

**SIÇANLARDA DENEYSEL OLUŞTURULAN  
ALT EKSTREMİTE İSKEMİ-REPERFÜZYON  
HASARINDA LEFLUNOMİDİN KORUYUCU  
ETKİNLİĞİ**

**Cebrail GÜRSUL**

**Tıp Fizyoloji Anabilim Dalı**

**Tez Danışmanı  
Prof. Dr. Mustafa GÜL**

**Doktora Tezi-2012**

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

**SIÇANLARDA DENEYSEL OLUŞTURULAN ALT  
EKSTREMİTE İSKEMİ-REPERFÜZYON HASARINDA  
LEFLUNOMİDİN KORUYUCU ETKİNLİĞİ**

**Cebrail GÜRSUL**

**Tıp Fizyoloji Anabilim Dalı  
Doktora Tezi**

**Tez Danışmanı  
Prof. Dr. Mustafa GÜL**


**ERZURUM  
2012**

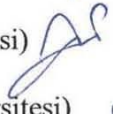
T.C.  
ATATÜRK ÜNİVERSİTESİ  
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ  
TIP FİZYOLOJİ ANABİLİM DALI


SIÇANLARA DENEYSEL OLUŞTURULAN ALT  
EKSTREMİTE İSKEMİ-REPERFÜZYON HASARINDA  
LEFLUNOMİDİN KORUYUCU ETKİNLİĞİ

Cebrail GÜRSUL

**Tez Savunma Tarihi** : 23.11.2012

**Tez Danışmanı** : Prof. Dr. Mustafa GÜL (Atatürk Üniversitesi) 

**Jüri Üyesi** : Doç. Dr. Alaadin POLAT (İnönü Üniversitesi) 

**Jüri Üyesi** : Doç. Dr. Ali KARADENİZ (Atatürk Üniversitesi) 

**Jüri Üyesi** : Yrd. Doç. Dr. Serap YILDIRIM (Atatürk Üniversitesi) 

**Jüri Üyesi** : Yrd. Doç. Dr. Tuncer NACAR (Atatürk Üniversitesi) 

**Onay**

Bu çalışma yukarıdaki jüri tarafından **Doktora Tezi** olarak kabul edilmiştir.

  
**Prof. Dr. Yavuz Selim SAĞLAM**  
Enstitü Müdürü

**Doktora Tezi**  
**ERZURUM-2012**

# İÇİNDEKİLER

<b>TEŞEKKÜR.....</b>	<b>IV</b>
<b>ÖZET.....</b>	<b>V</b>
<b>ABSTRACT.....</b>	<b>VII</b>
<b>SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ.....</b>	<b>IX</b>
<b>ŞEKİLLER DİZİNİ.....</b>	<b>XI</b>
<b>TABLolar DİZİNİ.....</b>	<b>XII</b>
<b>1. GİRİŞ.....</b>	<b>1</b>
<b>2. GENEL BİLGİLER.....</b>	<b>4</b>
2.1. İskemi-Reperfüzyon Hasarı.....	4
2.2. İskemi-Reperfüzyon Hasarının Fizyopatolojisi.....	5
2.3. İskemi-Reperfüzyonda Serbest Radikallerin Oluşumu.....	14
2.4. Kritik İskemi Süresi.....	15
2.5. Polimorfonükleer Nötrofillerin İskemi-Reperfüzyon Hasarındaki Rolü....	16
2.6. Nitrik Oksitin İskemi-Reperfüzyon Hasarındaki Rolü.....	19
2.7. İskemi-Reperfüzyon Hasarında Mitokondrilerin Rolü.....	20
2.8. Komplement Aktivasyonu.....	21
2.9. Sitokinlerin Rolü.....	23
2.10. No-Reflow Fenomeni.....	24
2.11. İskemi-Reperfüzyon Hasarının Lokal ve Sistemik Belirtileri.....	25
2.12. İskelet Kası İskemi-Reperfüzyon Hasarı.....	25
2.13. Leflunomid.....	30

<b>3. MATERYAL VE METOT.....</b>	<b>33</b>
3.1. Deney Grupları.....	33
3.2. Alt Ekstremitte Turnike İskemi Modeli ve İskeminin İndüksiyonu.....	34
3.3. Reperfüzyon İşlemi.....	34
3.4. Leflunomidin Hazırlanması ve Uygulanması.....	34
3.5. Sıçanların Batınlarının Açılması ve Kas ve Kan Örneklerinin Alınması....	34
3.6. Biyokimyasal Prosedür.....	35
3.6.1. Dokuların Hazırlanması.....	35
3.6.2. Katalaz (CAT) Enzim Aktivitesi.....	35
3.6.3. Süperoksit Dismutaz (SOD) Enzim Aktivitesi.....	36
3.6.4. Glutasyon Peroksidaz (GSH-Px) Enzim Aktivitesi.....	36
3.6.5. Tiyobarbitürük Asit Reaktif Maddeleri (TBARS) Miktarının Tayini.....	36
3.6.6. Protein Tayini.....	36
3.6.7. Kreatin Kinaz ve Laktat Dehidrogenaz Enzim Düzeyleri.....	37
3.7. Histopatolojik İnceleme.....	37
3.8. İstatistiksel Analiz.....	39
<b>4. BULGULAR.....</b>	<b>40</b>
4.1. Gastrokinemius Kası Biyokimyasal Bulguları.....	40
4.1.1. Malondialdehit (MDA).....	40
4.1.2. Süperoksit dismutaz(SOD).....	41
4.1.3. Glutasyon peroksidaz (GSH-Px).....	42
4.1.4. Katalaz (CAT).....	43
4.2. Serum Biyokimyasal Bulguları.....	44
4.2.1. Kreatin Kinaz (CK).....	44

4.2.2. Laktat Dehidrogenaz.....	45
4.3. Histopatolojik Bulgular.....	46
4.3.1. Kontrol Grubu Bulguları.....	46
4.3.2. IR Grubu Bulguları.....	48
4.3.3. IR+LEF Grubu Bulguları.....	51
4.3.4. Gastrokinemius Kası Lökosit İnfiltrasyonu.....	53
4.3.5. Gastrokinemius Kası İçin Histopatolojik Değerlendirme Skorlaması.....	54
<b>5. TARTIŞMA.....</b>	<b>55</b>
<b>6. SONUÇ VE ÖNERİLER.....</b>	<b>63</b>
<b>KAYNAKLAR.....</b>	<b>64</b>
<b>EKLER.....</b>	<b>74</b>
<b>EK-1. ÖZGEÇMİŞ.....</b>	<b>74</b>
<b>EK-2. ETİK KURUL ONAY FORMU.....</b>	<b>75</b>

## TEŞEKKÜR

Doktora tezi olarak sunduğum bu çalışmayı, değerli bilgi ve katkıları ile yöneten, tezimin her aşamasında yardımlarını esirgemeyen hocam Sayın Prof. Dr. Mustafa GÜL'e ve doktora eğitimim süresince bana her konuda destek olan değerli hocalarım Sayın Yrd. Doç. Dr. Serap YILDIRIM'a ve Sayın Yrd. Doç. Dr. Tuncer NACAR'a en derin saygı ve şukranlarımı sunarım.

Biyokimyasal analizler ilgili yardım aldığım Sayın Doç. Dr. Abdulkadir YILDIRIM'a ve analizlerde ve hesaplamalardaki yardımlarından dolayı Sayın Doç. Dr. Alaattin POLAT'a, histopatolojik incelemelerdeki yardımlarından dolayı Sayın Yrd. Doç. Dr. İsmail CAN'a, cerrahi işlemlerdeki yardımlarından dolayı Sayın Yrd. Doç. Dr. Hürrem Turan AKKOYUN'a, Sayın Yrd. Doç. Dr. İsa COŐKUN'a ve doktora ğrencisi arkadaşım Arş. Grv. Fazile Nur EKİNCİ AKDEMİR'e, tez izleme komitemde bulunan proje hazırlama aşamasında yararlandığım Sayın Doç. Dr. Ali KARADENİZ'e, bu çalışmayı **2011/281** BAP numarası ile destekleyen Atatürk Üniversitesi Bilimsel Araştırmalar Proje Birimi'ne çok teşekkür ederim.

Ayrıca, bugünlere gelmemde büyük emekleri olan ve bana her zaman destek olan aileme ve tez çalışmalarım sırasında yokluğuma katlanan ve yazım aşamasında yardımlarını esirgemeyen kıymetli eşim Zekiye GÜRSUL'a sonsuz teşekkürlerimi ve saygılarımı sunarım.

Cebrail GÜRSUL

## ÖZET

### **Sıçanlarda Deneysel Oluşturulan Alt Ekstremitte İskemi-Reperfüzyon Hasarında Leflunomidin Koruyucu Etkinliği**

**Amaç.** Bu çalışmada, sıçanların alt ekstremitelerinde turnike yardımı ile oluşturulan iskemi-reperfüzyon sonrası meydana gelen oksidatif kas hasarını önlemede anti-inflamatuvar, immunomodülatör ve antioksidan bir ajan olan leflunomid'in koruyucu etkinliğinin olup olmadığını araştırmayı amaçladık.

**Materyal ve Metot.** Bu çalışmada toplam 24 adet yetişkin erkek rat kullanıldı ve ratlar her grupta 8 adet olacak şekilde Kontrol, İskemi-Reperfüzyon ve İskemi-Reperfüzyon+Leflunomid gruplarına ayrıldı. Kontrol grubundaki ratlara 4 saat anestezi uygulandı. İskemi-Reperfüzyon grubundaki ratlar anestezi altına alındıktan sonra sol alt ekstremitelerine turnike yardımıyla 2 saat iskemi ve 2 saat reperfüzyon uygulandı. İskemi-Reperfüzyon+Leflunomid grubundaki ratlara iskemi öncesi 8 saat ara ile 20 mg/kg dozunda üç doz leflunomid intragastrik yolla verildi. Bu gruptaki sıçanlar da anestezi altına alındıktan sonra sol alt ekstremitelerine turnike yardımıyla 2 saat iskemi ve 2 saat reperfüzyon uygulandı. Deney sonunda ratlardan kas ve kan örnekleri alınarak çalışma sonlandırıldı.

