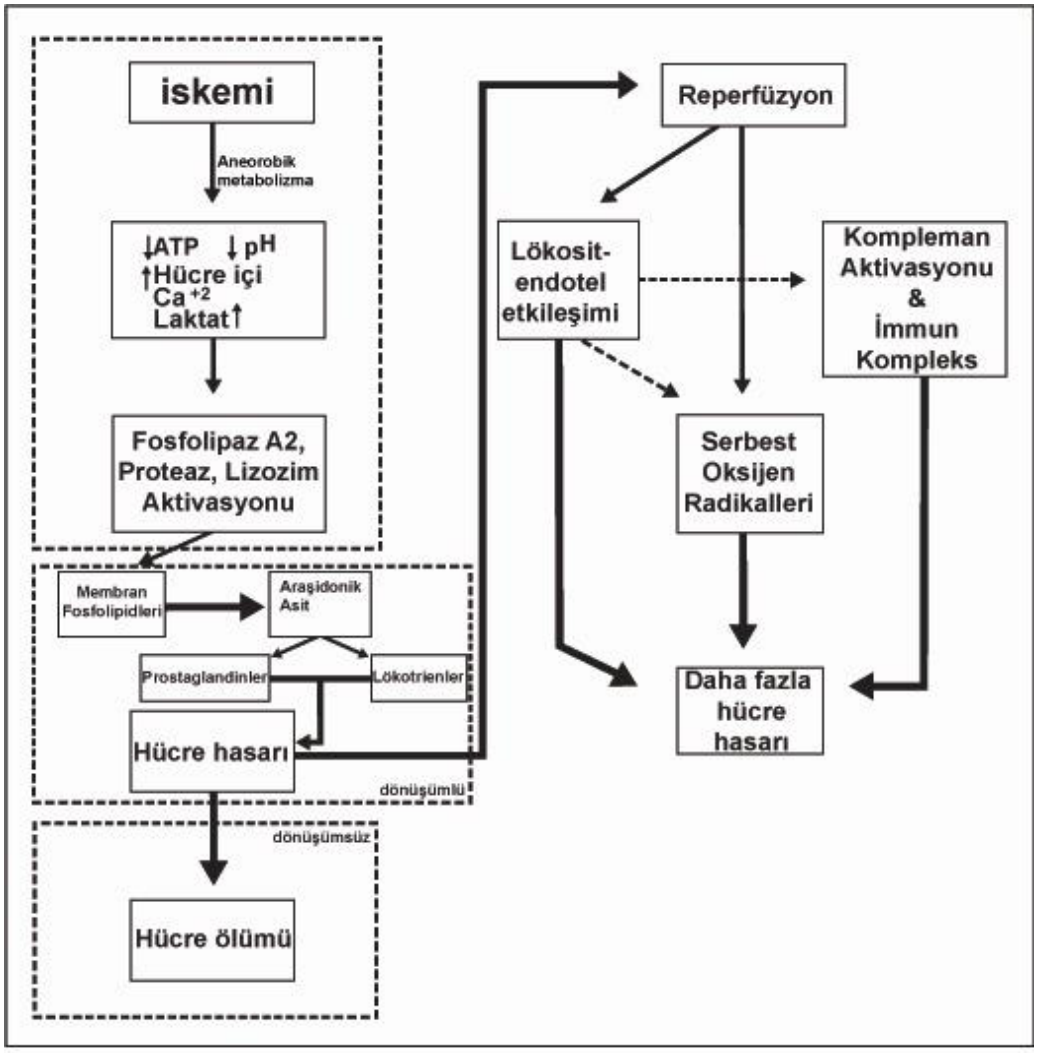
iii) Lizozomal zarlarda hasar ve lizozomal enzimlerin sitoplazmaya çıkması sonucu organellerin sindirilmesi, ölü hücrelerin fagositozu veya yağ asitlerine dönüşümü. Yağ asitlerinin kalsifikasyonu ve kalsiyum sabunu oluşumu ile karakterizedir (31).

2.2. Reperfüzyon

İskemik dokuda, hem hücrenin rejenerasyonu, hem de toksik metabolitlerin temizlenmesi için, yeniden kan akımının sağlanması gerekir. Ancak iskemik dokunun reperfüzyonu bir dizi olayın başlaması ile paradoksal olarak doku hasarına yol açar (32). Reperfüzyon döneminde dokuda nötrofil infiltrasyonu, kompleman sisteminin aktivasyonu, kalsiyum aracılı proteazların aktivasyonu, araşidonik asit (AA) metabolizması gibi pek çok sistem, serbest radikal (SR) oluşumunu artırarak, hasara neden olmaktadır (32). Şok, yanık, sepsis, pankreatit gibi olgularda ortaya çıkan hipovolemi ile iskemi ve bu durumların düzeltilmesi ile de reperfüzyon hasarı ortaya çıkmaktadır (32,33). Serebrovasküler olaylarda, miyokard enfarktüsünde uygulanan trombolitik tedavi veya revaskülarizasyon ameliyatları da yine reperfüzyon hasarına neden olmaktadır (32). Travmalarda ve travma cerrahilerinde hipovolemi ya da kanama kontrolü nedeniyle yapılan klemp, tampon uygulamaları iskemiye neden olurken,

resusitasyon sonrası mutlak bir reperfüzyon ile yine IRH gündeme gelmektedir (32,33). Kardiovasküler cerrahide aort ya da periferik arter klemp uygulaması sonrası ortaya çıkan tablo IRH ile karakterizedir. Transplantasyon cerrahisinde kaçınılmaz olarak transplante edilecek organın iskemi ve reperfüzyonu söz konusu olup, oluşan hasar greft fonksiyonlarını etkilemektedir. Özetle neredeyse bütün cerrahi işlemler sırasında dokuların iskemisi ve sıklıkla bunu takip eden bir reperfüzyon periyodu vardır (32). Daha önce de belirtildiği gibi iskemik dokuların reperfüzyonu, toksik serbest oksijen radikali (SOR) oluşumuna yol açar. Bunlar süperoksit anyonlar ($O2^{-}$), hidroksil radikalleri (OH^{-}), hipoklorik asit (HOCl), hidrojen peroksit (H2O2) ve nitrik oksitten derive peroksinitrittir (33). Oksijen kökenli serbest radikal (SR) aracılığı ile oluşan hasarda ilk basamak, ksantin oksidaz kökenli $O2^{-}$ anyonlarının üretilmesidir (34). İskemi sırasında hücresel ATP, hipoksantin oluşturmak üzere indirgenir. Normal koşullarda hipoksantin, ksantin dehidrogenaz yardımıyla ksantine oksidize edilir. Ancak iskemi sırasında ksantin dehidrogenaz, ksantin oksidaza dönüştürülür. Substrat olarak nikotinamid adenin dinükleotid kullanan ksantin dehidrogenazın tersine, ksantin oksidaz oksijeni kullanır ve bundan dolayı iskemi sırasında hipoksantinin ksantine dönüşümünü katalize edemez ve buda hipoksantinin dokuda aşırı seviyelere çıkmasına yol açar. Reperfüzyonla oksijen tekrar sunulduğunda, fazla miktardaki hipoksantinin ksantin oksidaz ile dönüştürülmesi toksik SOR oluşumu ile sonuçlanır (33). Sellüler ve subsellüler membranların lipid peroksidasyonu da, oksijen kökenli SR'in artırdığı hücre hasarında önemli bir mekanizmadır (35). Hücre membranları içerisinde poliansatüre yağ asitlerinin lipid peroksidasyonu,

hücresel bütünlük ve fonksiyon kaybı ile sonuçlanabilir. Bu durum tek başına OH^{-} radikalleri ile başlatılabileceği gibi, uygun bir şelatör varlığında $O2^{-}$ ile de başlatılabilir (23).



Şekil 2: İskemi Reperfüzyon Kaskadı (36)

2.3. İskemi Reperfüzyon Sonrası Oluşan İskelet Kası Hasarı

Tarihçe

1881 yılında Volkman tarafından tariflenen ve kemik kırığını takiben oluşmuş iskemik kontraktür, muhtemelen belirlenmiş ilk kas iskemisi komplikasyonudur. Yapılan hayvan deneylerinde; 1926'da Jepson, alt ekstremiteye turnike uygulanımı sonrası ödem oluştuğunu, 1945'de ise Dennis, oluşan bu ödeme fasyotomi ile müdahelenin klinik düzelme sağladığını göstermişlerdir. Ancak fasyotomi popülerliğini, 1964'de Patven, Pavlos ve Shires tarafından 76 iskemik alt ekstremite hastasında kas ödemini çözmek için kullanıldığında elde etmiştir (37). Şok sonrası toksik molekül oluşumunun, ilk kez 1920 yılında Cannon tarafından tariflenmesi, reperfüzyon hasarında ilk adım olmuştur. 1937'de ise Husveldt ve Bjering tarafından travmatik şoku takiben böbrek hasarı tariflenmistir. İkinci Dünya Savaşı sonrası Bywaters tarafından yayınlanan geniş bir seride ekstremite ezilmesini takiben oluşan böbrek yetmezliği tablosu ile reperfüzyon hasarı üzerinde durulmuştur (37). İskemik ekstremite revaskülarizasyonu ile oluşabilecek risk, ilk kez 1960 yılında Haimovici tarafından "Miyonefropatik-metabolik Sendrom" olarak tariflenmiştir (38). 1969 yılında, iskemik ekstremite revaskülarizasyonunu takiben %85'lik mortalite tariflenmiş olup Haimovici'den farklı olarak mortalitenin kardiyopulmoner nedenlere bağlı oluştuğu gözlenmiştir (39).

Ekstremite İskemi Reperfüzyonunun Patofizyolojisi

İskemiye karşı olan tolerans dokunun türüne ve kollateral dolaşım varlığına göre değişir. Normotermik doku iskemisinde geri dönüşümsüz hasar; kasta 4. saatte, sinirde 8. saatte, yağ dokusunda 24. saatte ve kemikte yaklaşık 4. günde oluşur (37).

a) Kas değişiklikleri:

İskelet kası, ekstremiteyi oluşturan primer kütle olup aynı zamanda iskemik hasara en hassas dokudur. Dolayısıyla iskelet kası hasarı ekstremite reperfüzyon hasarının en önemli bölümünü oluşturur (37). Kas ölümü sonrası makroskopik ve mikroskopik değişiklikler minimal olduğundan kas ölüm zamanını belirtmek zordur. İskemiyi takiben yaklaşık üçüncü saatte ciddi kas hasarı ve altıncı saatte yaklaşık %97'lik fonksiyonel doku kaybı oluştuğu spektrofotometrik (triphenyltetrazolium chloride) yöntemlerle gösterilmiştir. Dolayısıyla geri dönüşümsüz zedelenme zamanının tayininde spektrofotometre önemlidir (40). Kas nekrozu ve ATP deposu azalması arasında yakın ilişki saptanmıştır. İskemik kas dokusunda öncelikle glikojen ve kreatin fosfat azalırken bu safhada çok fazla miyonekroz oluşmaz. Sonrasında, ATP azalmasıyla birlikte, kas nekrozu hızla artar. 6 saatlik kas iskemisi sonucu, normal kas dokusu ATP deposunda %80 azalma ve kas dokusunun tümünde nekroz oluşur (41). Kas fiberleri, içerdikleri miyoglobin miktarına bağlı olarak, kırmızı (tip 1) ve beyaz (tip 2) olarak sınıflandırılır. Çoğu kas her iki türü de içermekteyse de bir tip daha baskın bulunur. Örneğin bacağın ön kompartmanında daha çok tip 1 veya yavaş kasılan fiberler baskın olup, enerji üretiminde aerobik metabolizmayı kullanmaları

bu kas grubunu iskemiye daha hassas kılar. Bacağın arka kompartmanında ise tip 2 veya hızlı kasılan fiberler baskın olup, enerji üretiminde anaerobik metabolizma ön plandadır (37). İskeminin süresi ve etkilenen fiber tipi iskemik hasarda önemli olmakla birlikte dokunun vücuttaki konumu da önemlidir. Örneğin, çabuk soğuma nedeniyle, distal ekstremite kas dokusu proksimal kas dokusuna göre iskemiye daha dirençlidir (37).

b) Mikrodolaşım Değişiklikleri:

Mikrodolaşım değişiklikleri, iskemik dönemde gerçekleşir ve iskemi süresi ile uyum gösterir. İskemi, ilk olarak kapiller endotel hücreleri etkileyerek, hem lümen hem de sitoplazmaya doğru uzanan parmaksı çıkıntılar oluşturur. İskeminin devamıyla birlikte endotel veziküllerinde artış oluşur. Bu arada, hücreler arası bağlar zayıflar ve geçit genişler. Heterojen dağılımlı endotel hücre ödemi oluşarak kırmızı küre sıkışmasını arttırır. İskeminin dördüncü saatinden sonra mikrosirkülasyonda hücresel etkileşimler (eristrositik, trombositik ve lökositik) başlar. Venöz ve arteriyel kapiller damarlar, reperfüzyon öncesinde, sıkışmış eritrositlerle kapanmış görünümdedirler. Rulo halindeki eritrosit kümeleri, erken reperfüzyon döneminde, endotel yüzeyde hasarlanma oluştururlar. Endotel hücre sitoplazmasındaki parçalanma sonucu hücreler arası büyük geçitler oluşur. Reperfüzyonla birlikte, özellikle venöz kapillerlerde, lümen içi platelet ve fibrin kümeleri ile karekterize trombotik komplikasyonlar oluşur. Bu platelet kümeler, endotel yüzde olan geniş defektleri kapatır. Venlerde lökosit diapedezi oluşurken, venöz kapillerlerde lökositlerin lenfosit ve monositlerle olan kümeleşmesi oluşur (37). İskemi süresi uzadıkça damarsal geçirgenlik artışı ve ilerleyici interstisyel

ödem oluşur. Yapılan bir çalışmada, 4 saatlik iskemi sonrası kas ağırlığının arttığı ve bu ağırlığın reperfüzyonun üçüncü saatinde maksimuma çıktığı belirtilmiştir (42).

c) "No reflow" fenomeni:

İlk kez Brooks ve arkadaşları tarafından 1922'de, hayvan deneyinde, bu durum gözlenmiş ve patofizyolojik olarak tarif edilmiştir (43). Ancak, "no reflow" teriminin ilk kez kullanımı, Ames tarafından, 1968'de iskemik beyin hasarında olmuştur (44). Kas iskemisi ilerlediğinde kası besleyen damarda kalıcı tıkanıklık oluşur. Dolayısıyla "no reflow" fenomeninin myonekroza ikincil mi oluştuğu, yoksa "no reflow" fenomeni sonucunda mı miyonekroz oluştuğu çelişkili bir konu olup, ilk durumun geçerli olduğu düşünülmektedir. Çünkü miyosit ve endotel hücrelerin iskemiye karşı toleransları farklıdır. Dört saatlik iskemi ciddi kas hasarı oluşturabilirken, bu durum endotelde 6 saatte oluşur. Bu nedenle, dokunun iskemiye karşı olan toleransını endotel değil doku hücresi belirler (37). "No reflow" fenomeni patofizyolojisinde, hemokonsantrasyon ve tromboz, kapiller endotel hücrelerde şişme, kapillerlerde lökosit kümeleşmesi ve doku ödemine ikincil artmış ekstravasküler doku basıncı vardır. Kapiller endotel şişmesi enerji depolarındaki azalmaya bağlıdır. Bu şişme erken reperfüzyon döneminde maksimum düzeyde olup kapiller kan akımına karşı rezistansı arttırır. Lökositler, kapiller endotelle adezyon oluşturmadan lümen içerisinde kümeleşerek "no reflow" oluşumunda önemli rol oynarlar. Dolayısıyla kümeleşmiş lökosit hareketi endotel hasarını arttırır (37).

d) Lokal inflamatuar cevap:

İskemik doku reperfüzyonu inflamatuar bir cevap doğurur. Ancak doku nekrozundan reperfüzyon döneminden çok iskemik dönem sorumludur (37). Damar tıkanıklıklarında, hayvan turnike modellerinin aksine, tıkanıklığın bir miktar distaline kadar, kollateral dolaşıma bağlı, normal doku izlenir. Dolayısıyla reperfüzyonla amaç, distaldeki nekrotik alanın değil bu alanın kanlandırılmasıdır. Bu bölge; nekrotik ve ciddi hasarlanmış hücrelerin iç içe olduğu ve inflamatuar aracıların sentezlendiği yerdir. Dolayısıyla, reperfüzyon sağlanmış hasarlı veya nekrotik alan miktarı morbiditeyi belirler. İnflamatuar cevabın tetikleyicileri; asit fosfataz, inorganik fosfat, laktik asit, miyoglobin, nükleotidler, potasyum, proteolitik enzimler ve pürin bazları gibi kas yıkım ürünleridir. Bu yıkım ürünleri; prokoagulan özellikte olup, intrensek pıhtılaşma sistemini aktive ederek venöz kılcal trombozu ve kollateral arteriyollerde vazospasm oluştururlar. İnflamatuar cevabın en belirgin olduğu geçiş alanındaki bu tarz bir aktivite, nekrotik alanda genişlemeye neden olur. Dolayısıyla, antitrombotik ve antiplatelet tedaviyle geri dönüşümlü hasar bölgelerine olan kollateral akım ve mikrodolaşım korunarak nekrotik genişleme engellenebilir (37).

2.4 İskemi Reperfüzyon Metabolizmaları:

Serbest Oksijen Radikalleri

SOR vücudun normal döngüsü esnasında değişik yollarla açığa çıkabilir. Hücre sitoplazma membranındaki NADPH oksidaz, endoplazmik retikulumda bulunan P-450 oksidazlar, peroksizomlardaki oksidazlar, sitoplazmadaki bazı

enzimler ve mitokondriyal oksidatif fosforilasyon sistemi süper oksit anyon ($O2^{-}$) meydana gelmesinde temel oluştururlar (1). Ayrıca, patolojik şartlarda dokuya nüfuz eden lökositler de SOR oluşumuna katkıda bulunurlar (1). SOR'nin özellikle iskemik çizgili kasın reperfüzyonundan sonra oluştuğu ve bunun doku hasarının temel bileşeni olduğu uzun zamandır bilinmektedir (45). Reperfüzyon esnasında dokuya tekrar sunulan oksijenin, SOR'nin oluşmasını potansiyalize edebileceği yönünde kanıtlar bulunmuştur.

Bunu destekleyen bir bulgu, oksijen miktarı azaltılmış reperfüzatlarla reperfüzyona uğratılan dokularda, hasarının azaldığının gösterilmiş olmasıdır (46,47). İskemi reperfüzyon hasarında SOR'un rolü olduğunu destekleyen diğer kanıtlar, ksantin oksidazı inhibe eden allopurinol, $O2^{-}$'nu yıkan SOD, H2O2'i yıkan katalaz (KAT) ve OH^{-} 'ni nötralize eden dimetilsülfoksid verilmesinin doku hasarını azalttığını gösteren çalışmalarla gelmiştir (48). Bu nedenle özellikle çizgili kastaki İRH'da ksantin oksidaz kaynaklı SOR'nin ve bunlardan da yukarıda sayılan üçünün rolü olabileceği ileri sürülmüştür (48). Buna ek olarak, desferoksamin ve apotransferrin gibi Fe şelatörleri verilen dokularda İRH'nin azaldığı ve dolayısıyla fenton reaksiyonu ile H2O2'den oluşan OH^{-}'nin bu olaya katkısının olduğu düşünülmüştür (49). Ayrıca, Fenton reaksiyonu sonucu oluşan OH^{-}'nin lipid peroksidasyon yaparak membran hasarına neden olduğu, lipid peroksidasyonunun göstergesi olan MDA düzeyleri ölçülerek değerlendirilmiş ve desferoksaminin MDA düzeylerini azalttığı tespit edilmiştir (50). OH^{-}'nin yukarıda bahsedilen yolak dışında kaynakları olabileceği de ileri sürülmüştür: Buna göre $O2^{-}$ ile nitrik oksit (NO)'in birleşmesiyle peroksinitrit ($ONOO^{-}$)

oluşmakta, bu da OH^{-}'ne dönüşmektedir (51). SOR'nin nasıl etki ettiği ile ilgili iki temel görüş vardır. Bunlardan birine göre SOR hücrelerdeki yapısal ve fonksiyonel rolleri olan kontraktil ve transport proteinlere, enzimlere, reseptörlere, nükleik asit ve membran lipidleri gibi birçok farklı moleküle etki ederek bunların işlevlerini bozar (52). Özellikle membran lipidlerinin peroksidasyonu sonucu oluşan membran hasarı neticesinde hücre içine kalsiyum girişi artabilir ve sonuçta hücre hasarı meydana gelebilir (52). Ayrıca SOR proteolitik reaksiyonları hızlandırarak da doku yıkımına yol açabilirler (52). İkinci durumda ise SOR'nin lökosit migrasyonuna yol açarak doku hasarına sebep olduğu düşünülmektedir. SOR'nin bu etkisini nasıl yaptığı ile ilgili bir dizi hipotez vardır. Bunlar;

1) Kemotaktik stimülanların (platelet aktive edici faktör (PAF), lökotrien B4 gibi) attırılması,

2) Kompleman aktivasyonu,

3) Antiadeziv bir molekül olan NO'nun yıkılması

4) Adezyon moleküllerinin ekspresyonunun artması (52).

