

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

**PİKROZİD-2' NİN RATLARDA İSKELET KASINDA İSKEMİ
REPERFÜZYON HASARINA KARŞI ETKİSİ**

UZMANLIK TEZİ

Dr. YİĞİT KILIÇ

**TEZ DANIŞMANI
Doç. Dr. TOLGA TATAR**

**ANKARA
2016**

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

**PİKROZİD-2' NİN RATLARDA İSKELET KASINDA İSKEMİ
REPERFÜZYON HASARINA KARŞI ETKİSİ**

UZMANLIK TEZİ

Dr. YİĞİT KILIÇ

**TEZ DANIŞMANI
Doç. Dr. TOLGA TATAR**

**ANKARA
2016**

ONAY SAYFASI



TEŞEKKÜR

Yoğun ve zorlu uzmanlık eğitimim süresince, bilgi ve tecrübeleriyle yol gösteren, desteklerini eksik etmeyen çok kıymetli 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' ye

Kendilerinden çok şey öğrendiğim Prof. Dr. Levent OKTAR, Prof. Dr. Erkan İRİZ, Doç. Dr. Dilek ERER, Doç. Dr. Mustafa Hakan ZOR' a

Bilgi ve tecrübesiyle beni destekleyen, yol gösteren, kendisinden çok şey öğrendiğim tez danışmanım Doç. Dr. Tolga TATAR'a

Uzmanlık eğitimim boyunca bilgisinden faydalandığım, insani ve ahlaki değerleri ile de örnek edindiğim, yanında çalışmaktan onur duyduğum ve ayrıca tecrübelerinden yararlanırken göstermiş olduğu hoşgörü ve sabırdan dolayı minnettar olduğum ustam ve ağabeyim Uzm. Dr. Abdullah Özer'e

Tez çalışmamın hazırlanması, tamamlanması ve yazımı aşamalarında, gerek vermiş oldukları destek ve gerekse de değerli yardımlarından dolayı Doç. Dr. Yusuf ÜNAL, Doç. Dr. Mustafa ARSLAN, Yrd. Doç. Dr. Faruk Metin ÇOMU, Yrd. Doç. Dr. Deniz BİLLUR, Yrd. Doç. Dr. Ali Doğan DURSUN'a

Asistanlık döneminin iyi, kötü günlerini beraber geçirdiğimiz tüm asistan arkadaşlarıma,

Ameliyathane, yoğun bakımda gece gündüz beraber mesai yaptığımız tecrübeleriyle bana destek olan tüm sağlık çalışanı iş arkadaşlarıma,

Kendisiyle gurur duyduğum, neşe kaynağım, kız kardeşim Mimar Övgü KILIÇ'a,

Beni bugünlere yetiştiren, kendilerine ne kadar teşekkür etsem de kelimelerin anlamsızlaştığı; bilgi, tecrübe ve sevgileriyle ne zaman ihtiyacım olsa yanıbaşında beliren canım annem ve babama,

Kendisini ilk gördüğüm andan beri beni hep şaşırtmayı başaran, asistanlık eğitimim süresince desteğini ve sabrını eksik etmeyen hayat arkadaşım, eşim Uzm.

Dr. Gaye KILIÇ' a ve onu bugünlere yetiştiren ailesine

Sonsuz sevgi ve saygılarımı sunar, teşekkür ederim.

Dr. Yiğit KILIÇ

İÇİNDEKİLER

Sayfa No

ONAY SAYFASI	i
TEŞEKKÜR	ii
İÇİNDEKİLER.....	iv
SİMGELER VE KISALTMALAR	vii
TABLolar.....	ix
ŞEKİLLER	x
RESİMLER	xi
1. GİRİŞ	1
2. GENEL BİLGİLER.....	4
2.1. İskemi.....	4
2.1.1. Geri Dönüşümlü Zedelenme	6
2.1.2. Geri Dönüşümsüz Zedelenme.....	7
2.2. Reperfüzyon.....	10
2.3. İskemi/ Reperfüzyon Hasarından Korunma Yöntemleri.....	13
2.3.1. İnflamatuar Mediatorler	14
2.3.2. Spesifik kimyasal mediyatörler	15
2.4. Serbest Radikaller	15
2.4.1. Hücresel Hasar Oluşumu	17
2.4.2. Radikallere Karşı Savunma Sistemleri	18
2.5. İskemi Reperfüzyon Sonrası Oluşan İskelet Kası Hasarı	22
2.5.1. Ekstremité İskemi Reperfüzyonunun Patofizyolojisi	23
2.6. İskemi Reperfüzyon Metabolizmaları: Serbest Oksijen Radikalleri.....	27
2.6.1. Lökosit İnfiltrasyonu	29
2.6.2. Fosfolipid Metabolizması	30
2.6.3. Eikosanoid Metabolizması.....	31
2.6.4. Sitokinler	31

2.7. Serbest Oksijen Radikallerinin Yapısı.....	32
2.7.1. Süperoksit Anyonu.....	32
2.7.2. Hidrojen Peroksit.....	32
2.7.3. Hidroksil Radikali.....	33
2.7.4. Hipoklorit.....	33
2.7.5. Nitrik Oksit	33
2.7.6. Peroksinitrit	34
2.8. Antioksidanlar.....	34
2.8.1. Süperoksit Dismutaz	35
2.8.2. Katalaz	35
2.8.3. Glutasyon Peroksidaz.....	36
2.8.4. Glutasyon Redüktaz	36
2.8.5. Glutasyon	36
2.8.6. Glukoz-6-Fosfat Dehidrogenaz	37
2.9. Hasar Mekanizmaları	37
2.9.1. Lipid Peroksidasyonu.....	38
2.9.2. Protein Oksidasyonu	38
2.9.3. DNA Oksidasyonu	39
2.9.4. Kovalent Bağlanma	39
2.9.5. Kalsiyum.....	39
2.10. Pikrozid II	39
3. GEREÇ VE YÖNTEM.....	43
3.1. Araştırmanın Tipi.....	43
3.2. Araştırmanın Yeri ve Zamanı	43
3.3. Etik Kurul Onayı.....	43
3.4. Kullanılan Denek Materyali.....	43
3.5. Denek Grupları ve Uygulama Protokolü	44
3.6. Pikrozid II'nin Hazırlanması ve Uygulanması.....	45
3.7. Cerrahi Yöntem.....	45
3.8. Dokuların Homojenizasyonu	45
3.9. Total Antioksidan Status/ Seviye (TAS) Ölçümü.....	46

3.10. Total Oksidatif Status/ Seviye (TOS) Ölçümü.....	47
3.10.1.Dokuların Hazırlanması ve Işık Mikroskobu İncelemeleri İçin Yapılan Çalışmalar	48
3.10.2.Gastrokinemius Kası İçin Uygulanan Histomorfometrik Çalışma	49
3.10.3.Terminal Deoxynucleotidyl Transferase-Mediated dUTP Nick End-Labeling (TUNEL).....	49
3.10.4.TUNEL Sonuç Değerlendirmeleri.....	50
3.11. İstatistiksel Analiz.....	50
4. TARTIŞMA	67
5. SONUÇLAR	73
6. ÖZET.....	74
7. ABSTRACT.....	75
8. KAYNAKLAR	76
9. EKLER.....	90
Ek-1: Etik Onay	90

SİMGELER VE KISALTMALAR

ACEİ	: Anjiyotensin dönüştürücü enzim inhibitörü
ATP	: Adenozin trifosfat
Ca⁺⁺	: Kalsiyum İyonu
CREB	: cAMP response element binding protein
GSH	: Glutasyon
GSH-Px	: Glutasyon peroksidaz
GSSH	: Glutasyon disulfit
H⁺	: Hidrojen İyonu
HIF-1	: Hipoksi indükleyici faktör – 1(Hypoxia inducible factor-1)
HOCl	: Hipoklorik Asit
H₂O	: Su
H₂O₂	: Hidrojen peroksit
IL	: İnterlökin
IRH	: İskemi reperfüzyon hasarı
ISAM	: İntrasellüler Adhezyon Molekülü
K⁺	: Potasyum İyonu
KAT	: Katalaz
MDA	: Malondialdehit
MODS	: Multipl organ disfonksiyon sendromu
Na⁺	: Sodyum İyonu
Na-K ATP'az	: Sodyum- Potasyum Adenozin Trifosfataz
NF- κB	: Nükleer faktör-kappa B

NO	: Nitrik oksit
O₂⁻	: Süperoksit anyonu radikali
OH⁻	: Hidroksil iyonu radikali
ONOO⁻	: Peroksinitrit
PAF	: Platelet Aktive Edici Faktör
PNL	: Polimorfonükleerlökosit
Se	: Selenyum
Se-OH	: Selenol
SIRS	: Sistemik inflamatuvar yanıt sendromu
SOD	: Süper oksit dismutaz
SOR	: Serbest oksijen radikalleri
SR	: Serbest radikal
TAF	: Trombosit Aktive Eden Faktör
TNF - α	: Tümör nekroz faktör alfa

TABLÖLAR

	Sayfa No
Tablo 1. Oksijen bileşikleri.....	17
Tablo 2. Major endojen antioksidanlar ve etkileri	19
Tablo 3. Sıçanların iskelet kas dokusunda oksidan durum parametreleri [Ort ± SS]	51
Tablo 4. Sıçanların iskelet kas dokusunda TUNEL pozitif hücre verileri [Ort ± SS]	52

ŞEKİLLER

	Sayfa No
Şekil 1. Reversible ve irreversible zedelenme	5
Şekil 2: İskemi Reperfüzyon Kaskad	12
Şekil 3. Pikrozid II molekül formülü.....	40



RESİMLER

	Sayfa No
Resim 1. Picrorhiza kurroa bitkisi.....	40
Resim 2. Kontrol grubuna ait mikrografta çizgili iskelet kası liflerinin enine kesit yüzleri çok kenarlı görünümde izlenmektedir. Kas liflerinin sarkolemmasının altında periferik yerleşimli çekirdekler (ok), sitoplazmada miyofibrillerin enine kesitleri (asterisk) gözlenirken kas liflerinin oluşturduğu fasikülleri çevreleyen perimisyum (P) içinde kan damarları (ok başı) dikkat çekmektedir. H&Ex200.	55
Resim 3. Pikrozid grubuna ait mikrografta çizgili iskelet kası liflerinin enine kesit yüzleri çok kenarlı görünümde izlenmektedir. Kas liflerinin sarkolemması altında periferik yerleşimli çekirdekler (ok) kas liflerinin oluşturduğu fasikülleri çevreleyen perimisyum (P) içinde kan damarları (ok başı) görülmektedir. H&Ex200.	56
Resim 4. I/R grubuna ait mikrografta kas liflerinin enine kesit yüzlerinin yuvarlak şekil aldığı (ok), lifler arasında endomisyum mesafesinin artışı (yıldız), kas liflerinde ileri derecede atrofi (kuyruklu ok) görülmektedir. H&Ex200.....	57
Resim 5. I/R grubuna ait mikrografta liflerinin enine kesitlerinde kesit yüzlerinin yuvarlak şekil alması, çekirdeğin orta duruşlu yerleşimi(ok), kas liflerinde ileri atrofi izlenmektedir. H&E x400.....	58
Resim 6. I/R grubuna ait mikrografta kas liflerinin enine kesitlerinde bazı kesit yüzlerinin yuvarlak şekil alması (ok), kalınlaşan perimisyumda (P) damar (ok başı) ve periferik sinir kesitleri (kuyruklu ok) ile mononükleer hücre infiltrasyonu (kalın ok) izlenmektedir. H&Ex200.	59
Resim 7. I/R+Pikrozid grubuna ait mikrografta kas liflerinin enine kesit yüzlerinin yuvarlak şekil alması (ok başı), çekirdeğin orta duruşlu yerleşimi (ok), kas lifleri arasında mononükleer hücre infiltrasyonu (kuyruklu ok) izlenmektedir. Bazı alanlarda ise	

normal görünümde çok yüzlü kesit yüzeyi gösteren kas lifi kesitleri (asterisk) görülmektedir. H&E x200..... 60

Resim 8. I/R+Pikrozid grubuna ait mikrografta kas liflerinin yuvarlak şekil alması (ok başı), kas lifleri arası alanda genişleme (yıldız), atrofik kas lifleri (ok) izlenmektedir. Bazı alanlarda ise normal görünümde çok yüzlü kesit yüzeyi gösteren kas lifi kesitleri (asterisk) görülmektedir. H&E x200..... 61

Resim 9. Kontrol grubuna ait mikrografta TUNEL boyama ile immunreaksiyon gösteren az sayıda hücre çekirdeğinde kahverengi boyanma gözlenmektedir. Büyütme: x400..... 62

Resim 10. Pikrozid grubuna ait mikrografta TUNEL boyama ile immunreaksiyon gösteren az sayıda hücre çekirdeğinde kahverengi boyanma izlenmektedir. Büyütme: x400 63

Resim 11. I/R grubuna ait mikrografta TUNEL boyama ile immunreaksiyon gösteren apoptotik hücre çekirdekleri (kahverengi boyanma) görülmektedir. Büyütme: x400 64

Resim 12. I/R + Pikrozid grubuna ait mikrografta TUNEL boyama ile immunreaksiyon gösteren apoptotik hücre çekirdekleri (kahverengi boyanma) görülmektedir. Büyütme: x400 65

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⁾ Morbidite ve mortalite riskini azaltmak adına, İRH'nin önlenmesi ve/veya negatif sonuçlarının en aza indirilmesi amacıyla değişik tedavi yöntemlerinin geliştirilmesi önemli bir araştırma alanı olmuştur.

İskemi, herhangi bir organın beslenmesi için sunulan gerekli kan miktarının azalması veya tamamen kesilmesi sonucu oluşan durumdur. İskemik dokularda enerji anaerobik metabolizma yoluyla sağlanmaya çalışılır ve oluşan metabolitler doku perfüzyonu olmadığından doku içinde birikir. Hipoksi sürdükçe hücre içi asidozis gelişir. Hücre zarındaki Adenozintrifosfat (ATP) bağımlı Sodyum-Potasyum Adenozin Trifosfataz (Na-K ATP'az) pompasındaki yetmezlik sonucu hücre içerisine kalsiyum iyonu (Ca^{++}), sodyum iyonu (Na^{+}) ve beraberinde su (H_2O) girmesi sonucu hücresel geçirgenlik bozulur.

Reperfüzyon ise iskemik dokuda kan akımının yeniden sağlanmasıdır. İskemi sonrasındaki reperfüzyon, inflamatuvar yanıt ile ilişkili intrasellüler adhezyon molekülü (ISAM), interlökin 1-beta ($IL-1\beta$), $IL-8$, tümör nekrozis faktör alfa ($TNF-\alpha$) gibi birçok transkripsiyon faktörlerini aktive eder. Reperfüzyon sonrası kan akımının yeniden sağlanması ise metabolitlerin oksidasyonu sonucu oluşan maddeler sistemik dolaşım ile tüm vücuda yayılır.⁽²⁾ İskemik alana oksijenin sunumu sonucu oluşan en önemli toksik madde serbest oksijen radikalleri

(SOR)'dir.⁽³⁾ Normal fizyolojik koşullarda, SOR oluşumu ve koruyucu antioksidan mekanizmaları denge halindedir. Antioksidan savunma sistemleri yetersiz olursa SOR miktarı artar ve şiddetli reperfüzyon hasarı oluşur. 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) dirençliyen 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, 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 inducible factor-1 (HIF-1)) çekirdek translokasyonu / stabilizasyonu gibi hücre metabolizması ve iskelet yapısını ilgilendiren birçok değişime neden olur.^(4,5) Reperfüzyon sonrası iskemik doku hasarının geri dönüşümlü veya geri dönüşümsüz olduğunu mitokondriyal disfonksiyon ve hücre zarı hasarının şiddeti belirler.⁽⁶⁾ Dolayısıyla uzun süreli iskemi reperfüzyonla şiddetlenen ciddi hücre hasarına neden olarak hücre ölümüyle sonuçlanır.^(7,8) Reperfüzyon hasarı ilk kez 1975 yılında Cerra tarafından tanımlanmıştır.⁽⁹⁾ İskemiye bağlı hasarın geri döndürülebilmesinde doku reperfüzyonu mutlak olmakla birlikte, paradoksal olarak, reperfüzyon sonrası sağlanan oksijen ve metabolitler doku hasarının artışına neden olur. Reperfüzyona bağlı hasarın karakteristik özellikleri hücresel şişme, hücre iskeleti değişiklikleri ve seçici mikrovasküler geçirgenlik kaybıdır. Bu

mekanizmalar, kapiller kan akımında azalmaya ve doku ödemeine neden olur.⁽¹⁰⁾ IRH'na bağı 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 bağı arteriolar vazodilatasyon bozukluğu, inflamatuvar ve adezyon molekülleri artışına bağı arteryel kılcallarda kapanma ("no reflow") ve lökosit birikimine (artmış oksidatif hasar) bağı venöz kapillerlerde geçirgenlik artışı ve doku ödemi görülür.⁽⁴⁾

Reperfüzyonla birlikte sistemik dolaşıma çıkan inflamatuvar aracılar, uzak organ endotel hücre aktivasyonu ve mikrovasküler disfonksiyona neden olurlar. Ksantin oksidaz, lökosit-endotel etkileşimi ve inflamatuvar aracılar IRH'na bağı uzak organ hasarında, önemli rol oynar. Yaygın uzak organ hasarı durumunda yüksek mortalite ile seyreden Multi Organ Fonksiyon Bozukluğu (multiple organ dysfunction syndrome; MODS) veya Sistemik İnflamatuvar Yanıt Sendromu (systemic inflammatory response syndrome; SIRS) gelişebilir.⁽⁷⁾

Pikrozid II, $C_{23}H_{28}O_{13}$ moleküler formüllü bir glikozit türevidir. Pikrozid II antioksidan, nöroprotektif, antienflamatuvar, gastrointestinal septomlarda kullanılmış olsa da etkinliği henüz kesinleşmemiş olup araştırmalar devam etmektedir.

Bu çalışmanın amacı intraperitoneal olarak uygulanan Pikrozid II'nin deneysel alt ekstremitte iskelet kası iskemik reperfüzyon hasarı üzerindeki etkinliğini değerlendirmektir.