**Bulgular.** Gastrokinemius kasında yapılan biyokimyasal analizlerde lipid peroksidasyonu indeksi olan MDA düzeyinin kontrol grubuna göre anlamlı derecede arttığı görüldü. Leflunomidin serbest radikal süpürücü özelliği ile MDA düzeyini anlamlı derecede düşürdüğü tespit edildi. SOD, CAT ve GSH-Px enzim aktivitelerinde kontrol grubuna göre anlamlı bir azalma olduğu ve leflunomid uygulamasının bu azalmayı önleyerek enzim aktivitelerini anlamlı derecede arttırdığı tespit edildi.

**Sonuç.** Sonuç olarak, iskemi-reperfüzyon süresi sonunda alt ekstremite dokusunda oksidatif stresin ve buna bağlı olarak kas hasarının meydana geldiği tespit edildi. Leflunomid güçlü antioksidan özelliği sayesinde oksidatif stres oluşumunu önleyerek kas hasarının oluşmasını engellemiştir.

**Anahtar Kelimeler:** Gastrokinemius kası, Leflunomid, Oksidatif stres, Sıçan

## ABSTRACT

### **The Protective Efficacy of Leflunomide at Experimental Induced Lower Limb Ischemia Reperfusion Injury in Rats**

**Aim.** In this study, we aimed to investigate whether leflunomide, which is an anti-inflammatory, immunomodulatory and anti-oxidant agent, has protective effects against oxidative muscle damage in rats, which were exposed to ischemia-reperfusion injury by a tourniquet in lower extremity.

**Materials and Method.** In this study, 24 adult male rats were used. There were 8 rats in each group. The groups were: control, ischemia-reperfusion and ischemia-reperfusion+leflunomide. The control group rats were anesthetized for 4 hours. Rats in ischemia-reperfusion group were exposed to ischemia for 2 hours by a tourniquet applied to left hindlimp, and 2 hours of reperfusion by opening the tourniquet under anesthesia. Leflunomide were given by intragastric route, 20 mg/kg, three times with 8 hour intervals.

**Results.** In ischemia-reperfusion group, the level of MDA in the gastrocnemius muscle, which is an index of lipid peroxidation, was significantly higher than the control group. With free radical scavenging property of leflunomide significantly reduced MDA level. SOD, CAT and GSH-Px enzyme activities were decreased significantly as compared to the control group, and the application of leflunomide prevented this decrease in enzyme activities.

**Conclusion.** As a result, at the end of ischemia-reperfusion period, muscle injury occurred due to oxidative stress in tissues of the lower extremity confirmed by increased serum creatin kinase activity, increased lipid peroxidation and neutrophil infiltration in the gastrocnemius muscle. Thanks to its strong antioxidant property, leflunomide

prevented muscle injury due to oxidative stress produced by ischemia-reperfusion injury.

**Key Words:** Gastrocnemius muscle, Leflunomide, Oxidative stress, Rat

## SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ

<b>AMP</b>	: Adenozin monofosfat
<b>ATP</b>	: Adenozin trifosfat
<b>ADP</b>	: Adenozin difosfat
<b><math>\alpha</math></b>	: Alfa
<b>HCO<sub>3</sub><sup>-</sup></b>	: Bikarbonat
<b>GSH</b>	: Glutasyon
<b>GSH-Px</b>	: Glutasyon peroksidaz
<b>GR</b>	: Glutasyon redüktaz
<b>GST</b>	: Glutasyon S-transferaz
<b>H<sub>2</sub>O<sub>2</sub></b>	: Hidrojen peroksit
<b>OH<sup>-</sup></b>	: Hükroksil radikali
<b>HOCl</b>	: Hipokloröz asit
<b>IL</b>	: İnterlökin
<b>IRI</b>	: İskemi reperfüzyon hasarı
<b>Ca<sup>++</sup></b>	: Kalsiyum
<b>CAT</b>	: Katalaz
<b>CP</b>	: Kreatin fosfat
<b>CK</b>	: Kreatin kinaz
<b>XDH</b>	: Ksantin dehidrogenaz
<b>XO</b>	: Ksantin oksidaz
<b>LDH</b>	: Laktat dehidrogenaz
<b>LEF</b>	: Leflunomid
<b>LOO<sup>-</sup></b>	: Lipid peroksil radikali
<b>LTB<sub>4</sub></b>	: Lökotrien B <sub>4</sub>
<b>MDA</b>	: Malondialdehid
<b>MPO</b>	: Miyeloperoksidaz
<b>mPTP</b>	: Mitokondrial permeabilite geçiş poru
<b>NO</b>	: Nitrik oksit
<b>NOS</b>	: Nitrik oksit sentetaz
<b>PMNL</b>	: Polimorfonükleer lökosit

<b>K</b>	: Potasyum
<b>ROS</b>	: Reaktif oksijen türleri
<b>sCR1</b>	: Çözünür komplement reseptörü tip-1
<b>SOR</b>	: Serbest oksijen radikalleri
<b><sup>1</sup>O<sub>2</sub></b>	: Singlet oksijen
<b>Na</b>	: Sodyum
<b>O<sub>2</sub><sup>-</sup></b>	: Süperoksit anyonu
<b>SOD</b>	: Süperoksit dismutaz
<b>TBA</b>	: Tiyobarbiturik asit
<b>TNF</b>	: Tümör nekrozis faktör

## ŞEKİLLER DİZİNİ

<u>Şekil No</u>		<u>Sayfa No</u>
Şekil 2.1.	Leflunomid ve aktif metaboliti A <sub>771726</sub> 'ın kimyasal yapısı.....	31
Şekil 2.2.	Lewis ratlarda tek doz oral leflunomid uygulamasından sonra A <sub>771726</sub> 'nın farmakokinetiği.....	32
Şekil 4.1.	Malondialdehit düzeyleri.....	40
Şekil 4.2.	Süperoksit dismutaz aktiviteleri.....	41
Şekil 4.3.	Glutasyon peroksidaz aktiviteleri.....	42
Şekil 4.4.	Katalaz aktiviteleri.....	43
Şekil 4.5.	Kreatin kinaz düzeyleri.....	44
Şekil 4.6.	Laktat dehidrogenaz düzeyleri.....	45
Şekil 4.7.	Gastrokinemius kası histopatolojik görüntüleri.....	47
Şekil 4.8.	İR grubu gastrokinemius kası ışık mikroskopik görüntüleri.....	49
Şekil 4.9.	İR grubu gastrokinemius kası ışık mikroskopik görüntüleri.....	50
Şekil 4.10.	İR+LEF grubu gastrokinemius kası ışık mikroskopik görüntüleri.....	52
Şekil 4.11.	Gastrokinemius kasındaki lökosit infiltrasyonu.....	53

## TABLULAR DİZİNİ

<b><u>Tablo No</u></b>		<b><u>Sayfa No</u></b>
<b>Tablo 2.1.</b>	Farklı dokularda kritik iskemi süreleri.....	15
<b>Tablo 4.1.</b>	Gruplara ait malondialdehit düzeyleri.....	40
<b>Tablo 4.2.</b>	Gruplara ait süperoksit dismutaz enzim aktiviteleri.....	41
<b>Tablo 4.3.</b>	Gruplara ait glutatyon peroksidaz enzim aktiviteleri.....	42
<b>Tablo 4.4.</b>	Gruplara ait katalaz enzim aktiviteleri.....	43
<b>Tablo 4.5.</b>	Gruplara ait kreatin kinaz düzeyleri.....	44
<b>Tablo 4.6.</b>	Gruplara ait laktat dehidrogenaz düzeyleri.....	45
<b>Tablo 4.7.</b>	Gastrokinemius kasındaki lökosit infiltrasyonu.....	53
<b>Tablo 4.8.</b>	Rat gastrokinemius kası için histopatolojik değerlendirme skoru.....	54

# 1. GİRİŞ

Akut ekstremite iskemisi, ekstremite perfüzyonunda hızlı bir azalmayla karakterize olan ciddi bir medikal olaydır. Çoğunlukla, gittikçe kötüleşen semptomlar ve belirtiler oluşturur ve sıklıkla ekstremite canlılığını tehdit eder.<sup>1</sup> Çeşitli dokularda meydana gelen iskemik olaylar sonrası meydana gelen doku hasarlarında, serbest radikallerin neden olduğu reaksiyonların önemli yer tuttuğuyla ilgili varsayımlar uzun zamandan beri tartışılmaktadır.<sup>2</sup> İskelet kasındaki iskemi-reperfüzyon hasarı (IRI) çoğunlukla, vasküler olayların bir bölümünün sonucu olarak meydana gelir. Bu olaylar trombolitik terapi, organ nakli, travmaya uğramış ekstremite ve kardiyovasküler cerrahidir.<sup>3</sup> Dünya genelinde her gün; kanamasız ortopedik operasyonlarda, iskelet-kas sistemiyle ilgili rekonstrüktif yöntemlerde ve vasküler cerrahilerde 20.000 den fazla turnike uygulaması yapılmaktadır. Ancak, turnike uygulamasının IRI gibi çok sayıda komplikasyona neden olduğu görülmüştür ve bu da turnikenin klinik kullanımını büyük ölçüde sınırlandırmıştır.<sup>4</sup>

IRI, şiddetli patolojik sonuçlar meydana getiren bir olaydır.<sup>5</sup> Hemorajik şok, inme, lokal travma ve miyokard enfarktüsü gibi klinik olaylar sonucu oluşan doku iskemisi ve bunu takiben dokunun oksijenlenmiş tam kanla reperfüzyonu; endotelial hücrelerin şişmesine neden olarak mikrovasküler ve hücrel bütünleşmeye, arteriolar çapta azalmayla ilişkili olarak mikrovasküler dirençte artmaya, lökositlerin kapillerleri tıkamasına, permeabilite değişimlerinin sonucu olarak lökositlerin postkapiller venüle yapışmasına yol açtığı ve olayların kollektif bir şekilde IRI'ya katkıda bulunduğu son zamanlarda yapılan çalışmalarla gösterilmiştir.<sup>6</sup>