Lökosit infiltrasyonu

SOR'nin önemli bir kaynağı aktive olmuş lökositlerdir; bu hücreler ayrıca salıverdikleri sitotoksik enzimler ve mikrosirkülasyonda oluşturdukları obstrüksiyonla da İRH'ye katkıda bulunabilirler. Çizgili kasta, iskemi-reperfüzyon periyodundan sonra lökositlerin biriktiği gösterilmiştir (53). Ayrıca, ATP-MgCI2, iloprost ve adenozin gibi lökosit metabolizmasını inhibe eden ilaçların İRH'yi önlediği saptanmıştır (53,54). Bu bulgulara paralel olarak,

reperfüzyon lökosit düzeyleri düşürülmüş kanla yapıldığında hasarın belirgin derecede azaldığı bulunmuştur (55,56). Köpeklerde yapılan benzer bir çalışmada, lökosit miktarı azaltılmış kanla reperfüzyon yapılmış, bu uygulamayla SOR'ne bağlı lipid peroksidasyonunun ve doku nekrozunun azaldığı bulunmuştur; bu bulgulara dayanarak lökosit kaynaklı SOR'nin bu patolojide rolünün olabileceği ileri sürülmüştür (57,58). Adezyon lökositlerin dokuya nüfuz edebilmelerinin ön koşuludur. Bugüne kadar yapılan çalışmalar adezyon olayında rol alan bazı moleküllerin varlığını göstermiştir. Bunlar;

1) CD11a/18, CD11b/18 ve CD11c/18 gibi lökosit integrinleri,

2) Endotelyal intersellüler adhezyon molekülü,

3) L-selektin (lökosit yüzeyinde), E-selektin (endotel yüzeyinde) ve P-selektin (endotel yüzeyinde) gibi selektin ailesinin üyeleri (59,60).

Başlangıçtaki adhezyona E-selektin, P-selektin ve L-selektin aracılık eder; böylece adezyona uğramış lökositler kompleman 5a (C5a), lökotrien B4, interlökin-8 ve platelet aktive edici faktör (PAF) vasıtasıyla aktive edilirler ve yüzeylerinde kompleman 11b/18 (CD11b/18) molekülleri belirir; CD11b/18 ve ayrıca endotelyal intersellüler adezyon molekülü etkinliği sonucu daha önce oluşan adezyon güçlenir ve transendoteliyal migrasyon oluşur (61-63). Nitekim CD11/CD18'in antikorlarla etkisiz hale getirilmesi, iskelet kasında iskemi sonrası ortaya çıkan kontraktil disfonksiyonun (64), mikrovasküler bariyer yıkımının (55) ve miyosit nekrozunun (65) azalmasına yol açtığı tespit edilmiştir. Ayrıca, iskelet kasında iskemi sonrası ortaya çıkan "no-reflow" fenomeninin anti-endotelyal intersellüler adezyon molekülü antikorları vasıtasıyla azaldığı bulunmuştur (66).

Çizgili kas IR modelinde akciğerlerde E-selektinin ekspresyonunun arttığı saptanmıştır (67).

Fosfolipid metabolizması

Fosfolipidler hücre membranının reseptör, enzim ve iyon kanal fonksiyonlarını düzenleyen temel yapıtaşları olduklarından hücrenin bütünlüğü için vazgeçilmezdir. İskemi-reperfüzyon hasarında membran fosfolipidlerin yapısı çeşitli yollarla bozulabilir:

1) SOR'ne bağlı lipid peroksidasyonu,

2) Fosfolipaz aktivasyonu sonucu yıkım artması

3) De novo fosfolipid sentezinin azalması

Sonuç olarak kalsiyum permeabilitesi ve hücre ölümü artabilir. Nitekim çizgili kas İRH'dan sonra fosfolipid kaybının varlığı saptanmıştır (57).

Eikosanoid metabolizması

Reperfüzyon iskemik çizgili kasta ve miyokardiyumda eikosanoid sentezinin artmasına yol açar (68-69). Eldeki kanıtlar eikosanoid artışının kaynağının nötrofiller olabileceğini düşündürmektedir; ilginç olarak çizgili kasta lökotrien B4, lökotrien C4, lökotrien D4 ve lökotrien E4 gibi eikosanoidlerin nötrofil aktivasyonuna aracılık ettiği gösterilmiştir (70). Tavşanda elde edilen bu bulgulara zıt olarak köpekte lökotrien B4'ün İRH'yle bir ilişkisi saptanamamıştır (71).

Sitokinler

Çizgili kasta, interlökin-1 ve tümör nekroz faktör-alfa (TNFα) iskemi reperfüzyonundan sonra salıverilirler ve lökosit aracılı zararı şu mekanizmalarla arttırırlar:

1) Lizozom salıverilmesinin fazlalaşması,

2) $O2^{-}$ üretiminin artması,

3) Nötrofil kemotaksisinin belirginleşmesi

4) Endotele adezyonunu kolaylaştırılması (72-73).

İnterlökin-1 antikoru ve reseptör antagonistleri ile elde edilen ve lökosit infiltrasyonu ve membran permeabilitesinin azaltıldığını gösteren çalışmalar, bu sitokinin çizgili kas İRH'de rolü olduğunu desteklemiştir (73). Bu sitokinlere ek olarak interlökin-6'nın da çizgili kas İRH'de yükseldiği saptanmıştır (73).

2.5 Serbest Oksijen Radikalleri

Moleküllerdeki atomların yapısına baktığımızda, atomların uzayda bir yer kapladıklarını ve bu yere orbital adı verildiğini görüyoruz. Her orbitalde biri saat yönünde diğeri ise tersi yönde hareket eden iki elektron bulunur. Eğer bir orbitalde yalnızca bir elektron bulunursa buna eşleşmemiş elektron adı verilir. SOR en dış orbitalinde eşleşmemiş elektron taşıyan, elektrik yüklü veya elektrik yüksüz olabilen atom veya moleküllerdir. Çok kısa yaşam süreli ancak yapılarındaki dengesizlik nedeniyle çok aktif olan serbest radikaller, tüm hücre bileşenleri ile etkileşebilme özelliği göstermektedir (74). Vücutta bulunan en temel serbest radikaller aşağıda sıralanmıştır.

Süperoksit anyonu

$O2^{-}$ hücrede enerji metabolizmasında oksidasyon sırasında ya da oksidazlar gibi bazı enzimlerin aktivitesi sonucu oluşur. $O2^{-}$ SOD adlı enzimle inaktive edilir (1). $O2^{-}$ fagositlerin bakterisit etkilerinin temel mekanizmasını oluşturur. Aynı zamanda iltihabi olaylarda normal dokulara bile zarar verebilecek aracılardır (75).

Hidrojen peroksit

$O2^{-}$'dan SOD enzimi vasıtasıyla meydana gelen daha az toksik bir radikaldir (1). KAT ve/veya glutaton peroksidaz enzimiyle H2O ve O2'ye çevrilerek etkisiz hale getirilir (1).

Hidroksil radikali

OH^{-} birkaç yolla oluşur: Suyun hidroliziyle ya da parçalanmasıyla hidrojen radikalleri ve OH^{-} oluşabilir (75). Aynı zamanda H2O2 üzerinden Fe ve Cu'ın rol aldığı Fenton reaksiyonuyla da oluşur (1). Diğeri de Haber-Weiss reaksiyonudur ($H2O2+O2 \rightarrow OH^{-}+ OH^{-}+O2$). OH^{-} radikalleri en reaktif serbest radikallerdir ve vücuttaki serbest radikal hasarının en önemli sorumlularıdır (75). Bu radikal glutatyon peroksidaz (GPO) enziminin rol aldığı bir reaksiyonla H2O'ya indirgenir (1).

Hipoklorit

Nötrofillerin bünyesinde bulunan myeloperoksidaz enziminin etkisiyle hidrojen peroksitten oluşur (1).

Nitrik oksit

Bugüne kadar yapılan çalışmalar nitrik oksitin (NO) kardiyovasküler, solunum, üriner, gastrointestinal ve sinir sistemindeki farklı birçok fizyolojik olayda rolü olduğunu göstermiştir; daha da önemlisi çeşitli hastalıklardaki fizyopatolojik mekanizmalarda rolünün olabileceğine dair kanıtların tespit edilmesidir (1). Aslında endojen NO'nun birbirinden farklı ve paradoksal olan dual etkisinin olduğu düşünülmektedir. Düşük konsantrasyonlarda NO'nun faydalı etkiler gösterebileceği ve yüksek konsantrasyonda ise zararlı olabileceği iddia edilmiştir (76). NO'nun dual etkisini açıklamaya çalışan diğer bir yaklaşım nitrik oksidin oluşturduğu bir takım fizyolojik etkilerle yararlı olabileceği, diğer taraftan $O2^{-}$ ile etkileşerek oluşturduğu peroksinitrit (ONOO-) vasıtasıyla zararlı etkiler yaratabileceğidir (77).

Peroksinitrit

$O2^{-}$ ile NO'nun etkileşmesi ile oluşan bir serbest oksijen radikalidir (1). Ya daha toksik olan OH^{-}'ne ve beraberinde nitrojen diokside dönüşür ya da indirgenmiş glutatyonla birleşerek bir endojen NO donörü olan S-nitrozoglutatyon'a dönüşür (1).

2.6 Antioksidanlar

Organizmada devamlı olarak SOR oluşmasına rağmen antioksidan savunma sistemleri ile oksidasyon arasındaki dinamik dengeden dolayı zararlı etkiler ortaya çıkmaz (78). Bu dengenin korunması organizmanın canlılığını sürdürmesi açısından son derece önemlidir. Antioksidan miktarının serbest radikalleri kompanse edememesi durumunda oksidatif stres olarak tanımlanan

durum ortaya çıkar (79). Fizyolojik ve patolojik olaylar sonucu dengenin oksidasyon lehine değişmesi durumunda oksidatif hasar gelişebilmektedir. Antioksidanlar hedef moleküllerdeki hasarı engelleyen ya da geciktiren maddeler olarak tanımlanmaktadır (80). Temel antioksidan etki mekanizmaları şöyle sıralanabilir:

1) Serbest radikal oluşumunu engellemek,

2) Oluşan radikali etkisizleştirmek,

3) Serbest radikalin oluşturduğu oksidatif hasarı önlemek,

4) Hasarlanmış molekülleri tamir etmek veya mutasyona uğrama ihtimalini minimale indirgemek (81).

Organizmada çok çeşitli antioksidan sistemleri vardır ve bunların belki de en önemlisi enzimlerdir: SOD, KAT, GPO, glutatyon reduktaz ve glutatyon transferaz (82).

Süperoksit dismutaz

SOD, $O2^{-}$ 'nun H2O2 ve moleküler oksijene dönüşümünü katalize eden bir enzimdir; aerobik tüm hücrelerde bulunan ve oksijen toksisitesine karşı organizmadaki ilk savunma sistemidir. Organizmada oksidatif stresin arttığı durumlarda SOD enzim aktivitesini artırarak koruyucu rol oynar (75). Bir metalloprotein yapısında olup içerdiği metal iyonuna göre hücrede 3 izoenzimi tanımlanmıştır:

1) SOD1; sitoplazmik yerleşim gösteren, Cu/Zn-SOD,

2) SOD2; mitokondride bulunan, Mn-SOD,

3) SOD3; ekstrasellüler ortamda bulunan tip (83).

Katalaz

Glikoprotein yapısında 4 hem grubu içeren, bilinen en hızlı enzimlerden biridir ve hücre içerisinde yoğun olarak peroksizomlarda bulunur; görevi H2O2'i oksijen ve suya dönüştürmektir; bu yolla daha toksik olan hidroksil radikallerinin oluşumunu önler (84).

Glutatyon peroksidaz

GPO, hücre içi enzim olup aktif merkezinde selenosistein içerir: H2O2 ve lipid hidroperoksitlerini katalizleyerek hücre membranını hasarlanmadan korur (85). Eritrositlerde oksidan strese karşı en etkili antioksidandır. GPO tarafından katalizlenen glutatyon redoks siklusu, H2O2 miktarını düşürerek, superoksit radikalleri arasındaki reaksiyon zincirini kırar (86).

Glutatyon redüktaz

Biyolojik sistemlerde antioksidan aktiviteye sahip en önemli enzimlerden biri de glutatyon redüktazdır ve bu enzim hücreleri oksidatif hasardan korur (87). Selenyum (Se) koenzimine sahip olan bu enzim, yükseltgenmiş glutatyonu NADPH varlığında indirgenmiş glutatyona çevirir (85)

Glutatyon

Karaciğerde çok yüksek konsantrasyonlarda bulunan tripeptid yapısında önemli bir antioksidandır. GPO tarafından katalizlenen glutatyon redoks siklusu, H2O2 miktarını düşürerek, superoksit radikalleri ve yüksek reaktif hidroksil

radikalleri arasındaki reaksiyon zincirini kırar (88). Glutatyon superoksit anyonlarına karşı doğal bir temizleyicilik görevi üstlenir ve oksidasyona karşı hücre bütünlüğünü sağlamak için mutlaka gerekli olan protein tiyol gruplarını bulundurmaktadır (87).

Glukoz-6-Fosfat Dehidrogenaz

Glukoz 6-fosfat dehidrogenaz enzimi, pentoz fosfat yolunun ilk reaksiyonunun katalizleyen kilit bir enzimdir. İndirgeyici fotosentetik pentoz fosfat yolu ile oksidatif pentoz fosfat yolunun her ikisinde de önemli fonksiyonlara sahiptir. Pentoz fosfat yolunun temel fonksiyonu NADPH ve değişik şeker fosfatlarını üretmektir; her iki yolda da fonksiyonel etkiye sahip olan bu enzim sitozolde ve kloroplastlarda bulunur. Glukoz 6-fosfat dehidrogenaz hemen hemen bütün hayvan dokularında, bitkilerde, mayalarda ve mikroorganizmalarda bulunur (89). Pentoz fosfat yolu ile ilgili radyoaktif C ile işaretlenmiş glukoz ile yapılan denemeler, bu yolun kas dokularından çok, adipoz dokuda aktif olduğunu göstermiştir. Bu sonuç pentoz fosfat yolunun başlıca rolünün, indirgeyici biyosentez olaylarında kullanılmak üzere, NADPH üretmek olduğu iddiasını desteklemektedir. Çünkü yağ dokusu hücrelerinde asetil Co A'dan yağ asitlerinin biyosentezinde büyük miktarda NADPH kullanılmaktadır (89). Vücutta antioksidan olarak çalışan, suda çözünen bazı maddeler de vardır: Vitamin C, ürik asit, glukoz ve sistein. Benzer olarak yağda çözünen moleküller de bulunur: Vitamin E, β-karoten, bilirubin, ubikinol ve flavanoidler. Ayrıca metal

iyonlarını bağlayan maddeler; ferritin, transferin, haptoglobin, hemopeksin, seruloplazmin ve albumindir (82).

2.7 Hasar Mekanizmaları

Organizmada SOR ortaya çıktıktan sonra radikal reaksiyon dizileri başlar (90). Eğer bir serbest radikal, radikal olmayan bir moleküle reaksiyona girerse, binlerce reaksiyondan oluşan reaksiyon zincirlerini başlatır (91). SOR paylaşılmamış elektronlarından dolayı lipid, protein, karbonhidrat, nükleik asit gibi çeşitli makromoleküllerin oksidatif hasarına neden olurlar. Bu hasarlanma özetle aşağıdaki şu mekanizmalarla olur (79).

Lipid peroksidasyonu

Serbest radikallerin hücrede başlattığı en önemli ve zararlı etki lipid peroksidasyonudur. Çoklu doymamış yağ asitlerinin serbest radikaller ile oksidasyonu lipid peroksidasyonu olarak tanımlanır. Lipid peroksidasyonu, organizmada oluşan kuvvetli yükseltgen bir radikalin etkisiyle membran yapısındaki çoklu doymamış yağ asidi zincirindeki alfa metilen gruplarından bir hidrojen atomunun uzaklaştırılması ile başlamaktadır. Biyolojik sistemlerde bu radikalin $O2^{-}$ ile OH^{-}'nin olduğu kabul edilmektedir. Bu radikallerin başlattığı peroksidasyon zincirleme bir reaksiyondur ve lipid zinciri bitene kadar ya da reaksiyon bir antioksidan tarafından durdurulana kadar devam eder. Sonuçta membran bütünlüğü bozulur ve hücre ölümüne yol açan süreçler tetiklenir (92).

Protein oksidasyonu

Serbest radikaller ile oluşan protein oksidasyonu, proteinlerin bağlanma özelliklerinde ve enzim aktivitelerinde farklılaşmaya neden olarak hücre fonksiyonlarında bozulmalara yol açabilir.

DNA oksidasyonu

SOR adenin ve piridin nükleotid durumlarının sürdürülebilmesi için gerekli yollara engel olabilirler. SOR, DNA ile tepkimeye girerek mutajenik olan 8-hidroksiguanin'in ortaya çıkmasına neden olurlar.

Kovalent bağlanma

Serbest radikaller polisiklik hidrokarbonlar, aromatik aminler, nitrozamin gibi ksenobiyotiklerin çeşitli biyomoleküllere kovalent bağlanmasına neden olabilir. Bu da doğrudan hücre hasarına yol açabilir.

Kalsiyum

Hücre yaralanması ile ilgili olduğu düşünülen bir elementtir. Kalsiyumun transportunu engelleyen herhangi bir durum hücre fonksiyonlarını olumsuz etkiler. Kalsiyum ATPaz enzimleri önemli sülfidril gruplarına sahiptir ve SOR tarafından inaktive edilebilir.

2.8 Adrenomedullin

Yeni bir düzenleyici peptid olarak Adrenomedullin (ADM), bazı peptidlerin trombosit cAMP düzeylerine etkisi araştırılırken feokromositoma hücrelerinden elde edilmiştir. Adrenal medulladan türediği için adrenomedullin denilen bu peptid hakkında ilk makale 1993 yılında sadece onun belirlenmesi ile ilgili değil aynı zamanda vazodilator etkisini de tanımlayacak biçimde dolaşımdaki ADM' yi ölçmek suretiyle yayınlanmıştır. Sonraki yıllarda birçok klinik durumda ADM düzeyleri ölçülmüş, ilk ADM reseptörleri tanımlanmış ve endokrinoloji başta olmak üzere tıbbın bir çok alanında araştırmalar yapılmıştır (15-16,93).

Adrenomedullinin yapısı ve sentezi

İnsan ADM' i 52 aminoasitten oluşan 16 ve 21. bölümlerinde tek bir disülfid köprüsü ile bağlanan ve karboksi terminalinde aminlenmiş tirozin içeren bir peptiddir. Kalsitonin gen ilişkili peptid (CGRP) ile benzerlik göstermesi nedeniyle kalsitonin, CGRP, amilin peptid ailesine eklenmiştir. ADM büyükçe bir öncül molekülün bir parçası olarak sentezlenir, 185 aminoasitten oluşan bu yapıya proadrenomedullin (pADM) denilir. Gen lokusu 11. kromozomda yerleşmiştir ve bir çok dokuda saptanmıştır. Adrenal medulla, kardiyak ventrikül, böbrekler ve akciğerler bunlardan ilk tanımlananlarıdır. Böylece bu peptidin nitrik oksit (NO) ve endotelin ile birlikte vasküler endotel hücrelerinin salgısal bir ürünü olduğu kabul edilmektedir (15,16).

Dolaşımdaki adrenomedullin

Yüksek frekanslı likid kromotografi (HPLC) yöntemi ile gösterilen immunoreaktif ADM'nin insan plazmasındaki gerçek ADM düzeyini gösterdiği kabul edilmektedir. Böylece, plazma ADM düzeylerinin 1-10 pikomol (pM) arasında olduğu, cinsiyet ve yaş farkından etkilenmediği kabul edilmiştir (94). Ancak Hata ve arkadaşları (95) normal aralığın çok üzerinde ADM değerleri saptamışlardır (13.7±6.7 ve 61.2±7.9 pM). Sonuç olarak plazma ADM düzeyleri için henüz belirlenmiş kesin bir referans değeri yoktur (96).

Hastalıklarda dolaşımdaki ADM düzeyleri

ADM düzeyleri birçok farklı hastalık durumunda ölçülmüştür. Esansiyel hipertansiyonda plazma ADM düzeyleri yüksek bulunmuştur. Bu durum yüksek plazma ADM düzeylerinin kan basıncını düzenlemedeki önemine işaret etmektedir (97). Sirozda hastalığın şiddeti ile orantılı olarak giderek artan ADM düzeyleri saptanmıştır. Bu hastalıkta renin angiotensin aldosteron konsantrasyonları ile ADM arasında pozitif korelasyon saptanırken, glomerüler filtrasyon hızı, kreatininin klerensi ve sodyum ekskresyonu arasında negatif korelasyon bulunmuştur ve ADM'nin hepatik sirozdaki hemodinamik değişikliklerde rol oynadığı ve asit oluşumunda etkili olduğunu düşünülmüştür (98). Septik şokta da ADM düzeylerinde belirgin artış gösterilmiştir. Bu durum ADM'nin septik şokun patofizyolojisinde anahtar rol oynadığını düşündürmektedir (99). Ayrıca preeklampsili gebelerin amnion sıvılarında ADM konsantrasyonları yüksek bulunmuştur (95).