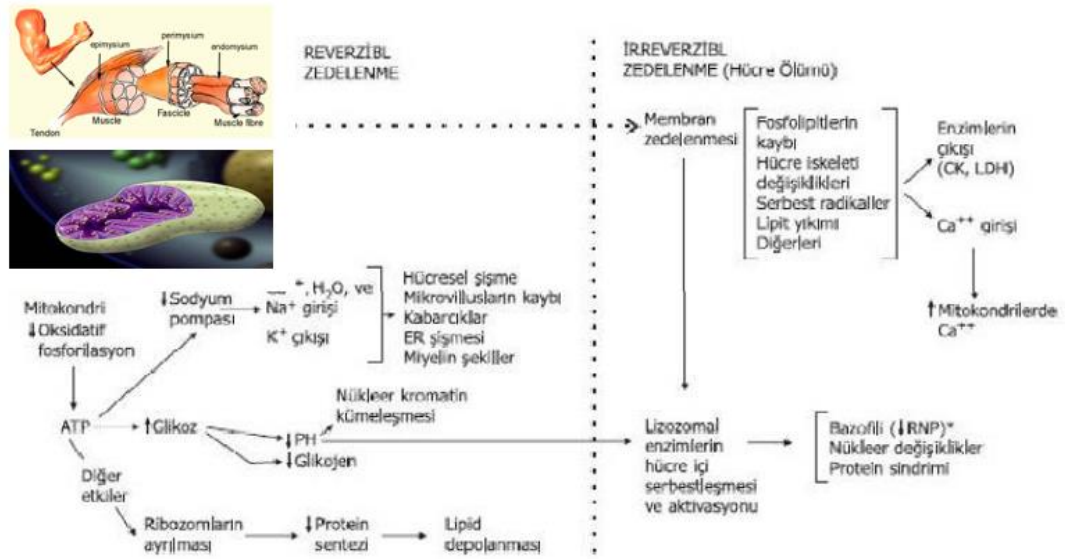
2. GENEL BİLGİLER

2.1. İskemi

İskemi, perfüzyon yetersizliğine bağlı olarak, dokuya gerekli olan oksijen ve diğer metabolitlerin dolaşım tarafından karşılanamaması ve meydana gelen artık ürünlerin yine dolaşım ile buradan uzaklaştırılamaması olarak tanımlanır. Hipoksi ise dokuya yetersiz oksijen ulaşması şeklinde tarif edilebilir. Hipoksinin en sık görülen nedeni iskemidir.⁽¹¹⁾ İskemi ve hipokside aerobik metabolizma devam edemediğinden mitokondrideki oksidatif fosforilasyon engellenir. ATP, kreatinin gibi yüksek enerjili fosfat sentezi azalır.⁽¹²⁾ Anaerobik glikoliz sonucu oluşan laktik asit ve hasarlanmış lizozomlardan salınan hidrojen (H^+) iyonu ile hücre içi pH düşer. ATP oluşumu yavaşlar ve durur. ATP azlığı, hücre zarında aktif Na-K ATP'az pompasında yetmezliğe neden olarak hücre içinde Na^+ tutulmasına ve hücre dışına potasyum iyonu (K^+) atılmasına neden olur. Solid madde birikimine izo osmotik su birikimi eşlik eder ve hücre sel şişme meydana gelir. ATP sentezinin azalması sonucu glikoliz aktivitesinin artmasıyla redüksiyon sistemleri aktive olur. Hücre içi Na^+ artması sonucu Ca^{++} artar.⁽¹³⁾ Hücre içi Ca^{++} 'un artması, fosfolipazlar (fosfolipaz A_2), proteazlar (kalpainler) ve endonükleazlar gibi enzimleri aktifleştirir. Fosfolipazenzim aktivitesinin artması ile membran fosfolipidleri parçalanır ve katabolik ürünler birikir. Proteaz enzim aktivitesinin artması ile membran ve hücre iskelet proteinleri parçalanır. Endonükleaz enzim aktivitesinin artması ile nükleer kromatin hasarı meydana gelir. Hücre içi Na^+ miktarının, fosfolipaz ve proteaz aktivitesinin artması ve ATP sentezinin azalması sonucu plazma membran permeabilitesi artar. Mitokondri permeabilitesi de artar ve

mitokondriyal membran potansiyeli kaybolur. Tüm bu olaylar neticesinde anoksik hasar, nekrotik hücre ölümüne neden olur.⁽³⁾

Kritik iskemi zamanı, doku canlılığının sürdürebildiği maksimum iskemi süresi olarak tarif edilir. Hücrenin metabolik aktivitesi ve adaptasyon mekanizmalarına göre kritik iskemi süresi farklılık göstermekle birlikte uzun süreli iskemide geri dönüşümsüz hasar ve nekroz kaçınılmazdır. Hipoksi sonucunda gelişen mitokondri fonksiyon bozukluğu ve hücre zarı hasarının doku oksijenasyonunun yeniden sağlanmasına rağmen düzeltilememesi geri dönüşümsüz hasarın en önemli göstergesidir.⁽⁴⁾



Şekil 1. Reversible ve irreversible zedelenme

2.1.1. Geri Dönüşümlü Zedelenme

Hipoksi, öncelikle mitokondrilerdeki oksidatif fosforilasyonu etkiler. Bu da ATP ve fosfokreatin depolarında azalmaya sebep olur. Mevcut ATP sırasıyla adenzindifosfat, adenzinmonofosfat, inozin ve hipoksantin'e yıkılır. Oluşan ve biriken bu metabolitler fosfofruktokinaz enzimini uyarır. Hücresel metabolizmanın anaerobik yöne kaymasına neden olur. Bu, daha fazla glikojen kullanımı ve daha az ATP üretimi (aerobik solunumla elde edilen miktarın yaklaşık %7'si) ile sonuçlanır.⁽¹⁵⁾ Dolayısıyla doku glikojen depoları süratle boşalır. İskeminin devamıyla hipoksantin ve anaerobik glikoliz ürünlerinin (laktik asit, hidrojen iyonu, inorganik fosfatlar) hücre içinde birikimi, asidozda artış ve dolayısıyla enzim ve protein hasarı oluşur.⁽¹⁶⁾ ATP depolarındaki azalma, ATP bağımlı hücre zarı pompalarında fonksiyon bozukluğuna yol açarak hücre dışı potasyum kaybı ve hücre içi ani sodyum kalsiyum-klorür artışına, ikincil hücresel şişmeye sebep olur. Bu hidropik değişiklik, inorganik fosfatlar, laktik asit ve pürin nükleotidleri gibi metabolitlerin birikimi sonucu artan osmotik yükü daha da belirginleştirir.⁽¹⁷⁾ Hücresel şişme, makroskopik olarak organ rengine solma ve ağırlığında artışla, mikroskopik olarak ise sitoplazmada berrak vakuoller oluşumuyla (hidropik değişiklik/vakuoler dejenerasyon) kendini gösterir.⁽⁵⁾ 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.⁽⁵⁾ Doku iskemisi sırasında başka birçok mekanizma daha aktive olur. Nükleer faktör-kappa B (NF- κ B) aktivasyonu ile, iltihabi aracılardan ve adezyon moleküllerinin (özellikle ICAM-1 ve E-selektin) sentezinde artış olur. Adezyon moleküllerindeki bu artış, iltihabi iskemik alan lökosit adezyonunu artırır. Endotel tarafından sentezlenen NO inaktivasyonu vazokonstriksiyona neden olur. Araşidonik asit kaskadında dengenin prostasiklin aleyhine dönmesi ise hem vazokonstriksiyon hem de platelet aktivasyonu ile sonuçlanır. Oksijen NO sentezi için de gerekli olup, iskemik dokuda NO seviyesinde azalma görülür. Bunlara ek olarak kompleman sistemi 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.⁽¹⁸⁾

2.1.2. Geri Dönüşümsüz Zedelenme

Kritik iskemi zamanı, doku canlılığının sürdürülebildiği maksimum iskemi süresi olarak tanımlanır. Ortalama kritik iskemi süresi ise, %50 doku kaybına neden olan iskemik zaman dönemidir. Hücrenin metabolik aktivitesi ve adaptasyon mekanizmalarına göre kritik iskemi süresi farklılık gösterir. Bununla birlikte uzun süreli iskemide geri dönüşümsüz hasar ve nekroz kaçınılmazdır.^(4,11) Geri

dönüşümsüz hasarın en önemli göstergesi hipoksi sonucunda gelişen mitokondri fonksiyon bozukluğu (oksidatif fosforilasyon yetersizliğine bağlı ATP depolarında azalma) ve hücre zarı hasarının doku oksijenasyonunun yeniden sağlanmasına rağmen düzeltilememesidir.^(6,19)

Bu dönemde mitokondriyal vakuolizasyon artışı ve matriks içi kalsiyum 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 hasarıyla lizozomal enzimler sitoplazma içerisine sızar. Asit hidrolazlar, düşük sitoplazmik pH'da, tüm hücresel elemanların enzimatik yıkımına yol açar. Lizozomal sindirim, hücre ölümü sonrası, interstisyel alanda dahi devam eder. Sonrasında ölü hücreler fosfolipid kitleler şekline dönüşerek “myelin şekiller” olarak tanımlanırlar. Bu fosfolipid kitleler yağ asitlerine parçalanır veya fagositoza uğrayarak ortadan uzaklaştırılır. Oluşmuş yağ asitlerinin kalsifikasyonu ile kalsiyum sabunları oluşur. Spesifik doku hasarı tespitinde hücrelere has proteinlerin hücre zarı hasarı veya hücre ölümüyle sistemik dolaşıma geçmesi ve bunların kan serum örneklerinde gösterilmesi önemlidir. Örnek vermek gerekirse, miyokard infarktüsü tanı ve takibinde miyokard dokusuna özgü kreatin kinaz ve troponin izoformu ölçümleri fikir vericidir.⁽⁵⁾

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 reaksiyon ve sentez azalması) sonucunda azalır.

b) Hücre iskelet anormallikleri: Hücre zarının iskeletten ayrılıp yırtılması, artmış hücre içi kalsiyum ile aktiveleşen 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 geçirgenliğidir. Artan hücre zarı geçirgenliği hacim regülasyon bozukluğu, hücre içi ve dışına makromoleküllerin artmış hareketi ve hücre zarı yapısal bozukluğuna neden olur.⁽²⁰⁾ 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 artışa 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), ATP'azlar (ATP yıkımı) ve endonükleazlar (kromatin yıkımı)] aktivasyon oluşturur.⁽²¹⁾ 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 mikroskopunda

görülebilen, hücre ölümü ancak 10-12 saatte belirgin hale gelir.⁽⁵⁾

Özet olarak geri dönüşümsüz zedelenme;

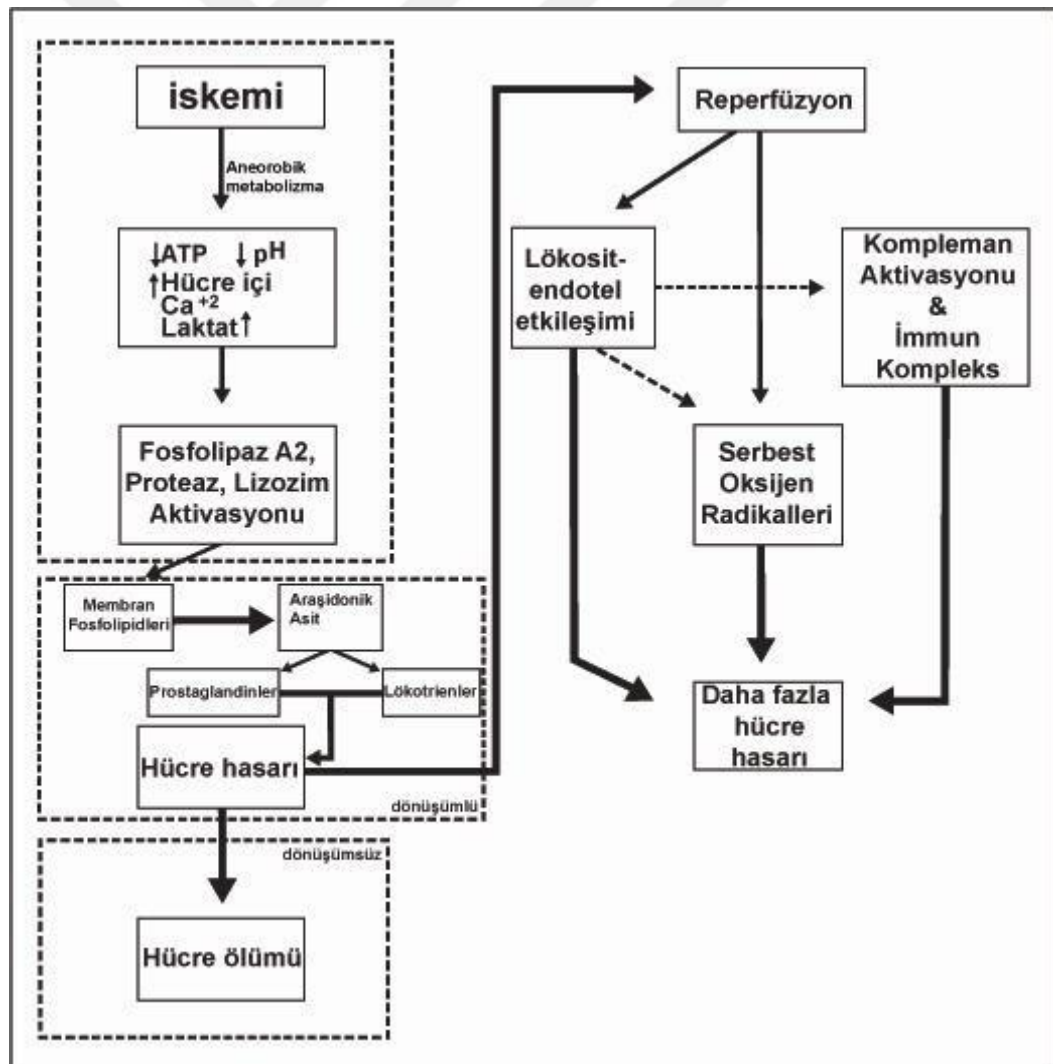
- i) Hücre zarı hasarı sonucu protein, enzim, koenzim, ribonükleik asit ve yüksek enerjili fosfat kaybı,
- ii) Mitokondri matriksinde amorf, düzensiz kalsiyum yoğunluklarının birikimi,
- iii) Lizozomal zarlarda hasar ve lizozomal enzimlerin sitoplazmaya çıkması sonucu organellerin sindirilmesi, ölü hücrelerin fagositozu veya yağ asitlerine dönüşümü, yağ asitlerinin kalsifikasyonu ve kalsiyum sabunu oluşumu ile karakterizedir.⁽²²⁾

2.2. Reperfüzyon

İskemik dokuda, hem hücrenin rejenerasyonu, hem de toksik metabolitlerin uzaklaştırılması için, yeniden kan akımı sağlanmalıdır. Reperfüzyon, iskekiye neden olan etkenin ortadan kaldırılarak dokuya kan akımının yeniden ulaştırılmasıdır. İskemik hasarın düzeltilebilmesi için reperfüzyon gereklidir. Ancak oksijenize kanın iskemik dokuya dönüşü dokuyu daha da fazla zedeleyen bir süreci başlatır. İskemik dokunun reperfüzyonu bir dizi olayın başlaması ile paradoksal doku hasarına yol açar.⁽²³⁾ Reperfüzyon sürecinde oluşan hasarın büyüklüğü iskemi süresi ve şiddeti ile doğru orantılıdır. 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.⁽²³⁾ Şok, yanık,

sepsis, pankreatit gibi olgularda ortaya çıkan hipovolemi ile iskemi ve bu durumların düzeltilmesi ile de reperfüzyon hasarı ortaya çıkmaktadır.^(23,24) Serebrovasküler olaylarda, miyokard enfarktüsünde uygulanan trombolitik tedavi veya revaskülarizasyon ameliyatları da yine reperfüzyon hasarına neden olmaktadır.⁽²³⁾ 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.^(23,24) 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.⁽²³⁾ Daha önce de belirtildiği gibi iskemik dokuların reperfüzyonu, toksik SOR oluşumuna yol açar. Bunlar süperoksit anyonlar (O_2^-), hidroksil radikalleri (OH^-), hipoklorik asit ($HOCl$), hidrojen peroksit (H_2O_2) ve nitrik oksitten derive peroksinitritir.⁽²⁴⁾ Oksijen kökenli serbest radikal (SR) aracılığı ile oluşan hasarda ilk basamak, ksantin oksidaz kökenli O_2^- anyonlarının üretilmesidir.⁽²⁵⁾ İskemi sırasında hücrel ATP, hipoksantin oluşturmak üzere indirgenir. Normal koşullarda hipoksantin, ksantin dehidrogenaz yardımıyla ksantine oksidize edilir. Ancak iskemi sırasında ksantin dehidrogenaz, ksantin oksidaza dönüştürülür. Substrat olarak nikotinamid adenin dinükleotid kullanan ksantin dehidrogenazın tersine, ksantin oksidaz oksijeni kullanır ve bundan dolayı iskemi sırasında hipoksantin ksantine dönüşümünü katalize

edemez ve bu da hipoksantin dokuda aşırı seviyelere çıkmasına yol açar. Reperfüzyonla oksijen tekrar sunulduğunda, fazla miktardaki hipoksantin ksantin oksidaz ile dönüştürülmesi toksik SOR oluşumu ile sonuçlanır.⁽²⁴⁾ Sellüler ve subsellüler membranların lipid peroksidasyonu da, oksijen kökenli SR'in artırdığı hücre hasarında önemli bir mekanizmadır.⁽²⁶⁾ 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 O_2^- ile de başlatılabilir.⁽²⁷⁾



Şekil 2: İskemi Reperfüzyon Kaskad

İskemik dokunun reperfüzyonu ile toksik metabolitler uzaklaştırılır. Ancak, bu kısmen oksijenasyonu azalmış metabolitlerin sistemik dolaşıma geçmesi sonucu hücrenin membranı ve diğer yapılarında hasara neden olur. Toksik oksijen türevlerinin büyük ölçüde reperfüzyon sırasında iskemi alanına infiltrate olan polimorfonükleer lökosit (PNL) tarafından yapıldığı düşünülmektedir.⁽²⁸⁾ Reperfüzyon oluşmazsa öldürücü iskemik hasar gelişir fakat toksik oksijen türevleri görülmez.

Reperfüzyonu takiben inflamatuvar yanıt meydana gelir.⁽²⁹⁾ İnflamatuvar yanıtta endotel hücreleri, nötrofiller, makrofajlar, lenfositler, plateletler aktive olur. Koagülasyon kaskadının aktivasyonu ve mediatörlerin salınımı sonucu mikrovasküler perfüzyon disfonksiyonu oluşur. Reaktif oksijen molekülerinin oluşumu artar.

2.3. İskemi/ Reperfüzyon Hasarından Korunma Yöntemleri.⁽³⁾

1. Kademeli reperfüzyon
2. İskemik önkoşullama (preconditioning)
3. Nötrofillerin temizlenmesi
4. Hipoksik reperfüzyon
5. Antioksidanlar
 - a. SOD
 - b. Katalaz
 - c. Tioller
 - d. E vitamini

6. İlaçlar ve diğer terapötik girişimler

- a. Kalsiyum antagonistleri
- b. Anjiyotensin dönüştürücü enzim inhibitörü (ACEİ)
- c. Allopurinol
- d. Demir şelasyon
- e. Fosfokreatin
- f. Lidoflazin

2.3.1. İnflamatuar Mediyatörler

İnflamatuar yanıtı aracılık eden kimyasal mediyatörlerden ilk keşfedilene histamindir. Günümüzde ise bu araçların sayıları giderek artmaktadır. Mediyatörler, hasarlı dokudan, hücrelerden veya plazmadan köken alan çeşitli kimyasal maddelerdir. Bunların bazı genel özellikleri şunlardır:⁽³⁰⁾

1. Plazmadan kaynaklı mediyatörler (örn. komplemanlar) biyolojik olarak aktif hale geçmek için bazı proteolitik değişikliklere uğrarlar. Sellüler mediyatörler normalde granüllerde bulunur ve ihtiyaç olduğunda salınır veya sentez edilirler (örn. prostoglandinler).
2. Aktivasyon veya salınma sonrasında çoğu kimyasal değişikliğe uğrar (örn. araşidonik asit metabolitleri) veya inaktive edilir (örn. Bradikininin kininaz ile inaktivasyonu).
3. Hedef hücredeki spesifik reseptörler aracılığıyla aktivite gösterirler.
4. Hedef hücrede aynı veya karşıt etkili sekonder mediyatör çıkışını uyarabilirler.

2.3.2. Spesifik kimyasal mediyatörler

1. Vazoaktif aminler: Histamin, serotonin
2. Plazma proteazları
 - a. Kininler
 - b. Kompleman sistemi
 - c. Koagülasyon-fibrinolitik sistem
3. Araşidonik asit metabolitleri
 - a. Siklooksijenaz yolu
 - b. Lipoksijenaz yolu
4. Lökosit ürünleri
5. Trombosit Aktive Eden Faktör (TAF)
6. Sitokinler
7. Growth Faktörler
8. Diğer mediyatörler

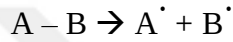
2.4. Serbest Radikaller

Serbest oksijen radikalleri, tüm aerobik hücrelerde oluşan, moleküler oksijen ve onun parçalarını içeren, dış yörüngelerinde bir veya daha fazla eşlenmemiş elektron bulunan, bu nedenle çok reaktif olan, stabil olmamaları nedeniyle çok kısa ömürlü olan yapılardır.⁽³¹⁾ Stabil olmayan yapıları nedeniyle diğer moleküllerle kolaylıkla elektron alışverişi yaparak onların kararlı yapılarını bozarlar.⁽³²⁾ Elektriksel yükleri pozitif, negatif veya nötr olabilir ve diğer moleküllerle reaksiyona girme olasılıkları, elektriksel yüklerine bağlıdır.⁽³³⁾ Hücre

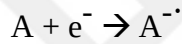
bileşenlerinin yapılarında değişiklik oluşturarak hücre ölümüne dahi neden olabilirler. Serbest radikallerin oluşum ve yıkım hızı dengede kaldığı sürece organizmada hasar oluşturmazlar.^(34,35)

Serbest radikaller üç şekilde meydana gelmektedir: ⁽³⁾

- a. Homolitik ayrılma: Molekülün kovalent bağının ayrılması sonucu her iki atomun, bağı oluşturan elektronlardan birini alması:



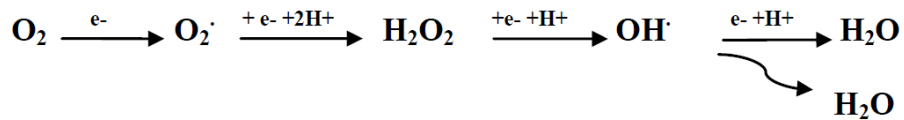
- b. Normal bir moleküle elektron eklenmesi:



- c. Normal bir molekülden elektron kaybı:



Serbest oksijen radikalleri, moleküler oksijen ile H₂O arasındaki reaksiyonda üç ara basamakta oluşur. Bir elektronun oksijene transferi ile süperoksit radikali oluşur. Oksijen, iki elektron ve iki hidrojen ile reaksiyona girerek hidrojen peroksit (H₂O₂) oluşturur. İki süperoksit molekülü iki hidrojenle reaksiyona girerek H₂O₂ ve oksijen oluşturur.