Turnike modeli, alt ekstremite IRI için bir model olarak önceki çalışmalarda kullanılmıştır. Bu modelde, iskemi reperfüzyon sonrasında meydana gelen lokal olaylar; kas permeabilitesinde artış ve ödem, nötrofil birikmesi ve nekrozdur.<sup>7</sup> İskelet kası

iskemi reperfüzyonu, dokuyu tahrip eden olaylar serisini başlatabilir. Bu olaylar; hücre ödemi, mitokondrilerde elektrolitik değişiklikler, sitozolde kalsiyum birikimi, iskemik hücrelerde reaktif oksijen türlerinin (ROS) oluşumu ve salınımı, membran fosfolipidlerinin yıkımı şeklinde sıralanabilir.<sup>8</sup>

Kritik bir iskemi periyodundan sonra dokunun tekrar kanlanması süresince dokuda meydana gelen tahribat reperfüzyon hasarı olarak bilinmektedir.<sup>9</sup> Reperfüzyondan sonra hızlı bir şekilde ekstravasküler alana giren büyük miktardaki lökosit, hücre antioksidan savunmasını bastırabilen büyük miktardaki reaktif oksijen türünü salıverirler. Bir ROS çeşidi olan hidroksil radikali (OH), süperoksit anyon radikali ( $O_2^-$ ), singlet oksijen ( $^1O_2$ ), hidrojen peroksit ( $H_2O_2$ ) ve nitrik oksit ( $NO^-$ ) fazla miktarda oluştuğu zaman lipidlere, proteinlere, karbonhidratlara ve nükleik asitlere zarar vererek hücre hasara neden olurlar.<sup>10</sup>

İskemik iskelet kası hücrelerinin reperfüzyonunun, oksijen serbest radikali oluşumuna yol açtığı gösterilmiştir. İskemik dokunun reperfüzyonu sonrasında oksijen serbest radikallerinin oluşum mekanizması tam olarak aydınlatılamamıştır. İskelet kasının reperfüzyon süresince moleküler oksijene maruz kaldığı ve bu durumun da oksijen serbest radikali oluşumuna yol açabileceği çok sayıda veri ile kanıtlanmıştır. Bunun yanında; ksantin oksidaz (XO) enzimi, aktive olmuş lökosit ve mitokondriyal elektron transport zincirinin de oksijen serbest radikallerinin muhtemel kaynağı olabileceği ifade edilmiştir.<sup>11</sup>

Reperfüzyon süresince, aşırı miktarda süperoksit ( $O_2^-$ ), hidrojen peroksit ( $H_2O_2$ ) ve hidroksil radikali (OH<sup>-</sup>) oluşur ve bu radikaller normal hücre fonksiyonlarına zarar verir.<sup>12</sup> Belirli bir periyotta gerçekleştirilen uzun süreli iskemiler, enerji yetersizliği nedeniyle hücre ölümüne ve dokuda nekroza neden olabilir. Yapılan son çalışmalar

doku hasarının sadece iskemi periyodunda meydana gelmediğini aynı zamanda reperfüzyon periyodunda da devam ettiğini göstermiştir.<sup>13</sup>

IRI; klinikte vasküler ve ortopedik cerrahilerde, crush sendromunda ve kopan ekstremitelerin tekrar transplatasyonunda ortaya çıkabilir.<sup>13</sup> Ekstremitte iskemisi ve onu izleyen reperfüzyon önemli bir klinik olaydır ve iskemik dokunun oksijenlenmiş kanla reperfüzyonu, iskemi-reperfüzyon hasarının oluşmasında önemli bir rol oynar.<sup>14</sup>

Leflunomid (LEF); izoksazol türevi, eşsiz bir immunomodülatör ve anti-inflamatuvar ajandır. Romatoid artrit, aynı türden veya başka türden yapılan doku nakillerinde red edilmeye karşı, sistemik lupus eritematozus, Crohn hastalığı ve prostat kanseri gibi hastalıkların tedavisinde kullanılan bir ajandır.<sup>15</sup> Yapılan son çalışmalar, leflunomidin anti-inflamatuvar ve immunoregülatör etkilerinin proinflamatuvar sitokinleri baskılama yeteneğiyle ilişkili olduğunu göstermiştir.<sup>16</sup> LEF, inflamatuvar mediatörlerin lokal konsantrasyonlarını azaltmanın yanında antioksidan özelliğiyle beyaz kan hücrelerinden ROS'un salınımını inhibe eder ve araşidonik asit metabolizması gibi reaksiyonlar yoluyla serbest radikal oluşumunu önler.<sup>16,17</sup> Deneysel çalışmalarda karaciğer, böbrek ve intestinal iskemi-reperfüzyonu sonucu meydana gelen oksidatif hasarlara karşı LEF'in koruyucu rolleri gösterilmiştir.<sup>15,16,17</sup>, ancak yaptığımız literatür taramasında LEF'in iskelet kası iskemi-reperfüzyon hasarındaki etkisinin çalışılmamış olduğunu farkettilik.

Bu nedenle biz de bu çalışmada; sıçanların alt ekstremitesinde turnike yardımı ile oluşturulan iskemi-reperfüzyon sonrası meydana gelen oksidatif kas hasarında LEF'in koruyucu etkinliğini araştırmayı amaçladık.

## 2. GENEL BİLGİLER

### 2.1. İskemi-Reperfüzyon Hasarı

Bir dokuya giden kan akımının azalmasının fonksiyonel sonuçları uzun yıllardan beri çalışılmaktadır. Hasarın hipoksi süresince meydana geldiği ve ATP tükenişinin önemli faktör olduğu varsayılmaktadır. Bu yüzden iskemik dokulara giden kan miktarının hızlı bir biçimde yeniden sağlanması oksijen ve besin azalmasıyla ilişkili hücrel hasarın ilerlemesini durdurmak için temel şart olduğu değerlendirilmiştir.<sup>18</sup> İskemi-reperfüzyon hasarı; miyokard enfarktüsü, kardiyopulmoner bypass, aortik veya periferel arter çapraz klempleri, inme, turnike uygulaması ve organ replantasyonu gibi çok sayıda olayda görülmektedir.<sup>19</sup> İskemi-reperfüzyon hasarı, iskemiye uğramış dokulara kan akımının yeniden sağlanmasından sonra hücrel fonksiyon kayıplarının ve ölümlerin aşırı miktarda artması olarak ifade edilmektedir. Kan akımının yeniden sağlanması iskemik dokuları kurtarmak için gereklidir ancak reperfüzyon iskemik dokudaki hasarın daha da ilerlemesine ve organ fonksiyonunun ve canlılığının tehdit edilmesine yol açar.<sup>20</sup>

İskemi-reperfüzyon hasarı, anestezi uygulamalarında (organ transplantasyonu, açık kalp cerrahisi, hipovolemik şokun düzeltilmesi gibi) ana patofizyolojik fenomenlerden biridir. Lokal ve sistemik inflamatuvar yanıtı neden olmaktadır. Ortopedik cerrahilerde uygulanan turnike açıldıktan sonra, kas ve sinir dokusunda iskemik-reperfüzyon hasarı olabilmektedir. Hipoksik hücrel değişiklikler, anaerobik glikolizis, nötrofil aktivasyonu, reaktif oksijen radikallerinin oluşması, vazoaktif faktörlerin salınımı da görülür.<sup>41</sup>

Reperfüzyonun izlediği uzamış iskemiler mikrodolaşımda geri dönüşümsüz hasarlar oluşturur bu da periferel dokulara olan kan akımında obstrüksiyona yol açar.

Obstrüksiyon; mikrodolaşımda trombus oluşumu, trombosit agregasyonu ve doku ödemi oluşumuyla ilerleyicidir.<sup>26</sup>

Reperfüzyonun birkaç dakika içinde gerçekleşmediği uzamış akut ekstremitte iskemileri geri dönüşümsüz iskelet kası hasarlarının oluşmasına yol açar. Oksijen yokluğundan kaynaklanan hücresel nekrozu önlemek için arteriyel dolaşımın onarılması temel olsa da bu olay oksidatif stres gelişimi ve serbest radikal oluşumu ile inflamatuvar cevabın oluşmasıyla reperfüzyona bağlı doku hasarlarına neden olur. Bu önemli bir konudur çünkü iskemi-reperfüzyon altındaki iskelet kasında çok sayıda vasküler hastalık gözlemlenir.<sup>37</sup>

## **2.2. İskemi-Reperfüzyon Hasarının Fiziopatolojisi**

İskemi-reperfüzyon hasarının fiziopatolojisi, serbest radikallerin salındığı noktadan başlayan kompleks olaylar dizisidir ve bu olayları malondialdehit (MDA) gibi maddelerin oluşumuyla sonlanan lipid peroksidasyonu izler. MDA düzeyi serbest radikal oluşumunun bir belirteci olarak kullanılabilir. İskemi süresince, ATP düzeyi sınırlı oksijen mevcudiyetine bağlı olarak azalır. İkincil olarak, membran iyon gradientindeki değişimler kalsiyumun hasarlı membranlara girişine neden olur. Bu olay sitozolik kalsiyum düzeyinin yükselmesine yol açar ve bu da ksantin dehidrogenazı (XDH) ksantin oksidaza (XO) dönüştürme yeteneğine sahip proteazları aktive eder. Reperfüzyon süresince sağlanan moleküler oksijen, ksantin oksidaz tarafından süperoksit radikaline dönüştürülür. Ksantin oksidaz düzeyinin iskemi süresince arttığıyla ilgili kanıtlar vardır.<sup>43</sup> İskemik dokunun reperfüzyonu süresince oluşan reaktif oksijen ürünleri çeşitli mikrovasküler değişimlerin oluşmasına yol açarlar. Bu değişimler, endotelial hücre şişmesi ve kapiller permeabilite artışını içerir. Kan akımının sağlanması, inflamatuvar maddelerin girişine neden olarak reperfüzyon hasarının oluşmasına ve sonuç olarak hasar oluşumuna neden olacaktır.<sup>44</sup>

İskemi-reperfüzyon hasarı, enerjinin yetersiz sağlanması, iskemik dokularda asidozis, oksijen maruziyetine cevap olarak salınan serbest oksijen radikallerinin neden olduğu ve hücre ölümüyle sonuçlanabilen olaylar dizisidir. Yapılan farklı çalışmalar, reaktif oksijen türlerinin iskemi-reperfüzyon hasarıyla ilgili hastalıkların geniş bölümünün başlamasında ve ilerlemesinde önemli bir rol oynadığını göstermiştir.<sup>35</sup>