Metabolik klerensi ve farklı biyolojik sıvılarda adrenomedullin

Plazma membran enzimlerinden metalloproteinazlar ve aminopeptidaz ADM'yi parçalamaktadır. Periferik plazma dışında idrarda, insan sütünde, beyin omurilik sıvısında, tükrük, amnion sıvısı, ter ve umblikal ven kanında ADM saptanmıştır (15,93).

Adrenomedullinin etkileri

ADM ilk tanımlandığında kardiyovasküler etkileri tanımlanmıştı ancak daha sonraki araştırmalar sadece basit bir vazodilator olmadığını ve ADM'nin hücre büyümesi ve farklılaşmasından hormon sekresyonunun düzenlenmesine ve antibakteriyel etkilere varıncaya dek geniş bir çerçevede etkileri olduğunu göstermiştir.

Vasküler etkileri

Rat, koyun ve insanlarda intravenöz ADM infüzyonunun güçlü bir hipotansiyon oluşturduğu, bunu da esasen damarlarda nitrik oksit (NO) üretimi aracılığı ile yaptığı gösterilmiştir. ADM'nin ani ya da sürekli uygulanmaları belirgin derecede total periferik direncin azalması ile birlikte kan basıncında düşme yapmaktadır. Bu durum artmış kalp hızı, kardiyak output ve atım hacmi ile birliktedir. Hipoksi durumlarında vazodilatör etki NO üretiminden daha çok prostoglandin sentezi aracılığıyla olmaktadır (100).

Büyüme ve gelişmeye etkileri

ADMnin ilk önce adrenal tümor hücreleri ve sonra da pulmoner tümorlerde gösterilmesi hem tümoral hem de normal hücrelerde otokrin ve parakrin bir rolü olduğunu düşündürmüştür. Özellikle ratlarda ADM'in DNA sentezi ve hücre proliferasyonu üzerine etkileri, onun cAMP yoluyla güçlü bir antiproliferatif etkisi olduğunu ortaya koymuştur (101). Yine de, ADM'in vasküler hücrelerdeki vazodilatör ve büyümeyi inhibe eden etkilerinin endotelin ve angiotensin II'nin vazokonstrüktör/proliferatif etkilerine karşıt olup olmadığının ileri çalışmalarla belirlenmesi gerekmektedir (102).

Endokrin etkileri

ADM' in hipofiz üzerine etkileri hayvan deneylerinde gösterilmiştir ve ADM ön hipofizde doza bağımlı olarak ACTH salınımını inhibe etmektedir. Adrenal bezde ADM belirgin olarak aldosteron üretimini inhibe etmekte ayrıca medulla hücrelerinden de bol miktarda ve nikotinik reseptör uyarımına yanıt olarak katekolaminlerle birlikte salgılandığı belirlenmiştir. Ratlarda pankreas adacık hücrelerinde insulin sekresyonunu uyarıcı etkileri vardır (15).

Renal damarlar üzerine olan etkileri

Damar tonusu düzenleme konusunda potent bir vazodilatör olan ADM, konsantrasyona bağımlı olarak böbrek arterlerinde vazodilatasyon yapmaktadır. Bu etkisi endotelyumu sağlam olan arterlerde daha güçlüdür. Yapılan çalışmalar bunu endoteliyal hücreler aracılığı ile NO'ya bağımlı olarak yaptığını ortaya

koymuştur. Adrenomedullin uygulanması kalp hızı ve arteriyel kan basıncını etkilemeksizin, renal kan akımını, idrar çıkışını, glomerüler filtrasyon hızını, idrar sodyum atılımını doza bağımlı yolla artırır ki bu preglomerüler ve postglomerüler arteriyolar etkisini göstermektedir. ADM'in renal medulla kanallarında saptanması bu dokularda su için oluşturduğu artmış geçirgenlik ile ilgilidir (103).

Natriüretik etkileri

ADM'in intrarenal infüzyonu belirgin diüretik ve natiüretik yanıta yol açar. Bu durum artmış Glomerüler filtrasyon hızı (GFR) ile birlikte azalmış sodyum reabsorpsiyonu yapmaktadır. ADM prostoglandin sentezinin inhibisyonunu tamamen ortadan kaldırarak natriürezi uyarmaktadır. ADM'e renal yanıt NO sentezinin inhibisyonu ile zayıflatılabilir. Bu durum ADM'in vazodilatör, diüretik ve natriüretik etkilerinin endogen NO salınım aracılığıyla olduğunu düşündürmektedir (104).

Mezangiyal hücre proliferasyonuna etkileri

ADM, mezangiyal hücre proliferasyonunu inhibe etmektedir ve trombosit türevi büyüme faktöür (PDGF) ile uyarılmış mitogen aktive edici protein kinazın (MAPK) aktivasyonunu azaltmaktadır. Bütün bunlar ADM'in mezangiyal hücre mitogenezini baskıladığını göstermektedir. Mezangiyal hücrelerde endotelin-1'in uyardığı MAPK aktivasyonunu da inhibe eder. ADM'in mezangiyal hücre supresyonunu, cAMP protein kinaz-A (PKA) yolu ile yaptığı, MAPK inhibisyonu ile birlikte, makrofaj infiltrasyonunu, mezangiyal hücrelerde reaktif oksijen

metaboliti üretimini azalttığı saptanmıştır. ADM aynı zamanda mezangiyal hücre biyolojisinde önemli bir yere sahiptir ve mezangiyal hücre kontraksiyonunu düzenleme yeteneğindedir. Böylece araştırmacılar ADM'in glomerül üzerindeki immuno-inflamatuar zedelenmeye karşı sitoprotektif otokoid bir ajan olarak görev yaptığını ileri sürmüşlerdir. Proenflamatuar sitokinler olan Tümör Nekroz Faktör-alfa (TNF-α) ve İnterlökin-1-beta (IL-1β)'nın ADM ile mezangiyal hücrelerde etkileşime girdiği böylece lokal hücrelerden ve makrofajlardan serbest radikal oluşumunu azalttığı gösterilmiştir (105).

Renin salınımı üzerine etkileri

Hayvan deneylerinde intravenöz ADM uygulanması ortalama arteriyel kan basıncında azalma ile sonuçlanmakta ve plazma renin aktivitesi artmaktadır. Jukstaglomerüler hücreler üzerinde ADM'in renin sekresyonu ve renin gen ekspresyonuna etkileri araştırılmıştır. İzole edilmiş perfüze rat böbreğinde renin salınımı ADM ile doza bağımlı olarak artmıştır. ADM renin sekresyonunun ve renin gen ekspresyonunun otokrin ve/veya parakrin uyarıcı faktörü olarak görev yapmaktadır (106). Öte yandan ADM'in sürekli infüzyonunun hipotansif etkileriyle birlikte plazma renin aktivitesini düşürdüğü şeklinde de çalışmalar vardır (107).

2.9 Vasküler Endotelyal Büyüme Faktörü

Vasküler Endotel Büyüme Faktörü (VEGF), özellikle endotel hücreleri için özgül etkilere sahip olan multifonksiyonel bir büyüme faktörü ailesidir (10). Endotel hücresinin proliferasyonuna, migrasyonuna ve differensiasyonuna sebep olur (11). VEGF, hem gelişim sırasında, hem de yetişkinde vaskülogenez ve anjiogenez için önemli ve gereklidir (13). Bu büyüme faktörü, özellikle damar oluşumunda kritik rol oynarken, endotel hücrelerinin yaptığı bir çok fonksiyonda da gerekli olduğu görülmüştür. Bunlar embriyogenez, yara iyileşmesi, tümör büyümesi, miyokardial iskemi, oküler neovasküler hastalıklar ve romatoid artrit gibi kronik inflamatuar hastalıkları da kapsayan fizyolojik ve fizyopatolojik olaylardır. Bu yüzden de son yıllarda ilgi odağı haline gelmekte ve birçok araştırmaya konu olmaktadır (108).

Üyeleri ve Yapısı

Son yıllarda VEGF üzerine yapılan çalışmalar, bu ailenin Trombosit Kaynaklı Büyüme Faktörleri (PDGF) süperailesinin önemli bir üyesi olduklarını ortaya koymuştur. Aynı zamanda VEGF ailesinin VEGF-A (Human-VEGF), VEGF-B, VEGF-C, VEGF-D, VEGF-E ve Plasenta büyüme faktörü (Placenta growth factor; PlGF) adı verilen altı üyeden meydana geldiğini göstermiştir (109,110). VEGF'ün cDNA dizileri salgı aktivitesini düzenleyen hidrofobik ve sekretuvar bir baş olan N-terminal dizilerinde şifrelenmiştir (111).

VEGF-A aynı zamanda Human-VEGF olarak bilinir. VEGF-A bazı makalelerde sadece VEGF olarak adlandırılmaktadır (109).

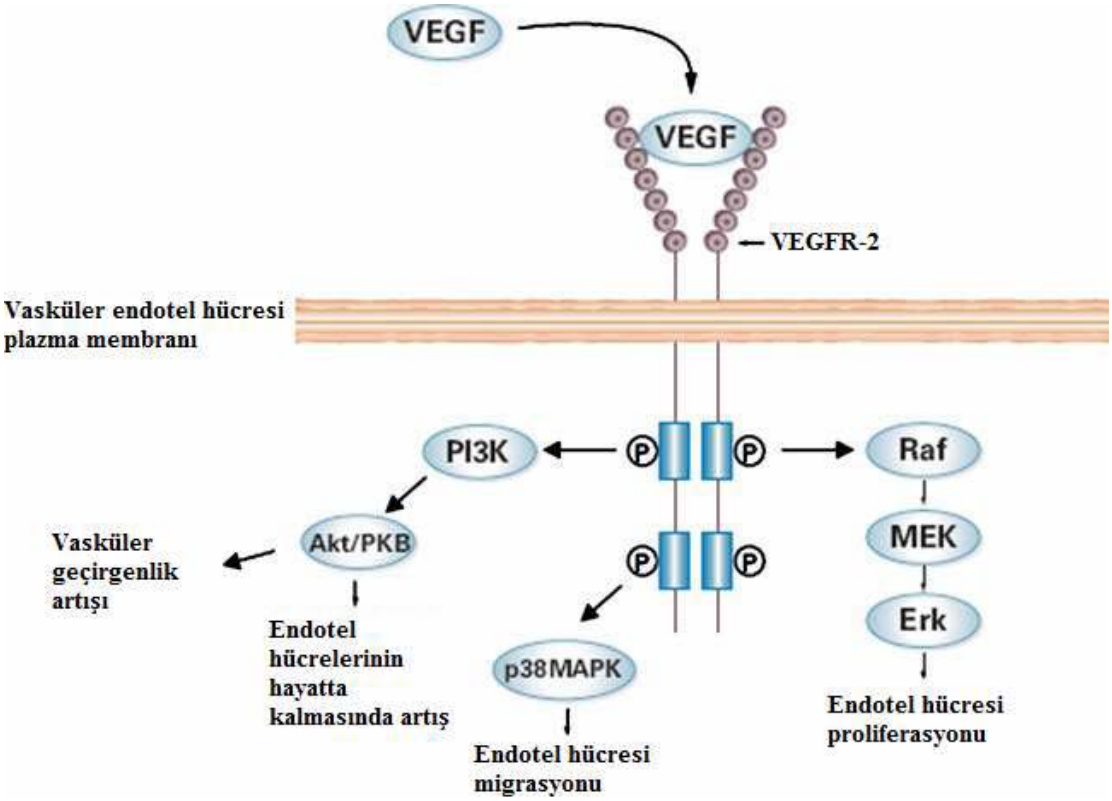
VEGF-B, vasküler endotel büyüme faktörü reseptörü-1 (VEGFR-1)'e bağlanarak monositlerin aktivasyonu ve farklılaşmalarında rol alır (112).

VEGF-C, VEGF-benzeri protein olarak da bilinir. Lenfatik damarların oluşmasında (lenfanjiogenez) rol oynamaktadır. VEGFR-2 ve VEGFR-3'e bağlanarak vasküler ve lenfatik endoteliyal hücrelerde mitojenik etki yapar (112,113). Yapılan bir deneyde, transjenik farenin derisinde VEGF-C'nin fazla salgılanmasının endotel hücre proliferasyonuna ve lenfatik damarlarda genişlemeye neden olduğu, bununla beraber vasküler doku oluşmadığı rapor edilmiştir (114). VEGF-C'nin Kaposi sarkomunda önemli oranda rol aldığı görülmüştür (115).

VEGF-D, Bu da VEGFR-2 ve VEGFR-3'e bağlanarak VEGF-C ile benzer işlevler yapar (110,112).

VEGF-E, Güçlü bir mitojen ve permeabilite arttırıcı faktördür. VEGFR-1'e bağlanmayı başaramaz ama VEGFR-2'ye seçici olarak bağlanarak etkisini gösterir (112).

PlGF, VEGF ailesinin tanımlanan ilk üyesidir. VEGF-B gibi VEGFR-1'e bağlanarak etki gösterir (112).



Şekil 3. VEGF'nin reseptör etkileşimi aracılığıyla oluşan etkileri. VEGF'nin çeşitli yolaklar üzerinden gerçekleştirdiği uyarılar ile, anjiyogenez için gerekli olan endotel hücre proliferasyonu ve migrasyonu ile birlikte yaşam oranında artış meydana gelir. (PI3K: Fosfoinozitid 3-kinaz; Akt/PKB: Protein kinaz B; p38MAPK: p38 mitojen ile aktive olan protein kinaz; MEK: mitojen ve ekstraseluler kinaz; Erk: Ekstraseluler duzenlenen kinaz)

Sentezi

Endotel hücreleri için önemli bir mitojen olan ve migrasyon etkisine sahip bu faktör, fizyolojik olarak ovulasyondan hemen önce ovaryum folliküllerinden salgılanarak yeni damarların oluşumunu arttırırken, ovulasyondan sonra bu salgılama görevini korpus luteum üstlenir. Erken implantasyon döneminde embriyo trofoblastlarınca salgılanır (116). Embriyolojik gelişimin ilk dönemlerinin sonuna doğru VEGF biraz azalırken, organogenez döneminde

oldukça yükselir. Yine VEGF yetişkinde akciğer alveolar hücrelerde, böbrek glomerüllerinde, proksimal tübüllerde, düşük seviyede de olsa karaciğer hepatositleri ve beyinde gösterilmiştir (117). Ayrıca, adrenal korteksin tüm hücrelerinde ve testiste testosteron üreten Leydig hücrelerinde VEGF yapımına ait mRNA'ların sentezlendiği gösterilmiştir. VEGF'ün demonstrasyonu için yapılan immunositokimyasal çalışmalarda aktive makrofajlarda, arteriolleri çevreleyen fibroblastlarda, akciğer bronşiyol epitelinde, koroid pleksus epitelinde ve renal glomerül visseral epitelinde varlığı gösterilmiştir (111).

VEGF mRNA'sının transkripsiyonu; trombosit kaynaklı büyüme faktörü-BB (PDGF-BB), keratinosit büyüme faktörü 7 (FGF-7), epidermal büyüme faktörü (EGF), tümör nekrosis faktör-α (TNF-α), transforming büyüme faktörü-β1 (TGF- β1) ve interlökin- β1 gibi çeşitli faktörler tarafından başlatılır. Böylece bu maddelerin mitojenik olmadığı, VEGF salgılanmasına yol açarak mitojeniteyi arttırdıkları gösterilmiştir (111).

Ayrıca protein büyüme faktörlerinin haricinde, forbol esterleri ve prostaglandin E_2 (PGE_2) gibi bazı küçük mediatörlerin de VEGF ekspresyonunu düzenledikleri görülmüştür (118). Hipoksi, belki de VEGF ve reseptörlerinin yapımını indükleyerek anjiyogenezi başlatan en etkili stimuluslardan biridir. Buna örnek olarak büyüyen tümörlerin hipoksik merkezleri oluşması ve bunu engellemek için tümör hücrelerinden VEGF ekspresyonu ve yeni damar yapımı gösterilebilir. Yine tıkanmış kalp damarlarına bağlı gelişen hipoksi sonrasında da VEGF ekspresyonu artmaktadır. Hipoksinin VEGF'ü arttırma mekanizmasının sadece bir kısmı çözülebilmiştir. VEGF yapımı hipoksi tarafından tetiklenirken,

CO tarafından da inhibe edilmektedir (11,13). Hipoksinin yanında azalan pH ve sitokinler ile de VEGF ekspresyonu artmaktadır (11).

3. GEREÇ VE YÖNTEM

Bu çalışma Gazi Üniversitesi Deneysel Araştırma Merkezi (GÜDAM) Laboratuarı'ndan temin edilen, her iki cinsten ve ortalama ağırlıkları 200-250 gr olan 36 adet Wistar-Albino cinsi rat kullanıldı. Ratlar rastgele ve eşit sayıda (n = 6) olarak altı gruba ayrıldı.

3.1 Aortik Oklüzyon ve İskemi Reperfüzyon Modeli

Deney başlangıcında; intramusküler enjeksiyonla, 50 mg/kg dozda ketamine hydrocholoride (Ketalar® flakon, Parke-Davis, USA) ve 10 mg/kg'dan xylazine hydrochloride (Alfazyne, %2, Ege Vet) verilerek anestezi sağlandı. İşlem, bir ısıtma lambası altında, ratlar supin pozisyonda iken gerçekleştirildi. Ciltleri aseptik olarak hazırlanan ratlara orta hat laparotomi yapıldı. Barsakların ıslak gazlı bez yardımıyla uzaklaştırılması ardından, infrarenal abdominal aorta eksplore edildi. Abdominal aortaya (AA), atravmatik bir mikrovasküler klemp konuldu. 120 dakika sonra AA'daki mikrovasküler klemp kaldırıldı ve 120 dakika süreyle reperfüzyon sağlandı. Aortik iskemi; klempleme işlemi sırasında distal aortada pulsasyonun kaybolmasıyla, aortik reperfüzyon ise; klempin kaldırılması sonrası distal aortada pulsasyonun geri gelmesiyle onaylandı. Kontrol grubunu oluşturacak ratlarda laporotomi ve abdominal aort diseksiyonu eşit sürede (240 dakika) uygulandı ancak bu grupta I-R oluşturulmadı. I-R dönemlerinde peritoneal boşluktan ısı ve sıvı kaybını en az miktara indirmek için; AA'ya klemp konulması ve kaldırılması sonrası dönemlerinde, peritoneal boşluğa serum

fizyolojik uygulanıp, batın insizyonu geçici olarak ıslak gazlı bez ile sarılarak kapatıldı. Sonrasında sağ gastroknemius kas doku örneği alındı. Doku alınan ratlar dekapitasyon yöntemiyle sakrifiye edildi. Kas doku örnekleri; immunohistokimyasal değerlendirme yapılıncaya kadar %10'luk formaldehid solüsyonu içinde saklandı. Biyokimyasal değerlendirme yapmak için ise -70 derecede saklandı.

3.2 Deney Grupları

Sham grubu (Gr S, n=6): Bu gruptaki ratlara alt ekstremite iskelet kası iskemisi yapılmaksızın sadece laparotomi yapılıp kapatıldı, işlemden 2 saat sonra anestezi altında ratların alt ekstremite iskelet kasları, bu dokularda immünohistokimyasal ve biyokimyasal değerlendirmeler için alındı.

İskemi grubu (Gr I, n=6): Bu gruptaki ratlarda laparotomi sonrasında 120 dakika süre ile abdominal aortaya kros klemp konularak alt ekstremite iskelet kasında iskemi gerçekleştirildi. 120 dakikalık iskemiyi takiben damar klempi açılarak ve ratların karnı kapatıldı. İşlemden 2 saat sonra anestezi altında ratların alt ekstremite iskelet kasları, bu dokularda immünohistokimyasal ve biyokimyasal değerlendirmeler için alındı.

İskemi ve VEGF grubu (Gr IV, n=6): Bu gruptaki ratlarda da laparotomi sonrasında 120 dakika süre ile abdominal aortaya kros klemp konularak alt ekstremite iskelet kasında iskemi gerçekleştirildi. 120 dakikalık iskemiyi takiben

damar klempi açılarak ve hemen akabinde reperfüzyon başlangıcında 30 dakika süre ile kuyruk veninden intravenöz VEGF (0,8 μg/kg) infüzyonu yapıldı. İnfüzyon sonrasında karın kapatılmasını takiben 2. saatte anestezi altında, alt ekstremite iskelet kasları immünohistokimyasal ve biyokimyasal değerlendirmeler için alındı.

VEGF grubu (Gr V, n=6): Bu gruptaki ratlara alt ekstremite iskelet kası iskemisi yapılmaksızın 30 dakika süre ile intravenöz VEGF (0,8 μg/kg) infüzyonu yapıldı. İşlemden 2 saat sonra anestezi altında ratların alt ekstremite iskelet kasları immünohistokimyasal ve biyokimyasal değerlendirmeler için alındı.