Tablo 1. Oksijen bileşikleri⁽³⁾

Reaktif Oksijen Bileşikleri	Reaktif Olmayanlar
O_2^- : Süperoksit	H_2O_2 : Hidrojen Peroksit
$\cdot OH$: Hidroksil	O_2 : Singlet Oksijen
HO^- : Hidroperoksil	$HOCl$: Hipokloröz Asit
RO^- : Alkoksil	$ONOO^-$: Peroksinitrit Radikali
ROO^- : Peroksil	O_3 : Ozon
NO^- : Nitrik Oksit	$LOOH$: Lipid Hidroperoksit
NO_2^- : Azot Dioksit	

2.4.1. Hücresel Hasar Oluşumu

Serbest oksijen radikalleri, apoptozis ve hücre nekrozunu uyarabilir. Hücre membranları doymamış yağ asitlerinden zengindir ve radikaller tarafından hasara uğratılır. Membran yapısının değişmesi sonucu akışkanlık kaybı, elektriksel gradient kaybı ve zar fonksiyonlarında bozulmalar oluşur.^(6,36,37)

Proteinler ve nükleik asitler doymamış yağ asitlerine göre daha az hasara uğramaktadır. Proteinlerin oksidasyonu ile yapı ve fonksiyonları önemli ölçüde değişmektedir. Aşırı miktardaki serbest radikaller kardiyomiyositlerin homeostazisinde önemli rol alan pek çok proteini etkilemektedir. Membran iyon kanallarındaki değişiklik sonucu K^+ , Ca^{++} ve daha az olarak Na^+ geçirgenliğinde değişiklikler oluşmaktadır. Na^+/Ca^{++} değişimi SOR varlığında uyarılabilmektedir.

Na^+-K^+ ATP'az ve Ca^{++} ATP'az aktiviteleri oksidatif strese azalmaktadır. Kontraktil proteinlerin oksidatif modifikasyonu hemodinamik yetmezlikle sonuçlanır. Protein oksidasyonu sonucu glutatyon sentetazda azalma, protein karbonilde artış gözlenmektedir.^(6,36,37) İyonize edici serbest radikaller DNA'yı etkileyerek hücrede mutasyon ve ölüme yol açabilir.^(36,38,39) Hücresel makro

moleküllerdeki hasarlanma mekanizmaları şunlardır:

1. Lipid peroksidasyonu
2. Protein oksidasyonu
3. DNA
4. Kovalen bağlanma
5. Kalsiyum

2.4.2. Radikallere Karşı Savunma Sistemleri

Memeli hücrelerini oksidanlara karşı savunan beş mekanizma önemlidir: ^{(36,}

40)

1. Metal iyonlarının bağlanması ile toksik radikal oluşumunun önlenmesi
2. Oluşan radikallerin toplanması ve bastırılması
3. Radikal zincir reaksiyonlarının kırılması
4. Hedef molekülün hasar sonrası tamiri veya tamir edilemeyecek durumdaki moleküllerin uzaklaştırılması
5. Antioksidan kapasitenin artırılması

Tablo 2. Major endojen antioksidanlar ve etkileri⁽³⁶⁾

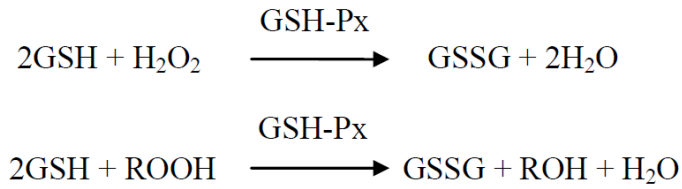
Adı		Etkisi
SOD -Cu, ZnSOD -MnSOD	Sitoplazma Hücre yüzeyi Mitokondri	Oksijenin hidrojenperoksit'e dismutasyonunu katalizler $2O_2^- + 2H^+ \rightarrow H_2O_2 + O_2$
Katalaz	Peroksizom Mitokondri membranı	$H_2O_2 \rightarrow 2H_2O + O_2$
Glutasyon peroksidaz	Sitoplazma	$H_2O_2 + 2GSH \rightarrow 2H_2O + GSS$ H
Glutasyon	Hücre içi	Hücre sel indirgen
Koenzim Q10	Hücre membranı	Aktif elektron taşıyıcısı
E vitamini (α- tokoferol)	Sitoplazma ve plazma	Lipid peroksidasyon zincirlerini kırma ve LDL reaksiyonu
β karoten (pro-vitamin A)	Plazma	LDL oksidasyonunun inhibisyonu
C vitamini (askorbik asit)	Sitoplazma ve plazma	Antioksidan olarak direkt veya E vitamini için kofaktör olarak

Antioksidanlar iki gruba ayrılır: ⁽³⁾

1. Enzimatik olanlar: Süperoksit dismutaz (SOD), katalaz, glutasyon peroksidaz
2. Enzimatik olmayanlar: C vitamini, E vitamini, melatonin, bazı β -blokerler (metoprolol, karvedilol), amiodaron, karotenoidler, tiyol antioksidanlar (glutasyon, tiyoredoksin ve lipoik asit), naturel flavanoidler

2.4.2.1. Glutasyon peroksidaz

Daha çok sitozollerde bulunur. H₂O₂ ve organik peroksitleri redükte ederek membran lipidlerini ve hemoglobini oksidatif hasara karşı korur. Glutasyon peroksidazlar (GSH-Px) peroksitlere iki elektron ekleyerek selenoller (Se-OH) oluştururlar. Selenoenzimler, antioksidan özellikleri sayesinde peroksitleri Fenton reaksiyonu aracılığıyla elimine ederler. GSH-Px'in aracılık ettiği katalitik reaksiyonun substratları H₂O₂ ve organik peroksit ROOH'dır.⁽⁴⁰⁾



GSH-Px, fagositik hücrelerde önemli görevlere sahiptir. Eritrositlerde oksidatif strese karşı en etkin antioksidandır. GSH-Px aktivitesindeki azalma, H₂O₂'nin artmasına ve şiddetli hücre hasarına neden olur.⁽⁴¹⁾

2.4.2.2. Glutasyon

Tiyol grubu antioksidanlardan biridir. Tripeptit yapıda olup sitozol, çekirdek ve mitokondride yüksek oranda bulunur. Redükte formu GSH (glutasyon); okside formu GSSH (glutasyon disulfid)'dir. GSH çekirdekte DNA yapımı ve onarımı için gerekli olan sülfhidril proteinlerinin redükte durumunun sürdürülmesinde görev alır.⁽⁴⁰⁾

2.4.2.3. Süperoksit dismutaz (SOD)

Başlıca endojen antioksidan olarak görev yapar. Oksijen üreten tüm mikroorganizmalarda bulunan metalloproteindir ve oksijen tüketimi yüksek dokularda aktivitesi artmıştır. Substratı olan süperoksitin H_2O_2 ve moleküler oksijene dönüşümünü sağlar.⁽³⁾

İnsanlarda SOD'ın üç tipi vardır:

4SOD1: Cu-Zn-SOD: Sitoplazmada bulunur.

SOD2: Mn-SOD: Mitokondride bulunur ve antitümör aktivitede etkindir.

SOD3: ES-SOD: Ekstrasellüler sıvıda bulunur. Heparin ve heparin sülfat gibi glukozaminoglikanlara afinitesi yüksektir. Memeli dokularında regülasyonu primer olarak sitokinlerce sağlanır.

SOD aktivitesi ile ortaya çıkan hidrojen peroksit H_2O_2 'ya GSH-Px veya katalaz tarafından dönüştürülür. SOD aktivitesinde artış olduğunda nötralizasyon için gerekli GSH-Px aktivitesinin de artması gerekir. Bu enzimlerin aktivitelerinin denge içinde sürdürülmesi hücreyi oksidatif hasardan korur. SOD, hücredeki SOR toksisitesinin düzenlenmesinde önemli rol oynar. Süperoksit iyonlarının artmış oluşumuna yanıt olarak SOD aktivitesi artar. Bu enzimlerin aktiviteleri arasındaki dengesizliklerin hücrelerdeki oksidatif stresi yansıttığı öngörülmektedir.

2.4.2.4. Katalaz

Bütün memeli hücrelerinde bulunan peroksizom enzimidir. Aktif merkezinde dört adet hem grubu içeren tetramerik yapılı bir hemoproteindir. Hidrojen peroksiti H_2O ve moleküler oksijene metabolize ederek reperfüzyon

hasarından korur, lipid peroksidasyonunu ve vasküler hasarı baskılar.⁽¹³⁾ Uzun süreli İ/R’de antioksidan enzim eksikliğinin kompanse edilememesine bağlı olarak bu enzimin aktivitesinde azalma ve hasar oluşur.

2.4.2.5. Malondialdehit (MDA)

Lipid peroksidasyonunu değerlendirmekte kullanılan ve serbest radikal hasarını gösteren bir lipid peroksidasyon yan ürünüdür. Üç veya daha fazla çift bağ içeren yağ asitlerinin peroksidasyonu sonucu meydana gelir. Günümüzde oksidatif stresin bir belirteci olarak kullanılmakta olup, doku hasarının en iyi göstergesidir.⁽³⁶⁾

Hücre membranları yağ asitleri ve fosfolipidlerden oluşmaktadır. Serbest oksijen radikalleri, lipid peroksidasyonuna yol açarak fonksiyonel ve yapısal değişikliklere neden olabilir. Lipid peroksit, hücre membranlarında rüptür, iyon kanallarında ve pompalarda değişikliğe neden olur. İntrasellüler Ca^{++} konsantrasyonundaki artış, Ca^{++} bağımlı fosfolipaz, proteaz ve endonükleaz gibi bazı enzimlerin aktivasyonuna neden olmaktadır.

2.5. İskemi Reperfüzyon Sonrası Oluşan İskelet Kası Hasarı

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 uygulaması sonrası ödem oluştuğunu, 1945’de ise Dennis, oluşan bu ödeme fasyotomi ile müdahalenin klinik düzelme sağladığını göstermişlerdir. Ancak

fasyotomi popülerliğini, 1964’de Patven, Pavlos ve Shires tarafından 76 iskemik alt ekstremite hastasında kas ödemiini çözmek için kullanıldığında elde etmiştir.⁽⁴²⁾ 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 tariflenmiştir. İkinci Dünya Savaşı sonrası Bywaters tarafından yayınlanan geniş bir seride ekstremite ezilmesini takiben oluşan böbrek yetmezliği tablosu ile reperfüzyon hasarı üzerinde durulmuştur.⁽⁴²⁾ İskemik ekstremite revaskülarizasyonu ile oluşabilecek risk, ilk kez 1960 yılında Haimovici tarafından “Miyonefropatik-metabolik Sendrom” olarak tariflenmiştir.⁽⁴³⁾ 1969 yılında, iskemik ekstremite revaskülarizasyonunu takiben %85’lik mortalite tariflenmiş olup Haimovici’den farklı olarak mortalitenin kardiyopulmoner nedenlere bağlı olduğu gözlenmiştir.⁽⁴⁴⁾

2.5.1. Ekstremitte 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.⁽⁴²⁾

a) Kas değişiklikleri:

İskelet kası, ekstremitteyi oluşturan primer kütle olup aynı zamanda iskemik hasara en hassas dokudur. Dolayısıyla iskelet kası hasarı ekstremitte reperfüzyon hasarının en önemli bölümünü oluşturur.⁽⁴²⁾ Kas ölümü sonrası makroskopik ve mikroskopik değişiklikler minimal olduğundan kas ölüm zamanını belirtmek zordur. İskemiye takiben yaklaşık üçüncü saatte ciddi kas hasarı ve altıncı saatte

yaklaşık %97'lik fonksiyonel doku kaybı olduğu spektrofotometrik (triphenyltetrazolium chloride) yöntemlerle gösterilmiştir. Dolayısıyla geri dönüşümsüz zedelenme zamanının tayininde spektrofotometre önemlidir.⁽⁴⁵⁾ 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.⁽⁴⁶⁾ Kas fiberleri, içerdikleri miyogloblin 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.⁽⁴²⁾ İskeminin süresi ve etkilenen fiber tipi iskemik hasarda önemli olmakla birlikte dokunun vücuttaki konumu da önemlidir. Örneğin, çabuk soğuma nedeniyle, distal ekstremitelerde kas dokusu proksimal kas dokusuna göre iskemiye daha dirençlidir.⁽⁴²⁾

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 artırır. İskeminin dördüncü saatinden sonra mikrosirkülasyonda hücrel etkileşimler (eritrositik, trombositik ve lökositik) başlar. Venöz ve arteriyel kapiller damarlar, reperfüzyon öncesinde, sıkışmış eritrositlerle kapanmış görünümündedirler. 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 karakterize 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.⁽⁴²⁾ 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.⁽⁴⁷⁾

c) “No reflow” fenomeni:

İlk kez Brooks ve arkadaşları tarafından 1922’de, hayvan deneyinde, bu durum gözlenmiş ve patofizyolojik olarak tarif edilmiştir.⁽⁴⁸⁾ Ancak, “no reflow” teriminin ilk kez kullanımı, Ames tarafından, 1968’de iskemik beyin hasarında olmuştur.⁽⁴⁹⁾ Kas iskemisi ilerlediğinde kası besleyen damarda kalıcı tıkanıklık oluşur. Dolayısıyla “no reflow” fenomeninin myonekroza ikincil mi olduğu, yoksa “no reflow” fenomeni sonucunda mı myonekroz olduğu 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.⁽⁴²⁾ “No reflow” fenomeni patofizyolojisinde, hemokonsantrasyon ve tromboz, kapiller endotel hücrelerde şişme, kapillerlerde lökosit kümeleşmesi ve doku ödemeine 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 artırır. Lökositler, kapiller endotelle adezyon oluşturmada lümen içerisinde kümeleşerek “no reflow” oluşumunda önemli rol oynarlar. Dolayısıyla kümeleşmiş lökosit hareketi endotel hasarını artırır.⁽⁴²⁾

d) Lokal inflamatuvar cevap:

İskemik doku reperfüzyonu inflamatuvar bir cevap doğurur. Ancak doku nekrozundan reperfüzyon döneminden çok iskemik dönem sorumludur.⁽⁴²⁾ 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 inflamatuvar aracılardan sentezlendiği yerdir. Dolayısıyla, reperfüzyon sağlanmış hasarlı veya nekrotik alan miktarı morbiditeyi belirler. İnflamatuvar cevabın tetikleyicileri; asit fosfataz, inorganik fosfat, laktik asit, miyogloblin, nükleotidler, potasyum, proteolitik enzimler ve pürin bazları gibi kas yıkım ürünleridir. Bu yıkım ürünleri; prokoagulan özellikte olup, intrinsek pıhtılaşma sistemini aktive ederek venöz kılcal trombozu ve kollateral arteriyollerde vazospazm oluştururlar. İnflamatuvar

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.⁽⁴²⁾

2.6. 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 (O_2^-) 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.⁽⁵⁰⁾ Reperfüzyon esnasında dokuya tekrar sunulan oksijenin, SOR'nin oluşmasını potansiyalize edebileceği yönünde kanıtlar bulunmuştur.

Bunu destekleyen bir bulgu, oksijen miktarı azaltılmış reperfüzatlara reperfüzyona uğratılan dokularda, hasarının azaldığının gösterilmiş olmasıdır.^(51,52) İskemi reperfüzyon hasarında SOR'un rolü olduğunu destekleyen diğer kanıtlar, ksantin oksidazı inhibe eden allopurinol, O_2^- 'nu yıkan SOD, H_2O_2 'i yıkan katalaz (KAT) ve OH^- 'ni nötralize eden dimetilsülfoksid verilmesinin doku hasarını azalttığını gösteren çalışmalarla gelmiştir.⁽⁵³⁾ Bu nedenle özellikle çizgili kastaki İRH'da ksantin oksidaz kaynaklı SOR'nin ve bunlardan da yukarıda sayılan üçünün rolü olabileceği ileri sürülmüştür.⁽⁵³⁾ 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.⁽⁵⁴⁾ $\text{OH}^\downarrow$ 'nin yukarıda bahsedilen yolak dışında kaynakları olabileceği de ileri sürülmüştür: Buna göre O_2^- ile nitrik oksit (NO)'in birleşmesiyle peroksinitrit (ONOO^-) oluşmakta, bu da OH^- 'ne dönüşmektedir.⁽⁵⁵⁾ SOR'nin nasıl etki ettiği ile ilgili iki temel görüş vardır. Bunlardan birine göre SOR hücrelerdeki yapısal ve fonksiyonel rolleri olan kontraktıl ve transport proteinlere, enzimlere, reseptörlere, nükleik asit ve membran lipidleri gibi birçok farklı moleküle etki ederek bunların işlevlerini bozar.⁽⁵⁶⁾ Özellikle membran lipidlerinin peroksidasyonu sonucu oluşan membran hasarı neticesinde hücre içine kalsiyum girişi artabilir ve sonuçta hücre hasarı meydana gelebilir.⁽⁵⁶⁾ Ayrıca SOR proteolitik reaksiyonları hızlandırarak da doku yıkımına yol açabilirler.⁽⁵⁶⁾ 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) atırılması,
- 2) Kompleman aktivasyonu,
- 3) Antiadeziv bir molekül olan NO'nun yıkılması
- 4) Adezyon moleküllerinin ekspresyonunun artması.⁽⁵⁶⁾

2.6.1. Lökosit İnfiltrasyonu

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.⁽⁵⁷⁾ Ayrıca, ATP-MgCl₂, iloprost ve adenozin gibi lökosit metabolizmasını inhibe eden ilaçların İRH'yi önlediği saptanmıştır.^(57,58) Bu bulgulara paralel olarak, reperfüzyon lökosit düzeyleri düşürülmüş kanla yapıldığında hasarın belirgin derecede azaldığı bulunmuştur.^(59,60) 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.^(61,62) 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) Endotelial intersellüler adezyon molekülü,
- 3) L-selektin (lökosit yüzeyinde), E-selektin (endotel yüzeyinde) ve P-selektin (endotel yüzeyinde) gibi selektin ailesinin üyeleri.^(63,64)

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 endotelial

intersellüler adezyon molekülü etkinliği sonucu daha önce oluşan adezyon güçlenir ve transendotelyal migrasyon oluşur.⁽⁶⁵⁻⁶⁷⁾ Nitekim CD11/CD18'in antikorlarla etkisiz hale getirilmesi, iskelet kasında iskemi sonrası ortaya çıkan kontraktil disfonksiyonun⁽⁶⁸⁾, mikrovasküler bariyer yıkımının⁽⁵⁹⁾ ve miyozit nekrozunun⁽⁶⁹⁾ azalmasına yol açtığı tespit edilmiştir. Ayrıca, iskelet kasında iskemi sonrası ortaya çıkan “no-reflow” fenomeninin anti-endotelyal intersellüler adezyon molekülü antikorları vasıtasıyla azaldığı bulunmuştur.⁽⁷⁰⁾

Çizgili kas İR modelinde akciğerlerde E-selektinin ekspresyonunun arttığı saptanmıştır.⁽⁷¹⁾

2.6.2. 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.⁽⁶¹⁾

2.6.3. Eikosanoid Metabolizması

Reperfüzyon iskemik çizgili kasta ve miyokardiyumda eikosanoid sentezinin artmasına yol açar.^(72,73) 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.⁽⁷⁴⁾ Tavşanda elde edilen bu bulgulara zıt olarak köpekte lökotrien B₄'ün İRH'yle bir ilişkisi saptanamamıştır.⁽⁷⁵⁾

2.6.4. Sitokinler

Çizgili kasta, interlökin-1 ve tümör nekroz faktör-alfa (TNF α) 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⁽⁷⁶⁻⁷⁷⁾

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.⁽⁷⁷⁾ Bu sitokinlere ek olarak interlökin-6'nın da çizgili kas İRH'de yükseldiği saptanmıştır.⁽⁷⁷⁾

2.7. Serbest Oksijen Radikallerinin Yapısı

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.⁽⁷⁸⁾ Vücutta bulunan en temel serbest radikaller aşağıda sıralanmıştır.