İskemi-reperfüzyon sırasında mitokondriyal oksidatif fosforilasyonun değişmesi, ATP'nin azalması, hücre içi kalsiyum artışı, hücre iskeleti ile membran fosfolipitlerinin bozulmasına öncülük eden proteaz ve fosfatazların aktive olması sonucu aşırı miktarda serbest oksijen radikalleri oluşarak oksidatif strese neden olur. İskemi-reperfüzyon hasarının fizyopatolojisinde serbest oksijen radikallerinin önemli bir rol oynadığı bildirilmektedir.<sup>47</sup>

Mitokondriyal oksidatif fosforilasyon tarafından hücreye sağlanan aerobik metabolizma, iskemiden ilk olarak etkilenir. Bu periyotta, ATP üretimi yavaşlar ya da durur. ATP eksikliği ve sonuç olarak Na/K pompasının aktivitesinin yetersizliği akut sitotoksik ödem oluşumuna yol açar. Tüm bu olaylar geri dönüşümlüdür. Bunun yanında takip eden periyotlarda, membran hasarı nedeniyle hücre membran fonksiyonlarının bozulması ve reperfüzyon ile oksijenlenmenin sağlanmasına rağmen geri dönüşümsüz membran hasarları meydana gelecektir.<sup>48</sup>

İskemik hasarın çoğu, serbest radikal ve diğer yüksek oranda reaktif oksitleyici kimyasal türlerinin oluşmasına yol açan aktif süreçler tarafından gerçekleştirildiğini gösteren çok sayıda kanıt bulunmaktadır. Diğer taraftan reperfüzyon, iskemik dokular için daha zararlıdır. Proteaz, reaktif oksijen türleri ve lipid türevli mediatörler gibi çeşitli kimyasal mediatörleri salıveren lökositler, iskemi-reperfüzyon hasarının oluşmasında önemli rol oynarlar.<sup>49</sup>

İskemik periyotlardan sonra dokular anerobik metabolizmaya adapte olur. Kan akımının yeniden düzelmesi gereksinim duyulandan fazla oksijenin sağlanması ile sonuçlanır ve bu durum makrofajların damar içinde aktive olmasına yol açar. Sonuç olarak oksidatif strese yol açan ve reaktif oksijen türleri olarak da ifade edilen süperoksit radikallerinin oluşumu gerçekleşir. Reperfüzyon hasarının başlangıç fazındaki anahtar olay ekstrasellüler ROS'un başlıca kaynağı olan makrofajların aktivasyonudur. ROS reperfüzyon hasarında anahtar öncül olarak endotelial hasara ve pro-inflamatuvar sitokinlerin daha fazla salınmasına yol açar. Bu yüzden nötrofiller iskemi-reperfüzyon hasarının geç fazında rol oynayan anahtar hücrelerdir.<sup>21</sup> İskemi-reperfüzyon makrofajları aktifleştirebilir ve bu da sitokin salınımında rol oynar. Sitokinler daha sonra lökosit aktivasyonunu, transmigasyonunu ve hedef hücreye tutunmasını etkiler. Reperfüzyondan sonra aniden ekstrasvasküler alana giren büyük miktarda lökosit, hücre antioksidan savunmasını bastırabilecek kadar fazla miktarda ROS'un salınmasına neden olur.<sup>10</sup> İskemi-reperfüzyon; doku ödemi, kompartman sendromu, fibrotik kontraktüre ve kontraktıl disfonksiyona neden olabilmektedir.<sup>25</sup>

İskemi-reperfüzyon, reperfüzyon süresince permeabilite artışına yol açan ve böylece proteinlerin vasküler yataktan kaçışına neden olan kapiller fonksiyon bozukluklarıyla ilişkilidir ve bunun sonucu olarak kaslarda ödem meydana gelir. Bu etkiler çoğunlukla reperfüzyon süresince meydana gelen oksidatif stresten kaynaklanır ve bu da iskemik periyot süresince endotelial bir enzim olan ksantin dehidrogenazın ksantin oksidaza dönüşümüyle başlar.<sup>30</sup>

Ksantin oksidaz sistemi, hipoksik dokuların tekrar oksijenlenmesinden sonra oluşan hücre hasarının ve oksijen serbest radikallerinin en önemli kaynağıdır. Ksantin oksidaz, memeli dokularında ksantin dehidrogenazdan sentezlenir. İskemi süresince ksantin dehidrogenaz, hipoksantini ksantine oksitleyen ksantin oksidaza dönüşür. Daha

sonra ksantin de reperfüzyonla gelen moleküler oksijenin süperoksit anyonu ve hidrojen peroksida indirgenmesiyle ürik aside dönüşür.<sup>31</sup>

Mitokondriler, hücresel enerjinin başlıca kaynağıdır ve iskemi-reperfüzyon süresince oksidatif stres artışının hem nedeni hem de hedefidir. Bu yüzden sistematik mitokondriyal fonksiyon testleri, periferel arter hastalıklarında yararlı olabilir. Bununla paralel olarak, iskelet kası mitokondriyal fonksiyon bozuklukları azaldığında, insan yürüme kapasitesi gelişmektedir.<sup>36</sup> Periferel arter hastalığı bulunan hastalarda, mitokondriyal fonksiyonun bozulduğu rapor edilmiştir ve bu da, bozulmuş elektron transport zinciri ve oksidatif fosforilasyonun, periferel arter hastalıklarıyla ilişkili sakatlık ve ölümlerden sorumlu mekanizmalarda önemli olabileceğini gösterir.<sup>37</sup>

Hiperkontraktür nedeniyle hücrenin aşırı biçimde kışalmasına yol açan mekanizmalar izole edilmiş miyosit modellerinin kullanılmasıyla yoğun bir biçimde araştırılmış, morfolojik değişimler ve iyon dengesizlikleri kontrollü bir ortamda eş zamanlı olarak analiz edilmiştir. Bu çalışmalarda, hücre içi kalsiyumun anormal yüksek konsantrasyonları (bu durum ATP varlığında kontrolsüz ve aşırı bir güç oluşturur) ile birlikte tekrar oksijenlenmenin (bu durum ATP bağımlı miyofibrillerin kontraktıl fonksiyonlarını yeniden aktive eder) hiperkontraktürün nedenleri olduğu gösterilmiştir.<sup>38</sup>

Miyofibrillerin hiperkontraktürü, muhtemelen en önde gelen patomekanizmadır. İskemi süresince, miyositlerde enerji tükenişi gerçekleşir. Anerobik metabolizma nedeniyle meydana gelen asidozis, Na/H değiştiricisi vasıtasıyla Na girişini artırır ve Na/K-ATPaz'ın hızlı inhibisyonu Na'nın başlangıç birikimini artırır. Sarkolemmal Na/Ca değiştiricisinin ters yönde çalışması ve Na'nın Ca ile sonradan yer değiştirmesiyle miyositlerde aşırı kalsiyum birikimi meydana gelir. Artmış sitozolik Ca düzeyi mitokondrial permeabilite geçiş porlarının (mPTP) açılmasına katkıda bulunur.<sup>39</sup>

Endotelial hücre hasarı; mikrodamarlarda daralma, perfüzyon basıncında artma, vazodilatör salınımında azalma, kapillerlerde çatlama ve sonuç olarak mikrodolaşım yetersizliği ile sonuçlanır.<sup>44</sup>

### **İskemik Hasar**

İskemik hasar çok yönlüdür. Oksijen ve substratların yetersiz dağılımı, yüksek enerjili fosfatların azalması, iskemik metabolizmanın toksik son ürünlerinin birikimiyle ilgilidir. İskemik olayların düzelmesinden sonra metabolik faktörler normalleşme eğilimindedirler fakat şaşırtıcı bir biçimde hücre hasarı devam eder.<sup>25</sup> *In vitro* çalışmalar, iskeminin kas sarkoplazmik retikulumuna kalsiyum transportunu önemli derecede baskıladığını göstermiştir.<sup>25</sup> İskemik hasarın fizyopatolojisi komplekstir ve oksijen ve besin dağıtımının yetersizliği, hücresel enerji tükenimi, iyon dağılımının bozulması, iskemik metabolitlerin birikimi, membran permeabilitesinde değişimler ve oksijen türevli serbest radikallerin neden olduğu reperfüzyon hasarı gibi olaylarla ilişkilidir.<sup>28</sup>

Cerrahi işlemler esnasında alınan biyopsilerde yapılan ultrayapısal analizlerde reperfüzyon olmadan gerçekleştirilen çeşitli iskemi periyotları sonrasında (15 dk ile 90 dk arasında), özellikle metabolik olarak önemli organellerin uzaması gibi iskelet kasının ultrayapısal özelliklerinde nihai patolojik değişimler meydana geldiği görülmüştür. Bu değişikliklerin reperfüzyon süresince daha da kötüleşeceği tahmin edilmektedir.<sup>30</sup>

İskemik faz süresince meydana gelen olaylar, oksijen yokluğunda metabolik aktivite için gerekli enerji depolarının korunumuna karşı bir saldırıyı temsil eder. Hücre içi enerji depoları adenosin trifosfat (ATP), adenosin difosfat (ADP), adenosin monofosfat (AMP) ve kreatin fosfattır. Dinlenme halindeki kas dokusunda ATP için gereksinim duyulan enerji nispeten azdır ve normal koşullar altında serbest yağ asitlerinin oksidasyonu ile karşılanır. İskemi süresince, enerji depoları daha çok

membran potansiyeli ve iyon dağılımını sürdürebilmek için kullanılır. Kısıtlanmış dolaşım, özellikle oksijen ve yağ asidi gibi eksojen substratların azalmasına yol açar ve iskelet kasında enerji üretimi için anerobik yolların sırayla aktivasyonu gerçekleşir.<sup>32</sup>