İskemi ve Adrenomedullin Grubu (Gr IA, n=6): Bu gruptaki ratlarda da laparotomi sonrasında 120 dakika süre ile abdominal aortaya kros klemp konularak alt ekstremite iskelet kasında iskemi oluşması sağlandı. 120 dakikalık iskemiyi takiben damar klempi açılarak ve hemen akabinde reperfüzyon başlangıcında intravenöz 30 dakika süre ile ADM (12 mikrogr/kg) infüzyonu yapıldı. İnfüzyon esnasında karnı kapatılan ratlar, infüzyon bitimini takiben 2. saatte yeniden anestezi altında ratların alt ekstremite iskelet kasları, bu dokularda immünohistokimyasal ve biyokimyasal değerlendirmeler için alındı.

ADM grubu (Gr SV, n=6): Bu gruptaki ratlarda laparotomi yapılmaksızın 30 dakika süre ile ADM (12 mikrogr/kg) infüzyonu yapıldı. İnfüzyonu takiben 2. saatte anestezi altında ratların alt ekstremite iskelet kasları bu dokularda immünohistokimyasal ve biyokimyasal değerlendirmeler için alındı.

3.3 Biyokimyasal İşlemler

Ratlar'dan alınan dokular -70 derecede saklandı. Sonrasında saklanmış dokulardan IRH'nı göstergeleri olan MDA, SOD, Katalaz, NO ve HIF1 alfa değerleri biyokimya bölümü tarafından ölçüldü.

Doku Örneklerinin Homojenize Edilmesi

Doku örnekleri 1/10 oranında 50 mM Tris-HCI (pH=7.4) tamponda, buz içinde, soğukta homojenize edildi. Homojenatlar soğutmalı santrifüjde 15.000 rpm'de 15 dakika santrifüj edilip, süpernatantlardan katalaz ve SOD aktiviteleri, doku malondialdehit (MDA), NO ve HIF 1 alfa düzeyi tayini yapıldı (87).

Doku Malondialdehit Analizi

Doku MDA düzeyleri Ohkawa ve arkadaşlarının (119) yöntemine göre ölçülmüştür. Bu yöntemin ilkesi; homojenattaki proteinlerin sodyum dodesil sülfat (SDS) ile bağlanmasıyla, örnekte bulunan MDA'nın tiobarbitürik asit (TBA) ile ortam pH'sı 3,5 olduğu şartlarda oluşturduğu komplekse bağlı kırmızı rengin spektrofotometrik ölçümüne dayanır.

Kullanılan Reaktifler:

% 8,1 Sodyum Dodesil Sülfat (SDS) : Distile su içinde hazırlanmıştır

% 0.8 Tiobarbitürik asit (TBA) : Distile su içinde hazırlanmıştır

% 20 Asetik asit : Distile su içinde hazırlanmıştır (NaOH ile pH=3,5'a ayarlanmıştır) .

n-butanol/ piridin : (15:1 ,v/v)

Sonuçlar ‘nmol/g yaş doku’ cinsinden belirlenmiştir.

Süperoksit Dismutaz

SOD, süperoksit anyonunu hidrojen peroksit ve moleküler oksijene çeviren bir metalloenzimdir.

$$O2^{-} + O2^{-} \xrightarrow{SOD} H_2O_2 + O_2$$

Bu reaksiyon, süperoksit zincirleme radikal reaksiyonlarının güçlü bir başlatıcısı olduğundan oksidatif strese karşı ilk savunma olarak değerlendirilir.

Memelilerde üç çeşit SOD bulunmaktadır (120):

1) *Sitozolik SOD (Cu-ZnSOD, SOD1)*: Genellikle sitozolde ve lizozomal fraksiyonlarda yer alır, fakat mitokondriyal boşlukta da bulunmaktadır. İki alt birimden oluşmaktadır. Kofaktörleri çinko ve bakırdır. Enzimin aktivitesinden bakır, stabilitesinden çinko sorumludur.

2) *Mitokondrial SOD (Mn-SOD, SOD2)*: Mitokondride bulunur ve tetramerik yapıdadır. Kofaktörü mangandır.

3) *Ekstrasellüler SOD (EC-SOD, SOD3)*: Tetramerik yapıdadır ve ekstrasellüler bölümlere salgılanır. Kofaktörleri çinko ve bakırdır. Ayrıca bazı bakterilerde Fe-SOD da saptanmıştır (121).

Katalaz (CAT EC 1.11.1.6)

Peroksizomlarda lokalize, dört tane hem grubu bulunan hemoproteindir. Karaciğer, böbrek ve eritrositlerde aktivitesi yüksektir. H_2O_2 'i oksijen ve suya parçalar (122).

Katalaz

$$2\ H_2O_2 \longrightarrow 2\ H_2O + O_2$$

Aynı zamanda fenol ve alkollerin de detoksifikasyonunu sağlayan katalaz; hidrojen peroksitin fenton reaksiyonları ile demir ve bakır iyonları tarafından reaktif hidroksil radikaline dönüşümünü engeller (123).

Nitrik Oksit

Memeli hücrelerinde NO başlıca Nitrik Oksit Sentaz (NOS)'ın aktivitesi sonucu sentezlenir. NOS, oksijeni kullanarak L-arjinin amino asitinden; sitrülin ve NO'yu oluşturur. Bu olay, nikotinamid adenin dinükleotid fosfat (NADPH), flavin mononükleotid (FMN), flavin adenin dinükleotid (FAD), tetrahidrobiopterin (BH_4) ve kofaktör olarak bir tiyol donörüne ihtiyaç duyar (124).

$$\text{Arginin} + O_2 + \text{NADPH} + H^+ \longrightarrow \text{Sitrülin} + NO^{\bullet} + \text{NADP} + H_2O$$

Eşleşmemiş elektronu nedeniyle bir serbest radikal türü olarak bazı memeli hücre tiplerince üretilen NO; damar tonusunun kontrolünde, platelet agregasyonunda, lökosit adezyonunda, hücre aracılı immün sitotoksisitesinde, sinaptik geçirgenlikte sinyal molekülü olarak önem taşımaktadır (125).

Hypoxia inducable factor 1 alfa (HIF-1α)

HIF-1, basit bir heliks-halka-heliks per-ARNT-sim (PAS) protein olup, HIF-1 alfa ve HIF-1 beta alt ünitelerinden oluşur. Hipoksi durumunda, HIF-1 protein seviyesi hızlı şekilde artarken, doku iskemisi ortadan kaldırıldığında, hücreler tarafından sentezi baskılanır. Dolayısıyla hipokside, hücre çekirdeği HIF-1 alfa proteini birikerek HIF-1 beta protein ile dimerleşir ve çekirdek deoksiribonükleik asit (DNA) 5I-CGTG-3I sırasına bağlanarak VEGF transkripsiyonunu aktive eder (22).

Dokuda MDA, SOD, Katalaz, NO ve HIF 1 alfa düzeylerinin belirlenmesi

Doku MDA düzeyleri Ohkawa ve arkadaşlarının (119) yöntemi ile,

Doku SOD aktiviteleri Cayman Superoxide Dismutase Assay Kit (Catalog No: 706002) ile,

Doku Katalaz aktiviteleri Cayman Catalase Assay Kit (Catalog No: 707002) ile,

Doku NO düzeyleri Cayman Nitrate/Nitrite Colorimetric Assay Kit (Catalog No: 780001) ile,

HIF 1 alfa düzeyleri ise Uscn life marka elisa kiti (Catalog No: E90798Ra) ile ölçülmüştür.

3.4 Alt ekstremite İskelet Kası Doku Örneklerinin Histopatolojik Olarak Değerlendirmesi:

Işık Mikroskobik Takip Yöntemi

Işık mikroskobik inceleme için 1 cm^3 büyüklüğünde kesilen doku örnekleri %10 luk nötral formaldehitte 72 saat tespit edildi. Daha sonra aşağıda belirtilen alışıla gelmiş takip yöntemlerden geçirilerek parafine gömüldüler.

1- 24 saat akarsuda yıkama	12 saat
2- % 70 etil alkol	20 dk
3- % 80 etil alkol	20 dk
4- % 96 etil alkol	20 dk
5- Aseton I	20 dk
6- Aseton II	20 dk
7- Aseton III	20 dk
8- Aseton IV	20 dk
9- Ksilol I	30 dk

10- Ksilol II 30 dk

11- 60°C'lik etüvde erimiş parafin I 1 saat

12- Parafin II 1 saat

13- Parafin içinde bloklama

14- 4µm kalınlığında kesit alma

15- Hematoksilen & eozin (H&E) ile boyama

TUNEL Yöntemi

DNA fragmantasyonu ile gelişen apoptozisi saptamak için TUNEL yöntemi uygulandı. Kesitler 37^{o} C'deki etüvde bir gece tutuldu daha sonra deparafinizasyonu kolaylaştırmak için etüv ısısı 57^{o} C'ye çıkarılarak bu ısıda 1 saat, son olarakta 61 ^{o}C' de 20 dakika bekletildi. Camlar deparafinizasyonu tamamlamak için 3 kez 20'şer dakika ksilol'e etkin bırakıldı. Daha sonra 10'ar dakika sırasıyla %100, %96, %90, % 80 ve %70'lik alkol serilerinden geçirildi. Kesitler alkolden arındırılmak için iki kez 5'er dakika distile sudan geçirildi.

Sudan çıktıktan sonra etrafı PAP-pen ile çevrelenen dokular, 25 dakika boyunca 37 ˚C'de 20 µg/ml proteinaz K(REF: 03115836001, Lot: 11403400, Roche Diagnostics, GmbH) ile inkübe edildi. Daha sonra dokular 3 kez 3'er dakika PBS ile yıkandı. PBS ile yıkama aşamasından sonra 15 dakika %3'lük hidrojen peroksit (Cat: AP- 9003- 500, Lot: 9003LT13610, Lab Vision, Fremont, USA) ile etkin bırakılan dokularda endojen peroksidaz aktivitesi bloke edildi. PBS ile yıkanan kesitler 60 dakika 37 ˚C nemli ve karanlık ortamda TUNEL kiti

(450 µL Label solüsyon, 50 µL Enzim solüsyon) (Roche, In Suti Cell Death Detection Kit, AP Cat: 116489910) ile inkübe edildi. Kalan 100 µL Label solüsyonu negatif kontroller için kullanıldı. Daha sonra dokular 3 kez 3'er dakika PBS ile yıkandı. Ardından dokular converter-POD (Cat: 11684817910, Roche Diagnostics, İndianapolis, IN, USA, 001) solüsyonu ile nemli ortamda, 37 derecede 30 dakika inkübe edildi. Tekrar dokular 3 kez 3'er dakika PBS ile yıkandı. Yıkamanın ardından TUNEL pozitif hücreleri belirleyebilmek için DAB ile boyama yapıldı. Zemin boyası olarak Mayer'in hematoksileni kullanıldı.

Boyanan camlar azalan alkol serilerinden geçirildi. Son olarak da 20 dakika ksilolde bekletildikten sonra entallan ile lamelle kapatıldılar. Kesitler Leica DM 4000 (Germany) bilgisayar destekli görüntüleme sisteminde, Leica Q Vin 3 programında değerlendirildi.

Histopatolojik olarak incelemeler değerlendirildiğinde iskemik olan dokularda;

-Nekroz kasın central bölgesinde perifere göre daha büyük olması (+)

-Kapiller lümenine doğru hücre membranının parmaksı çıkıntıları (-)

-Endotelial hücre ödemi (-)

-Kapiller lümeninde kırmızı kan hücreleri (+)

-Kas fibrillerinde küçülme (+)

-Fibrillerin yuvarlaklaşması yada ovalleşmesi (+)

-Çekirdekler merkezde lokalize olması (+)

-Kas lifleri içine infiltre olan inflamatuar hücreler (+)

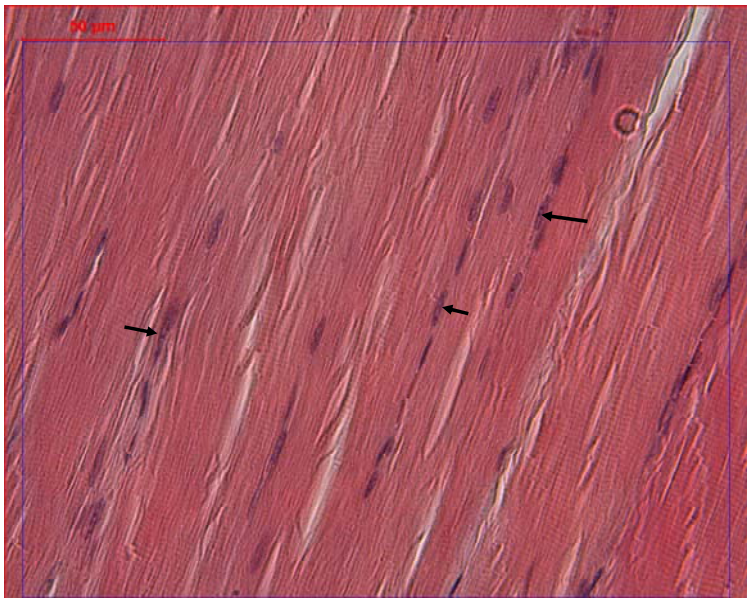
TUNEL Sham	Sham 1	Sham 2	Sham 3	Sham 4	Sham 5	Sham 6
	2	1	1	3	0	1
	0	1	2	1	1	4
	1	2	2	1	2	1
	3	4	1	2	4	3
	0	0	1	1	2	2
	4	1	2	2	2	1
TUNEL IR	IR 1	IR 2	IR 3	IR 4	IR 5	IR 6
	19	21	29	21	34	32
	14	20	24	19	29	24
	22	19	31	23	23	27
	24	23	22	17	32	31
	18	17	28	21	26	25
	16	22	24	23	20	24
TUNEL VEGF	VEGF 1	VEGF 2	VEGF 3	VEGF 4	VEGF 5	VEGF 6
	4	1	2	3	2	2
	4	3	1	2	3	1
	2	2	1	4	3	3
	2	4	0	2	1	3
	1	1	2	2	2	2
	3	1	1	2	2	1

TUNEL IR+VEGF	IR+VEGF 1	IR+VEGF 2	IR+VEGF 3	IR+VEGF 4	IR+VEGF 5	IR+VEGF 6
	12	8	14	11	13	8
	9	11	12	10	14	12
	11	13	12	11	11	14
	11	9	9	9	10	12
	14	9	13	11	10	12
	10	11	12	13	11	9
TUNEL ADM	ADM 1	ADM 2	ADM 3	ADM 4	ADM 5	ADM 6
	0	1	1	1	4	3
	2	3	1	2	2	2
	2	0	3	1	2	1
	1	0	1	1	1	1
	0	1	1	1	3	2
	1	2	2	1	2	1
TUNEL IR+ADM	IR+ADM 1	IR+ADM 2	IR+ADM 3	IR+ADM 4	IR+ADM 5	IR+ADM 6
	9	9	5	8	11	10
	9	12	9	3	8	6
	6	6	7	8	8	8
	10	6	5	8	9	8
	6	8	8	6	8	6
	7	4	8	9	9	7

Tablo 1: Gruplarda sayılan Tunel (+) hücre sayıları

3.5 Histolojik Kesitler

1.Sham

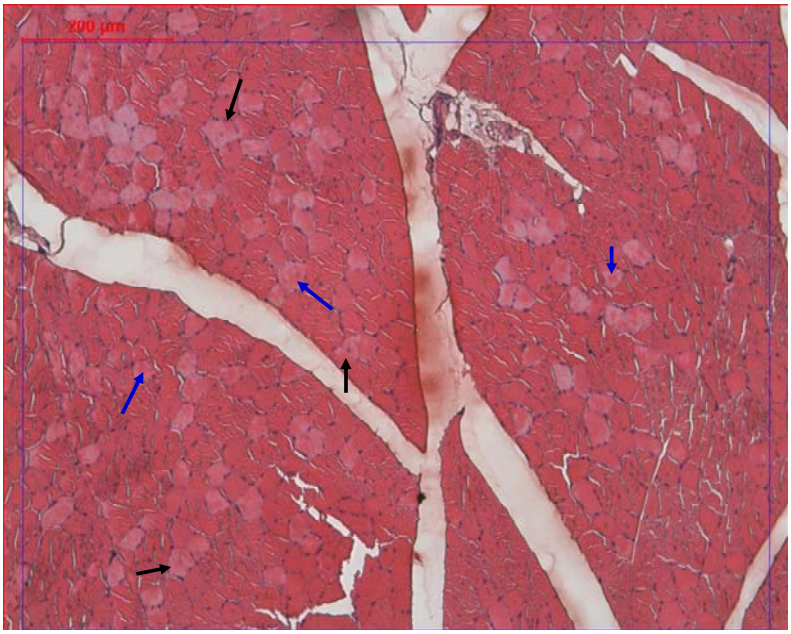


Sham grubunda normal görünümde kas fibrilleri ve periferik yerleşimli sıralı nukleuslar (oklar), Longitudinal kesit. H&E

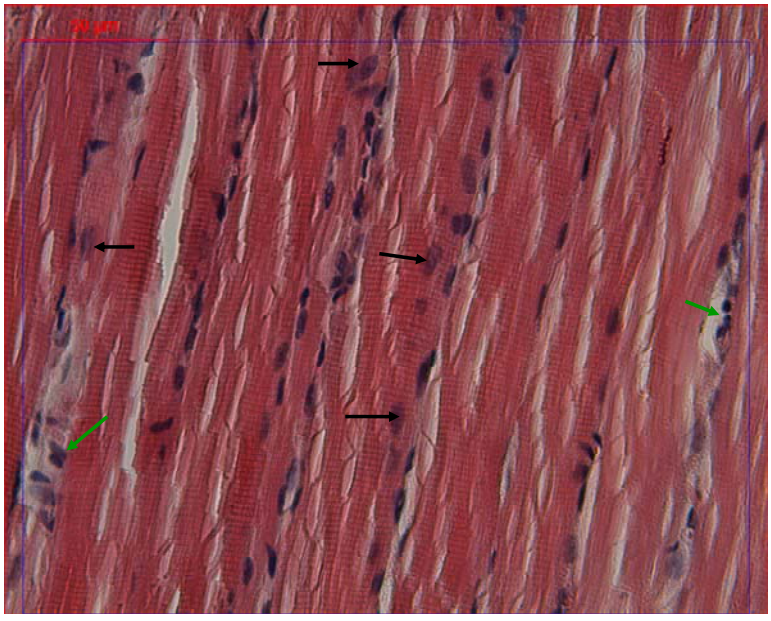


Sham Grubunda TUNEL boyaması: Normal görünümde kas fibrilleri periferik yerleşimli, sıralı TUNEL (-) nukleuslar (oklar). Longitudinal kesit. TUNEL

2. İskemi Reperfüzyon



IR grubunda: Merkeze göç etmiş nukleusları (oklar) ile ve miyofibriler kayıp nedeniyle merkezi korlu (mavi oklar) atrofik kas fibrilleri. Enine kesit H&E

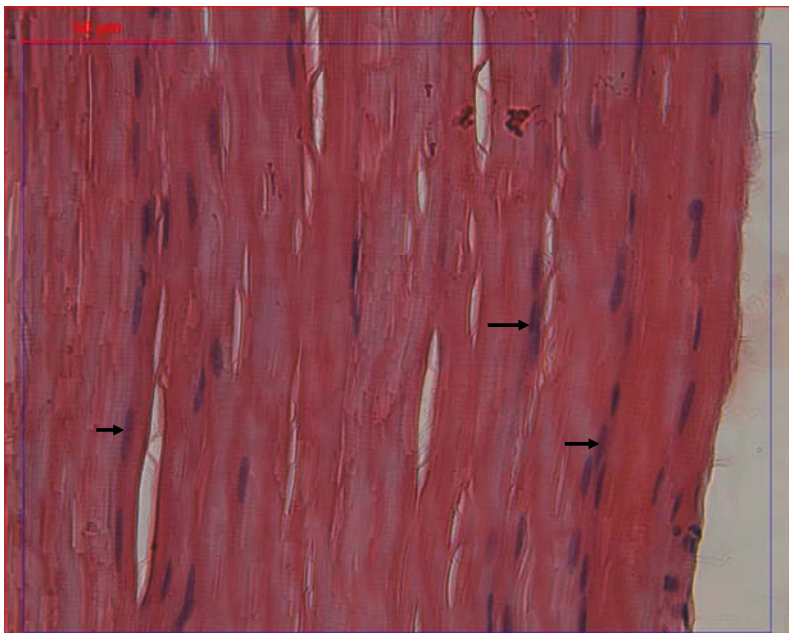


IR Grubunda: Merkeze göç eden nukleuslar (oklar), yaygın perikapiller inflamatuar hücre infiltrasyonu (yeşil oklar) Longitudinal kesit H&E.