2.7.1. Süperoksit Anyonu

O_2^- hücrede enerji metabolizmasında oksidasyon sırasında ya da oksidazlar gibi bazı enzimlerin aktivitesi sonucu oluşur. O_2^- SOD adlı enzimle inaktive edilir.⁽¹⁾ O_2^- fagositlerin bakterisit etkilerinin temel mekanizmasını oluşturur. Aynı zamanda iltihabi olaylarda normal dokulara bile zarar verebilecek araçlardır.⁽⁷⁹⁾

2.7.2. Hidrojen Peroksit

O_2^- 'dan SOD enzimi vasıtasıyla meydana gelen daha az toksik bir radikaldir.⁽¹⁾ KAT ve/veya glutatyon peroksidaz enzimiyle H_2O ve O_2 'ye çevrilerek etkisiz hale getirilir.⁽¹⁾

2.7.3. Hidroksil Radikali

OH^- birkaç yolla oluşur: Suyun hidroliziyle ya da parçalanmasıyla hidrojen radikalleri ve OH^- oluşabilir.⁽⁷⁹⁾ Aynı zamanda H_2O_2 üzerinden Fe ve Cu'nın rol aldığı Fenton reaksiyonu ile da oluşur.⁽¹⁾ Diğer de Haber-Weiss reaksiyonudur ($\text{H}_2\text{O}_2 + \text{O}_2 \rightarrow \text{OH}^- + \text{OH}^- + \text{O}_2$). OH^- radikalleri en reaktif serbest radikallerdir ve vücuttaki serbest radikal hasarının en önemli sorumlularıdır.⁽⁷⁹⁾ Bu radikal glutatyon peroksidaz (GSH-Px) enziminin rol aldığı bir reaksiyonla H_2O 'ya indirgenir.⁽¹⁾

2.7.4. Hipoklorit

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

2.7.5. 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.⁽⁸⁰⁾ NO'nun dual etkisini açıklamaya çalışan diğer bir yaklaşım nitrik oksidin oluşturduğu bir takım fizyolojik etkilerle yararlı olabileceği, diğer taraftan

O_2^- ile etkileşerek oluşturduğu peroksinitrit ($ONOO^-$) vasıtasıyla zararlı etkiler yaratabileceğidir.⁽⁸¹⁾

2.7.6. Peroksinitrit

O_2^- 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⁾

2.8. Antioksidanlar

Organizmada devamlı olarak SOR oluşmasına rağmen antioksidan savunma sistemleri ile oksidasyon arasındaki dinamik dengeden dolayı zararlı etkiler ortaya çıkmaz.⁽⁸²⁾ Bu dengenin korunması organizmanın canlılığını sürdürmesi açısından son derece önemlidir. Antioksidan miktarının serbest radikalleri kompanse edememesi durumunda oksidatif stres olarak tanımlanan durum ortaya çıkar.⁽⁸³⁾ Fizyolojik ve patolojik olaylar sonucu dengenin oksidasyon lehine değişmesi durumunda oksidatif hasar gelişebilmektedir. Antioksidanlar hedef moleküllerdeki hasarı engelleyen ya da geciktiren maddeler olarak tanımlanmaktadır.⁽⁸⁴⁾ Temel antioksidan etki mekanizmaları şöyle sıralanabilir:

- 1) Serbest radikal oluşumunu engellemek,
- 2) Oluşan radikali etkisizleştirmek,
- 3) Serbest radikalın oluşturduğu oksidatif hasarı önlemek,
- 4) Hasarlanmış molekülleri tamir etmek veya mutasyona uğrama ihtimalini

minimale indirgemek.⁽⁸⁵⁾

Organizmada çok çeşitli antioksidan sistemleri vardır ve bunların belki de en önemlisi enzimlerdir: SOD, KAT, GPO, glutatyon reduktaz ve glutatyon transferaz.⁽⁸⁶⁾

2.8.1. Süperoksit Dismutaz

SOD, O_2^- 'nun H_2O_2 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.⁽⁷⁹⁾ 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.⁽⁸⁷⁾

2.8.2. Katalaz

Glikoprotein yapısında 4 hem grubu içeren, bilinen en hızlı enzimlerden biridir ve hücre içerisinde yoğun olarak peroksizomlarda bulunur; görevi H_2O_2 'i oksijen ve suya dönüştürmektir; bu yolla daha toksik olan hidroksil radikallerinin oluşumunu önler.⁽⁸⁸⁾

2.8.3. Glutasyon Peroksidaz

GPO, hücre içi enzim olup aktif merkezinde selenosistein içerir: H_2O_2 ve lipid hidroperoksitlerini katalizleyerek hücre membranını hasarlanmadan korur.⁽⁸⁹⁾ Eritrositlerde oksidan strese karşı en etkili antioksidandır. GPO tarafından katalizlenen glutasyon redoks siklusu, H_2O_2 miktarını düşürerek, superoksit radikalleri arasındaki reaksiyon zincirini kırar.⁽⁹⁰⁾

2.8.4. Glutasyon Redüktaz

Biyolojik sistemlerde antioksidan aktiviteye sahip en önemli enzimlerden biri de glutasyon redüktazdır ve bu enzim hücreleri oksidatif hasardan korur.⁽⁹¹⁾ Selenyum (Se) koenzimine sahip olan bu enzim, yükseltgenmiş glutasyonu NADPH varlığında indirgenmiş glutatyona çevirir.⁽⁸⁹⁾

2.8.5. Glutasyon

Karaciğerde çok yüksek konsantrasyonlarda bulunan tripeptid yapısında önemli bir antioksidandır. GPO tarafından katalizlenen glutasyon redoks siklusu, H_2O_2 miktarını düşürerek, superoksit radikalleri ve yüksek reaktif hidroksil radikalleri arasındaki reaksiyon zincirini kırar.⁽⁹²⁾ Glutasyon superoksit anyonlarına karşı doğal bir temizleyicilik görevi üstlenir ve oksidasyona karşı hücre bütünlüğünü sağlamak için mutlaka gerekli olan protein tiyol gruplarını bulundurmaktadır.⁽⁹¹⁾

2.8.6. 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.⁽⁹³⁾ 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 CoA'dan yağ asitlerinin biyosentezinde büyük miktarda NADPH kullanılmaktadır.⁽⁹³⁾ 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, haptogloblin, hemopeksin, seruloplazmin ve albumindir.⁽⁸⁶⁾

2.9. Hasar Mekanizmaları

Organizmada SOR ortaya çıktıktan sonra radikal reaksiyon dizileri başlar.⁽⁹⁴⁾ Eğer bir serbest radikal, radikal olmayan bir molekülle reaksiyona girerse,

binlerce reaksiyondan oluşan reaksiyon zincirlerini başlatır.⁽⁹⁵⁾ SOR paylaşılmamış elektronlarından dolayı lipid, protein, karbonhidrat, nükleik asit gibi çeşitli makromoleküllerin oksidatif hasarına neden olurlar. Bu hasarlanma özetle aşağıdaki şu mekanizmalarla olur.⁽⁸³⁾

2.9.1. 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 radikalın etkisiyle membran yapısındaki çoklu doymamış yağ asidi zincirindeki alfa metilen gruplarından bir hidrojen atomunun uzaklaştırılması ile başlamaktadır. Biyolojik sistemlerde bu radikalın O_2^- 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.⁽⁹⁶⁾

2.9.2. Protein Oksidasyonu

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

2.9.3. 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.

2.9.4. Kovalent Bağlanma

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

2.9.5. 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.

2.10. Pikrozid II

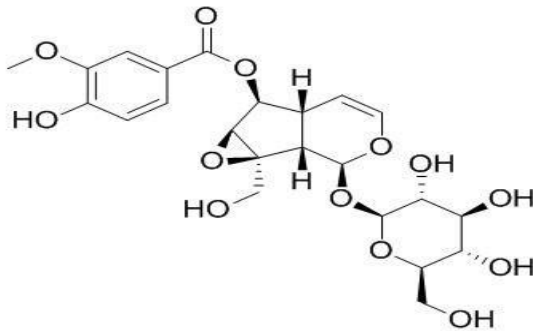
Picrorhiza kurroa, Nepal'in kuzey batı Himalayalar bölgesinde yaygın olarak bulunan Hindistan ve Çin'de sağlık alanında yaygın olarak kullanılan kök, gövde, yaprak ve meyveden oluşan 15-20 cm uzunluğunda kısa bir bitkidir.



Resim 1. Picrorhiza kurroa bitkisi

Picrorhiza kurroa'dan elde edilen Pikrozid I, Pikrozid II, ve Pikrozid III'den biyolojik aktif metaboliti olan bitkinin kökünden elde edilen Pikrozid II'dir (97,98).

Pikrozid II, Picrorhiza kurroa'dan elde edilen $C_{23}H_{28}O_{13}$ moleküler formüllü bir glikozit türevidir.



Şekil 3. Pikrozid II molekül formülü

Pikrozid II'nin yapılan çalışmalarda anti-oksidan, anti-apatotik ve anti-enflamatuar gibi birçok farmakolojik etkisi gösterilmiştir. (99,100)

Toll benzeri reseptörler (TLR); polimorfonükleer nötrofiller, monosit,

makrofaj, dentritik hücreler gibi bağışıklık sistemi hücreleri üzerinde bulunur^(101,102) ve TLR sinyal yolu, sitokin üretimi ve proliferasyon dahil olmak üzere efektör tepkilerini artırır.⁽¹⁰²⁾ Pikrozid II'nin hasarlı beyin dokusunda inflamasyonu tetikleyen TLR 2 ve TLR 4 ekspresyonunu inhibe ederek iskemi reperfüzyonun neden olduğu beyin hasarını hafifletir.⁽¹⁰³⁾

Pikrozid II oksidatif stres ve inflamatuvar süreçte azalma sağlayarak böbrek dokusu üzerine de koruyucu etki gösterdiği saptanmıştır.⁽¹⁰⁴⁾ Yapılan çalışmalarda proinflamatuvar sitokinlerden TNF- α , ve IL-1 β gibi proinflamatuvar sitokinlerle, ICAM gibi adezyon moleküllerinin (ICAM1, mRNA) düzeylerinin pikrozid II ile azaldığı gözlenmiştir.⁽¹⁰⁴⁾ Pikrozid II'nin hasarlanmış dokuda MDA düzeyindeki yükselmeyi azalttığı ve SOD, GSH-Px'i artırdığı görülmüştür.^(104,105)

NF-kB (nükleer faktör kappa B); immün yanıtta yer alan, hücre proliferasyonuna ve apoptoza katılan yaygın bulunan enhancer bağlayıcı bir transkripsiyon faktörü olup, 50 ve 65 kDa alt birimlerden (p50 ve p65) oluşur.⁽¹⁰⁶⁾ Pikrozid II, TLR₄ / NF-kB yolunun blokajını sağlayarak antienflamatuvar etkinlik gösterir.⁽¹⁰⁴⁾

PI-3 K Fosfoinositid 3 Kinaz- protein kinaz B (PI3K/Akt) sinyal yolağının aktivasyonu sonrasında iki nedenden ötürü; endotel hücrelerinde NO sentaz fosforillenmesi sonucu NO üretiminde artma ve damar düz kas hücrelerinin kalsiyum konsantrasyonunda, miyozin hafif zincirinin kalsiyuma duyarlılığında azalma ile damar genişlemesi görülür.⁽¹⁰⁷⁾ Pikrozid II; PI3K/Akt sinyal yolağını aktifleyerek, iskemik miyokard dokusunda, kalbin fonksiyonel iyileşmeyi artırdığı düşünülen NO'nun düzeyini artırır.⁽¹⁰⁸⁾

Pikrozid II'nin iskemi reperfüzyon hasarının neden olduğu apaptosizi, Bcl-2 ekspresyonunu artırıp, Bax ekspresyonunu azaltmasının yanında bir transkripsiyon faktörü olan CREB'i (cAMP response element binding protein) ve PI3K/Akt yolağını fosforilleyerek aktiflemesi yolu ile inhibe eder.⁽¹⁰⁹⁾



3. GEREÇ VE YÖNTEM

3.1. Araştırmanın Tipi

Bu deneysel çalışmada ratlarda iskelet kası iskemisi öncesi intraperitoneal olarak uygulanan Pikrozid II'nin iskelet kasını iskemi ve reperfüzyon hasarına karşı koruyup korumadığının gösterilmesi çalışıldı.

3.2. Araştırmanın Yeri ve Zamanı

Bu çalışmada Gazi Üniversitesi Laboratuvar Hayvanları Yetiştirme ve Deneysel Araştırma Merkezi'nde (GÜDAM), Mayıs 2015 tarihinde gerçekleştirildi.

3.3. Etik Kurul Onayı

Bu çalışma Gazi Üniversitesi Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu Başkanlığı'nın 08/04/2015 tarih, 66332047-604.01.02 sayılı, G.Ü.ET-15.019 kod numaralı onayı doğrultusunda gerçekleştirildi.

3.4. Kullanılan Denek Materyali

Bu çalışmada kullanılan ratlar Gazi Üniversitesi Laboratuvar Hayvanları Yetiştirme ve Deneysel Araştırma Merkezi'nden (GÜDAM) temin edilmiştir.

Çalışmada kullanılan 24 adet Wistar-Albino cinsi, 6–8 haftalık erkek (210–300 g) ratların bakım ve beslemeleri çalışma boyunca 24° çevre sıcaklığı, % 55–60 nem ve 12:12 saatlik aydınlık-karanlık döngüsü şartlarında gerçekleştirildi. Kuru pellet yemle besleme ve günlük taze su temini sürekli sağlandı.

3.5. Denek Grupları ve Uygulama Protokolü

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

İskemi-Reperfüzyon Grubu (Gr II, 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 klemp açıldı. İşlemden 2 saat sonra anestezi altında ratların alt ekstremite iskelet kasları, bu dokularda immünohistokimyasal ve biyokimyasal değerlendirmeler için alındı.

Pikrozid II Grubu (Gr III, n=6): Bu gruptaki ratlara alt ekstremite iskelet kası iskemisi yapılmaksızın Pikrozid II 10 mg/kg intaperitoneal yolla uygulandı. İşlemden 2 saat sonra anestezi altında ratların alt ekstremite iskelet kasları immünohistokimyasal ve biyokimyasal değerlendirmeler için alındı.

İskemi - Reperfüzyon - Pikrozid II 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 oluşması sağlandı. 120 dakikalık iskemiyi takiben damar klemp açılarak ve hemen akabinde reperfüzyon başlangıcında 10 mg/kg Pikrosid II intaperitoneal yolla uygulandı. Bunu takiben 2. saatte yeniden anestezi altında ratların alt ekstremite iskelet kasları, bu dokularda immünohistokimyasal ve biyokimyasal değerlendirmeler için alındı.

3.6. Pikrozid II'nin Hazırlanması ve Uygulanması

Pikrozid II, (safılık>%98, molekül formülü $C_{23}H_{28}O_{13}$, Sıgma Aldrich CAS N:39012-20-9, Almanya) fosfat tamponlu salin (PBS) ile 10 g/L' lik bir çözelti meydana getirmek üzere seyreltilti. Pikrozid II, 10 mg/kg olmak üzere Pikrozid II - Sham grubu ve İskemi - Reperfüzyon - Pikrozid II grubundaki ratlara reperfüzyon başlangıcında intraperitoneal yolla uygulandı.⁽¹¹⁰⁾

3.7. Cerrahi Yöntem

Deney başlangıcında; intramusküler enjeksiyonla, 50 mg/kg dozda ketamine hydrochloride (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. Supin pozisyonda yatırılıp cerrahi sahaları tıraş edildi. Ciltleri aseptik olarak hazırlanan ratlara orta hat laparotomi yapıldı. Barsakların ıslak gazlı bez yardımıyla uzaklaştırılmasının ardından infrarenal abdominal aorta eksplore edildi. 1 dizyem heparin subkutan yapıldı. Abdominal aortaya atravmatik bir mikrovasküler klemp konularak iskemi yapıldı. İşlemden iki saat sonra tüm ratlara derin anestezi altında intrakardiyak kan alınarak ötanazi uygulandı. Çıkarılan dokular -80° de derin dondurucuda (SANYO MDF-U2086S®) eppendorf tüpüne alınarak saklandı.

3.8. Dokuların Homojenizasyonu

Dondurucuda -80°de tutulan dokular sıvı azot dolu taşıyıcı kaba alındıktan sonra kullanılacak olan örnek eppendorf tüpünden çıkarıldı. Çözünmesine izin

verilmeden dokular hızla hassas terazide tartılıp 22 numaralı bistüri ucu (PLUSMED®) kullanılarak 80-100 mg olarak ayrıldı. Alınan doku parçaları porselen havanda sıvı azot varlığında ezildi. Toz halindeki dokular homojenizasyon tüpüne aktarılıp üzerlerine; her bir gram doku için, dilüsyon 1/10 olacak şekilde 140 mM KCl solüsyonu eklendi. Homojenizasyonda ısı artışı olmaması için homojenizasyon tüpü kar dolu cam beher içinde tutularak, iki dakika süre ile 50 dönüş/dakika (rpm) hızda homojenizatör (Glas_Col K5424®) ile homojenizasyon işlemi tamamlandı. Homojenizat eppendorf tüpüne alındı. Eppendorf tüpleri parafilm ile kaplandıktan sonra 3000 rpm'de 10 dakika santrifüj (Hettich Mikro 200R®) edildi. Santrifüj sonrası süpernatant başka bir Eppendorf tüpüne alınarak Total Oksidatif Seviyesi (TOS) ve Total Antioksidan Seviyesi (TAS) ölçümleri yapıldı

3.9. Total Antioksidan Status/ Seviye (TAS) Ölçümü

Total antioksidan seviye ölçümünde, TAS kiti (RelAssay Diagnostic®, Türkiye) kullanıldı. TAS ölçümü için, kitin prosedüründe belirtildiği şekilde, 500 mL reaktif 1 (ölçüm tamponu) ve 30 mL örnek karıştırılıp spektrofotometre ile (NanoDrop® ND-1000), 660 nm'de absorbans ölçümü yapıldı (A_1). Eppendorf tüpündeki karışıma 75 mL reaktif 2 (renkli 2,2-azino-bis-3-etilbenzotiazolin-6-sülfonik asit), (ABTS) solüsyonu eklendi. Tüp parafilmle kaplanarak, 37 ° deki sıcak su banyosunda (Şimşek Labortechnik®) 5 dakika inkübe edildi. İnkübasyon sonrası 660 nm'de absorbans ölçümü yapıldı (A_2). Standart ölçümü için, 1 mmol/L konsantrasyonundaki Trolox Eq çözeltisi örnek yerine kullanıldı. İlk ve ikinci

ölçümler üçer defa yapılarak ortalaması alındı. İkinci absorbans değerinden (A_2) ilk absorbans değeri (A_1) çıkarılarak absorbans değişimi (ΔAbs) hesaplandı. TAS düzeyleri kitte belirtilen formülle hesaplandı ve mmol Trolox Eq/L olarak ifade edildi.

$$TAS = [(\Delta Abs \text{ H}_2\text{O} - \Delta Abs \text{ Örnek}) / (\Delta Abs \text{ H}_2\text{O} - \Delta Abs \text{ Standart})]$$

3.10. Total Oksidatif Status/ Seviye (TOS) Ölçümü

Total oksidan seviye ölçümünde, TOS kiti (RelAssay Diagnostic®, Türkiye) kullanıldı. TOS ölçümü için, kitin prosedüründe belirtildiği şekilde, 500 mL reaktif 1 (ölçüm tamponu) ve 75 mL örnek karıştırılıp spektrofotometre (NanoDrop® ND-1000) ile 530 nm’de absorbansı ölçümü yapıldı (A_1). Karışıma 25 mL reaktif 2 (pro-kromojen solüsyon) eklendi. Tüp parafilmle kaplanarak 37°C’deki sıcak su banyosunda (Şimşek Labortechnik®) 5 dakika inkübe edildi. İnkübasyondan sonra 530 nm’de absorbans ölçümü yapıldı (A_2). Standart ölçümü için kitte verilen, 10 $\mu\text{mol/L}$ hidrojen peroksit (H_2O_2) ekivalan/ litre içeren standart çözeltisi kullanıldı. İlk ve ikinci ölçümler üçer defa yapılarak ortalaması alındı. İkinci absorbans değerinden (A_2) ilk absorbans değeri (A_1) çıkarılarak absorbans değişimi (ΔAbs) hesaplandı. TOS düzeyleri kitte belirtilen formülle hesaplandı, mmol H_2O_2 Eq/L olarak ifade edildi.

$$TOS = [(\Delta Abs \text{ örnek}) / (\Delta Abs \text{ standart})] \times \text{Standart Konsantrasyonu} \\ (10\mu\text{mol/L})$$

3.10.1. Dokuların Hazırlanması ve Işık Mikroskobu İncelemeleri İçin

Yapılan Çalışmalar

Işık mikroskobu incelemeleri için gruptan alınan kas dokusu örnekleri tespit amacıyla 72 saat tamponlanmış %10'luk formalin içerisinde bekletildi. Fikse olan dokular rutin histolojik takip aşamalarına alındı. Bir saat akan çeşme suyu altında yıkanan dokular sırasıyla %75, %80, %90 ve %100'lük alkol serilerinden geçirilerek dehidrate edildi. Ksilen ile şeffaflandırılan dokular parafin bloklara gömüldü. Örneklerden Leica RM 2125RT model mikrotom kullanılarak 5 µm kalınlığında kesitler lam üzerine alındı. Lamalar 60°C'lik etüvde deparafinizasyon için bir gece bekletildi, ksilen ile şeffaflandırılarak Hematoksilin Eozin boyaması yapıldı. Kesitler AxioScope. A1 (Carl Zeiss, Oberkochen, Germany) marka ışık mikroskopunda grupları bilmeyen iki farklı Histoloji ve Embriyoloji uzmanı tarafından morfolojik ve histomorfometrik özellikleri açısından incelenerek değerlendirildi ve fotoğraflandı.