İskelet kaslarında devam eden ATP'nin anerobik üretimi, kreatin fosfat tüketimi ve glikojen metabolizması olmak üzere iki farklı yolla gerçekleşir. İskelet kaslarında büyük kreatin fosfat depoları bulunmaktadır ve bunlar kreatin kinaz enziminin katalizlediği bir reaksiyonla, bir ADP molekülüne yüksek enerjili bir fosfat iyonu vererek ATP'ye dönüşümü gerçekleştirirler. İskelet kaslarında büyük glikojen depoları bulunmaktadır ve glikolizle ATP üretimini sağlayan enzimler bulunmaktadır. Glikojen birkaç adımda yıkılarak pirüvat üretimi gerçekleşir. Bu yolağın devamı için piruvat, hidrojen iyonu ayrılmasıyla laktata dönüşür. ATP'nin bu yetersiz üretimi hücre içi pH'yı düşürür ve bu da sonuç olarak, glikolizde hız sınırlayıcı enzim olan fosfofruktokinaz üzerinde negatif feed-back yoluyla glikoliz işleminin sınırlandırılmasına yol açar.<sup>32</sup>

İskemi sonucu olduğu bilinen hücrel değişikliklerin bazıları şunlardır:

- ✓ Hücre içi kalsiyum artışı
- ✓ Osmotik kontrolün değişmesi
- ✓ Membran hasarı
- ✓ Serbest radikal üretimi
- ✓ Hücre içi pH'nın düşmesi
- ✓ ATP düzeyinin azalması
- ✓ Oksijenin tükenmesi
- ✓ Hücre içi glikoz seviyesinin azalması.<sup>33</sup>

İskemik dokudan salınan inflamatuvar mediatörler şunlardır;

- ✓ Kompleman

- ✓ Histamin
- ✓ İnterlökin
- ✓ Lökotrienler
- ✓ Oksijen serbest radikalleri
- ✓ Trombosit aktive edici faktör
- ✓ Serotonin
- ✓ Tromboksan
- ✓ Tümör nekrozis faktör (TNF).<sup>34</sup>

İskemi sonrası meydana gelen kan akımı bozukluklarının nedenleri şunlardır:

1. İntravasküler hemokonsantrasyon ve trombozis
2. Kapiller endotelyal hücrelerin şişmesi
3. Lökositlerin kapillerleri tıkaması
4. İntersitisyel ödem oluşumu nedeniyle meydana gelen ekstravasküler doku

basıncı artışı.<sup>34</sup>

İskemi süresince oluşan ilk iyon dengesizliklerinden biri, sarkolemmadaki Na / K pompasının enerji yokluğunda çalışmaması ve anerobik glikoliz nedeniyle ilerleyici sitozolik asidifikasyondur. Kan akımının yeniden sağlanması, ekstrasellüler matriksten başlıca H gibi katabolitlerin hızlı bir biçimde temizlenmesini sağlar ve bu da hücrelerle çevreleri arasında bir pH gradienti oluşmasına yol açar. Bu durum hücre içi asidozis oluşumunu doğrulayan mekanizmaları aktive eder. Bu mekanizmalar plazma membranındaki Na/H değiştiricisi ve Na/HCO<sub>3</sub> kotransportudur.<sup>38</sup>

### **Reperfüzyon hasarı**

Doku için gerekli substratların sağlandığı ve metabolik son ürünlerin uzaklaştırıldığı süreç olan reperfüzyon, normal kas metabolik aktivitesinin onarılmasına ve kas hücrelerinde canlılığın geri dönmesine yol açmaktadır. Çok fazla iskemik hasara

maruz kalan bazı hücreler diğerleri gibi onarılmaya şansına sahip değildir. İskeminin ara derecelerinde olanlar, reperfüzyonda meydana gelen olaylara bağlı olarak yaşayabilirler. Kan akımının yeniden sağlanması, hücrel hasarın artmasına yol açabilen yeni reaksiyonların başlamasına ve bunun da kas hücrelerinin kurtarılabilirliğinin aksine hasarın daha da artmasına neden olabileceği olasılığı büyük oranda kabul görmüştür.<sup>32</sup>

Kan akımının onarılması çelişkili bir biçimde, iskeminin neden olduğu hasara ek olarak daha fazla hasarın oluşmasına yol açabilen olaylar zincirini başlatır. Kan akımı tekrardan sağlandığında, iskemi süresince meydana gelen biyokimyasal ve moleküler olaylar serbest radikallerin aracılık ettiği hasara zemin oluşturur. Süperoksit anyon radikali, hidrojen peroksit ve hidroksil radikali serbest radikal türleridir ve bu toksik maddeler arasında yer almaktadır. Reperfüzyon hasarı; ksantin oksidaz sistemi ve nikotinamid difosfonükleotid sistemi olmak üzere başlıca iki büyük süperoksit üretim süreciyle ilgilidir.<sup>44</sup>

Sitotoksik oksijen metabolitleri (serbest oksijen radikalleri) reperfüzyon hasarının önemli medyatörleri olarak ifade edilmiştir. İskemik dokunun tekrar oksijenlenmesi, bol miktarda oksijen radikali üretimine ve sonrasında hücre hasarına yol açmaktadır.<sup>25</sup>

Reperfüzyon hasarını açıklamak için üç teori ileri sürülmüştür. Bunlar;

1. Oksijen radikali oluşumunda bir patlamayla sonuçlanan ve membran hasarına yol açabilen oksidatif stres,

2. Enerjetik mitokondriyal mekanizmaların yeniden başlamasının miyofibriler hiperkontraktür, hücre iskeletinde kırılmalar ve membranda parçalanmalarla sonuçlandığını ileri süren enerji paradoksu,

3. Lökosit birikimi ve aktivasyonunun etkilerini işaret eden inflamasyonun rolüdür.<sup>40</sup>

Reperfüze edilmiş kalpte oksijen radikali oluşumunun nedeni olarak ileri sürülen mekanizmalardan bazıları şunlardır:

1. Ksantin oksidaz enzimi
2. Mitokondriyal oksidasyon
3. Siklooksijenazların neden olduğu doymamış yağ asidi oksidasyonu
4. Kateşolamin oksidasyonu
5. P450'nin neden olduğu oksidasyon
6. Lökositlerdeki NADPH oksidazın aktivasyonu
7. Demir salınımı ve redoks döngüsü.<sup>29</sup>

Trombosit endotelyal hücre adhezyon modkülü-1'in etkisinin, monoklonal antikorların kullanılmasıyla *in-vivo* olarak bloke edilmesi iskemi-reperfüzyon hasarını belirgin bir biçimde azaltır. Bu muhtemelen, nötrofillerin transendotelyal geçişinin inhibisyonu ve kapiller perfüzyonun kas mikrodolaşım düzeyinde artmasıyla gerçekleşir. Yüksek derecede etkili bir fibrin çözücü olan doku plazminojen aktivatörünün (t-PA) mikrodolaşım düzeyinde lökosit-endotelyal etkileşimleri üzerindeki etkisiyle, lökositlerin yapışma ve göç aktivasyonunda bir azalma ve belirgin anti-inflamatuvar etkisi sayesinde doku ödeminde gerileme tespit edildi.<sup>44</sup>

Anjiopietin-1 (Ang-1), endotelyal hücreye özgü anjiojenik bir faktördür ve başlıca kan damarlarının değişimi, olgunlaşma ve stabilizasyonu süresince işlev görür. İskemi-reperfüzyon çalışmalarında, anjiopietin-1'in yararlı etkileri iyi bir biçimde kanıtlanmıştır. Anjiopietin-1'in kullanıldığı gen terapilerinin, kas parçalarının hemodinamiklerini arttırdığı, deri parçalarının yaşam süresini uzattığı ve kas parçalarının perfüzyonunu arttırdığı tespit edilmiştir.<sup>44</sup>

### 2.3. İskemi-Reperfüzyonda Serbest Radikallerin Oluşumu

Ekstremitenin iskemik dokularının oksijenize kanla reperfüzyona maruz kalması hidroksil, süperoksit anyon, singlet oksijen, hidrojen peroksit ve nitrik oksit gibi serbest radikalleri içeren reaktif oksijen ürünlerinin aşırı üretimine ve bunların kan dolaşımına katılımına neden olur. Bu reaktif oksijen ürünleri uzamış iskemik ekstremitede, hücre hasarına yol açabilmektedir.<sup>24</sup> Dokuda oksidatif reperfüzyon hasarı meydana gelmeden önce iskemik dokuda bazı olaylar meydana gelir. Ksantin dehidrogenaz enziminin ksantin oksidaz enzimine dönüştüğü gösterilmiştir ve bu enzim de süperoksit radikali ve hidrojen peroksitin potansiyel üreticisidir. İskemi süresince bu reaksiyonun substratları olan hipoksantin ve ksantin birikimi gerçekleşir. Bunun yanında, iskemi süresince oksidatif hasara karşı hücre sel savunma, süperoksit dismutaz ve glutatyon peroksidaz enzim aktivitelerinin azalmasıyla zayıflar.<sup>29</sup>

Üç ana enzim yolağının, radikal üretiminin önemli kaynakları olduğu belirlenmiştir. Bunlar;

1. Başlıca endotellerde yerleşim gösteren ksantin oksidaz,
2. Başlıca kas hücrelerinde yerleşim gösteren mitokondrial elektron transport zinciri,
3. Başlıca lökositlerde yerleşim gösteren NADPH oksidaz'dır.<sup>29</sup>

İskeminin başlamasıyla, ksantin dehidrogenazın ksantin oksidaza hızlı bir proteolitik dönüşümü ve adenin nükleotitlerin (ATP) yıkımıyla hipoksantin substratının birikimi gerçekleşir. Oksijen yokluğunda hipoksantin ksantine dönüşümü gerçekleşmez. Bu eksik substrat aniden aşırı bir şekilde bulunduğunda, reperfüzyon süresince moleküler oksijenin indirgenmesine paralel olarak hızlı bir biçimde oksidasyon devam eder. Bu indirgenme, yan ürün olarak süperoksit radikalinin oluşumu ile sonuçlanır. Kendi başlarına bir dereceye kadar sitotoksik olsalar da, bu süperoksitler

sonradan hidrojen peroksidi ve ikincil olarak, Haber-Weiss reaksiyonuyla son derece sitotoksik hidroksil radikalini oluşturabilirler. Bu toksik oksijen metabolitleri başlıca hücre ve mitokondri membranındaki lipidlerin peroksidasyonu yoluyla hücre hasara neden olurlar.<sup>4</sup>