IR Grubunda; TUNEL (+) DNA fragmantasonu gösteren kas hücre nukleusları (oklar). Longitudinal kesit, TUNEL

3. VEGF

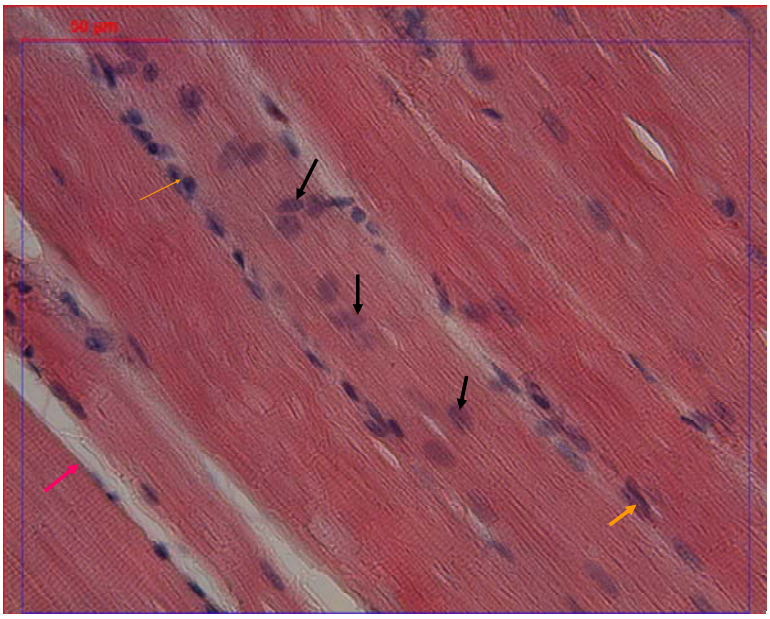


VEGF Grubu histolojik olarak Sham grubuna benzer özellik göstermekte. Priferik yerleşimli, sıralı kas hücre çekirdekleri (oklar). Longitudinal kesit, H&E.



VEGF Grubu: Periferik yerleşimli TUNEL (-) kas hücre çekirdekleri (oklar) . Longitudinal kesit. TUNEL

4. IR + VEGF

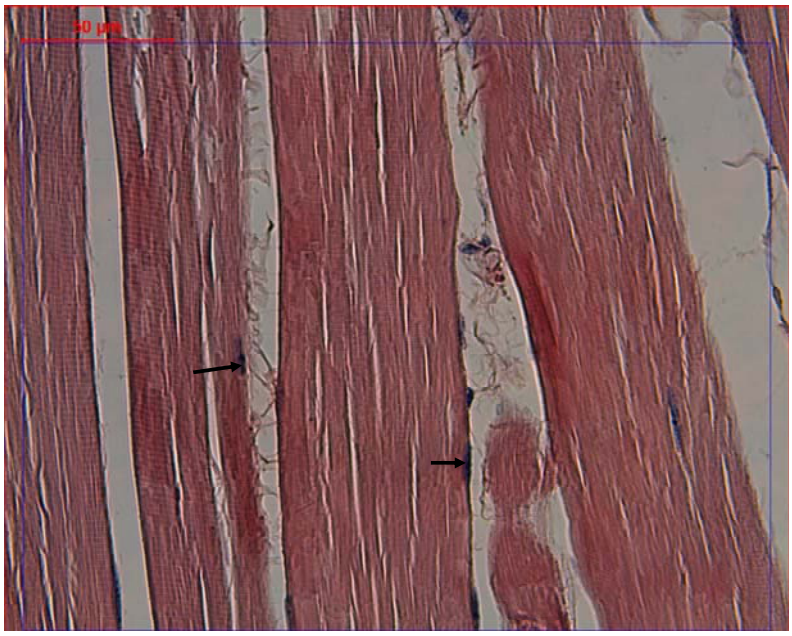


IR+VEGF Grubunda; Az sayıda merkezi yerleşimli (siyah oklar), genellikle periferik yerleşimli, sıralı nukleuslar (sarı oklar) , perivasküler inflamatuar hücre infiltrasyonu gözlenmiyor (pembe ok). Longitudinal kesit H&E.

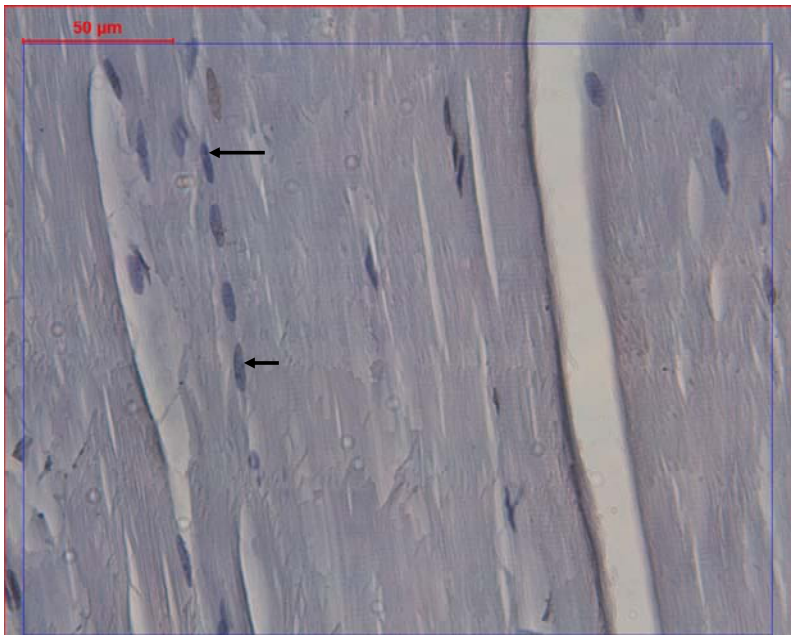


IR+VEGF Grubunda; İskemi grubuna göre daha az sayıda TUNEL (+) kas hücre çekirdekleri (oklar) Longitudinal kesit. TUNEL

5. Adrenomedullin

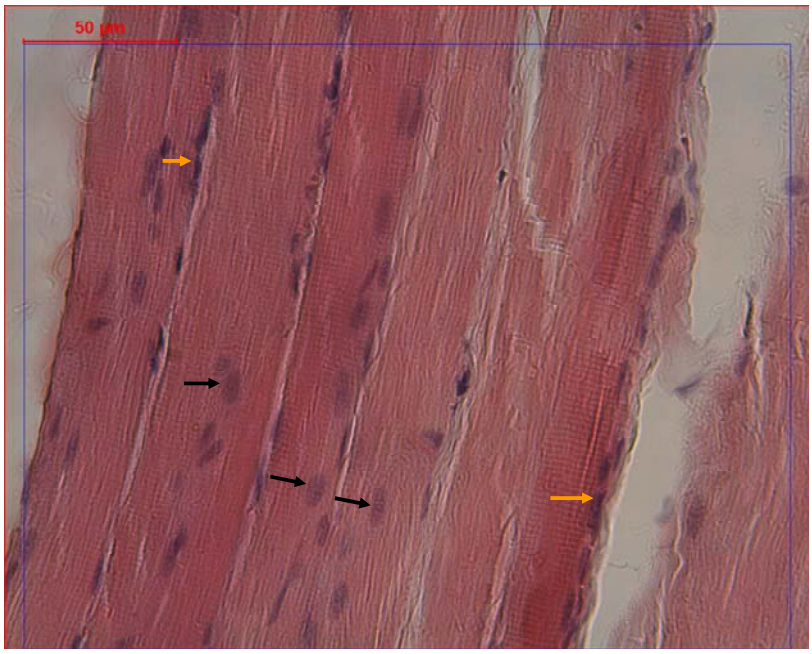


ADM Grubu bulguları histolojik olarak Sham ve VEGF grubu bulgularına benzerlik göstermekteydi. Periferik yerleşimli, sıralı kas hücre çekirdekleri (oklar). Longitudinal kesit, H&E.

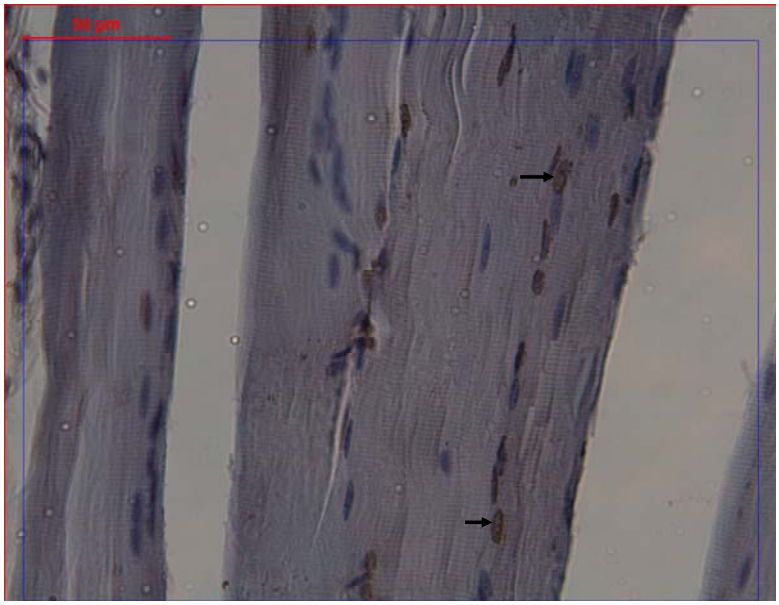


ADM Grubunda: Periferik yerleşimli TUNEL (-) kas hücre çekirdekleri (oklar) . Longitudinal kesit. TUNEL

6. IR + Adrenomedullin



IR+ADM Grubunda; Az sayıda merkezi yerleşimli (sarı oklar), genellikle periferik yerleşimli, sıralı (siyah oklar) nukleuslar, Longitudinal kesit H&E.



IR+ADM Grubunda; az sayıda periferik yerleşimli TUNEL (+) kas hücre nukleusları (oklar). Longitudinal kesit. TUNEL

4. İSTATİSTİK

İstatistik değerlendirme SPSS 12.0 bilgisayar proğramında aşağıda sıralanan testler kullanılarak gerçekleştirildi. İstatistiksel analiz verileri [Ortalama ± standart sapma , (En az - En çok)] olarak sunuldu. Yapılan tüm istatistiksel analizlerde anlamlılık sınırı olarak $p<0.05$ değeri anlamlı kabul edildi.

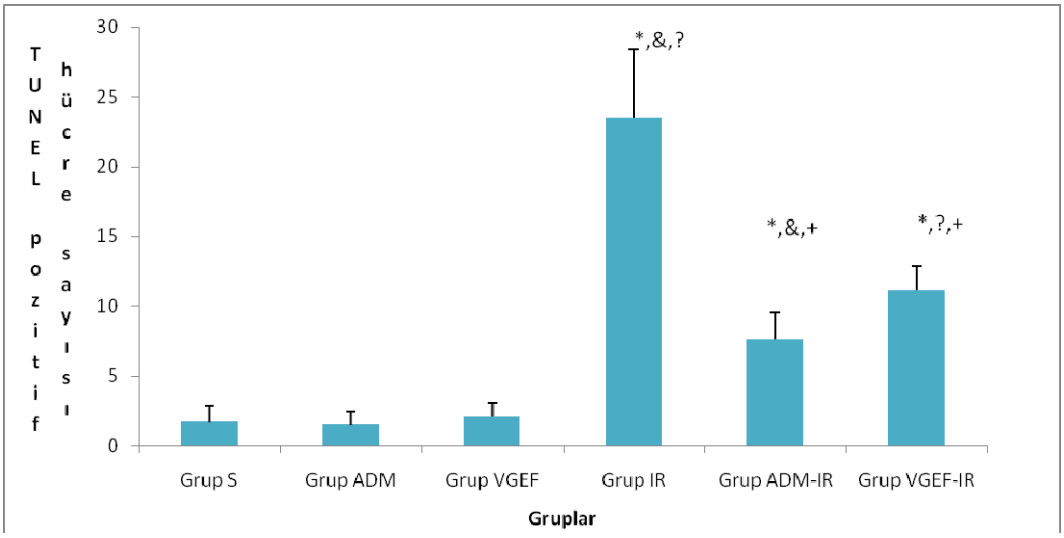
Ölçülebilen parametrelere Kolmogorov-Smirnov testi uygulanarak dağılımın normal ya da anormal olup olmadığı belirlendi. Normal dağılım gösterenler için gruplar arasında fark olup olmadığını belirlemede bağımsız gruplarda Kruskal-Wallis testi ile değerlendirildi. Farklılık olması durumunda gruplar arası Mann-Whitney U testi ile karşılaştırılma yapıldı.

4.1. Histopatoloji Bulgularına Göre

TUNEL

Grup	Ortalama	Standart Sapma	Minimum	Maksimum	Varyans
Sham	1,6944	1,14191	0,00	4,00	1,304
IR	23,4444	4,90740	14,00	34,00	24,083
VEGF	2,0833	1,02470	0,00	4,00	1,050
IR+VEGF	11,1389	1,72631	8,00	14,00	2,980
ADM	1,4722	0,94070	0,00	4,00	0,885
IR+ADM	7,6111	1,88646	3,00	12,00	3,559

Tablo 2: Sıçanların iskelet kas dokusunda TUNEL (+) hücre verileri



Grafik 1: Gruplardaki sıçanların TUNEL pozitif hücre sayısı verileri (uM) [Ort ± SS]

- Her denekten 6 preparattan 6 kesitte 100 hücreden pozitif olan hücreler sayıldı ve ortalamaları belirlendi.
- TUNEL pozitif hücre ortalamaları; sham grubunda 1,69 ± 1,14; IR grubunda 23,44 ± 4,90; VEGF grubunda 2,08 ± 1,02; IR+VEGF grubunda 11,13 ± 1,72; ADM grubunda 1,47 ± 0,94; IR+ADM grubunda ise 7,61 ± 1,88 olarak saptandı.
- Kruskal Wallis testine göre 4 grup arasında fark anlamlı olarak bulundu (p=0,000). Grupların ikili karşılaştırılması Mann Whitney U testi ile yapıldı. P değeri 0,05'ten küçük olanlar anlamlı kabul edildi.
- SHAM grubu ile IR grubu karşılaştırıldığında; **p=0,000 (anlamlı)**
- Sham grubu ile VEGF grubu karşılaştırıldığında; p=0,094 (anlamlı değil)

- Sham grubu ile IR+VEGF grubu karşılaştırıldığında; **p=0,000 (anlamlı)**
- Sham grubu ile ADM grubu karşılaştırıldığında; p=0,460 (anlamlı değil)
- Sham grubu ile IR+ADM grubu karşılaştırıldığında; **p=0,000 (anlamlı)**
- IR grubu ile VEGF grubu karşılaştırıldığında; **p=0,000 (anlamlı)**
- IR grubu ile IR+VEGF grubu karşılaştırıldığında; **p=0,000 (anlamlı)**
- IR grubu ile ADM grubu karşılaştırıldığında; **p=0,000 (anlamlı)**
- IR grubu ile IR+ADM grubu karşılaştırıldığında; **p=0,000 (anlamlı)**
- VEGF grubu ile IR+VEGF grubu karşılaştırıldığında; **p=0,000 (anlamlı)**
- VEGF grubu ile ADM grubu karşılaştırıldığında; **p=0,011 (anlamlı)**
- VEGF grubu ile IR+ADM grubu karşılaştırıldığında**; p=0,000 (anlamlı)**
- IR+VEGF grubu ile ADM grubu karşılaştırıldığında; **p=0,000 (anlamlı)**
- IR+VEGF grubu ile IR+ADM grubu karşılaştırıldığında; **p=0,000 (anlamlı)**
- ADM grubu ile IR+ADM grubu karşılaştırıldığında; **p=0,000 (anlamlı)**

4.2. Biyokimyasal Sonuçlara Göre

	Grup S (n=6)	Grup AD (n=6)	Grup VGEF (n=6)	Grup IR (n=6)	Grup AD-IR (n=6)	Grup VGEF-IR (n=6)	P**
MDA (nmol/gr doku)	85.17±9.02 (70-93)	95.40±9.86 (83-107)	104.80±4.09 (102-111)	125.00±17.51*,&,? (111-153)	102.20±9.26+ (88-111)	106.60±7.44+ (97-116)	0.001
CAT (umol/dk/mL)	0.99±0.37 (0.70-1.47)	0.99±0.34 (0.49-1.42)	1.15±0.55 (0.61-2.13)	1.73±0.39 (1.44-2.36)	0.89±0.38 (0.42-1.48)	1.32±0.17 (1.08-1.50)	0.051
SOD (U/mL)	199.94±20.85 (165.16-219.35)	204.51±16.52 (188.10-224.53)	210.75±20.15 (190.08-238.43)	243.68±13.04*,&,? (224.53-257.17)	207.04±15.20+ (192.09-232.70)	229.03±25.25 (196.23-257.17)	0.037
NO (uM)	76.83±28.85 (38-106)	92.50±32.90 (60-139)	131.80±28.41 (96-172)	224.33±37.89*,&,? (162-281)	79.50±21.91+ (50-106)	52.83±15.26 ?,+ (41-81)	<0.0001
HIF 1 alfa (ng/mL)	0.49±0.12 (0.34-0.62)	0.88±0.35 (0.44-1.19)	0.64±0.30 (0.24-1.09)	4.09±2.60*,&,? (2.18-8.08)	1.03±0.46+ (0.52-1.63)	2.35±0.87*,? (1.05-2.85)	0.001

Tablo 3. Sıçanların iskelet kas dokusunda oksidan durum parametreleri [Ort ± SS (En az-En çok)]

P**: Kruskal Wallis testi ile anlamlılık düzeyi $p < 0.05$

*$p<0.05$: Grup S ile karşılaştırıldığında; &$p<0.05$: Grup ADM ile karşılaştırıldığında; ? $p<0.05$: Grup VGEF ile ile karşılaştırıldığında; + $p<0.05$: Grup IR ile karşılaştırıldığında.

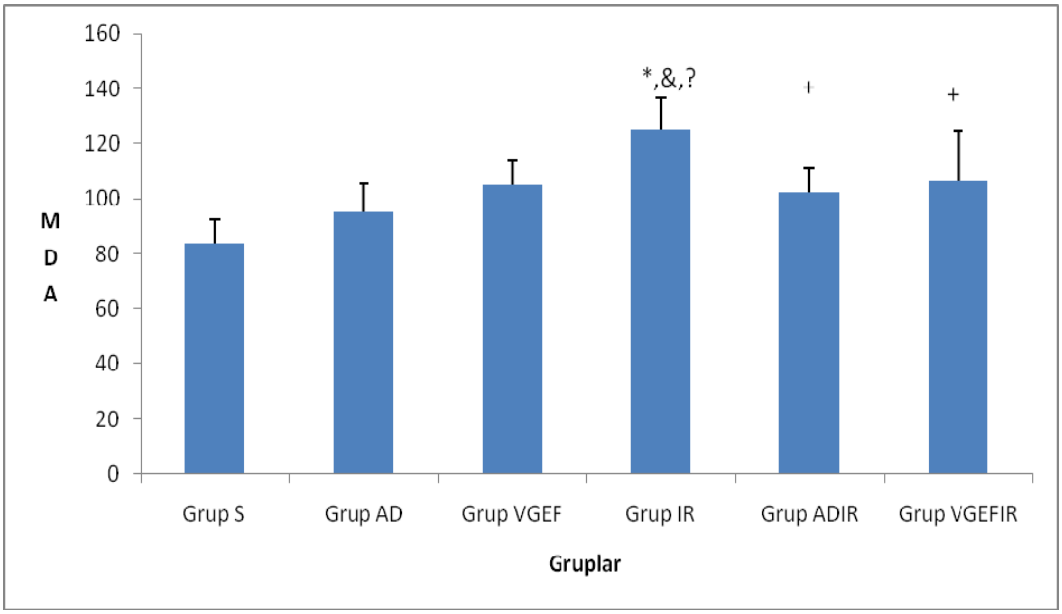
Gruplar iskelet kas dokusu MDA enzim aktivitesi açısından kendi aralarında kıyaslandığında, gruplar arasında anlamlı fark vardı (p=0.001). MDA enzim aktivitesi IR grubunda S, ADM ve VGEF gruplarına göre anlamlı yüksek olarak bulundu (p=0.004, p=0.008, p=0.014, sırasıyla). Ayrıca, ADM+IR ve VGEF+IR gruplarında MDA enzim aktivitesi IR grubuna göre anlamlı düşük olarak tespit edildi (p=0.016, p=0.046, sırasıyla) (Tablo 3, Grafik 2).

Gruplar iskelet kas dokusu SOD enzim aktivitesi açısından kendi aralarında kıyaslandığında, gruplar arasında anlamlı fark vardı (p=0.037). SOD enzim aktivitesi IR grubunda S, AD ve VGEF gruplarına göre anlamlı yüksek olarak tespit edildi (p=0.008 p=0.012, p=0.032, sırasıyla). Ayrıca, ADM+IR grubunda SOD enzim aktivitesi IR grubuna göre anlamlı düşük olarak tespit edildi (p=0.016) (Tablo 3, Grafik 3).