Histolojik hasar skorunu belirlemek için; aynı hayvana ait 3 farklı kesitte x100 büyütmede gözlemlenen kas lifleri dejenerasyon ve disorganizasyon bulgularına göre sırasıyla 0: normal, (%0) 1: hafif, (%1-%33), 2: orta (%34 -%66) ve 3: şiddetli (%67-%100) olmak üzere değerlendirildi. Aynı kesitlerde mononükleer hücre infiltrasyonunun şiddetini belirlemek için de yine yukarıda verilen skor tablosu kullanıldı.⁽¹¹¹⁾

3.10.2. Gastroknemius Kası İçin Uygulanan Histomorfometrik Çalışma

Her bir kas dokusu için H-E ile boyanan enine kas kesitlerinden elde edilen örnekler x200 büyütme kullanılarak beş farklı mikroskop alanında ışık mikroskobu ile incelendi ve bu alandaki her bir kas lifinin enine kesit alanı Axiovision bilgisayar programı kullanılarak ölçüldü. Sonuçlar istatistiksel olarak değerlendirildi.

3.10.3. Terminal Deoxynucleotidyl Transferase-Mediated dUTP Nick End- Labelling (TUNEL)

Dokulardaki apoptotik hücreleri belirlemek üzere TUNEL (in situ uç işaretleme) yöntemi uygulandı. Bunun için In situ Cell Death Detection Kit (POD Roche Applied Science, Cat # 11684817910) üretici firmanın önerileri doğrultusunda kullanıldı.

Polilizinli lamlara alınan 4 µm kalınlığında kesitler bir gece 60°C'lik etüvde bekletilerek ksilen ile deparafinize edildi. Kesitler sırasıyla %75, %80, %90 ve %100'lük dereceli alkol serilerinden geçirilerek rehidrate edildi ve PBS (phosphate buffered saline) ile yıkandı. 0,1 M sitrat tampon ile mikrodalga fırında 5 dakika 350 Watt enerji kullanılarak antijen açığa çıkarma işlemi uygulandı. PBS ile yıkama yapıldı. Kesitler TUNEL reaksiyon karışımı ile [işaretleme solüsyonu + terminal deoksinukleotidil transferaz (TdT) enzim solüsyonu] 37°C'de 1 saat nem odasında inkübe edildi ve PBS ile iki kez yıkandı. Negatif kontrol amaçlı olarak bazı kesitler sadece işaretleme solüsyonu ile muamele edildi. Bu aşamadan sonra tüm kesitler converter-POD ile 37°C'de 30 dak inkübe edildi ve PBS ile iki kez yıkandı. Ardından kesitler 3,3-diaminobenzidine (DAB) substrat ile reaksiyon görülünceye

kadar oda sıcaklığında muamele edildi ve PBS ile iki kez yıkandı. Karşıt boyama olarak kesitler kesitler 10 dakika Harris Hematoksilen ile boyandı, dereceli alkollerden geçirilerek dehidrate edildi ve ksilenle şeffaflandırıldı, entellan ile kapatılarak ışık mikroskobunda incelenmeye alındı.

3.10.4. TUNEL Sonuç Değerlendirmeleri

İmmunohistokimyasal olarak dokulardaki TUNEL boyama için immunreaktivite gösteren hücreler AxioScope.A1 (Carl Zeiss, Oberkochen, Germany) ışık mikroskobu ile x 40 büyütmede her bir kesitte 5 farklı alanda sayıldı.

Her grubun Apoptozis İndeksi yüzde (%) olarak aşağıdaki formüle göre hesaplandı;

Apoptozis İndeksi (%) = (TUNEL pozitif boyanan hücre sayısı / Total hücre sayısı) x100

3.11. İstatistiksel Analiz

İstatistik değerlendirme SPSS 20.0 bilgisayar programında sıralanan testler kullanılarak gerçekleştirildi. İstatistiksel analiz verileri [Ortalama ± standart sapma] 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.

Tablo 3. Sıçanların iskelet kas dokusunda oksidan durum parametreleri [Ort $\pm$ SS]

	Grup K (n=6)	Grup P (n=6)	Grup İR (n=6)	Grup İR-P (n=6)	P**
TOS (mmol H ₂ O ₂ Eq/l)	0.49 $\pm$ 0.08*	0.57 $\pm$ 0.12	0.66 $\pm$ 0.07	0.48 $\pm$ 0.10*	0.023
TAS (mmol Trolox Eq/l)	9.99 $\pm$ 2.09*	11.63 $\pm$ 2.94	14.35 $\pm$ 3.19	9.23 $\pm$ 2.83*	0.017

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

* $p < 0.05$: Grup İR ile karşılaştırıldığında

Gruplar (iskelet kas dokusu) TOS enzim aktivitesi açısından kendi aralarında kıyaslandığında, gruplar arasında anlamlı fark vardı ($p=0.023$). TOS enzim aktivitesi İR grubunda K ve İR-P gruplarına göre anlamlı yüksek olarak bulundu ($p=0.014$, $p=0.005$, sırasıyla), (Tablo 3).

Gruplar (iskelet kas dokusu) TAS enzim aktivitesi açısından kendi aralarında kıyaslandığında, gruplar arasında anlamlı fark vardı ($p=0.017$). TAS enzim aktivitesi İR grubunda K ve İR-P gruplarına göre anlamlı yüksek olarak tespit edildi ($p=0.007$ $p=0.005$, sırasıyla) (Tablo 3).

Tablo 4. Sıçanların iskelet kas dokusunda TUNEL pozitif hücre verileri [Ort $\pm$ SS]

	Grup K (n=6)	Grup P (n=6)	Grup İR (n=6)	Grup İR-P (n=6)	P**
TUNEL pozitif hücre	9.00 $\pm$ 5.76*,&	12.00 $\pm$ 5.59*,&	90.17 $\pm$ 6.97	48.17 $\pm$ 10.28*	<0.0001
İnfiltrasyon	0.00 $\pm$ 0.00*,&	0.33 $\pm$ 0.18*,&	2.00 $\pm$ 0.68	1.33 $\pm$ 0.52*	<0.0001
Hasar	0.00 $\pm$ 0.00*,&	0.16 $\pm$ 0.16*,&	2.67 $\pm$ 0.52	1.67 $\pm$ 0.52*	<0.0001
Enine kesit	2821.49 $\pm$ 479.9 2	2829.06 $\pm$ 155.64	1167.88 $\pm$ 373.73	2870.25 $\pm$ 294.32	<0.0001

P**:

*p<0.05: Grup İR ile karşılaştırıldığında

&p<0.05: Grup İR-P ile karşılaştırıldığında

Gruplar iskelet kas dokusu TUNEL hücre sayısı açısından kendi aralarında kıyaslandığında, gruplar arasında anlamlı fark vardı (p<0.0001). TUNEL hücre sayısı İR grubunda K, P ve İR-P gruplarına göre anlamlı yüksek olarak tespit edildi (p<0.0001, p<0.0001, p<0.0001, sırasıyla). Ayrıca, İR-P grubunda TUNEL hücre sayısı K ve P gruplarına göre anlamlı yüksek olarak tespit edildi (p<0.0001, p<0.0001, sırasıyla) (Tablo 4, Resim 9-12).

Gruplar iskelet kas dokusu infiltrasyon açısından kendi aralarında kıyaslandığında, gruplar arasında anlamlı fark vardı (p<0.0001). İnfiltrasyon İR grubunda K, P ve İR-P gruplarına göre anlamlı yüksek olarak tespit edildi (p<0.0001, p<0.0001, p=0.027, sırasıyla). Ayrıca, İR-P grubunda infiltrasyon K ve P gruplarına göre anlamlı yüksek olarak tespit edildi (p<0.0001, p=0.002, sırasıyla) (Tablo 4, Resim 2-8).

Gruplar iskelet kas dokusu hasar açısından kendi aralarında kıyaslandığında, gruplar arasında anlamlı fark vardı (p<0.0001). Hasar İR grubunda

K, P ve İR-P gruplarına göre anlamlı yüksek olarak tespit edildi ($p<0.0001$, $p<0.0001$, $p=0.003$, sırasıyla). Ayrıca, İR-P grubunda infiltrasyon K ve P gruplarına göre anlamlı yüksek olarak tespit edildi ($p<0.0001$, $p<0.0001$, sırasıyla) (Tablo 4, Resim 2-8).

Gruplar iskelet kas enine kesit açısından kendi aralarında kıyaslandığında, gruplar arasında anlamlı fark vardı ($p<0.0001$). Hasar İR grubunda K, P ve İR-P gruplarına göre anlamlı yüksek olarak tespit edildi ($p<0.0001$, $p<0.0001$, $p<0.0001$, sırasıyla), (Tablo 4, Resim 3-9).

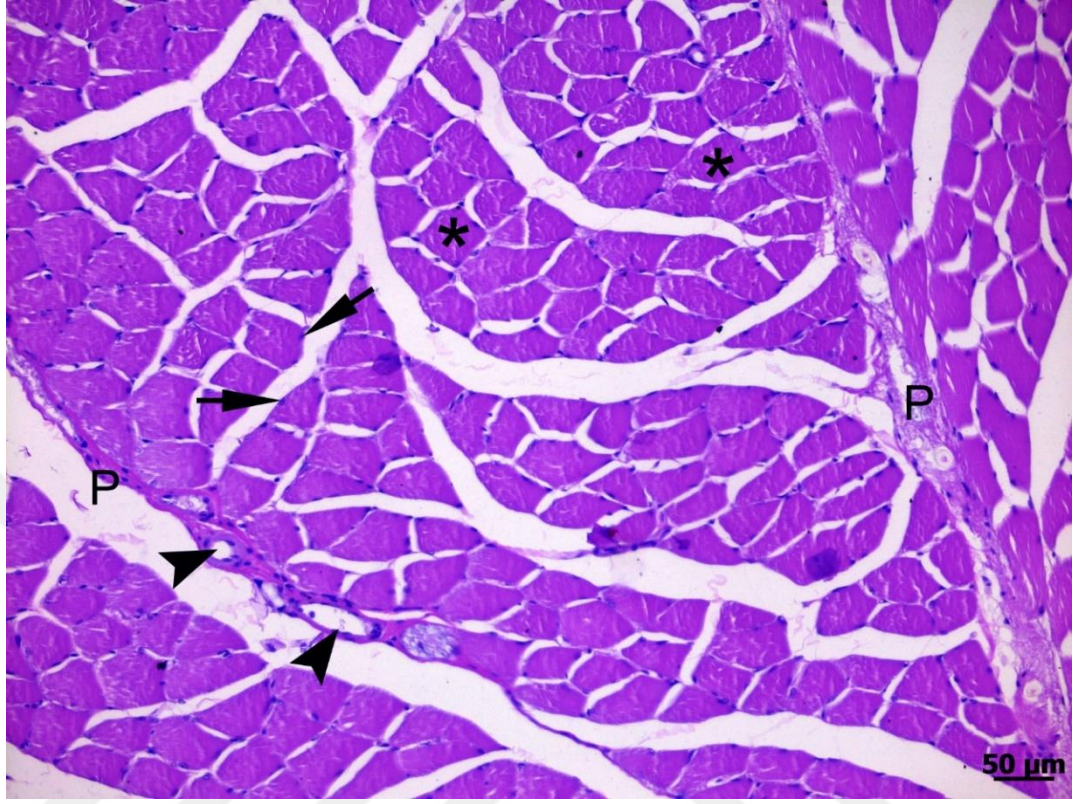
Kontrol ve Pikrosid gruplarında incelenen enine kesitlerde kas liflerinin yuvarlağımsı veya birbirine basınç yapıyorlarsa hafif köşeli poligonal şekilde oldukları görüldü. Perimisyumla çevrili fasikül içinde kas liflerinin sıkıca bir arada oldukları, interstisyel alanın son derece dar olduğu gözlemlendi. Sarkolemmmanın hemen altında yerleşmiş bir veya daha fazla sayıda çekirdek içeren kesitlerin yanında çekirdek içermeyen enine kesitlerin de bulunduğu görüldü. Bağ dokusu kılıflarında yerleşmiş kan damarları ve sinir kesitleri izlendi. Kas liflerinin enine kesit yüzeylerinde miyofibrillerin enine kesitleri görüldü (Resim 2, 3).

İR grubunda kas liflerinin enine kesit yüzlerinin yuvarlak yada düzensiz şekilde olduğu, çekirdeğin orta duruşlu yerleştiği, endomisyumla çevrili kas lifleri arasındaki mesafesinin arttığı görüldü. Atrofiye uğramış kas liflerinin varlığı dikkat çekti. Kas fasiküllerini çevreleyen perimisyumda kalınlaşma ile damar çevresinde daha belirgin olmak üzere mononükleer hücre infiltrasyonu izlendi (Resim 4-6).

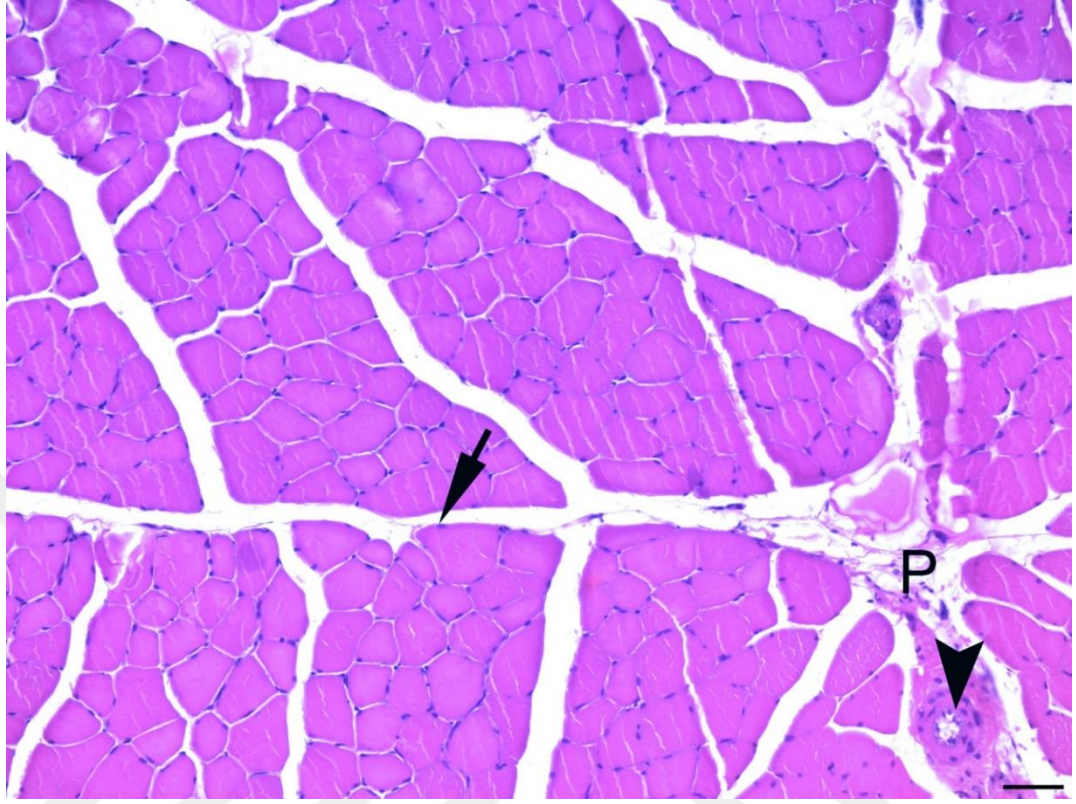
İR+Pikrozid grubunda kas liflerinin enine kesit yüzlerinin yer yer yuvarlak şekilli gözlenmesi yanında bazı liflerde çekirdeğin orta duruşlu yerleşimi dikkat

çekti. Kas lifleri arasındaki alanda genişleme ve hafif şiddette mononükleer hücre infiltrasyonu izlendi. İncelenen örneklerde yer yer atrofik kas lifleri görülse de bazı alanlarda normal görünümde çok yüzlü kesit yüzeyi gösteren kas lifleri bulunmaktaydı (Resim 7,8).