#### 2.4. Kritik İskemi Süresi

Kritik iskemi süresi, bir dokunun tolere edebildiği ve canlılığını devam ettirdiği maksimum zaman aralığıdır. Kritik iskemi süresi, doku çeşidine ve sıcaklığa bağlı olarak değişir.<sup>58</sup> Kritik iskemi süresi organa göre değişir. Karaciğer ve böbrekte 15-10 dk, iskelet kasında 2.5 saattir. Bunun yanında bu süre beyinde 5 dk'dan daha azdır ve bu sürenin uzaması büyük nöronal ölümlere ve enfarktüse neden olur. Kritik iskemi süresinin aşılmasından sonra gerçekleşen reperfüzyon endotelial ve parenşimal hasarla sonuçlanır.<sup>21</sup> Kritik iskemi süresi, dokunun tam iskemiye tolere edebildiği maksimum zaman uzunluğunu vurgular ve dolaşım onarıldığında canlılık devam eder. Ortalama kritik iskemi süresi, uygulama yapılan yerlerin %50'sinin ölmesine neden olan iskemi periyodudur. Kritik iskeminin süresi, farklı doku tiplerine göre değişir. Arterlerde ve rastgele deri uygulamalarında 13 saat civarındadır. Bununla birlikte, ortalama sekonder kritik iskemi süresi 7 saat civarında iken bu uygulamaların güvenilir sekonder kritik iskemi süresi sadece 4.7 saattir.<sup>44</sup>

**Tablo 2.1.** Farklı Dokularda Kritik İskemi Süreleri.<sup>58</sup>

Normal Isıda, Farklı Dokularda Kritik İskemi Süreleri	
Doku Tipleri	Süre
Kas	4 saat
Sinir	8 saat
Yağ	13 saat
Deri	24 saat
Kemik	4 gün

İskeminin süresi, doku hasarının şiddetini belirler. İskemide yapısal ve metabolik değişmeler; kapiller çapın daralması, lökositlerin birikmesi, endotel hücrelerde metabolik fonksiyon bozuklukları, hedef organ hücre membranında fonksiyon bozuklukları, inflamatuvar mediatörleri oluşturan enzim sistemlerinin düzeylerinin artmasıdır. Doku oksijen düzeyindeki azalma laktat birikimine neden olur ve doku pH'sı düşer. Membran transport fonksiyonları zayıflar. Transport fonksiyonlarındaki yetersizliğin en önemli sonuçlarından biri hücre içi kalsiyum düzeyindeki artıştır. Kalsiyum bir ikincil haberci gibi hareket ederek bazı enzimlerin aktivasyonunu başlatır ve pro-inflamatuvar mediatörler birikir.<sup>44</sup>

İskelet kası, ekstremitelerde en bol bulunan dokudur. Fizyopatolojik çalışmalar, iskeminin üçüncü saatinden sonra geri dönüşümsüz kas hücre hasarı başlar ve yaklaşık olarak altıncı saatte tamamlanır. İskemi biyolojisi alanında gerçekleştirilen farklı iskemi-reperfüzyon modellerinden elde edilen son bulgular, iskemi-reperfüzyonun neden olduğu hücre hasarında mitokondriyal fonksiyon bozukluklarının ve hücre ölümüne yol açan mitokondriyal proapoptotik proteinlerin salınımının etkili olduğunu göstermiştir.<sup>50</sup>

## **2.5. Polimorfonükleer Nötrofillerin İskemi-Reperfüzyon Hasarındaki Rolü**

Polimorfonükleer nötrofiller iskemik dokudaki serumda aktive olurlar ve oksijen radikalleri ve elastaz salıvererek direk olarak endotel hücrelerde hasara neden olurlar. Polimorfonükleer nötrofiller hidrojen peroksit üretimi ve lökotrien B4 (LTB4) artışındaki geçici çakışma, polimorfonükleer lökositlerin kemotaktik aktiviteye sahip oldukları bilinen LTB4 tarafından uyarıldığını ileri sürülmektedir.<sup>23</sup> Lökositlerin, iskemi sonrası iskelet kasında endotel permeabilite değişikliklerini arttıran mediatörler olduğu ifade edilmiştir.<sup>28</sup>

İskemik dokuların reperfüzyonu süresince oluşan oksijen serbest radikallerinin bir diğer ana kaynağı da aktive edilmiş nötrofillerdir. Aktive edilmiş nötrofiller, miyeloperoksidaz gibi sitotoksik maddeler ve pro-inflamatuvar mediatörler salıverir. Miyeloperoksidaz (MPO), hipokloröz asit (HOCl) oluşturmak için H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>'yi kullanarak klorun oksidasyonunu katalizler. Hipokloröz asit son derece sitotoksik bir radikaldir.<sup>31</sup>

Reperfüze edilmiş iskelet kasında, beyaz hücre birikimi açık bir biçimde gösterilmiştir. Beyaz hücrelerin aracılık ettiği ilk hasarın ilk adımı, beyaz hücrelerin endotelyuma tutunmasıdır. Bu olay, endotelyal lökosit adhezyon moleküllerinin artan yoğunlukları kadar CD 11/CD18 gibi nötrofil adhezyon reseptörlerinin sayısının artması ya da konformasyonel değişim yoluyla olmaktadır. Reperfüzyon süresince, beyaz kan hücrelerinin endotelyal hücrelere tutunması geri dönüşümlü bir olay olabilir çünkü kapalı kapiller yataklara kan akımının yeniden sağlanmasından sonra bu beyaz hücrelerin sürüklendiği intra-vital mikroskopinin kullanılmasıyla gösterilmiştir. Tutunmadan sonra aktivasyon meydana gelir. Lokal membranlardaki hasarın daha da artmasına yol açan oksijen serbest radikallerinin yanında elastaz ve proteinaz gibi sitotoksik enzimlerin salınımı gerçekleşir. Bu olaylar reperfüzyonun sadece ilk birkaç saatinde değil ilk 48 saat süresince meydana gelmesi beyaz kan hücrelerinin ilerleyici bulunuşunu göstermektedir. Dokularda bulunan nötrofil miktarının iyi bir göstergesi olan miyeloperoksidaz enzimi konsantrasyonu reperfüzyonun 48. Saatinden sonra kasda yaklaşık 100 kat artmaktadır. Aynı zamanda, reperfüzyonun erken dönemlerinde beyaz kan hücrelerinin uzaklaştırılması serbest radikallerin neden olduğu hasarı düşürür. Bu süreç beyaz kan hücrelerinin bulunuşuyla ilgilidir ve uzamış reperfüzyonlar süresince gelişerek devam eder.<sup>32</sup>

Lökositlerin yüzeyindeki hücre yapışma molekülleri, endotelyal hücrelerdeki ligandlarıyla etkileşir ve birbirleriyle son derece ilişkili olan olaylar dizisini başlatır ve

sonuç olarak, diapedez olarak bilinen lökositlerin kan dolaşımından dokuya geçmesine yol açar. İlk aktive olan hücre nötrofillerdir. Eskiden nötrofillerin, iskemi-reperfüzyon hasarının başlatıcısı olduğu düşünülmekteydi. Bununla birlikte daha yakın zamanlarda, nötrofillerin yol ya da yıkım olaylarının çoğu arasından son yolak olduğu rapor edilmiştir. Adhezyon ve göçü doğrulamak için, lökositlerin yuvarlanarak akışının ilerlemesi iyi sıralanmış bir süreçtir. Nötrofiller, primer iskemik faz süresince trombositler, endotelial hücreler ve diğer lökositler tarafından üretilen kemotaktik sinyallerle inflamasyon bölgesine akarlar. Nötrofiller bir kez aktive oldukları zaman, hasar bölgesindeki vasküler endotelyuma tutunurlar ve interstisyel alan ortamına göç ederler. Polimorfonükleer nötrofillerin göçü, üç adımlı bir işlem olarak tanımlanır. İlk olarak, lökositler endotelial hücre yüzeyi boyunca yuvarlanırlar. Bu, glikoproteinlerin selektin familyası tarafından gerçekleştirilir. Onlar daha sonra, damar duvarına tutunurlar. Sonuç olarak, onların çoğu ardı ardına endotelial hücreler arasından göç ederler ve zararlı etkilerini gösterecekleri hedef dokuya yakın bölgelere gelirler. Polimorfonekleer nötrofiller, birçok yolla zararlı etkilere neden olurlar. Bunlar; sitoplazmik granüllerden elastaz gibi proteolitik enzimlerin salgılanması, solunum patlaması ve kapiller düzeyde mikrodolaşımın fiziksel olarak kesilmesi yoluyla serbest radikal üretimi ve iskeminin uzamasıdır. Klinik sonuçlar; mikrodolaşım düzeyinde fonksiyonel kapillerlerin kapanması, trombus oluşumu ve yeniden akımın olmamasına yol açan mikro damarların tıkanmasıdır. Klinik olarak bu olaylar, transfer edilmiş dokunun kısmi ya da total iskemisi ile sonuçlanır.<sup>44</sup>

## 2.6. Nitrik Oksitin İskemi-Reperfüzyon Hasarındaki Rolü

Nitrik oksit bir serbest radikaldır ve NO sentaz enzimi tarafından L-arjininden sentezlenir. NOS üç farklı formda bulunur; nöronal NOS (nNOS, NOS-I), endotelial NOS (eNOS, NOS-III) ve indüklenebilir NOS (iNOS, NOS-II). eNOS iskemiye yanıt olarak anjiogenesisi düzenler.<sup>22</sup> Yapılan son çalışmalar nitrik oksitin mikrovasküler hasar ile ilişkili olduğunu göstermiştir. Nitrik oksit, çeşitli hücrelerde L-arjininin terminal guanidinonitrojen atomundan sentezlenir.<sup>23</sup> İskemi-reperfüzyon süresince, dokuda L-arjinin ve BH4 kofaktörünün tükenmesinin bir sonucu olarak endotelial NOS'dan süperoksit üretiminde dereceli bir artış meydana gelir. İskemi süresince ATP'nin ksantin ve hipoksantine yıkımı gerçekleşir. Reperfüzyon süresince ksantin oksidaz pürin metabolitlerinin ürata dönüşümünü katalizler. Bu reaksiyonun bir ürünü olarak bol miktarda süperoksit oluşur. Süperoksit daha sonra, ortamda bulunan NO ile etkileşerek peroksinitriti oluşturur. Peroksinitrit de protonlanarak peroksinitröz asiti oluşturur. Peroksinitröz asidin kademeli olarak çözülmesiyle son derece sitotoksik ürünler olan NO<sub>2</sub> ve OH radikali oluşur ve bu radikaller ya apoptotik hücre ölümüne ya da doku nekrozisine neden olarak dokudaki hasarın daha da ilerlemesine neden olurlar.<sup>20</sup>