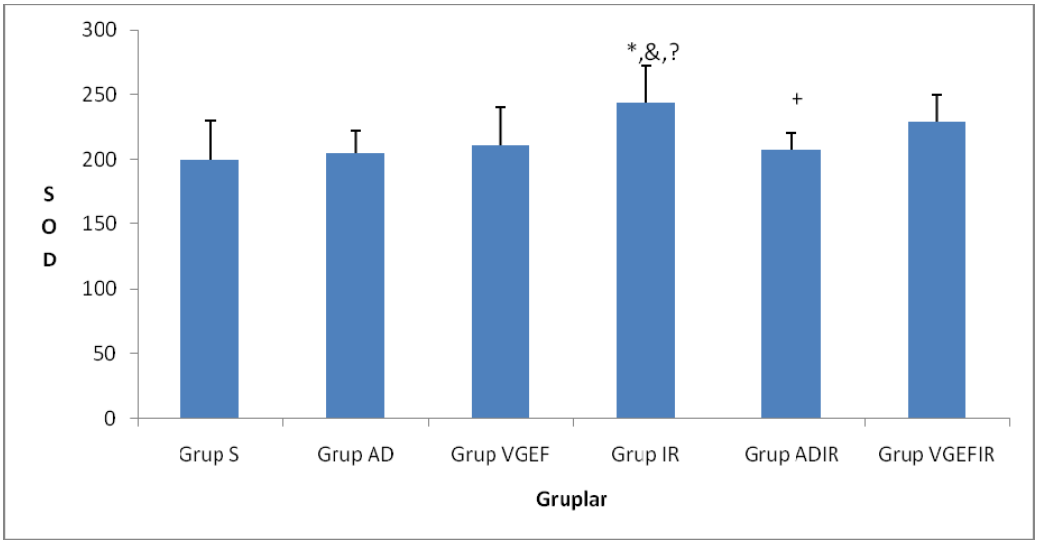
Sıçanlara ait gruplar iskelet kas dokusu CAT enzim aktivitesi açısından kendi aralarında kıyaslandığında gruplar arasında fark bulunmadı (p=0.051)), (Tablo 3, Grafik 4).

Gruplar iskelet kas dokusu NO düzeyi açısından kendi aralarında kıyaslandığında, gruplar arasında anlamlı fark vardı (p<0.0001). NO düzeyi IR grubunda S, AD ve VGEF gruplarına göre anlamlı yüksek olarak bulundu (p=0.002, p=0.04, p=0.011, sırasıyla). Ayrıca, ADM+IR ve VGEF+IR gruplarında NO düzeyi IR grubuna göre anlamlı düşük olarak tespit edildi (p=0.004, p=0.002, sırasıyla). Bunlara ek olarak VGEF+IR grubunda NO düzeyi, VGEF grubuna göre anlamlı artmış bulundu (p=0.006) (Tablo 3, Grafik 5).

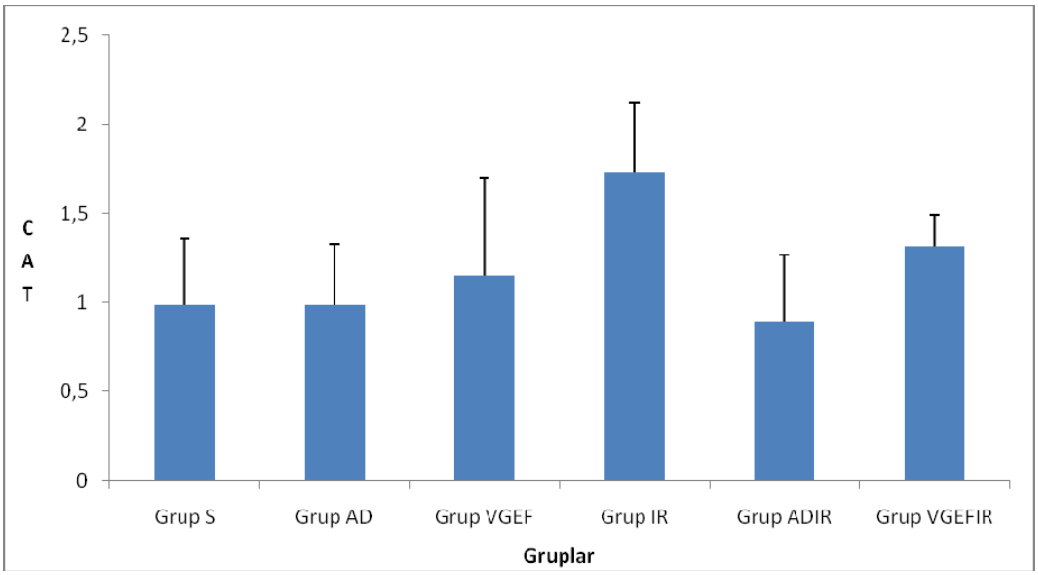
Gruplar iskelet kas dokusu HIF 1 alfa düzeyi açısından kendi aralarında kıyaslandığında, gruplar arasında anlamlı fark vardı (p=0.001). HIF 1 alfa düzeyii IR grubunda S, AD ve VGEF gruplarına göre anlamlı yüksek olarak tespit edildi (p=0.010, p=0.004, p=0.004,sırasıyla). Ayrıca, ADM+IR grubunda HIF 1 alfa düzeyi IR grubuna göre anlamlı düşük olarak tespit edildi (p=0.004). Bunlara ek olarak VGEF+IR grubunda HIF 1 alfa düzeyi S ve VGEF gruplarına göre anlamlı artmış bulundu (p=0.019) (Tablo 3, Grafik 6).



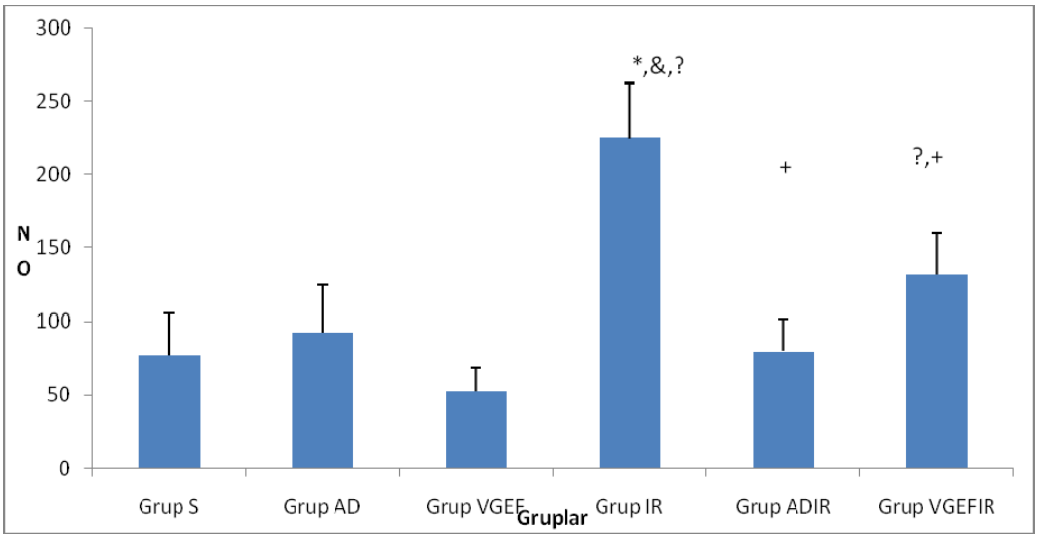
Grafik 2. Gruplardaki sıçanların MDA enzim aktivite verileri (nmol/gr doku) [Ort ± SS]



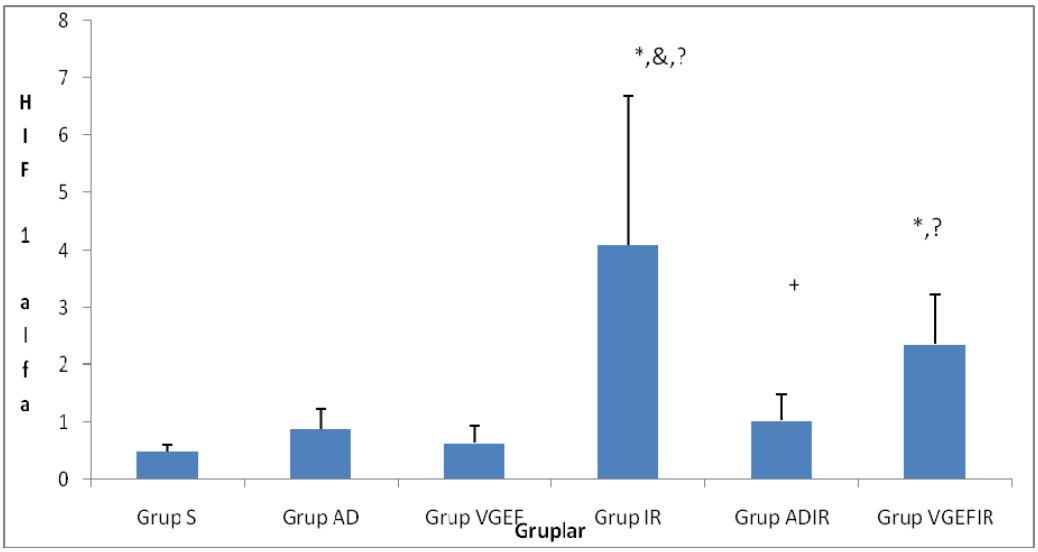
Grafik 3. Gruplardaki sıçanların SOD enzim aktivite verileri (U/mL) [Ort ± SS]



Grafik 4. Gruplardaki sıçanların CAT enzim aktivite verileri (umol/dk/mL) [Ort ± SS]



Grafik 5. Gruplardaki sıçanların NO verileri (uM) [Ort ± SS]



Grafik 6. Gruplardaki sıçanların HIF 1 alfa verileri (uM) [Ort ± SS]

5.TARTIŞMA

Çizgili kas dokusunda iskemik reperfüzyon hasarlanması, hastaların morbiditesini olumsuz yönde etkileyen klinik bir durumdur. Bundan dolayı bu olayın negatif sonuçlarını azaltmak amacıyla yeni ilaçların geliştirilmesi önem arz etmektedir. Damarı klempleme veya turnike uygulaması, bazı ameliyatlarda, ameliyat bölgesinde mümkün olduğunca kansız bir ortam sağlamak ve böylece cerrahın çalışmasını kolaylaştırmayı amaçlayan bir yöntemdir. Ancak bu yöntemin İRH'ye yol açabilme gibi bir sakıncası vardır. Bununla ilgili olarak, hem bu hasarı azaltarak hastayı koruyacak hem de klempleme süresini uzatarak cerrahın işini kolaylaştıracak ilaçların uygulanması faydalı bir yaklaşım olacaktır. Bu nedenle, bu çalışmada vaskülogenez ve anjiyogenez etkilerinin olduğu bilinen, bazı dokuların iskemik reperfüzyon hasarlanmasında antioksidan aktivitesi gösterilmiş bir ajan olan VEGF'ün ve güçlü bir vazodilatatör olduğu bilinen, bazı dokuların iskemik reperfüzyon hasarlanmasında da antioksidan aktivitesi yeni yeni gösterilmeye başlanmış bir ajan olan adrenomedullinin sıçan alt ekstremite iskelet kası İRH modelindeki olası yararlı etkilerinin araştırılması yapıldı.

Kas hücresinde İRH sonucu önce geri dönüşümlü, iskeminin ilerleyen dönemlerinde hücre ölümünün gözlendiği geri dönüşümsüz zedelenme ortaya çıkar. Hücrede geri dönüşümlü zedelenmede akut hücresel şişme, nükleer kromatin kümeleşmesi, mikrovillusların kaybı, endoplazmik retikulum (ER) ve mitokondri şişmesi (dilatasyon) gibi değişiklikler ortaya çıkar. ER'da şişme sonucu protein sentezi bozulur. Hipoksi düzelmez ise mitokondri fonksiyonlarının daha da kötüleşmesi ve membran permeabilitesinin artması daha fazla morfolojik

bozulmaya neden olur. Geri dönüşümsüz zedelenmeye, mitokondrilerin daha şiddetli şişmesi ve mitokondri matriksinde şekilsiz, kalsiyumdan zengin yoğunlukların birikimi eşlik eder. Lizozomal membranların zedelenmesi, enzimlerin sitoplazma içine sızmasına yol açar. ER'da lizis, fosfolipitlerin kaybı, hücre iskelet değişiklikleri, SOR oluşumu, lipitlerin yıkımı, protein sindirimi, kreatin kinaz (CK) ve LDH gibi enzimlerin ortaya çıkışı gözlenir. Çekirdekte ise kromatin bazofilisinde azalma (karyolizis), nükleer büzülme (piknoz) ve piknotik çekirdeğin parçalanması (karyorhekzis) gözlenir. İRH'nın ilerleyen döneminde hücre ölümü, "nekroz" ortaya çıkar (23,36,126).

MDA, poliansatüre yağ asitlerinin peroksidasyonu sonucu oluşan stabil bir son üründür. Doku IR hasarında, ksantin oksidaz enzimi, mitokondriyal oksidasyon, siklooksijenaz aracılı doymamış yağ asidi oksidasyonu, katekolamin oksidasyonu, sitokrom p 450 aracılı oksidasyon, lökosit NADPH oksidaz aktivasyonu, demir salınımı ve redoks siklusu lokal ve sistemik serbest oksijen radikal oluşumuna katkıda bulunur (4,17). Bununla birlikte her doku için baskın sistem farklıdır. Artmış serbest oksijen radikalleri (özellikle hidroksil radikali), hücre zarı fosfolipidlerinin (araşidonik asit, linoleik asit ve linolenik asit gibi çoklu doymamış yağ asitleri) peroksidasyonuna neden olarak hücre zarı bütünlüğünde bozulma, hücre şişmesi ve araşidonik asit / lipidperoksil salınımına neden olur (4,17). Bu süreçte, zincirleme bir serbest oksijen ve yağ asidi radikali oluşumu ile ilerleyici hücre zarı hasarı gerçekleşir (4,17). Dolayısıyla, bu kısır döngü sırasında meydana gelen ve stabil bir molekül olan MDA düzeyi ölçümü ile reaktif oksijen türevleri ve membran hasarı derecesi hakkında fikir sahibi

olunabilinir (127). Bozkurt ve arkadaşlarının yaptığı bir çalışmada iloprostun deneysel AIR modelinde iskelet kası hasarına olan etkisinin araştırıldığı ve AIR + iloprost grubuna ait MDA değerlerinin, AIR grubundaki değerlere göre anlamlı düzeyde azaldığı bulunmuştur (128) Özyurt ve arkadaşlarının yaptığı bir çalışmada Kafeik asit fenetil ester (Caffeic acid phenetyl esther, CAPE)'in deneysel AIR modelinde iskelet kası hasarına olan etkisinin araştırıldığı ve AIR + CAPE grubuna ait MDA değerlerinin, AIR grubundaki değerlere göre anlamlı düzeyde azaldığı bulunmuştur (129). Akbaş ve arkadaşlarının yaptığı bir çalışmada karvedilol'ün deneysel AIR modelinde iskelet kası hasarına olan etkisinin araştırıldığı ve AIR+ karvedilol grubuna ait MDA değerlerinin AIR grubundaki değerlere göre anlamlı düzeyde azaldığı bulunmuştur (130) Çalışmamızda, AIR sonrası dokudaki ölçülen MDA değerinin anlamlı derecede yükseldiği görüldü. Çalışmamızda, AIR+VEGF ve AIR+ADM grubundaki iskelet kas dokusu MDA değerinin AIR grubuna göre anlamlı derecede düşük olmasının benzer çalışmaların sonuçları ile paralellik içinde olduğu görülmektedir. AIR+VEGF ve AIR+ADM grubu MDA değerlerinin AIR grubuna göre düşük olması, VEGF ile ADM'nin AIR sonrası oluşan lipid peroksidasyonu miktarını azalttığını düşündürmektedir.

Süperoksit dismutaz (SOD), bir metalloenzimdir. Oksijeni metabolize eden bütün hücrelerde bulunur. Süperoksidin hidrojen perokside dönüşümü reaksiyonunu katalizler. Süperoksit dismutaz, bu reaksiyonda hem oksidan hem de redüktan olarak hareket eder ve bilinen en hızlı etki gösteren enzim sistemidir ancak difüzyon hızı sınırlıdır. Oksijen radikalleriyle oluşan hasara karşı SOD,

katalaz ve glutatyon enzim sistemiyle birlikte çalışan bir savunma mekanizmasıdır. Böylece oluşan hidrojen peroksit, katalaz veya glutatyon peroksidaz enzimleri tarafından su ve oksijene indirgenmektedir. Peroksit radikalinin dismutasyonu ile oluşan hidrojen peroksit doku için biyolojik avantaj sağlar. SOD'un görevinin aerobik organizmaları, süperoksitin zararlı etkilerine karşı korumak olduğu sanılmaktadır (131). Enzim, hücrede değişik kompartmanlarda bulunmaktadır. Sitozolik ve ekstrasellüler enzim, her biri içinde bir ekivalan bakır (Cu2+) ve çinko (Zn2+) taşıyan birbirine benzer iki alt üniteden meydana gelir. Fakat mitokondriyal enzim, bakterilerde bulunana benzer şekilde sadece manganez (Mn+2) içerir. Süperoksit dismutaz bütün temel aerobik dokularda bulunmaktadır (83).

Çalışmamızda AIR grubunda alt ekstremite iskelet kası dokusunda SOD aktivitesinde istatistiksel olarak anlamlı yükselme saptandı, ancak AIR+VEGF grubunda SOD aktivitesinde istatistiksel olarak anlamlı azalma saptanmadı. AIR+ADM grubunda istatiksel olarak anlamlı bir azalma olduğu görüldü. Dimakakos P.B. ve ark. (132) deneysel bir çalışmada, abdominal aortada oklüzyon oluşturup, intestinal organlarda oksidan hasara karşı vitamin E'nin etkisini araştırmışlar. Bunun için kanda SOD aktivitesine bakmışlar. E vitamini verilen grupta SOD aktivitesinde azalma saptamışlar ve vitamin E' nin postiskemik hasara karşı koruduğunu savunmuşlardır. İlhan A. ve ark. (133) yaptıkları çalışmada, tavşanlarda kafeik asit fenetil esterin spinal kord IRH' na olan etkilerini araştırmışlar ve serbest radikal hasarının göstergesi olarak SOD aktivitesi bakmışlar, ancak tüm gruplar arasında anlamlı fark saptayamamışlardır,

özellikle ilaç verilmesiyle SOD aktivitesinin anlamlı azalmaması çalışmamızla uyumludur. Ege E. ve ark. (134) tavşan spinal kord IRH' na erdosteinin etkisini araştırdıkları çalışmada, IR grubunda, kontrol grubu ile karşılaştırıldığında, SOD aktivitesinde anlamlı artma saptamış olmaları çalışmamızla uyumlu iken, erdostein verilen grupta SOD enzim aktivitesinde anlamlı azalma saptamışlardır. Bizim çalışmamızda AIR +ADM grubunda SOD düzeyinde belirgin azalma olması, ancak AIR+VEGF grubunun kontrol seviyesine inmemesi, oksidatif stresin VEGF uygulanan grupta azaldığını ancak tamamen ortadan kalkmadığını düşündürmektedir. AIR+ADM uygulanan grupta normale yakın bir seviyeye düşmüş olması ilacın etkin olduğunu düşündürmektedir.

Katalaz hücre içinde peroksizomlarda bulunur. Bilinen en hızlı enzimlerden biridir. Saniyede alt ünite başına 200.000 katalitik olayı gerçekleştirebildiği saptanmıştır. SOD tarafından oluşturulan hidrojen peroksiti peroksizomlarda su ve oksijene çevirir. Katalaz hücreyi kendi respiratuvar patlamasına karşı koruyucu olarak hizmet eder. Katalazın indirgeyici aktivitesi hidrojen peroksitin yanı sıra metil-hidroperoksitler, etil-hidroperoksitler gibi küçük moleküllü lipid hidroperoksitleri de içine alır. Katalaz da iskemi reperfüzyon hasarının saptanmasında sık kullanılan parametrelerden biridir (44,135). Çalışmamızda, AIR grubunda alt ekstremite iskelet kası dokusundaki KAT aktivitelerinde, kontrol grubuna göre rakamsal olarak artma saptandı. AIR + ADM ve AIR+VEGF grubunda da AIR grubuna göre rakamsal azalma saptandı, fakat istatistiksel anlam bulunmadı. Kiriş ve ark. (136) infrarenal AIR modelinde renal hasarı araştırdıkları çalışmada, IRH göstergesi olarak KAT aktivitesini

incelemişler ve AIR grubunda kontrol grubuna göre KAT aktivitesinin anlamlı olarak arttığını saptamışlardır. Erten S.F. ve ark. (137) deneysel spinal kord IRH' na melatoninin etkisini araştırmışlar ve iskemi reperfüzyon grubunda KAT aktivitelerinde anlamlı artış saptamışlardır. Melatonin verilmesi ile de bu aktivitelerde anlamlı azalma saptanmıştır. Mezzetti A. ve ark. (138) kardiopulmoner by-pass sırasında kanda KAT ve diğer antioksidan enzim aktivitelerini araştırmışlar, iskemi ve takiben yapılan reperfüzyon ile KAT ve diğer antioksidan enzim aktivitelerinde artış bulmuşlardır. Ayrıca bu değişikliklerin iskemik arrestin süresi ile ilişkili olduğunu ve reperfüzyonla serbest radikal üretiminin, önceki iskemik periyodun şiddetine bağımlı olduğunu saptamışlardır. Çalışmamızın AIR grubundaki KAT aktivite değerlerinin değişimi bu literatürlerle uyumludur. Çalışmamızda AIR grubunda KAT aktivitesi artışı, yükselmiş SOD aktivitesi ile oluşan hidrojen peroksitin KAT enzimi ile elimine edildiğini düşündürmektedir. VEGF uygulanan grupta azalan SOD aktivitesi oksidatif stresin azaldığını, ancak tam ortadan kalkmadığını, bununla birlikte bu grupta oluşan hidrojen peroksitin indirgenmesi için KAT aktivitesinde artışa yol açmadığı görülmüştür. KAT aktivitesinin AIR + VEGF ve AIR+ADM gruplarının iskelet kası dokusunda kontrol grubu değerlerine inmese de azalmasının bu nedenle olabileceği kanaatindeyiz.