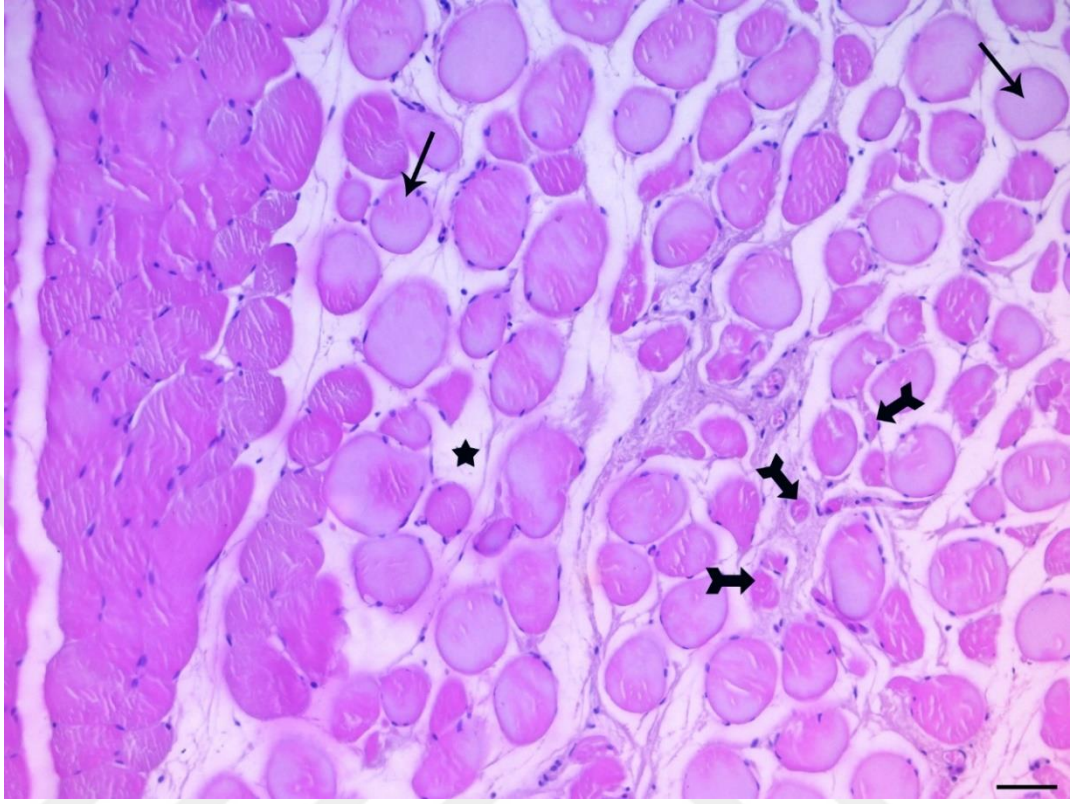




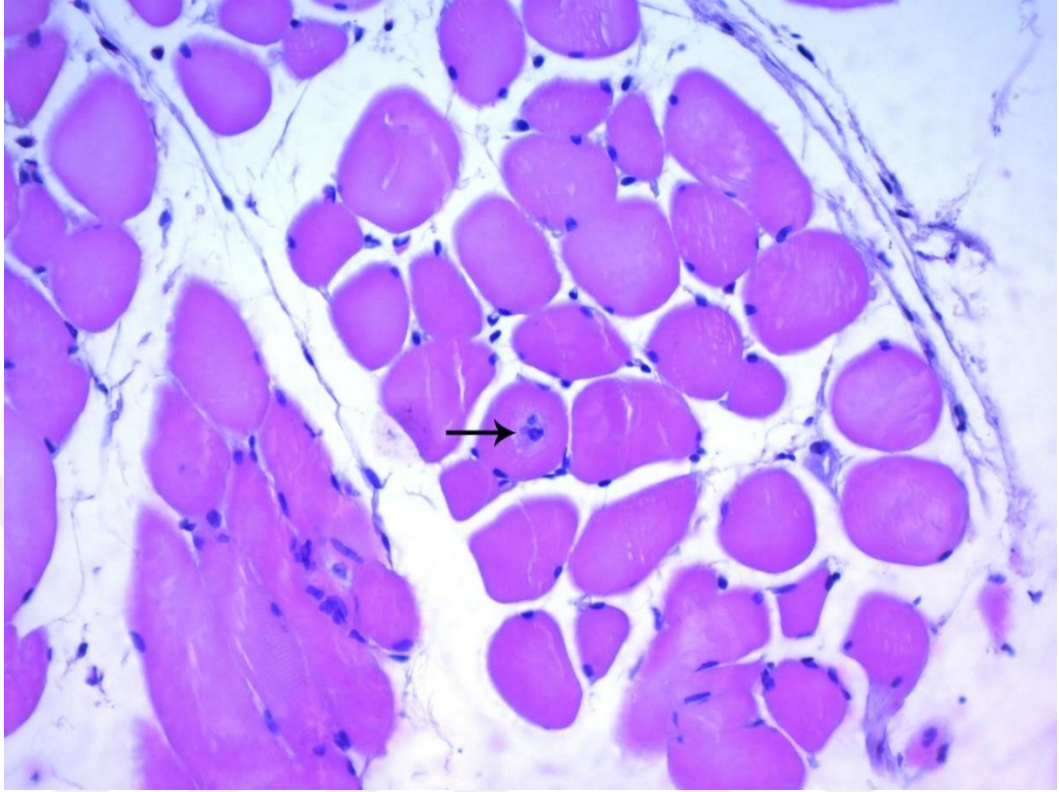
Resim 2. Kontrol grubuna ait mikrografta çizgili iskelet kası liflerinin enine kesit yüzleri çok kenarlı görünümde izlenmektedir. Kas liflerinin sarkolemmasının altında periferik yerleşimli çekirdekler (ok), sitoplazmada miyofibrillerin enine kesitleri (asterisk) gözlenirken kas liflerinin oluşturduğu fasikülleri çevreleyen perimisyum (P) içinde kan damarları (ok başı) dikkat çekmektedir. H&Ex200.



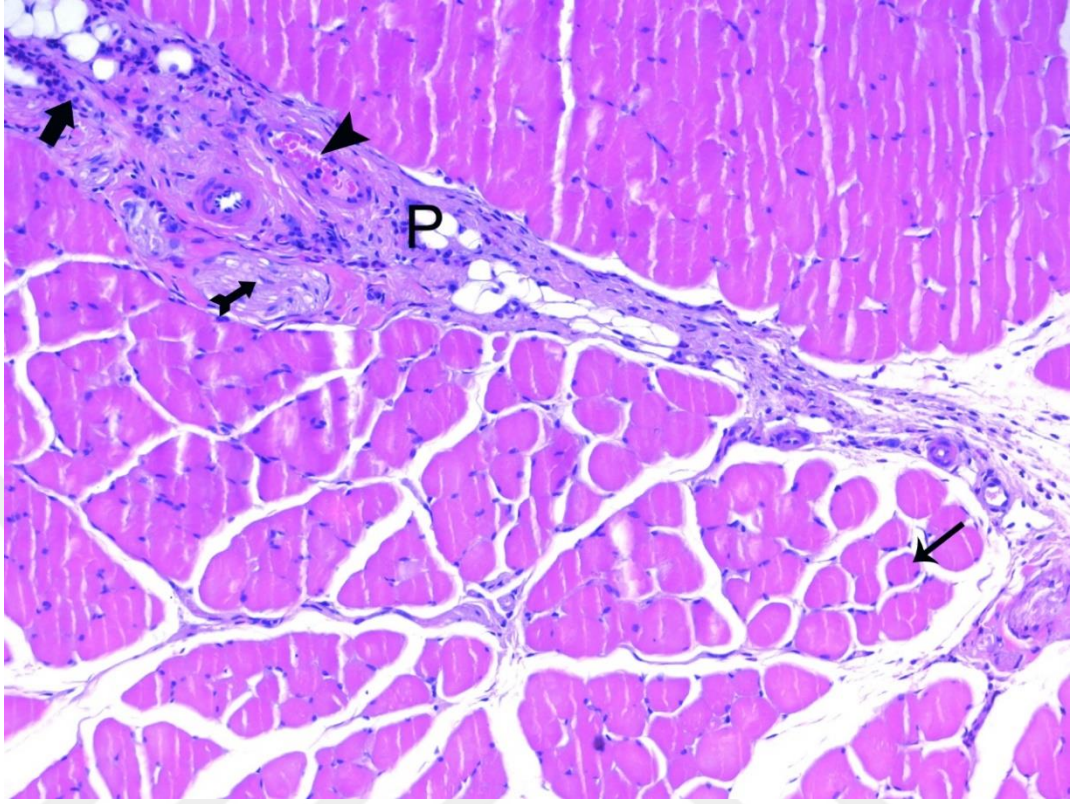
Resim 3. Pikrozid grubuna ait mikrografta çizgili iskelet kası liflerinin enine kesit yüzleri çok kenarlı görünümde izlenmektedir. Kas liflerinin sarkolemması altında periferik yerleşimli çekirdekler (ok) kas liflerinin oluşturduğu fasikülleri çevreleyen perimisyum (P) içinde kan damarları (ok başı) görülmektedir. H&Ex200.



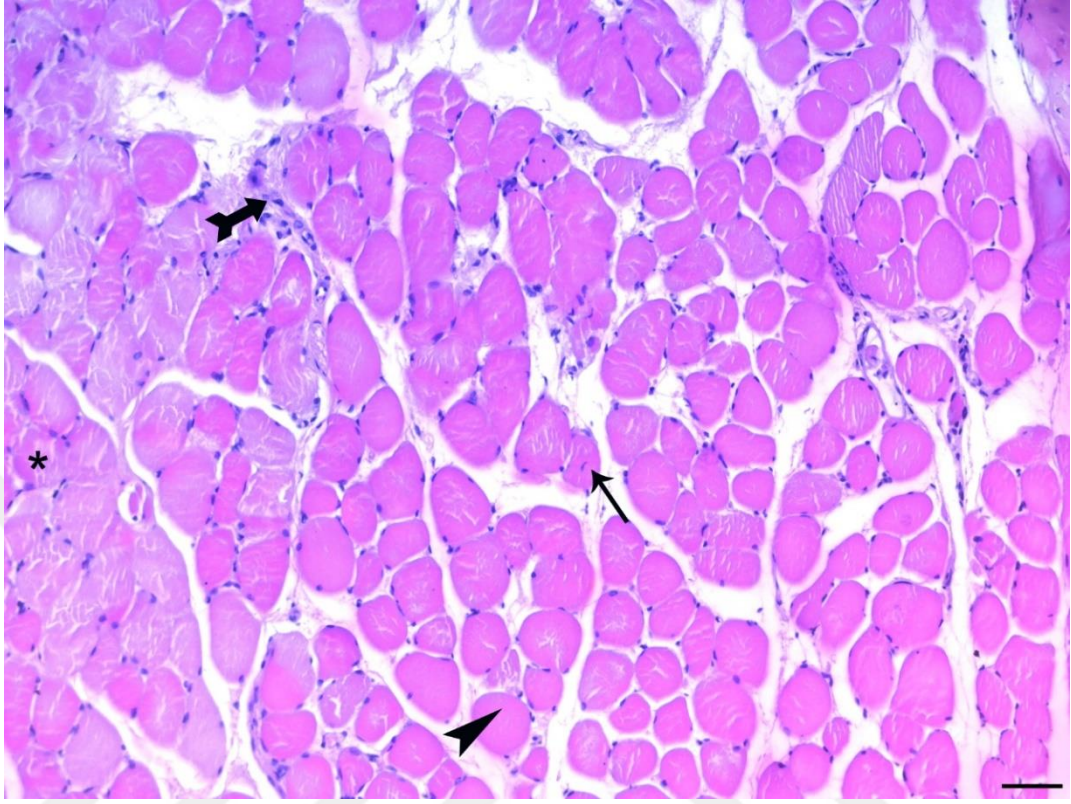
Resim 4. İ/R grubuna ait mikrografta kas liflerinin enine kesit yüzlerinin yuvarlak şekil aldığı (ok), lifler arasında endomisyum mesafesinin artışı (yıldız), kas liflerinde ileri derecede atrofi (kuyruklu ok) görülmektedir. H&Ex200.



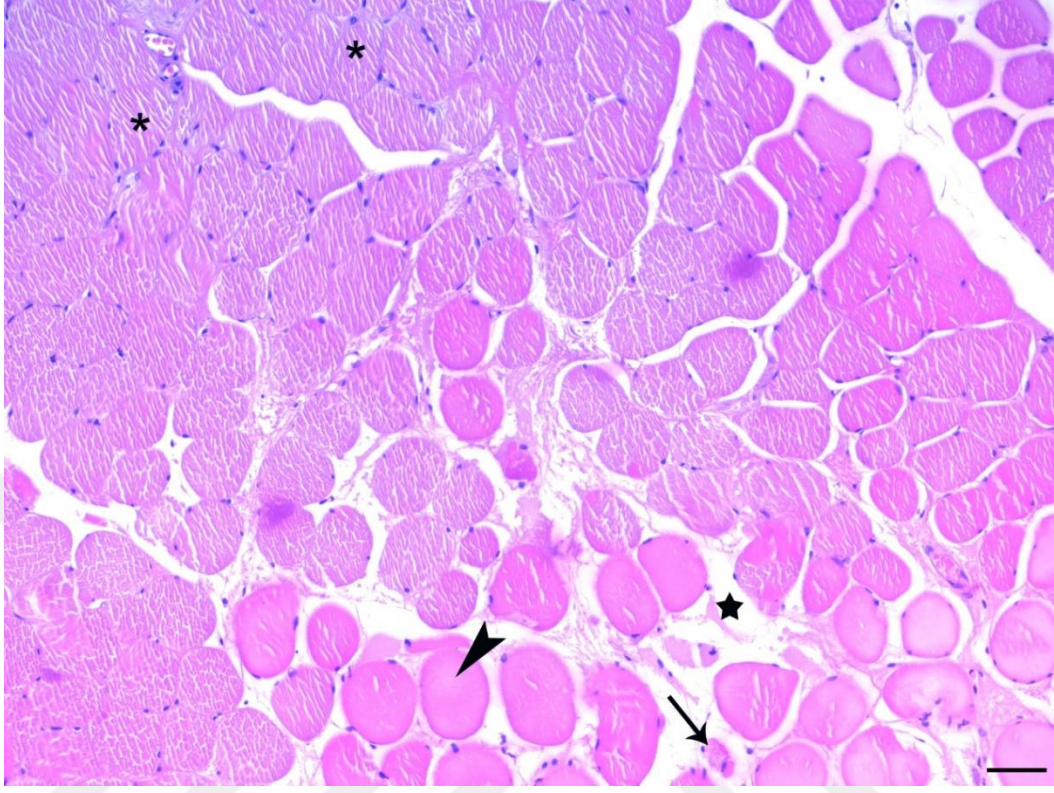
Resim 5. İ/R grubuna ait mikrografta liflerinin enine kesitlerinde kesit yüzlerinin yuvarlak şekil alması, çekirdeğin orta duruşlu yerleşimi (ok), kas liflerinde ileri atrofi izlenmektedir. H&E x400.



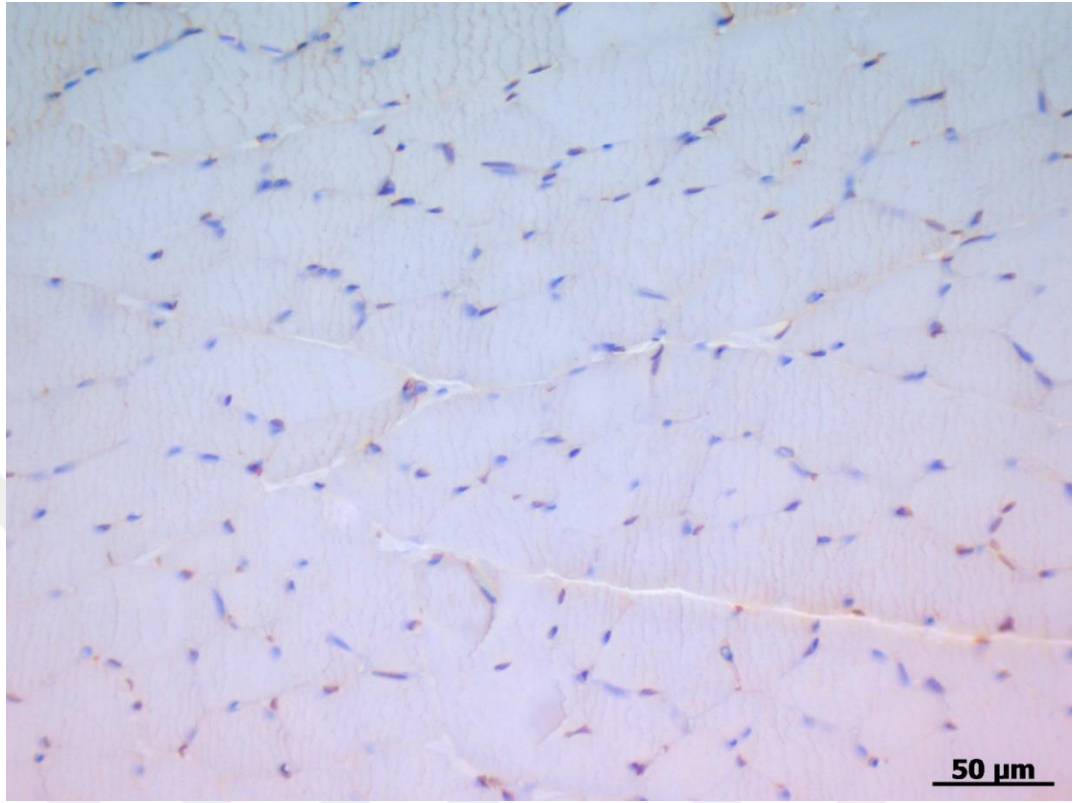
Resim 6. İ/R grubuna ait mikrografta kas liflerinin enine kesitlerinde bazı kesit yüzlerinin yuvarlak şekil alması (ok), kalınlaşan perimisyumda (P) damar (ok başı) ve periferik sinir kesitleri (kuyruklu ok) ile mononükleer hücre infiltrasyonu (kalın ok) izlenmektedir. H&Ex200.



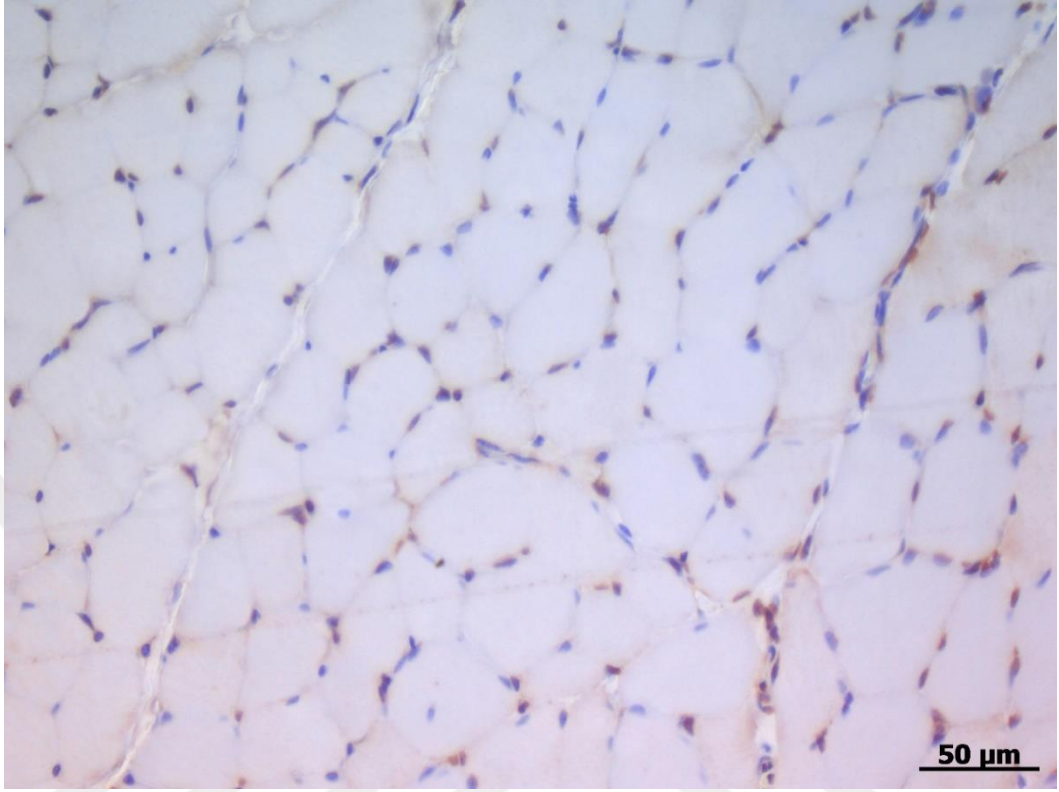
Resim 7. İ/R+Pikrozid grubuna ait mikrografta kas liflerinin enine kesit yüzlerinin yuvarlak şekil alması (ok başı), çekirdeğin orta duruşlu yerleşimi (ok), kas lifleri arasında mononükleer hücre infiltrasyonu (kuyruklu ok) izlenmektedir. Bazı alanlarda ise normal görünümde çok yüzlü kesit yüzeyi gösteren kas lifi kesitleri (asterisk) görülmektedir. H&E x200.