NO; vazodilatör, anti-inflamatuvar ajan, nötrofil tutunma inhibitörü ve oksijen serbest radikal süpürücüsü olarak damarları korur. Bununla birlikte NO, ksantin oksidaz sistemi tarafından üretilen süperoksit radikali ile etkileşerek peroksinitriti oluşturur. Peroksinitrit son derece sitotoksik bir üründür ve bazı hücrel komponentleri okside eder. NO, NO sentaz (NOS) olarak bilinen bir enzim ailesi tarafından sentez edilir. NO sentazların indüklenebilir formu iNOS, patolojik süreçlerde ve pro-inflamatuvar ajanlara cevap olarak etkinleşir ve büyük miktarda NO üreterek iskemi-reperfüzyon hasarının patofizyolojisine katkıda bulunur.<sup>31</sup>

Endotelyum önemli bir nitrik oksit kaynağıdır ve nitrik oksit, iskemi-reperfüzyon hasarına karşı iyi bilinen bir mediatör veya koruyucudur. Nitrik oksit, NO sentaz (NOS) olarak adlandırılan bir enzim ailesi ile L-arjininin guanidum grubundan sentez edilen iki atomlu bir serbest radikaldir. NOS'un üç izoformu tanımlanmıştır. Tüm formları NADPH'ı kullanır. Nitrik oksitin etkileri aşağıdaki şekilde sıralanabilir;

1. Vasküler tonusun fizyolojik düzenleyicisi olarak doku koruyucu etkisi,
2. Platelet agregasyonunun inhibisyonu,
3. Lökositlerin endotelyuma tutunmasının zayıflatılması,
4. Oksijen türevli serbest radikallerin süpürülmesi,
5. Normal vasküler permeabilitenin sürdürülmesi
6. Düz kas proliferasyonunun inhibisyonu,
7. İmmun savunma,
8. Endotelyal hücre yenilenmesinin uyarılması.<sup>44</sup>

Nitrik oksidin inhibisyon mekanizması hala kesin olmasa da, nitrik oksit salınımındaki azalmayla karakterize olan etkilenmiş endotelyumdaki şiddetli fonksiyon kayıplarının iskemi-reperfüzyon hasarına neden olacağı kesindir. Muhtemelen kısmi oksijen akışı ve endotelyal hücreler tarafından üretilen nitrik oksit, reperfüzyonun erken fazları süresince oksijen birikimine destek olur. Bu nitrik oksit birikimini sınırlandırabilir ve yararlı etkilerini engelleyebilir.<sup>44</sup>

## **2.7. İskemi-Reperfüzyon Hasarında Mitokondrilerin Rolü**

Mitokondriler, hücrelerdeki en büyük organeldir ve oksidatif fosforilasyon işlemiyle adenosin trifosfat (ATP) üretimini sağlar. İç ve dış membran içerirler. İç kısım elektron transport zinciri bileşenlerini içerir. Uzun iskemi periyotları elektron transport komplekslerini değiştirebilir. Komplekslerin tümü, 60 dakikalık ısı iskemisinden sonra alt ünitelerindeki yapısal hasardan dolayı aktivite kaybı gösterirler fakat kompleks 1

(NADH dehidrogenaz) ve kompleks 3 (CoQH<sub>2</sub>-c redüktaz), iskemik hasara en duyarlı olan komplekslerdir. Reperfüzyonda, oksijenin tekrardan gelmesiyle elektron transport zinciri kompleksleri zarar görerek elektronların sızmasına neden olabilir ve bu elektronların O<sub>2</sub>'yi oluşturmak için oksijenle reaksiyona girmesi oksidatif patlamaya neden olur. Mitokondriler, iskemi-reperfüzyon hasarında rol oynarlar çünkü elektron transport zincirinin spesifik inhibitörlerini kullanarak önemli miktarda hidrojen peroksit üretimi gerçekleştirirler.<sup>44</sup>

İskemi süresince, ATP sentezinin azalması Na/K ATPaz'ın inhibe olmasına ve bu da hücre içi Na ve Ca düzeyinin artmasına yol açar. Glikolizin artması, laktik asit birikimine ve pH'nın düşmesine neden olur. Bununla birlikte, reperfüzyon hücre içi Ca, pH ve reaktif oksijen türlerinde hızlı bir artışa neden olur. Bu durum, mitokondriyal permeabilite geçiş poru (MPTP) olarak bilinen mitokondri iç membranında nonspesifik porların açılmasına neden olur. Reperfüzyon hasarının ana nedeninin, fizyolojik koşullar altında ve iskemi periyodunda bile sağlam bir biçimde kapalı olan fakat reperfüzyonda açılan bu MPTP'ler olduğu ifade edilmiştir. MPTP'lerin açılması aşağıdaki olayların meydana gelmesine neden olur:

1. Membran potansiyelinin bozulması
2. Matrikste şişme
3. Mitokondri dış membranında kopmalar
4. Bir preapoptotik protein olan sitokrom c'nin salıverilmesi ve hücre apoptozisine neden olması.<sup>50</sup>

## **2.8. Komplement Aktivasyonu**

Komplement aktivasyonunun, iskeminin neden olduğu hasara yol açan olaylarda önemli bir bileşen olduğu bilinmektedir. İskemi-reperfüzyon hasarında, miyokard enfarktüsü esnasında komplement aktivasyonu ilk olarak otuz yıldan daha fazla bir süre

önce tanımlanmıştır. Komplement sistemi üç farklı mekanizma tarafından aktive edilir. Bunlar; klasik yolak, lektin yolağı ve alternatif yolaktır. Bu yolakların tümü, C3 ve C5'in güçlü proinflamatuvar C5-a ve C5b-9'u kullanır. Bunların iskemi-reperfüzyon hasarının başlıca sorumluları olduklarına inanılır. İskemi-reperfüzyon süresince, doku hasarı oluşumunda komplement aktivasyonunun rolü tanımlandıktan sonra komplement sistemi deneysel iskemi-reperfüzyon için ana terapötik hedef haline gelmiştir. Rekombinat çözünür komplement reseptörü tip-1 (sCR1)'in miyokardiyal iskemi-reperfüzyon modellerinde, deneysel akciğer ve karaciğer nakillerinde ve intestinal iskemi-reperfüzyonda önemli yararlı etkileri olmuştur. sCR1'in aynı zamanda, inme modelindeki nöronal korumada ve iskelet kası iskemi-reperfüzyon hasarında koruyucu olduğu gösterilmiştir.<sup>44</sup>

Komplement inhibisyonunun bir diğer metodu C1 esteraz inhibitörünün kullanılmasıdır. C1 esteraz inhibitör terapisi, miyokardiyal iskemi reperfüzyonu süresince endotelial adhezyon molekülü ekspresyonunu baskılamış bu da nötrofillerin neden olduğu iskemi-reperfüzyon hasarında direk bir etkiye olduğunu göstermiştir. Komplemanların neden olduğu doku hasarında önemli bir faktör olduğuna inanılan C5a bloke edici antikor ya da inhibitör tarafından hedef alınmıştır. Rat intestinal iskemi-reperfüzyon modellerinde, C5a'nın yanında C5'in de bloke edilmesi iskemi-reperfüzyon hasarına karşı koruyucu etki ile sonuçlanmıştır.<sup>44</sup> Ratlardaki miyokardiyal enfarktüslerde C5'e karşı verilen antikorlar nekrozu ve nötrofil infiltrasyonunun yanında hücre apoptozisini inhibe etmiştir.<sup>44</sup>

Reperfüzyon hasarının patogenezi tam olarak anlayılamamışken, komplement sistemin katkısının olduğu düşünülmektedir. Çünkü, hipoksik dokunun reperfüzyonundan sonra C5-9 komplement bileşenlerinin birikimiyle ilgili kesin kanıtlar bulunmaktadır ve hasar sCR1 ön tedavisiyle kısmen inhibe edilebilir. sCR1 ile ön

tedavinin nötrofil akışını, C5-9 birikimini ve rat miyokardiyal iskemi modelinde enfarktüs büyüklüğünü azalttığı görülmüştür. İskemik rat alt ekstremitelerinin ya da intestininin veya fare iskelet kasının reperfüzyonundan sonra inflamasyon oluşumunu bloke etmek veya azaltmak için yapılan benzer çalışmalarda sCR1 kullanılmıştır. Normalde insan eritrositleri, B lenfositleri, granülositleri ve makrofajlarında bulunan complement reseptör tip 1 (CR1; CD35) aktive olmuş C3 (C3b) ve C4 (C4b)'e bağlanarak C3 ve C5 komplement sistemlerini aktive eden enzimlerin ayrışmasına ve C3b ile C4b'nin serum faktör 1 tarafından proteolitik yıkımına yol açar. Çözünebilir formda uygulandığında sCR1, serum komplement aktivasyonunun son derece etkili bir inhibitörü olarak işlev görür.<sup>45</sup>

## **2.9. Sitokinlerin Rolü**

Sitokinler, hücreler arası iletişimle ilgili bir sinyal iletim kategorisidir. Onlar, düzenleyici polipeptidlerin büyük ve farklı bir familyasını oluşturur ve farklı embriyolojik orijinli hücreler tarafından vücudun geniş bir bölümünde üretilir. Sitokin terimi aynı zamanda, interlekin ve interferonlar gibi immünomodülatör ajanları tanımlamak için kullanılır. Literatürde, interlekin-1 (IL-1), interlekin-6 (IL-6), tromboksan A2 (TXA2) tümör nekrozis faktörün (TNF) iskemi-reperfüzyon hasarındaki rolleri iyi bir biçimde araştırılmıştır. Bu sitokinler, lökosit ve vasküler endotelial bariyer arasında sinyalleri oluştururlar ve lökositlerin seçici adhezyonundan ve transmigasyonundan sorumlu olduklarına inanılmaktadır.<sup>58</sup>