Serbest bir radikal olan NO^{-}, birçok fizyolojik ve patolojik olaylardaki kan akımının düzenlenmesinde önemli rol oynamaktadır. İskemi, damar endotelinde hem inflamatuvar hücre infiltrasyonu hem de indüklenebilir nitrik oksit sentaz (iNOS) aktivitesini artırır. Böylece iskemi sırasında NO^{-} seviyesi

artarken, reperfüzyon sürecinde kan akımının yeniden başlamasıyla, büyük miktarlarda moleküler oksijen dokulara taşınır. Reperfüzyon hasarından sorumlu olduğu düşünülen çok miktarda serbest oksijen radikali ortaya çıkar (139,140). İskemi sırasında oluşan NO^{-}, ya bu radikalin stabil son ürünleri olan nitrit ve nitrata dönüşür, ya da $O2^{-}$ radikali ile reaksiyona girerek bir toksik oksijen metaboliti olan peroksinitrit ($ONOO^{-}$) oluşturur. $ONOO^{-}$ ise dokularda hasar yapmaktadır (139,141). NO^{-} artışındaki bir diğer muhtemel mekanizma ise, nötrofillerin aktivasyonu ve etkilenen dokuya sekestrasyonudur (142). Yapılan birçok araştırmada, iskemi reperfüzyona bağlı olarak yüksek miktarda meydana gelen NO^{-} ve $ONOO^{-}$ oluşumu azaltılarak hasarın önlenebileceği ileri sürülmüştür (143). NO'nun $O2^{-}$ ile reaksiyona girerek daha az toksik olan $ONOO^{-}$ açığa çıkardığı ve bununda glutatyon ile birleşerek zararsız bir molekül olan S-nitrozoglutatyona dönüşebileceği hesaba katıldığında (1), VEGF ve ADM'nin antioksidan etki mekanizmasının NO üzerinden oluşabileceği söylenebilir. Ayrıca yapısal NO sentaz enzimi (cNOS) aracılığıyla açığa çıkan NO'nun birçok patolojik olayda genelde koruyucu etki gösterdiği gerçeği de bu hipotezi destekler niteliktedir (144). Öte yandan indüklenebilir NO sentaz enzimi (iNOS) aktivitesi sonucu açığa çıkan NO'un ise zararlı etkilerinin olduğu da genel olarak kabul edilmektedir (144). iNOS'un ürettiği yüksek miktardaki NO'un oksidan travmaya yol açabileceği ihtimali de göz ardı edilmemelidir. iNOS'un çizgili kas İRH'deki zararlı etkisi deney hayvanlarında gösterilmiştir (145,146). Yarılanma ömrünün kısa olması ve kimyasal yapısı nedeniyle, NO^{-} direkt olarak saptanması zor olduğundan dolayı, NO^{-} değerlendirmesi için stabil son ürünleri

olan nitrit ve nitrat ölçümü kullanılmaktadır. Çalışmamızda, AIR sonrası dokudaki ölçülen NO değerinin anlamlı derecede yükseldiği görüldü. Çalışmamızda, AIR+VEGF ve AIR+ADM grubundaki iskelet kası doku NO değerinin AIR grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı derecede düşük olmasının benzer çalışmaların sonuçları ile paralellik içinde olduğu görülmektedir.

HIF-1 (Hipoksi ile indüklenen faktör-1) transkripsiyon faktörü, hipoksiye adaptasyon cevabının gelişiminde anahtar rol oynayan düzenleyici bir proteindir (147). Bu proteinin etki ettiği mekanizmalar, çok sayıda genin transkripsiyonunun düzenlenmesi, hücrelerin dediferansiyasyonu, vaskülarizasyon, otokrin büyüme faktörü üretimi, proliferasyon, invazyon ve metastaz, metabolik yeniden programlanma, tümör büyümesinin artması olarak sıralanabilir (148,149). HIF-1 proteini, hücrede sürekli olarak eksprese edilen HIF-1ß altünitesi ile HIF-1α altünitesinin bir araya gelmesi ile oluşan bir heterodimerdir. HIF-1α altünitesi, ortamda oksijen konsantrasyonunun azalmasına bağımlı olarak aktive olmaktadır. Hipoksik koşullar altında, HIF-1α altünitesi sitoplazmadan çekirdeğe yer değiştirerek HIF-1ß ile dimer oluşturur. Çekirdekteki diğer kofaktörlerin de bağlanması ile aktive olan HIF-1α DNA üzerinde "hipoksi cevap elemanı" olarak tanımlanan özgül diziye bağlanır ve hedef genlerin ekspresyonunu tetikler. Dokularda, lokal hasarlanma, irritanlar ve enfeksiyonun varlığı, yeni damar oluşumunu indüklemektedir. Bu oluşum, çevre dokular tarafından salgılanan faktörlerce kontrol edilir. Burada en önemli parametre dokulara gelen oksijenin azalmasıdır. Hücrelerin hipoksik ortama adaptasyonu çeşitli faktörlerce sağlanır. Bunlardan en önemlisi gen regulasyon proteini olan HIF1'dir. Bu protein,

özellikle VEGF gen ekspresyonunu artırmak suretiyle endotel hücrelerini aktive ederek damarlanmayı arttırır. Diğer yandan eritropoetin gen expresyonunu da artırmak suretiyle hücrelerin hipoksik ortama adaptasyonunu sağlamaktadır. Yeni damar oluşumu gerçekleşip oksijen konsantrasyonu arttığında HIF1 aktivitesi azalır. Bir başka deyişle HIF ekspresyonunun artması dokuda hipoksinin varlığına işaret etmektedir (18). Çelik M ve arkadaşlarının 2009 yılında yaptıkları ESWL uygulanan hastalara pentoksifilin verilerek HIF 1 alfa ekspresyonuna bakmışlar ve yaptıkları çalışma sonucunda pentoksifilin HIF 1 alfa düzeyini anlamlı olarak azalttığını gözlemlemişlerdir. Literatürlere bakıldığında oluşturulan deneysel rat abdominal aorta iskemi reperfüzyon modeli ile alt ekstremite iskelet kası hasarlanması çalışmalarında biyokimyasal parametre olarak HIF 1 alfa'nın bakılmadığı, çalışmamızın HIF 1 alfa ölçümü açısından ilk olarak gerçekleştirilen bir çalışma olduğu görülmektedir. Çalışmamızda IR grubunda S,ADM ve VEGF gruplarına göre anlamlı düzeyde arttığı istatiksel olarak gösterilmiştir. ADM+IR grubunda IR'ye göre anlamlı olarak HIF 1 alfa düzeyinin düştüğü, VEGF+IR grubunda istatiksel olarak anlamlı düzeyde düşmediği görülmüştür. Çalışmamızda VEGF+IR grubunda istatistiksel olarak anlamlı düşme olmamasının nedeninin, hipoksi durumunda salınan HIF 1'in VEGF ekspresyonunu arttırması ve bu nedenle reseptörlerin uyarılabilirliğini düşmesi ile dışarıdan verilen VEGF'in yeterince etkin olamaması olduğu düşüncesindeyiz.

Grupların histopatolojik değerlendirmeleri, alt ektremite iskelet kası dokuları Hemotoksilen Eozin boya ve Tunel yöntemiyle boyanması sonrasında ışık mikroskobu ile değişik büyültmelerde incelenerek gerçekleştirilmiştir. Alt

ekstremite iskelet kası dokularının Sham, VEGF ve ADM grupları arasında histopatolojik olarak belirgin değişiklik gözlenmemiştir. IR grubunda kontrol grubuna göre hasar belirgin olarak gösterilmiştir. Bu hasar İR + VEGF ve IR+ADM gruplarında, İR grubuna göre kıyaslandığında daha az, kontrol grubuna göre kıyaslandığında daha fazla olarak tespit edilmiştir. Çalışmamızın histopatolojik sonuçlarının biyokimsal parametre sonuçları ile paralellik gösterdiği görülmüştür.

SONUÇ

Sonuç olarak, çalışmamızdan elde edilen bulgular çerçevesinde, iskelet kasında iskemi reperfüzyon hasarına adrenomedullin ve vasküler endoteliyal büyüme faktörü uygulanması ile oluşan etkilerin araştırılması sonucunda biyokimyasal ve histopatolojik veriler ışığında anlamlı sonuç elde edilmiştir. İlaçların geliştirilme aşamasında, insanlarda yapılan klinik çalışmalardan önce, hayvan araştırmaları ile aday ilaçların potansiyel etkileri değerlendirilmektedir. Bu çalışmada, İRH modeli oluşturulan ratlarda, araştırma ilaçlarımızın etkisi incelenmiştir. Çalışmamızda etkili bulunan bu ilaçların, insanlarda da kullanım alanı bulabilmesi için bir dizi klinik ilaç araştırması yapılması gerekmektedir. Unutulmaması gereken bir nokta, bu çalışmaları yaparken, sadece biyokimyasal parametreler değil ayrıca klinik uç-noktalar da değerlendirilerek ilaçların gerçekten yararlı olup olmadıklarının kanıtlanmasına odaklanılmasıdır. Aksi takdirde, bu ilaçların İRH'ye yol açan durumlarda klinik kullanıma girmesi sağlanamayacak ve İRH gibi hastaları olumsuz etkileyen bir süreçte hastalara yeni tedavi seçenekleri sunulması gecikebilecektir.

ÖZET

VASKÜLER ENDOTELİYAL BÜYÜME FAKTÖRÜ VE ADRENOMEDULLİNİN RATLARDA İSKELET KASI İSKEMİ REPERFÜZYON HASARINA KORUYUCU ETKİSİ

Dr. Mehmet KİRİŞCİ, Gazi Üniversitesi Tıp Fakültesi Kalp ve Damar Cerrahisi Anabilim Dalı, Ankara, Türkiye

Amaç: Bu çalışmanın amacı alt ekstremite iskemi-reperfüzyon modelinde vasküler endoteliyal büyüme faktörü (VEGF) ve adrenomedullinin etkilerini araştırmaktır.

Metod: Otuzaltı Wistar rat randomize olarak altı gruba ayrıldı (n=6). Tüm gruplara genel anestezi altında laparotomi uygulandı. Grup S (Sham)'de başka bir işlem yapılmadı. İskemi reperfüzyon grubuna (Grup IR) infrarenal abdominal aortaya sırayla klemp konup kaldırılması ile 2 saatlik periyodlar haline iskemi ve reperfüzyon uygulandı. Grup VGEF ve Grup ADM'ye iskemi ve reperfüzyon uygulanmaksızın sırasıyla intravenöz VEGF (0,8 μg/kg) veya ADM (12 μg/kg) infüzyonu verildi. Grup IR+VEGF ve Grup IR+ADM'ye 2 saatlik iskemi periyodunun hemen ardından sırasıyla VEGF (0,8 μg/kg) veya ADM (12 μg/kg) intravenöz olarak uygulandı. Reperfüzyon dönemi bitiminde alt ekstremite iskelet kasından biyokimyasal ve histopatolojik incelemeler için örnekler alındı.

Bulgular: IR grubundaki malondialdehid (MDA), superoksit dismutaz (SOD), nitrik oksit (NO) ve hipoksi ile indüklenen faktör 1 alfa (HIF 1 alfa) doku

düzeyleri kontrol grubundaki düzeylere göre anlamlı derecede yüksek bulundu ($p < 0.05$). IR+ADM grubundaki MDA, SOD, NO ve HIF 1 alfa doku düzeyleri IR grubundaki düzeylere göre anlamlı olarak düşüktü ($p < 0.05$). IR+VEGF grubundaki MDA ve NO doku düzeyleri IR grubundaki düzeylere göre anlamlı düşüktü ($p < 0.05$). Her bir gruba ait katalaz doku düzeyleri birbiri ile karşılaştırıldığında istatistiksel olarak anlamlı fark bulunmadı. Histopatolojik olarak incelendiğinde; IR grubunda, nekrozun kasın santral bölgesinde perifere göre daha büyük olduğu, kapiller lümeninde kırmızı kan hücrelerinin olduğu, kas fibrillerinin küçüldüğü ve yuvarlaklaştığı ya da ovalleştiği görüldü. IR+ADM ve IR+VEGF gruplarında bu değişikliklerde istatistiksel olarak anlamlı azalma olduğu görüldü.

Sonuç: Bu sonuçlar ADM ve VEGF'nin ratlarda iskelet kası iskemi-reperfüzyon hasarında koruyucu etkiye sahip olduğunu göstermektedir.

Anahtar Kelimeler: İskemi reperfüzyon, Adrenomedullin, VEGF, iskelet kası, rat, histopatoloji

SUMMARY

PROTECTIVE EFFECTS OF VASCULAR ENDOTHELIAL GROWTH FACTOR AND ADRENOMEDULLIN ON ISCHEMIA REPERFUSION INJURY IN SKELETAL MUSCLE IN RATS

Dr. Mehmet KİRİŞCİ, Department of Cardiovascular Surgery, Faculty of Medicine, Gazi University, Ankara, Turkey

Aim: The aim of this study is to investigate the effects of vascular endothelial growth factor (VEGF) and adrenomedullin (ADM) in the model of lower extremity skeletal muscle ischemia reperfusion injury.

Method: Thirty-six Wistar rats were randomized into six groups (n=6). Laparotomy was performed in all groups under general anesthesia. Nothing else was done in Group S (Sham). Ischemia reperfusion group (Group IR) underwent ischemia and reperfusion performed by Clamping and declamping of the infrarenal abdominal aorta for 120 minutes, respectively. Group VGEF and Group ADM received intravenous infusion of VEGF (0,8 μg/kg) or ADM (12 μg /kg) respectively, without ischemia and reperfusion. Group IR+VEGF and Group IR+ADM received intravenous infusion of VEGF (0,8 μg/kg) or ADM (12 μg /kg) respectively immediately after 2 hours period of ischemia. At the end of reperfusion period, skeletal muscle samples of lower extremity were taken from all groups for biochemical and histopathologic examinations.

Results: Tissue levels of malondialdehyde (MDA), superoxide dismutase (SOD), nitric oxide (NO) and hypoxia inducible factor 1 alpha (HIF 1 alpha) were found to be significantly higher in Group IR than the levels in Group S ($p < 0.05$). Tissue levels of MDA, SOD, NO and HIF 1 alpha were significantly lower in Group IR+ADM when compared with the levels in Group IR ($p < 0.05$). In Group IR+VEGF, tissue levels of MDA and NO were significantly lower than the levels in Group IR ($p < 0.05$). No statistically significant difference was found in the tisue levels of catalase among the groups. In histopathologic examination, central muscular necrosis was found to be larger than the peripheral necrosis, red blood cells were found in the lumens of capillary vessels and atrophy and elliptical or round shape in muscle fibers in Group IR. In groups IR+ADM and IR+VEGF, statistically significant decreases were detected in these changes.

Conclusion: These results indicate that ADM ve VEGF have protective effects on ischemia reperfusion injury in skeletal muscle in rats.

Key Words: Ischemia reperfusion, Adrenomedullin, VEGF, skeletal muscle, rat, histopathology.

KAYNAKLAR

1. Ergün Y: Çizgili kas iskemi-reperfüzyon hasarı ve nitrik oksit ile ilişkisi. Arşiv-2006; 15; 133-157.

2. Köksal C, Bozkurt AK, Cangel U. Attenuation of ischemia/reperfusion injury by N-acetylcysteine in a rat hind limb model. J Surg Res. 2003 May 15;111(2): 236-9.

3. Eltzschig HK, Collard CD. Vascular ischaemia and reperfusion injury. Br Med Bull. 2004; Oct 19;70:71-86. Print 2004. Review. Erratum in: Br Med Bull. 2005;73-74:139.

4. Kumar V, Abbas AK, Fausto N, eds Robbins and Cotran Pathologic Basis of Disease, 7th Edition, Philadelphia: Elsevier Saunders, 2004.

5. Hensley K, Robinson KA, Gabbita SP, Salsman S, Floyd RA. Reactive oxygen species, cell signaling, and cell injury. Free Radic Biol Med. 2000; 15;28(10):1456-62

6. Carden DL, Granger DN. Pathophysiology of ischeamia-reperfusion injury. J Pathol, 2000; 190:255- 266.

7. Anaya-Prado R, Toledo-Pereyra LH, Lentsch AB, Ward PA Ischemia/reperfusion injury. J Surg Res.2002; 15;105(2):248-58

8. Cerra FB, Lajos TZ, Montes M, Siegel JH. Hemorrhagic infarction: A reperfusion injury following prolonged myocardial ischemic anoxia. Surgery.1975; Jul;78(1):95-104

9. Homer-Vanniasinkam S, Crinnion JN, Gough MJ: Post-ischaemic organ dysfunction: a review. Eur J Vasc Endovasc Surg, 1997; 14:195-203.

10. Yancopoulus GD, Davis S, Gale NW, Rudge JS, Wiegand SJ, Holash J. Vasculer-spesific growth factors and blood vessel formation. Nature 2000; 407:242-8)

11. Bikfalvi A. Recent developments in the inhibition of angiogenesis: examples from studies on platelet factor-4 and the VEGF/VEGFR system. Biochemical Pharmacology 2004; 68:1017-21

12. Shalaby R, Rossant J, Yamaguchi TP, Gertsenstein M, Wu X, Breitman ML, et al. Failure of blood-island formation and vasculogenesis in Flk-1 deficent mice Nature 1995; 376:62

13. Sheweiki D, ıtin A, Soffer D, Keshet E. Vasculer endothelial growth Factor induced by hypoxia may mediate hypoxia-initiated angiogenesis. Nature 1992; 359:843-5

14. Kıtamura K, Kongawa K, Eto T. Adrenomedullin and PAMP: Discovery Structurs and Cardiovasculer functions. Microvasc Res Technol. 57:3-13, 2002

15. Hinson JP, Kapas S, Smith DM. Adrenomedullin, a multifunctional regulatory peptide. Endocr Rev. 2000;21:138-167

16. Jougasaki M, Burnett Jr JC.Adrenomedullin as a regulator peptide. Nephrol Dial Transplant 2000;15: 293-295

17. Siemionow M, Arslan E. Ischemia/reperfusion injury: a review in relation to free tissue transfers. Microsurgery. 2004;24(6):468-75. Review

18. Semenza GL. Perspectives on oxygen sensing. Cell. 1999; Aug 6;98(3):281-4

19. Maureen McMichael DVM, DACVECC, Rustin M. Moore DVM, PhD, DACVS Ischemiareperfusion injury pathophysiology, part I. Journal of Veterinary Emergency and Critical Care 2004; 14 (4): 231–241

20. Stein I, Itin A, Einat P, Skaliter R, Grossman Z, Keshet E Translation of vascular endothelial growth factor mRNA by internal ribosome entry: implications for translation under hypoxia. Mol Cell Biol, 1998; 18, 3112–3119

21. Forsythe J, Jiang B, Iyer N et al. Activation of vascular endothelial growth factor gene transcription by hypoxia-inducible factor 1. Mol Cell Biol,1996; 16, 4604–4613

22. Semenza GL. HIF-1: mediator of physiological and pathophysiological responses to hypoxia. J Appl Physiol, 2000; 88, 1474–1480

23. Kumar V, Otran R, Robbins SL. Temel patoloji (Basic Pathology), 6. baskı, Temmuz 2000, 6-10, 30-36

24. Lehninger AL. Generation of ATP in anaerobik cell. In: Bioenergetics.ed 2 Menlo park, Calif: WA Benjamin 1971:53-71

25. Grum CM. Cellular energetics, In: Zelenock G. ed. Clinical Ischemic Syndromes: Mechanism and Consequence of Tissue Injury. St. Louis: The CV Mosby Co.; 1990; pp. 47–62

26. Siesjö BK. Mechanisms of ischemic brain damage. Crit. Care Med 1988;16:954-63

27. Newmeyer DD, Ferguson-Miller S. Mitochondria: releasing power for life and unleashing the machineries of death. Cell. 2003;21;112(4):481-90

28. Anaya-Prado R, Toledo-Pereyra LH. The molecular events underlying ischemia/reperfusion injury. Transplant Proc. 2002;34(7):2518-9.

29. Droge W. Free radicals in the physiological control of cell function Physiol Rev. 2002;82(1):47-95

30. Paschen W. Role of calcium in neuronal cell injury: which subcellular compartment is involved? Brain Res Bull. 2000;1;53(4):409-13

31. Orrenius S, Zhivotovsky B, Nicotera P. Regulation of cell death: the calcium-apoptosis link. Nat Rev Mol Cell Biol. 2003;4(7):552-65.