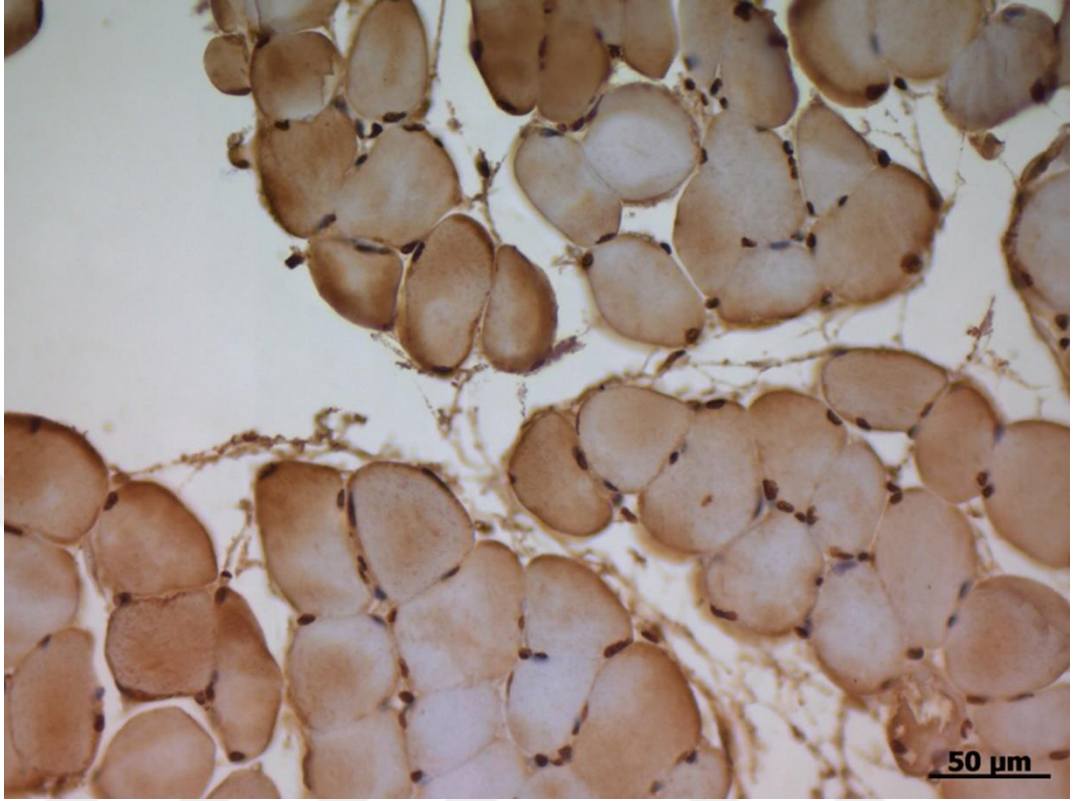
Resim 8. İ/R+Pikrozid grubuna ait mikrografta kas liflerinin kesit yüzlerinin yuvarlak şekil alması (ok başı), kas lifleri arası alanda genişleme (yıldız), atrofik kas lifleri (ok) izlenmektedir. Bazı alanlarda ise normal görünümde çok yüzlü kesit yüzeyi gösteren kas lifi kesitleri (asterisk) görülmektedir. H&E x200.



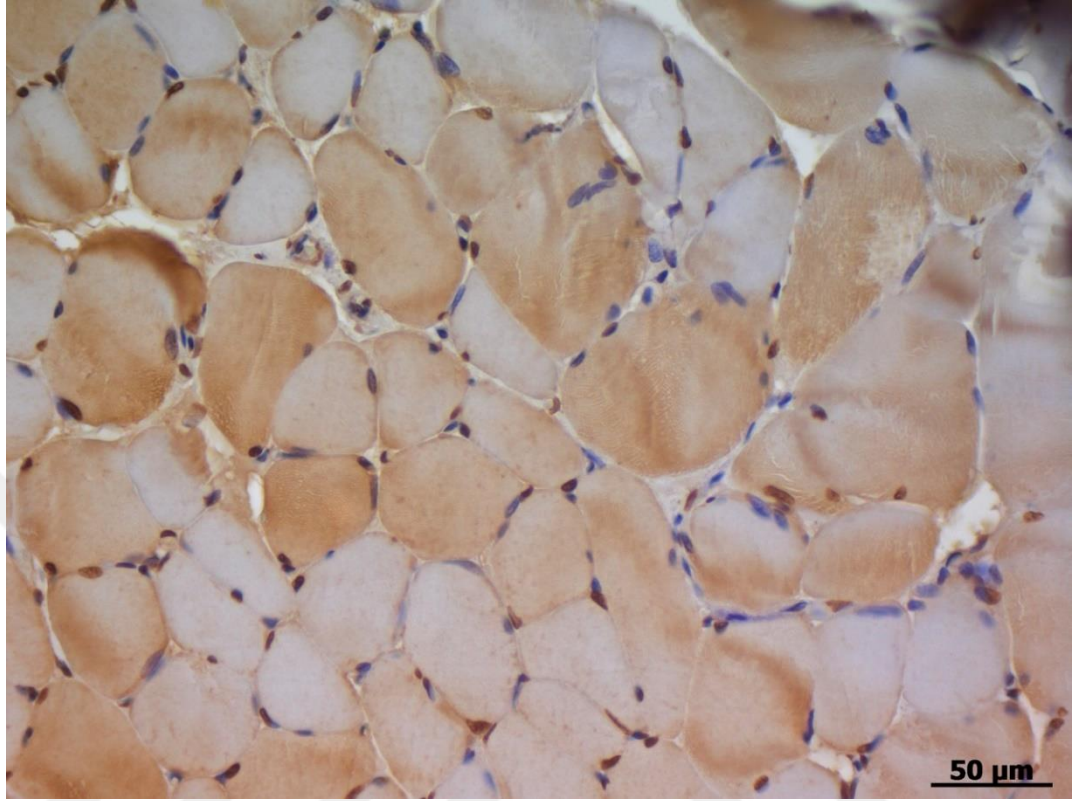
Resim 9. Kontrol grubuna ait mikrografta TUNEL boyama ile immunreaksiyon gösteren az sayıda hücre çekirdeğinde kahverengi boyanma gözlenmektedir. Büyütme: x400



Resim 10. Pikrozid grubuna ait mikrografta TUNEL boyama ile immunreaksiyon gösteren az sayıda hücre çekirdeğinde kahverengi boyanma izlenmektedir. Büyütme: x400



Resim 11. İ/R grubuna ait mikrografta TUNEL boyama ile immunreaksiyon gösteren apopitotik hücre çekirdekleri (kahverengi boyanma) görülmektedir. Büyütme: x400



Resim 12. İ/R + Pikrozid grubuna ait mikrografta TUNEL boyama ile immunreaksiyon gösteren apoptotik hücre çekirdekleri (kahverengi boyanma) görülmektedir. Büyütme: x400

SİÇANLAR	HASAR	İNFİLTRASYON
IR-1	2	1
IR-2	3	2
IR-3	2	2
IR-4	3	3
IR-5	3	2
IR-6	3	2
IR/P-1	2	1
IR/P-2	2	2
IR/P-3	1	1
IR/P-4	2	1
IR/P-5	1	2
IR/P-6	2	1

4. TARTIŞMA

Akut ekstremitte iskemisini takiben, ekstremitenin yeniden kanlandırılması ve normal dolaşımın sağlanması, doku hasarı ve sistemik komplikasyonları birlikte getirir. Çizgili kas dokusunda iskemik reperfüzyon hasarlanması, hastaların mortalite ve morbiditesini olumsuz yönde etkileyen klinik bir durumdur. Bu yüksek mortalite ve morbiditenin sebebi, reperfüzyon hasarının etkisiyle ortaya çıkan myonefropatik-metabolik sendromdur. Uzun süre iskemik kalmış ekstremitenin tekrar kanlandırılmasıyla ortaya çıkan serbest oksijen radikallerinin, endotel ve nötrofillerle etkileşerek, lipid peroksidasyonunu artırması, lokal ve sistemik birçok etkinin ortaya çıkmasına neden olur. Hücre şişmesi, ödem, toksin ve myoglobulin salınımı ile beraber, serbest oksijen radikallerinin etkisi ile akut böbrek yetersizliği, akciğer ödemi, akut sıkıntılı solunum sendromu, şok karacigeri gibi sistemik hasarlar gelişebilir. 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.^(112,113) Kardiyak cerrahide iskemik süre, uygulanan prosedüre göre değişmekle birlikte genellikle azaltılamadığından, bu konuda yapılan çalışmalar reperfüzyon esnasında ortaya çıkan hasarı azaltmak üzerine yoğunlaşmıştır. Uzun yıllardır İ/R hasarının sonuçları ve korunma yöntemleri birçok araştırmacı tarafından daha detaylı çalışılmıştır ve günümüzde bu çalışmalar yoğunlaşarak devam etmektedir. Reperfüzyon sırasında etkilenen alandaki hasarın dışında, tam

olarak netleşmemiş mekanizmalara bağlı olarak uzak organlarda da ciddi hasarlar meydana gelmektedir. Hasara uğrayan bu organların başında akciğer, karaciğer ve böbrek gelmektedir. Bu organların arasında ise en çok etkilenen akciğerlerdir ve bunlarda oluşacak hasarlar post-operatif safhadaki önemli mortalite ve morbidite nedenleridir. Reperfüzyon hasarından serbest oksijen radikallerinin büyük oranda sorumlu olmaları nedeniyle, iskemik alanda bu moleküllerin azaltılması oluşacak olan doku hasarını da azaltabilecektir.

Herhangi bir nedene bağlı olarak iskemi ve takiben reperfüzyon gelişirse, genelde iskeminin süresi ile ilgili olarak antioksidan savunma mekanizmaları yetersiz kalır ve hücrelerde miktarları yükselen SOR'ler çeşitli derecelerde hasar meydana getirir.⁽¹¹⁴⁾ Kas hücresinde İRH sonucu önce geri dönüşümlü, sonrasında iskeminin ileri evrelerinde geri dönüşümsüz hücre hasarı 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, lipidlerin 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 (karyorheksis) gözlenir. İRH'nın ilerleyen döneminde hücre ölümü, "nekroz" ortaya çıkar.^(27,115,116)

Pikrozid II, Picrorhiza Kurroa' dan elde edilen $C_{23}H_{28}O_{13}$ moleküler formüllü bir glikozit türevidir. Chang Z. ve ark.⁽¹⁰¹⁾, Liu G. ve ark.⁽¹⁰²⁾ Pikrozid II'nin anti-oksidan, anti-apatotik ve anti-enflamatuar gibi birçok farmakolojik etkisini yaptığı çalışmalarla göstermiştir. Wang Y. ve ark.⁽¹⁰³⁾ Pikrozid II'nin beyin dokusunda inflamasyonu tetikleyen TLR-2 ve TLR-4 ekspresyonunu inhibe ederek İ/R' nun neden olduğu beyin hasarını hafiflettiği göstermiştir. Lei W. ve ark.⁽¹⁰⁴⁾ proinflamatuvar sitokinlerle(TNF- α ve IL-1 β gibi), adezyon moleküllerinin (ICAM1 mRNA) düzeylerinin Pikrozid II ile azaldığını; Pikrozid II'nin İ/R hasarı meydana gelmiş dokuda MDA düzeyindeki yükselmeyi azalttığını ve SOD, GSH-Px' i artırdığını göstermiştir. Yine aynı şekilde Gao H ve ark.⁽¹⁰⁵⁾ Pikrozid II'nin İ/R hasarı meydana gelmiş dokuda MDA düzeyindeki yükselmeyi azalttığını ve SOD, GSH-Px' i artırdığını göstermiştir. Lei W. ve ark.⁽¹⁰⁴⁾ Pikrozid II'nin hücre proliferasyonu ve apoptozda görev alan NF-kB adlı transkripsiyon faktörü ve TLR-4 yolunun blokajıyla antienflamatuar etkinliğini sağladığını göstermiştir. Meng FJ ve ark.⁽¹⁰⁹⁾ Pikrozid II'nin İ/R hasarı sebebiyle ortaya çıkan apoptosizi Bcl-2 ekspresyonunu artırıp, Bax ekspresyonunu azaltarak ve bir transkripsiyon faktörü olan CREB'i ve PI3K/Akt yolağını fosforilleyerek aktiflemesi yolu ile inhibe ettiğini göstermiştir. Nan W ve ark.⁽¹⁰⁸⁾ Pikrozid II'nin oksidatif stres ve inflamatuvar süreçte azalma sağlayarak böbrek dokusu ve miyokard üzerine koruyucu etki gösterdiğini saptamıştır.

Son yıllarda İ/R hasarının sonuçları ve korunma yöntemleri birçok araştırmacı tarafından daha detaylı çalışılmış ve günümüzde bu çalışmalar yoğunlaşarak devam etmektedir. Bu çalışmada Pikrozid II'nin alt ekstremitte İ/R hasarında reaktif oksijen türevleri ile koruyucu antioksidan mekanizmaları arasındaki dengeye etkisinin gösterilmesi hedeflenmiştir.

Çalışmamızda serbest radikallerin saldırısına karşı organizmadaki toplam antioksidan korumayı yansıtan TAS ve oksidatif stresin toplam değeri olan TOS belirteçleri kullanılmıştır. Yapılan çalışmalarla TAS seviyesi ölçümünün, antioksidanların tek tek ölçümünden daha değerli bilgi verdiği görülmüştür.^(117,118)

Çalışmamızda iskelet kas dokusu TOS enzim aktivitesi açısından kendi aralarında kıyaslandığında, gruplar arasında anlamlı fark vardı. TOS enzim aktivitesi İR grubunda K ve İR-P gruplarına göre anlamlı yüksek olarak bulundu. İ/R hasarının başlıca aktörü olan oksidatif stresin TOS ölçümü ile Pikrozid II verilen gruplarda daha düşük olduğu tespit edildi.

Ayrıca çalışmamızda iskelet kas dokusu TAS enzim aktivitesi açısından kendi aralarında kıyaslandığında, gruplar arasında anlamlı fark vardı. TAS enzim aktivitesi İR grubunda K ve İR-P gruplarına göre anlamlı yüksek olarak tespit edildi ki bu da antioksidan sistemlerin İR hasarı ile bozulduğu yönündeki bilgilerle paralel olup Pikrozid II verilen gruplarda TAS enzim aktivitesinin düşük olması antioksidan sistemlerin korunduğunu diğer bir deyişle aktif olduğunu gösterir.

TUNEL yöntemi apoptozisin bir göstergesi olan DNA fragmanlarının (kırıklarının) in situ olarak saptanması için kullanılan bir boyama yöntemidir. Apoptotik sinyaller DNA üzerinde kırıklar oluşturmaktadır. Açığa çıkan DNA

parçacıklarının serbest 3'-OH uçlarına TdT aracılığı ile biotin ile işaretlenmiş ve işaretlenmemiş deoksinükleotidler eklenir. Daha sonra biotin ile işaretlenmiş nükleotidler, streptavidin-horseradish peroksidaz konjugatı ile tespit edilir. Diaminobenzidine, işaretlenmiş örnek ile tepkimeye girerek DNA kırığı bölgesinde çözünemeyen bir substrat oluşturur. Metil yeşili ile ters boyama yapılarak işlem sonlandırılır. Kahverengi-siyah nükleer-perinükleer boyanma pozitif reaksiyon olarak değerlendirilir. 1 mm²'lik alanda epiteloid granülomlar içerisinde pozitiflik saptanan inflamatuvar hücre (histiyositlenfosit) sayısı TUNEL pozitif hücre sayısı olup çalışmamızda iskelet kas dokusu TUNEL hücre sayısı açısından kendi aralarında kıyaslandığında, gruplar arasında anlamlı fark vardı. TUNEL hücre sayısı İR grubunda K, P ve İR-P gruplarına göre anlamlı yüksek olarak tespit edildi. Ayrıca, İR-P grubunda TUNEL hücre sayısı K ve P gruplarına göre anlamlı yüksek olarak tespit edildi.

Çalışmamızda iskelet kas dokusu infiltrasyon açısından kendi aralarında kıyaslandığında, gruplar arasında anlamlı fark vardı. İnfiltrasyon İR grubunda K, P ve İR-P gruplarına göre anlamlı yüksek olarak tespit edildi. Ayrıca, İR-P grubunda infiltrasyon K ve P gruplarına göre anlamlı yüksek olarak tespit edildi.

Çalışmamızda iskelet kas dokusu hasar açısından kendi aralarında kıyaslandığında, gruplar arasında anlamlı fark vardı. Hasar İR grubunda K, P ve İR-P gruplarına göre anlamlı yüksek olarak tespit edildi. Ayrıca, İR-P grubunda infiltrasyon K ve P gruplarına göre anlamlı yüksek olarak tespit edildi.

Çalışmamızda iskelet kas enine kesit açısından kendi aralarında kıyaslandığında, gruplar arasında anlamlı fark vardı. Hasar İR grubunda K, P ve İR-P gruplarına göre anlamlı yüksek olarak tespit edildi.



5. SONUÇLAR

Çalışmamızda ratlarda iskelet kası iskemi reperfüzyon hasarında Pikrozid II'nin biyokimyasal değerlendirmeler sonucunda oksidatif strese karşı antioksidan etkisi gösterilmiştir.

İ/R hasarı oluşturulan rat modelinde iskelet kası dokusunda Pikrozid II'nin İ/R hasarına karşı koruyucu etkisi saptanmıştır.

Çalışmamızdaki bu bilgiler ışığında, Pikrozid II'nin İ/R hasarına karşı koruyucu etkilerinin başka çalışmalarla desteklenmesi gerektiği görüşündeyiz.

6. ÖZET

Pikrozid II'nin Ratlarda İskelet Kasında İskemi Reperfüzyon Hasarına Karşı Etkisi; Alt ekstremite iskemi-reperfüzyon hasarı sık ve önemli bir fenomendir. Bu tip hasarlarda doku ve hücrelerde pek çok yapısal ve fonksiyonel bozukluklar gözlenmektedir. İskemik dokunun kanlandırılmasından sonra ortaya çıkan reperfüzyon hasarının tedavisine yönelik bilimsel çalışmalar her geçen gün artmaktadır. Bu çalışmada ratlarda iskemi reperfüzyon sırasında pikrozid II'nin iskelet kası üzerine etkisinin değerlendirmeyi amaçladık.

Ratlar her biri altı hayvandan oluşan 4 gruba ayrıldı (sham, I/R, sham + Pikrozid II ve İ/R + Pikrozid II). İ/R grubunda infrarenal abdominal aorta atravmatik mikrovasküler bir klemple oklude edildi. Klemp 120 dk sonar çıkarıldı ve 120 dk daha reperfüzyon sağlandı. Uygun gruplardaki (sham + Pikrozid II, İ/R + Pikrozid II grupları) hayvanlara Pikrozid II (10 mg·kg⁻¹) intraperitoneal yolla uygulandı. Tüm ratlara intraperitoneal ketamin (100 mg·kg⁻¹) uygulaması ve abdominal aortadan kan alarak ötenazi yapıldı. Çalışmanın sonunda TAS (total antioxidant status), TOS (total oxidant status) seviyelerini belirlemek amacıyla iskelet kası dokusu çıkarıldı ve apoptozis TUNEL yöntemiyle değerlendirildi.

TOS enzim aktivitesi İR grubunda K ve İR-P gruplarına göre anlamlı yüksek olarak bulundu (p=0.014, p=0.005, sırasıyla). TAS enzim aktivitesi İR grubunda K ve İR-P gruplarına göre anlamlı yüksek olarak tespit edildi (p=0.007 p=0.005, sırasıyla). TUNEL testi Pikrozid II'nin hücre nekrozunu azalttığını ortaya koydu.

Sonuçlar Pikrozid II'nin iskemi reperfüzyon hasarını engellemede kritik bir rol oynadığını desteklemektedir. İleri deneysel ve klinik çalışmalar bu bulguların deneysel ve klinik öneminin ve olayın moleküler mekanizmasının değerlendirilmesi ve netleştirilmesi için gereklidir.

Anahtar Kelimeler: İskemi Reperfüzyon, Pikrozid II, Alt Ekstremitte İskelet Kası

7. ABSTRACT

Effect of Picroside II in Rats Subjected to Hind Limb Ischemia Reperfusion

Injury; Ischemia reperfusion injury (I/R) in hind limb is a frequent and important clinical phenomenon. Many structural and functional damages are observed in cells and tissues in these kinds of injuries. The scientific studies for the treatment of reperfusion injury after perfusion of ischemic tissue have been increasing day by day. In this study, we aimed to evaluate the effect of Picroside II on skeletal muscle during I/R in rats.

Rats were randomly divided into four groups – each containing six animals (sham, I/R, sham + picroside II, and I/R + picroside II). The infrarenal section of the abdominal aorta was occluded with an atraumatic microvascular clamp in I/R groups. The clamp was removed after 120 minutes and reperfusion was provided for a further 120 minutes. Picroside II (10 mg·kg⁻¹) was administered intraperitoneally to the animals in the appropriate groups (sham + picroside II, I/R + picroside II groups). All rats were euthanized by intraperitoneal administration of ketamine (100 mg·kg⁻¹) and taking blood from the abdominal aorta. At the end of the study, skeletal muscle tissue was obtained for determining total oxidant status (TOS) and total antioxidant status (TAS) levels and apoptosis was evaluated by TUNEL experiment.