32. Nuh Zafer Cantürk, İskender Sayek. Cerrahi araştırma kitabı. 2005 nobel tıp kitabevleri

33. Toyokuni S: Reactive oxygen species-induced molecular damage and its application in pathology. Pathol int 1999; 49:91-102

34. Granger DN. Role of xanthine oxidase and granulocytes in ischaemia-reperfusion injury. Am L Physiol 1988; 255.HI269-75

35. Ernster L. Biochemistry of reoxygenation injury. Crit Care Med 1988;16:947-53

36. Alizan A, Khalil C, Farah A, John C. Reperfusion injury. Plast. Reconstr Surg 2006;117: 1024–1033

37. Blaisdell FW: The pathophysiology of skeletal muscle ischemia and the reperfusion syndrome: a review. Cardiovasc Surg 2002; 10:620-630

38. Haimovici H. Metabolic complications of acute arterial occlusions and related conditions: myonephropathic-metabolic syndrome. Futura Publ Co, Mount Kisco, NY, 1988

39. Stallone RJ, Blaisdell FW, Cafferata HT et al. Analysis of morbidity and mortality from arterial embolectomy. Surgery, 1969; 65, 207–217

40. Belkin M, Brown RD, Wright JG et al. A new quantitative spectrophotometric assay of ischemia reperfusion injury in skeletal muscle. Am J Surg, 1988; 156, 83–86

41. Hayes G, Liauw S, Romaschin AD, Walker PM. Separation of reperfusion injury from ischemiainduced ecrosis. Surg Forum, 1988; 39, 306–308

42. Harman JW. The significance of local vascular phenomena in the production of ischemic necrosis in skeletal muscle. Am J Pathol, 1948; 24, 625–641

43. Brooks B. Pathologic changes in muscle as the result of disturbances of circulation. Arch Surg, 1922, 5, 188-216

44. Ames A Jr, Wright RL, Kowada M. Cerebral ischemia II. The no-reflow phenomenon. Am J Pathol, 1968, 52, 437–453. 28

45. Lindsay T, Romaschin A, Walker PM: Free radical mediated damage in skeletal muscle. Microcirc Endothelium Lymphatics- 1989; 5: 157-170

46. Hearse DJ, Humphrey RM, Chain EB: Abrupt reoxygenation of the anoxic potassium arrested rat heart: A study of myocardial enzyme release. J Mol Cell Cardiol -1973; 5: 395-407

47. Wright JG, Fox D, Kerr JC, ve ark: Rate of reperfusion blood flow modulates reperfusion injury in skeletal muscle. J Surg Res- 1988; 44; 754-763

48. Korthuis RJ, Granger DN, Townsley MI, ve ark: The role of oxygen derived free radicals in Ischemia induced increases in vanine skeletal muscle vaskuler permeability. Circ res- 1985; 57: 599-600

49. Smith JK, Carden DL, Grisham MB, ve ark: Role of iron in postischemic microvaskuler injury. Am J Physiol- 1989; 256:,1472-1477

50. Fantini GA, Yoshioka T. Desferoxamine prevents lipid peroxidation and attenuates reoxygenation injury in postischemic skeletal muscle. Am J Physiol - 1993;264: 1953-1959

51. Beckman JS, Beckman TW, Chen J, ve ark: Apparent hydroxyl radical production by peroxynitrit: implications for endothelial cell injury from nitric oxide and superoxide. Proc Natl Acad Sci USA -1990;87: 1620-1624

52. Gute DC, Ishida T, Yarimizu K, ve ark: Inflamatory responses to ischaemia and reperfusion in skeletal muscle. Mol Cell Biochem-1998;179:169-187

53. Belkin M, Wright JG, Hobson RW: Iloprost infusion decreases skeletal muscle Ischeamia-reperfusion injury. J Vasc Surg-1990; 11: 77-83

54. Hayes G, Liauw S, Smith A, ve ark: Exogenous magnesium chloride-adenosine triphosphate administration during reperfusion reduces the extent of necrosis in previously ischemic skeletal muscle. J Vasc Surg- 1990; 11: 441-448, 26

55. Carden DL, Smith JK, Korthuis RJ: Neutrophil mediated microvascular dysfunction in postischemic canine skeletal muscle. Circ Res- 1990; 66: 1436-1444

56. Korthuis RJ, Grisham MB, Granger DN: Leukocyte depletion attenuates vascular injury in postischemic skeletal muscle. Am J Physiol-1988; 254: 823-827

57. Rubin BB, Chang G, Liauw S, ve ar: Phospholipid peroxidation depletion and remodeling in postischemic skeletal muscle. Am J Physiol -1992; 263: 1695-1702

58. Rubin BB, Smith A, Tittley J, ve ark: A clinically applicable method for long term salvage of postischemic skeletal muscle. J Vasc Surg- 1991; 13; 53-63

59. Bevilacqua MP, Sengelin S, Gimbrone MA, ve ark: Endothelial leukocyte adhesion molecule 1: an inducible receptor for neutrophils related to complement regulatory proteins and lectins. Science Wash DC -1989; 243: 1160-1165

60. McEver RP: Selectins: novel adhesion receptors that mediate leukocyte adhesion during Thromb Haemostasis -1991; 65: 223-228

61. Kishimoto TK: A dynamic model for neutrophil localization to inflammatory sites. J Natl Inst Health Res -1991; 3: 75-77

62. Sengelov H, Kjeldsen L, Diamond MS, ve ark: Subcellular localization and dynamics of Mac-1 (alpha m beta 2) in human neutrophils. J Clin Invest -1993; 92: 1467-1476

63. Smith CW: Molecular determinants of neutrophil activation. Am J Respir Cell Mol Biol -1990; 2: 487-499

64. Wesselcouch R, Goldman G, Paterson IS, ve ar: Effect of in vivo inhibition of neutrophil adherence on skeletal muscle function during Ischeamia in ferrets. Am J Physiol -1991; 261: 1178-1183

65. Petresak PF, Liauw S, Romaschin AD, ve ark: Salvage of postischemic skeletal muscle by monoclonal antibody blockade of neutrophil adhesion molecule CD18. J Surg Res -1994,;56:512-513

66. Jerome SN, Dore M, Paulson JC, ve ark:. P-selectin and ICAM-1-dependent adherence reactions: role in the genesis of postischemic no-reflow. Am J Physiol-1994; 266: 1316-1321

67. Seekamp A, Warren JS, Remick DG, ve ark: Requirements for tumor necrosis factor-alpha and interlökin-1 in limb Ischeamia/reperfusion injury and associated lung injury. Am J Pathol- 1993; 143: 453-463

68. Engels W, Van Bilsen M, DeGroot MTM: Ischeamia and reperfusion-induced formation of eicosanoids in isolated rat hearts. Am J Physiol- 1990; 258: 1865-1871

69. Lehr HA, Guhlmann A, Nolte D, ve ark: Leukotriens as mediators in Ischeamia-reperfusion injury in a microcirculation model in the hamster. J Clin Invest- 1991; 87: 2036-2041

70. Goldman G, Welbourn R, Paterson IS, vark: Ischeamia-induced neutrophil activation and diapedesis is lipoxygenase dependent. Surgery St Louis- 1990; 107: 428-433

71. Carden DL, Korthuis RJ. Role of leukotriene B4 in postischemic skeletal muscle microvascular dysfunction. FASEB J -1991; 5: 893

72. Ascer EM, Gennaro M, Cupo S, ve ark: Do cytokines play a role in skeletal muscle Ischeamia and reperfusion? J Cardiovasc Surg- 1992; 33: 588-592 64

73. Seekamp A, Mulligan MS, Till GO, ve ark: Requirements for neutrophil products and L-arginine in Ischeamia-reperfusion injury. Am J Pathol -1993; 142: 1217-1226

74. Nakazawa H, Genka C, Fujishima M: Pathological aspects of active oxygen free radicals. Jap J Physiol -1996; 46: 15-32

75. Fleming J, Miguel J, Econimos A: Is cell aging caused by respiration dependent injury to the mitokondrial genome. Gerontol- 1982; 28-44

76. Jugdutt BI: Nitric oxide and cardioprotection during Ischeamia-reperfusion. Heart Failure Reviews -2002; 7: 391-405

77. Ferdinandy P, Schultz R: Nitric oxide, superoxide, and peroxynitrite in myocardial Ischeamia-reperfusion injury and preconditioning. Br J Pharmacol-2003; 138: 532-543

78. Zwart LL, Meerman JHN, Commandeur JNM, ve ark: Biomarkers of free radikal damage applications in experimental animals and humans. Free Radic Biol Med -1996; 26: 202-226

79. Ertan T, Soran A, Kılıç M, ve ark: Kan MDA ve total antioksidan seviyesinin (TAS) önemi. Cerrahi Tıp Bülteni- 2001; 24:154-167

80. Storz G, Imlay JA: Oxidative stres. Cur Opin Microbiol-1992:188-194

81. Gutteridge JMC: Lipid peroxidation and antioxidants as biomarkers of tissue damage. Clin Chem-1995; 41: 1819-1828

82. Girotti AW: Lipid hydroperoxide generation, turnover, and effector action in biological systems. J Lipid Res -2000; 3: 1529-1542

83. Johnson F, Giulivi C: Superoxide dismutases and their impact upon human health. Mol Aspects Med-2005; 26: 340-352

84. Beutler E: Red cell metabolism. A manuel of biocemical methods. New York: In Grune and stratton- 1973;74

85. Kurokawa T, Kobayashi H, Nonami T, ve ark: Mitokondrial glutathione redox and energy producing function during liver ischemia and reperfusion. J Surg-1996; 66: 1-5

86. Faraji B, Kang HK, ValentineJL: Methods compared for determining glutathione peroxidase activity in blood. Clin chem -1987; 33: 539-543

87. Anderson ME: Glutathione an overview of biosyntesis and modulation. Chem Biol Interact- 1998;111: 1-14

88. Stein HJ, Oosthuizen MMJ, Hinder RA, ve ark: Oxygen free radicals and glutatyone in hepatic ischemia-reperfusion injury. J Surgery -1991; 50: 398-402

89. Bergmayer J, Grabl M: Methods of enzymatic analysis-1983;190-302

90. Floyd R. Role of oxygen free radicals in carcinogenesis and brain ischemia. FASEB J-1990; 4: 2587-2597

91. Mc Cord J: Oxygen derived free radicals in postischemic tissue injury. N Eng J Med -1985; 312: 159-163

92. Uysal M. Serbest radikaller, lipid peroksitleri ve organizmada prooksidan-antioksidan dengeyi etkileyen koşullar. Klinik gelişim-1998;11: 336-341

93. Kapas, S., Martinez, A., Cuttitta, F., Hinson, J.P.: Local production and action of adrenomedullin in the rat adrenal glomerulosa. J Endocrinol 156: 477-484, 1998

94. Cameron, V.A., Fleming, A.M.: Novel sites of adrenomedullin gene expression in mouse and rat tissues. Endocrinology 53: 979-985,1998

95. Hata, T., Miyazaki, K.: Adrenomedullin in preeclampsia. Lancet 351: 676-677, 1998

96. Kangawa, K., Kitamura, K., Minamino, N., et al.: Adrenomedullin: a new hypotensive peptide. J Hypertens 14 suppl (5): 105-110, 1996

97. Kohno, M., Hanehira, T., Kano, H., et al.: Plasma adrenomedullin concentrations in essential hypertension. Hypertension 27: 102-107, 1996

98. Guevara, M., Gines, P., Jimenez, W., et al.: Increased adrenomedullin levels in cirrhosis: relationship with hemodynamic abnormalities and vasoconstrictor systems. Gastroenterology 114: 336-343, 1998

99. Nishio, K., Akayi, Y., Murao, Y., et al.: Increased plasma concentrations of adrenomedullin correlate with relaxation of vascular tone in patients with septic shock. Crit Care Med 25: 953- 957,1997

100. Eguchi, S., Hırata, Y., Iwasaki, H., et al.: Structure-activity relationship of adrenomedullin, a novel vasodilatory peptide, in cultured rat vascular smooth muscle cells. Endocrinology 135: 2454,1994

101. Martinez, A., Miller, M.J., Unsworth, E.J., et al.: Expression of adrenomedullin in normal human lung and in pulmonary tumors. Endocrinology 136: 4099-4105, 1995

102. Imai, T., Hirata, Y., Iwashina, M., Marumo, F.: Hormonal regulation of rat adrenomedullin gene in vasculature. Endocrinology 136: 1544-1548, 1995

103. Hirata, Y., Hayakawa, H., Suzuki, Y., et al.: Mechanisms of adrenomedullin-induced vasodilatation in the rat kidney. Hypertension 25: 790- 795, 1995

104. McGregor, D., Trougton, R.W., Frampton, C., et al.: Hypotensive and natriuretic actions of adrenomedullin in subjects with chronic renal impairment. Hypertension 37:1279-1284, 2001

105. Chini, E., Chini, C.C.S., Bolliger, C., et al.: Cytoprotective effects of adrenomedullin in glomeruler cell injury: Central role of cAMP signaling pathway. Kidney Int 52: 917-925, 1997

106. Kita, T., Kitamura, K., Kuwasako, K., Kawamoto, M., Eto, T.: Short-term modulation of the reninangiotensin system does not alter plasma adrenomedullin concentrations in humans. J Hypertens 16: 2057-2062, 1998

107. Isumi, Y., Shoji, H., Sugo, S., et al.: Regulation of adrenomedullin production in rat endothelial cells. Endocrinology 139: 838-846, 1998

108. Zachary I. Molecules in focus VEGF. Int J Biochem Cell Biol 1998; 30:1169-74

109. Kleespies A, Guba M, Jauch KW, Bruns CJ. Vascular endothelial growth factor in esophageal cancer. J Surg Oncol 2004; 87:95-104.

110. Ortega N, L'faqihi F-E, Plouet J. Control of VEGF angiogenic activity by the extracellular matrix. Biol Cell 1998; 90:381-390

111. Thomas KA. VEGF, a potent and selective angiogenic agent. J Biol Chemistry 1996; 271:603-6

112. Clauss M. Molecular biology of the VEGF and the VEGF receptor family. Semin Thromb Hemost 2000; 26:561-9.

113. Ferrara N, Gerber HP, Le Couter J. The biology of VEGF and its receptors. Nat Med 2003; 9:669-76

114. Jeltsch M, Kaipainen A, Joukov V, Meng X, Lakso M, Rauvala H, et al. Hyperplazia of lymphatic vessels in VEGF-C transgenic mice. Science 1997; 276:1423-25.

115. Detmar M. Tumor angiogenesis. J. Investig. Dermatol Symp Proc 2000; 5:20-3.

116. Tamanini C, De Ambrogi M. Angiogenesis in developing follicle and corpus luteum. Reprod Domest Anim 2004; 39:206-16

117. Monacci WT, Merrill MJ, Oldfield EF. Expression of vascular permeability factor/vascular endothelial growth factor in normal rat tissues. Am J Physiol 1993; 264:C995-C1002.

118. Harada S, Nagy JA, Sullivan KA, Thomas KA, Endo N, Rodan GA, et al. Induction of vascular endothelial growth factor expression by prostaglandin E2 and E1 in osteoblasts. J Clin Invest 1994; 93:2490-6.

119. Ohkawa H, Ohishi N, Yagi K. Assay for lipid peroxides in animal tissues by thiobarbituric acid reaction. Anal Biochem 1979; 95, 351-8.

120. Lai CC, Huang W, Askari A, Wang Y. Differantial regulation of superoxide dismutase in copper deficient rat organs. Free Radic Biol Med 1994; 16: 613-20

121. Powers SK, Leeuwenburgh C. Exercise training-induced alterations in skeletal muscle antioxidant capacity. Med Sci Sports Exerc 1999; 31: 987-97

122. Guemori L, Arthur Y, Herbeth B, Jeandel C, Cunny G, Siest G. Biological variability of süperoxide dismutase, glutathione peroxidase and catalase in blood. Clin Chem 1991; 37:1932-7

123. Nordberg J, Arner ES. Reactive oxygen species; antioxidants and the mammalian thioredoxin system. Free Radic Biol Med 2001; Dec 1, 31 (11): 1287-312

124. Dringen R, Pawlowski PG, Hirrlinger J. Peroxide detoxification by brain cells. J Neurosci Res 2005; 79:157-65

125. Mayne PD. Clinical Chemistry in Diagnosis and Teratment. Oxford University Press, New York, 1992

126. Appell H J, Glöser S, Duarte JA, Zellner A, Soares JM. Skeletal muscle damage during tourniquet-induced ischaemia. The initial step towards atrophy after orthopaedic surgery? Eur J Appl Physiol Occup Physiol 1993;67:342–7

127. Kingston R, Kelly CJ, Murray P. The therapeutic role of taurine in ischaemia-reperfusion injury. Curr Pharm Des. 2004;10(19):2401-10

128. Bozkurt AK. Alpha-tocopherol (Vitamin E) and iloprost attenuate reperfusion injury in skeletal muscle ischemia/reperfusion injury. J Cardiovasc Surg (Torino) 2002; Oct;43(5):693-6

129. Ozyurt H, Ozyurt B, Koca K: Caffeic acid phenethyl ester (CAPE) protects rat skeletal muscle against ischemia-reperfusion-induced oxidative stress. Vascular Pharmacology -2007; 47: 108-112

130. Akbaş H, Özden M, Kanko M, ve ark: Protective antioxidant effects of carvediol in a rat model of ischemia-reperfusion injury. J Inter Med Res -2005; 33: 528-536.

131. Salvemini D, Cuzzocrea S. Superoxide, superoxide dismutase and ischemic injury. Curr Opin Investig Drugs.;3(6):886-95.2002

132. Dimakakos PB, Kotsis T, Kondi-Pafiti A, Katsenis K, Doufas A, Chondros K, Kouskouni E. Oxygen free radicals in abdominal aortic surgery. An experimantal study. J Cardiovasc Surg (Torino). 2002; Feb;43(1):77-82.

133. İlhan A, Koltuksuz U, Özen S, Uz E, Çıralık H, Akyol O. The effects of caffeic acid phenethyl ester (CAPE) on spinal cord ischemia/reperfusion injury in rabbits. Eur J Cardiothorac Surg. 1999; Oct;16(4):458-63

134. Ege E, Ilhan A, Gurel A, Akyol O, Ozen S. Erdosteine ameliorates neurological outcome and oxidative stress due to ischemia/reperfusion injury in rabbit spinal cord. Eur J Vasc Endovasc Surg. 2004; Oct;28(4):379-86

135. Bilgin Ö. Lipopolisakkarit ile uyarılmış hepatik iskemi reperfüzyon hasarı oluşturulan deneklerde, melatonin uygulanmasının NfkB ekspresyonu ile kan ve doku lipid peroksidasyonu üzerine etkisi. Mersin Üniversitesi Tip Fakültesi Genel Cerrahi Anabilim Dalı .Mersin 2007

136. Kiris ,Okutan H, Savas Ç, Yönden Z, DelibasN. Deneysel aortik iskemi reperfüzyon modelinde renal hasara gadolinyum klorürün etkisi. Turkish J Vasc Surg 2005;14(2):13-18

137. Erten SF, Kocak A, Ozdemir I, Aydemir S, Colak A, Reeder BS. Protective effect of melatonin on experimental spinal cord ischemia. Spinal Cord. 2003; Oct;41(10):533-8

138. Mezzetti A, Lapenna D, Pierdomenico SD, Di Giammarco G, Bosco G,Di Ilio C, Santarelli P, Calafiore AM, Cuccurullo F. Myocardial antioxidant defenses during cardiopulmonary bypass. J Card Surg. 1993; Mar;8(2):167-71

139. Ferdinandy P, Schulz R. Nitric oxide, superoxide, and peroxynitrite in myocardial ischemia-reperfusion injury and preconditioning. Br J Pharmacol. 2000;138(4):532–543,104.

140. Ronson RS, Nakamura M, Vinten-Johansen J. The cardiovascular effects and implications of peroxynitrite. Cardiovasc Res. 1999;44(1):47–59

141. Beckman JS. rebounding from nitric oxide. Circ Res. 2001;89(4):295– 297

142. Adams LB, Hibbs JB Jr, Taintor RR, Krahenbuhl JL.Microbiostatic effect of murine-activated macrophages for Toxoplasma gondii. Role for synthesis of inorganic nitrogen oxides from L-arginine. J Immunol. 1990;144(7):2725–29

143. James JP, Benedict RL. Mechanism of myocardial reperfusion injury. Ann Thorac Surg 1999;68:1905-12

144. Moncada S, Palmer RMJ, Higgs EA: Nitric oxide: Physiology, pathophysiolopy, and pharmacology. Pharmacol Rev-1991; 43: (2): 109-142.

145. Barker JE, Knight KR, Romeo R, ve ark: Targeted disruption of the nitric oxide synthase 2 gene protects against ischaemia/reperfusion injury to skeletal muscle. J Pathol- 2001;194:109-115.

146. Zhang l, Looney CG, Qi W-N, ve ark: Reperfusion injury is reduced in skeletal muscle by inhibition of inducible nitric oxide synthase. J Appl Physiol - 2003; 94: 1473-1478.

147. Shafee, N., Kaluz, S., Ru, N., Stanbridge, E.J. (2009) PI3K/Akt activity

has variable cell-specific effects on expression of HIF target genes, CA9

and VEGF, in human cancer cell lines. Cancer lett, 282 (1), 109-115.

148. Patiar, S., Harris, A.L. (2006) Role of hypoxia-inducible factor-1. as a cancer therapy target. Endocrine-Related Cancer, 13, 61-75.

149. Semenza, G.L. (2007) Evaluation of HIF-1 inhibitors as anticancer agents. Cancer lett, 12 (19-20), 853-859.