TOS levels were significantly higher in Group I/R, when compared with groups S and IR-P (p=0.014, p=0.005, respectively). TAS levels were significantly higher in Group I/R, when compared with groups S, IR-P (p=0.007 p=0.005, respectively). TUNEL assay revealed that Picroside II reduced cell necrosis. These results support that Picroside II plays a critical role to prevent I/R injury. Further experimental and clinical studies are needed to evaluate and clarify the molecular mechanisms of action and clinical importance of these findings.

Keywords: Ischemia Reperfusion, Picroside II, Hind Limb Skeletal Muscle

8. KAYNAKLAR

1. Ergün Y: Çizgili kas iskemi-reperfüzyon hasarı ve nitrik oksit ile ilişkisi. Arşiv- 2006; 15; 133-157.
2. Taş, A. Desfluran ve propofol anestezisinin rat hepatik iskemi reperfüzyon hasarı üzerindeki koruyucu etkilerinin karşılaştırılması. Uzmanlık Tezi. Ankara: Gazi Üniversitesi, Kasım 2010
3. Duran E. Kalp ve Damar Cerrahisi. 1. Baskı. Edirne: Ekim 2004; cilt 1, 197.
4. 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.
5. Kumar V, Abbas AK, Fausto N, eds Robbins and Cotran Pathologic Basis of Disease, 7th Edition, Philadelphia: Elsevier Saunders, 2004.
6. 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
7. Carden DL, Granger DN. Pathophysiology of ischaemia-reperfusion injury. J Pathol, 2000; 190:255- 266.
8. Anaya-Prado R, Toledo-Pereyra LH, Lentsch AB, Ward PA Ischemia/reperfusion injury. J Surg Res.2002; 15;105(2):248-58

9. 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
10. Homer-Vanniasinkam S, Crinnion JN, Gough MJ: Post-ischaemic organ dysfunction: a review. *Eur J Vasc Endovasc Surg*, 1997; 14:195-203.
11. Siemionow M, Arslan E, Ischemia/reperfusion injury: a review in relation to free tissue transfers. *Microsurgery*. 2004;24:468-75.
12. Wilhelm J. Metabolic aspects of membrane lipid peroxidation. *Acta Univ Carol Med Monogr* 1990; 137:1-53.
13. Green CJ, Gower JD, Healing G, Cotterill LA, Fuller BJ, Simpkin S. The importance of iron, calcium and free radicals in reperfusion injury: an overview of studies in ischaemic rabbit kidneys. *Free Radic Res Commun* 1989;7: 255-6.
14. Anaya-Prado R, Toledo-Pereyra LH. The molecular events underlying ischemia/reperfusioninjury. *Transplant Proc*.2002;34: 2518-9.
15. Lehninger AL. Generation of ATP in anaerobik cell. In: *Bioenergetics*.ed 2 Menlo park, Calif: WA Benjamin 1971:53-71
16. 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
17. Siesjö BK. Mechanisms of ischemic brain damage. *Crit. Care Med* 1988;16:954-63

18. Newmeyer DD, Ferguson-Miller S. Mitochondria: releasing power for life and unleashing the machineries of death. *Cell*. 2003;21;112(4):481-90
19. Anaya-Prado R, Toledo-Pereyra LH. The molecular events underlying ischemia/reperfusion injury. *Transplant Proc*. 2002;34(7):2518-9.
20. Droge W. Free radicals in the physiological control of cell function *Physiol Rev*. 2002;82(1):47-95
21. Paschen W. Role of calcium in neuronal cell injury: which subcellular compartment is involved? *Brain Res Bull*. 2000;1;53(4):409-13
22. Orrenius S, Zhivotovsky B, Nicotera P. Regulation of cell death: the calcium-apoptosis link. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2003;4(7):552-65.
23. Nuh Zafer Cantürk, İskender Sayek. Cerrahi araştırma kitabı. 2005 nobel tıp kitabevleri
24. Toyokuni S: Reactive oxygen species-induced molecular damage and its application in pathology. *Pathol int* 1999; 49:91-102
25. Granger DN. Role of xanthine oxidase and granulocytes in ischaemia-reperfusion injury. *Am L Physiol* 1988; 255.HI269-75
26. Ernster L. Biochemistry of reoxygenation injury. *Crit Care Med* 1988;16:947-53
27. Kumar V, Otran R, Robbins SL. Temel patoloji (Basic Pathology), 6. baskı, Temmuz 2000, 6-10, 30-36
28. Grace PA. Ischaemia-reperfusion injury. *Br J Surg* 1994;81: 637-47.

29. Groot H, Rauen U. Ischemia-Reperfusion Injury: Processes in Pathogenetic Networks: A Review. *Transplant Proc* 2007;39: 481-4.
30. Kuralay F, Çavdar Z. İnflamatuar mediyatörlere toplu bir bakış. *Genel Tıp Dergisi* 2006;16: 143-152.
31. Basaga HS. Biochemical aspects of free radicals. *Biochem Cell Biol* 1990;68:989
32. Cadenas E. Mechanisms of antioxidant action. In: Tomris Özben, editor. *Free Radicals, Oxidative Stress and Antioxidants*. New York: Plenum Press 1998;237-251.
33. Cheeseman KH, Slater TF. An introduction to free radical biochemistry. *Br Med Bull* 1993;49: 481-93.
34. Rangan U, Bulkley GB. Prospects for treatment of free radical-mediated tissue injury. *Br Med Bull* 1993;49: 700-18.
35. Erden M, Serbest radikaller. *T. Klinik Tıp Bilimleri Dergisi* 1992;12: 201- 7
36. Dhalla NS, Elmoselhi AB, Hata T, Makino N. Status of myocardial antioxidants in ischemia-reperfusion injury. *Cardiovasc Res* 2000;47: 446-456.
37. Boyle EM, Pohlman TH, Cornejo CJ, Verrier ED. Ischemia-Reperfusion injury. *Ann Thorac Surg* 1997;64:S24-30.
38. Becker LB. New concepts in reactive oxygen species and cardiovascular reperfusion physiolog. *Cardiovasc Res* 2004;61: 461-470.

39. Anselmi A, Abbate A, Girola F. Myocardial ischemia, stunning, inflammation and apoptosis during cardiac surgery: a review of evidence. *Eur J Cardio-thorac Surg* 2004;25: 304-311.
40. Gaeta LM, Tozzi G, Pastore A, Federici G, Bertini E, Piemonte F. Determination of superoxide dismutase and glutathione peroxidase activities in blood of healthy pediatric subjects. *Clin Chim Acta* 2002;322: 117-120.
41. Murrell GA, Francis MJ, Bromley L. Modulation of fibroblast proliferation by oxygen free radicals. *Biochem J* 1990;265: 659-65.
42. Blaisdell FW: The pathophysiology of skeletal muscle ischemia and the reperfusion syndrome: a review. *Cardiovasc Surg* 2002; 10:620-630
43. Haimovici H. Metabolic complications of acute arterial occlusions and related conditions: myoneuropathic-metabolic syndrome. Futura Publ Co, Mount Kisco, NY, 1988
44. Stallone RJ, Blaisdell FW, Cafferata HT et al. Analysis of morbidity and mortality from arterial embolectomy. *Surgery*, 1969; 65, 207–217
45. 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
46. Hayes G, Liauw S, Romaschin AD, Walker PM. Separation of reperfusion injury from ischemia-induced necrosis. *Surg Forum*, 1988; 39, 306–308
47. Harman JW. The significance of local vascular phenomena in the production of ischemic necrosis in skeletal muscle. *Am J Pathol*, 1948; 24, 625–641

48. Brooks B. Pathologic changes in muscle as the result of disturbances of circulation. *Arch Surg*, 1922, 5, 188-216
49. Ames A Jr, Wright RL, Kowada M. Cerebral ischemia II. The no-reflow phenomenon. *Am J Pathol*, 1968, 52, 437–453. 28
50. Lindsay T, Romaschin A, Walker PM: Free radical mediated damage in skeletal muscle. *Microcirc Endothelium Lymphatics*- 1989; 5: 157-170
51. 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
52. 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
53. Korthuis RJ, Granger DN, Townsley MI, ve ark: The role of oxygen derived free radicals in Ischemia induced increases in canine skeletal muscle vascular permeability. *Circ res*- 1985; 57: 599-600
54. Fantini GA, Yoshioka T. Desferoxamine prevents lipid peroxidation and attenuates reoxygenation injury in postischemic skeletal muscle. *Am J Physiol* - 1993;264: 1953-1959
55. Beckman JS, Beckman TW, Chen J, ve ark: Apparent hydroxyl radical production by peroxynitrite: implications for endothelial cell injury from nitric oxide and superoxide. *Proc Natl Acad Sci USA* -1990;87: 1620-1624

56. Gute DC, Ishida T, Yarimizu K, ve ark: Inflammatory responses to ischaemia and reperfusion in skeletal muscle. *Mol Cell Biochem*-1998;179:169-187
57. Belkin M, Wright JG, Hobson RW: Iloprost infusion decreases skeletal muscle Ischemia-reperfusion injury. *J Vasc Surg*-1990; 11: 77-83
58. 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
59. Carden DL, Smith JK, Korthuis RJ: Neutrophil mediated microvascular dysfunction in postischemic canine skeletal muscle. *Circ Res*- 1990; 66: 1436-1444
60. Korthuis RJ, Grisham MB, Granger DN: Leukocyte depletion attenuates vascular injury in postischemic skeletal muscle. *Am J Physiol*-1988; 254: 823-827
61. Rubin BB, Chang G, Liauw S, ve ar: Phospholipid peroxidation depletion and remodeling in postischemic skeletal muscle. *Am J Physiol* -1992; 263: 1695-1702
62. 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

63. Bevilacqua MP, Sengelín 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
64. McEver RP: Selectins: novel adhesion receptors that mediate leukocyte adhesion during Thromb Haemostasis -1991; 65: 223-228
65. Kishimoto TK: A dynamic model for neutrophil localization to inflammatory sites. *J Natl Inst Health Res* -1991; 3: 75-77
66. 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
67. Smith CW: Molecular determinants of neutrophil activation. *Am J Respir Cell Mol Biol* -1990; 2: 487-499
68. Wesselcouch R, Goldman G, Paterson IS, ve ar: Effect of in vivo inhibition of neutrophil adherence on skeletal muscle function during Ischemia in ferrets. *Am J Physiol* -1991; 261: 1178-1183
69. 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
70. 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

71. Seekamp A, Warren JS, Remick DG, ve ark: Requirements for tumor necrosis factor-alpha and interleukin-1 in limb Ischemia/reperfusion injury and associated lung injury. *Am J Pathol*- 1993; 143: 453-463
72. Engels W, Van Bilsen M, DeGroot MTM: Ischemia and reperfusion-induced formation of eicosanoids in isolated rat hearts. *Am J Physiol*- 1990; 258: 1865-1871
73. Lehr HA, Gohlmann A, Nolte D, ve ark: Leukotriens as mediators in Ischemia-reperfusion injury in a microcirculation model in the hamster. *J Clin Invest*- 1991; 87: 2036-2041
74. Goldman G, Welbourn R, Paterson IS, vark: Ischemia-induced neutrophil activation and diapedesis is lipoxygenase dependent. *Surgery St Louis*- 1990; 107: 428-433
75. Carden DL, Korthuis RJ. Role of leukotriene B4 in postischemic skeletal muscle microvascular dysfunction. *FASEB J* -1991; 5: 893
76. Ascer EM, Gennaro M, Cupo S, ve ark: Do cytokines play a role in skeletal muscle Ischemia and reperfusion? *J Cardiovasc Surg*- 1992; 33: 588-592 64
77. Seekamp A, Mulligan MS, Till GO, ve ark: Requirements for neutrophil products and L-arginine in Ischemia-reperfusion injury. *Am J Pathol* -1993; 142: 1217-1226
78. Nakazawa H, Genka C, Fujishima M: Pathological aspects of active oxygen free radicals. *Jap J Physiol* -1996; 46: 15-32

79. Fleming J, Miguel J, Econimos A: Is cell aging caused by respiration dependent injury to the mitokondrial genome. *Gerontol*- 1982; 28-44
80. Jugdutt BI: Nitric oxide and cardioprotection during Ischeamia-reperfusion. *Heart Failure Reviews* -2002; 7: 391-405
81. Ferdinandy P, Schultz R: Nitric oxide, superoxide, and peroxynitrite in myocardial Ischeamia-reperfusion injury and preconditioning. *Br J Pharmacol*- 2003; 138: 532-543
82. 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
83. Ertan T, Soran A, Kılıç M, ve ark: Kan MDA ve total antioksidan seviyesinin (TAS) önemi. *Cerrahi Tıp Bülteni*- 2001; 24:154-167
84. Storz G, Imlay JA: Oxidative stres. *Cur Opin Microbiol*-1992:188-194
85. Gutteridge JMC: Lipid peroxidation and antioxidants as biomarkers of tissue damage. *Clin Chem*-1995; 41: 1819-1828
86. Girotti AW: Lipid hydroperoxide generation, turnover, and effector action in biological systems. *J Lipid Res* -2000; 3: 1529-1542
87. Johnson F, Giulivi C: Superoxide dismutases and their impact upon human health. *Mol Aspects Med*-2005; 26: 340-352
88. Beutler E: Red cell metabolism. A manuel of biocemical methods. New York: In Grune and stratton- 1973;74

89. 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
90. Faraji B, Kang HK, Valentine JL: Methods compared for determining glutathione peroxidase activity in blood. Clin chem -1987; 33: 539-543
91. Anderson ME: Glutathione an overview of biosynthesis and modulation. Chem Biol Interact- 1998;111: 1-14
92. Stein HJ, Oosthuizen MMJ, Hinder RA, ve ark: Oxygen free radicals and glutathione in hepatic ischemia-reperfusion injury. J Surgery -1991; 50: 398-402
93. Bergmayer J, Grabl M: Methods of enzymatic analysis-1983;190-302
94. Floyd R. Role of oxygen free radicals in carcinogenesis and brain ischemia. FASEB J-1990; 4: 2587-2597
95. McCord J: Oxygen derived free radicals in postischemic tissue injury. N Eng J Med -1985; 312: 159-163
96. Uysal M. Serbest radikaller, lipid peroksidleri ve organizmada prooksidan-antioksidan dengesini etkileyen koşullar. Klinik gelişim-1998;11: 336-341
97. Sud A, Chauhan RS, Tandon C. Identification of imperative enzymes by differential protein expression in *Picrorhiza kurroa* under metabolite accumulating and non-accumulating conditions 2013 Jul 1;20(7):826-35.

98. Zhu J, Xue B, Ma B, Zhang Q, Liu M, Liu L, Yao D, Qi H, Wang Y, Ying H, Wu Z. A pre-clinical pharmacokinetic study in rats of three naturally occurring iridoid glycosides, Picroside-I, II and III, using a validated simultaneous HPLC-MS/MS assay. 2015 May 6;993-994C:47-59
99. Cao Y, Liu JW, Yu YJ, Zheng PY, Zhang XD, Li T, Guo MC. Synergistic protective effect of picroside II and NGF on PC12 cells against oxidative stress induced by H₂O₂. *Pharmacol Rep.* 2007;59:573–579.
100. He LJ, Liang M, Hou FF, Guo ZJ, Xie D, Zhang X. Ethanol extraction of *Picrorhiza scrophulariiflora* prevents renal injury in experimental diabetes via anti-inflammation action. *J Endocrinol.* 2009;200:347–355. doi: 10.1677/JOE-08-0481.
101. Chang Z. Role of toll-like receptors in regulatory functions of T and B cells. *Chinese Science Bulletin.* 2008;53(8):1121–1127.
102. Liu G, Zhang L, Zhao Y. Modulation of immune responses through direct activation of Toll-like receptors to T cells. *Clinical and Experimental Immunology.* 2010;160(2):168–175.
103. Wang Y, Ge P, Zhu Y. TLR2 and TLR4 in the brain injury caused by cerebral ischemia and reperfusion. *Mediators Inflamm.* 2013;2013:124614
104. Lei Wang, Xiu-Heng Liu, Hui Chen, Zhi-Yuan Chen, Xiao-Dong Weng, Tao Qiu, and LIN LIU Department of Urology, Renmin Hospital of Wuhan University, Wuhan, Hubei 430060, P.R. China 10.3892/.2015.2225.

105. Gao H, Zhou YW. Anti-lipid peroxidation and protection of liver mitochondria against injuries by picoside II. *World J Gastroenterol*. 2005;11:3671–3674. doi: 10.3748/wjg.v11.i24.3671.
106. Kierszenbaum AL. *Histology and Cell Biology An Introduction to Pathology*. Second edition. Canada: Elsevier 2007; 85-104.
107. Sowers JR. Insulin resistance and hypertension. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2004;286:1597-1602
108. Nan Wu, Wenna Li, Wenqi Shu, and Dalin Jia et al. 2014; 8: 545–554. Protective effect of picoside II on myocardial ischemia reperfusion injury in rats.
109. Meng FJ, Jiao SM, Yu B. 2012 Aug;30(2):263-70. Picoside II protects cardiomyocytes from hypoxia/reoxygenation-induced apoptosis by activating the PI3K/Akt and CREB pathways.
110. Li Zhao, Xiaodan Li, Tingting Wang, Yunliang Guo, Fangfang Pang, Cuicui Chang The anti-inflammatory effect of picoside II and the optimizing of therapeutic dose and time window in cerebral ischemic injury in rats Institute of Cerebrovascular Diseases, Affiliated Hospital of Qingdao University Medical College, Qingdao, China 2013 Vol.2, No.3, 46-53.
111. Erkanli K¹, Kayalar N, Erkanli G, Ercan F, Sener G, Kirali K. Melatonin protects against ischemia/reperfusion injury in skeletal muscle. *J Pineal Res*. 2005 Oct;39(3):238-42

112. Pontoppidan H, Geffin B, Lowenstein E. Acute respiratory failure in the adult. N Engl J Med 1972; 287:690-806.
113. Dantzker DR, Scharf SM. Cardiopulmonary Critical Care. 3rd ed. Philadelphia, WB Saunders, 1998. 41-42.
114. Robicsek F, Schaper J. Reperfusion injury: Fact or myth?, J Cardiac Surg 1997;12:133-7
115. Alizan A, Khalil C, Farah A, John C. Reperfusion injury. Plast. Reconstr Surg 2006;117: 1024–1033
116. 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
117. Ghiselli, A., Serafini, M., Natella, F. Total antioxidant capacity as a tool to assess redox status: Critical view and experimental data. Free Radic Biol Med 2000; 29 (11): 1106-14.
118. Erel O.. A novel automated direct measurement method for total antioxidant capacity using a new generation, more stable ABTS radical cation. Clin Biochem. Apr 2004;37(4):277-85.

9. EKLER

Ek-1: Etik Onay

Evrak Tarih ve Sayısı: 08/04/2015-43500



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



Sayı : 66332047-604.01.02-
Konu : Değerlendirme ve Onay

Sayın Doç. Dr. Tolga TATAR
Kalp ve Damar Cerrahisi Anabilim Dalı Başkanlığı - Öğretim Üyesi

Araştırmacı grubu Tolga TATAR, Yiğit KILIÇ, Mustafa Hakan ZOR, Mustafa ARSLAN, Mehmet KIRIŞÇI, Hakan KARTAL, Ali Doğan DURSUN, Ayşegül KÜÇÜK ve Deniz BILLUR'dan oluşan, G.Ü.ET-15.019 kod numaralı ve "**Pikrosid-2'nin Ratlarda İskelet Kasında İskemi-Reperfüzyon Hasarına Karşı Etkisi**" başlıklı araştırma öneriniz incelenmiş ve Gazi Üniversitesi Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurul Yönergesindeki ilkelere uygun olduğu saptanarak onaylanmasına oybirliği ile karar verilmiştir.

Bilgilerinizi rica ederim.

It is unanimously approved that the research project numbered G.Ü.ET-15.019 and entitled "*The Effect of Picroside-2 Against the Ischemia-Reperfusion Damage of Skeletal Muscles on Rats*" is in compliance with Gazi University Animal Experiments Local Ethics Committee regulations.

With my best regards,

e-imzalıdır
Prof. Dr. Leyla AÇIK
Kurul Başkanı

EK :
1 Liste