Proinflamatuvar sitokinler, iskemi-reperfüzyon hasarına yol açan olaylar yolağında kritik bir rol oynar. Lökositler ve endotelial hücreler, iskemi-reperfüzyon hasarına yol açan sitokin üretimiyle ilgili olan başlıca hücre tipleridir. Nükleer faktör- $\kappa$ B bir transkripsiyon faktörüdür ve iskemi-reperfüzyona cevap olarak çok sayıda genin ekspresyonunu etkiler. İnterlekin (IL)- $\beta$  ve tümör nekrozis faktör-  $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ),

proinflamatuar lokal ve sistemik etkisi olan ve düzeyi artan iki sitokindir ve iskemik alt ekstremitenin reperfüzyonundan hemen sonra tespit edilebilir. IL1- $\beta$  güçlü kemotaktik etkiye sahiptir ve endotelial hücrelerde adhezyon moleküllerinin ekspresyonlarının artmasına neden olur. TNF- $\alpha$  endotelial hücrelerde değişimlere neden olur ve kapiller sızmaya yol açar. TNF- $\alpha$ , monosit kemotaktik protein-1'e ilave olarak IL-6 ve IL-8'in ekspresyonuna neden olur. IL-8 nötrofil kemotaksisine ve adhezyonuna yol açarken IL-6'da daha sonra endotelial permeabilite ve karaciğerden akut faz reaktanlarının üretimine daha fazla katkıda bulunur. Monosit kemotaktik protein-1 bir kemokindir (kemotaktik sitokin) ve dolaşımdaki monositlerin inflamasyon ve hasar bölgesine yönelmesine yol açar. İskemi-reperfüzyon hasarı nedeniyle meydana gelen sitokin artışının net sonucu lökositlerin aktivasyonu ve taşınmasının yanında endotelial bütünlüğün bozulmasıdır.<sup>67</sup>

### **2.10. No-Reflow Fenomeni**

Reperfüzyon süresince, aktive olmuş lökositler endotelialya tutunurlar ve endotelial tahribe yol açan bir mikroçevre oluştururlar. Aktive olmuş lökositler aynı zamanda post kapiller venüllerden intersitisyel alana geçerler ve ROS ve sitotoksik enzim salınımıyla mikrovasküler bariyerin tahrip olmasına yol açarlar. Bu olay plazma proteinlerinin sızmasına neden olur. İntersitisyel sıvı basıncı, artmış transkapiller sıvı filtrasyonu nedeniyle artar. Artmış intersitisyel sıvı basıncının sonucu olarak oluşan ödem kapillerlere baskı yaparak no-reflow fenomeninin oluşmasına yol açarlar. Bu yüzden, yapışan ve göç eden lökositler direk olarak miyositlere hücum ederek ve no-reflow fenomeni yoluyla iskelet kası iskemi-reperfüzyon patogenezisine katkıda bulunurlar. No-Reflow fenomeni nedeniyle miyositlerin metabolik ihtiyaçları reperfüzyon süresince karşılanamaz ve kas nekrozu meydana gelir. Bunun yanında,

nötrofillerin kapiller endotelyuma direk olarak tutunduğu ve mikrovasküler oklüzyona neden olduğu ileri sürülmüştür.<sup>58</sup>

### **2.11. İskemi-Reperfüzyon Hasarının Lokal ve Sistemik Belirtileri**

Akut ekstremitte iskemisi, ilerlemiş periferik vasküler hastalıkların bir komplikasyonudur. Terapötik girişimler, etkilenmiş ekstremitte kan akımının tekrar sağlanmasına yönelmiştir ve bu da iskemi-reperfüzyon hasarının oluşmasına yol açabilir. Ekstremitte iskemi-reperfüzyon hasarının lokal belirtileri sıklıkla ekstremitte kaybı ve fonksiyon bozukluklarıdır. İskemi-reperfüzyon hasarının sistemik belirtileri, kardiyopulmoner fonksiyon bozuklukları ve iskelet kasından metabolik son ürünlerin ve proinflatuvar mediatörlerin salınımına ilişkin olan şok durumudur. İskemi-reperfüzyon hasarı, başlangıçta kan akımının durmasıyla başlayan ve iskemi süresince iskelet kasında enerji substratlarının azalması ve asidozisin gerçekleştiği kompleks fizyolojik bir senaryodur. Reperfüzyon süresince, kas hasarında paradoksik bir artış meydana gelir ve bu da devam eden metabolik fonksiyon bozukluklarına, lokal trombozise ve şiddetli inflamatuvar cevabın oluşmasına yol açar. Ekstremitte iskemisinin teşhis edilmesinde büyük ilerlemelere ve iskemik ekstremitenin reperfüzyonunun başarılı bir şekilde gerçekleştirildiği girişimlere rağmen akut ekstremitte iskemisinden sonra ekstremitte kaybı ve ölüm insidansı son on yıl süresince değişmeden kalmıştır. Lokal ve sistemik hasarı iyileştirmek için yapılan farmakolojik girişimler trombolitik, antikoagülan ve antiplatelet ajanlarla sınırlandırılmıştır.<sup>59</sup>

### **2.12. İskelet Kası İskemi-Reperfüzyon Hasarı**

İki saatten daha uzun süren iskemi-reperfüzyon hasarı büyük çaplı iskelet kası lif ölümüne neden olur. İskelet kaslarının hasardan sonra rejenerasyon yeteneği olduğu için, rejenerasyon olan kas liflerinin sonraki formasyonu takip eden günlerde oluşacaktır. Dört saatlik iskemi-reperfüzyon hasarını takip eden 14. günde kas fonksiyonlarının tam

olarak iyileşmediği görülmüştür. Önceki çalışmalarda, miyosit hasarından sonra kasın tam olarak iyileşmesinin birkaç haftayı alabildiği gösterilmiştir. Bu yüzden, hücre ölümüne yol açan iskemi-reperfüzyon hasarını takip eden uzun süreli kas iyileşmesini çalışmak önemlidir.<sup>51</sup>

Dolaşımın aniden kesilmesinden sonra meydana gelen iskelet kası iskemisi, yüksek enerjili fosfat moleküllerinin üretiminde ve kullanımında dengesizliğe yol açar. İskemik iskelet kasında kasılma olmadığı için enerji gereksinimi azalır fakat adenosin trifostafın hidrolizi, membran stabilizasyonu ve iyon dağılımı için gereksinim duyulan hücrel enerjiyi karşılamak için devam edecektir.<sup>53</sup>

İskemik stresin üçüncü saatinde, geri dönüşümlü biyokimyasal ve morfolojik değişimler meydana gelir ve kısaca bu olaylar nekrozla sonuçlanır. İskemik stresin altıncı saatinden sonra hücre yapısında tam düzensizlik meydana gelir ve kaslarda tamamlanmış nekroza yol açan geri dönüşümsüz biyokimyasal değişimler meydana gelir. Kreatin fosfat (CP) tükenişinden sonra, ATP üretimi sadece glikolitik yolla mümkün hale gelir ve bu da potansiyel olarak zararlı bir ajan olan laktat üretimine yol açar. Reperfüzyon süresince, yüksek enerji depolarının restorasyonu mitokondrilerdeki elektron transportu için faal hücrel mekanizmalar kadar oksijen ve adenin nükleozidler gibi öncüllerin düzeyinin yeterli olması gerekir. İskemik hasar, normal hücrel sentetik süreçleri engelleyebilir ve nükleotidlerin iskemik dejenerasyonu yağda çözünebilir ürünler oluşturabilir ve reperfüzyonla sitoplazmadan uzaklaştırılır.<sup>53</sup>

İskemi-reperfüzyon hasarı, indirek hasarın en önemli konusudur. İskelet kası bu olguya özellikle yatkındır ve bu doku, iki saat veya daha uzun süreli bir iskemi periyodundan sonra önemli ödem ve hücrel yaşam kayıpları gösterebilir.<sup>54</sup> Mekanik veya farmakolojik olayların neden olduğu akut arteriyal oklüzyon ve onu izleyen reperfüzyon, önemli organ hasarlarına yol açabilen genel klinik olaylar dizisidir.

Ekstremitelerde travmatik veya tromboembolik olayların neden olduğu akut iskemi, önemli sakatlık ve ölümlerden sorumludur. İskemi süresini azaltmanın önceleri, doku hasarını azaltmada tek önemli yol olduğuna inanılsa da iskemiye takip eden reperfüzyonun iki kat etkiye sahip olduğu açıktır. Reperfüzyon, canlılığın devamı için esas olarak gerekli olsa da aynı zamanda zararlı olaylar dizisini başlatır. Bu olaylar; akut hücre şişmesi, zıt elektrolit akışı, mikrodamar geçirgenliğinde artış, kan akımının tekrardan gerçekleşmemesi, zararlı oksijen radikallerinin oluşması ve temel yüksek enerjili fosfat öncüllerinin uzaklaşmasıdır.<sup>55</sup>

Reperfüzyon, iskemik hasarın iyileşmesi için şüphesiz bir önkoşuldur. Fakat şaşırtıcı bir biçimde, tekrardan sunulan moleküler oksijen zararlı oksijen radikallerinin bir kaynağıdır. Oksijen radikalleri de lipid peroksidasyonu ve sonuç olarak hücre membran bütünlüğünün bozulmasıyla ilişkilidir.<sup>56</sup>

İskemide, mitokondriyal ATP sentezi durur ve yerini glikoliz alır. Bu laktat ve hücre içi hidrojen birikimine neden olur. Hücre içi hidrojen birikimi, Na / H antiport taşıyıcısının (NHE-1) aktivite artışını uyarır ve bu da H çıkışına ve hücre içi Na birikimine yol açar. Burada sodyum birikiminde daha fazla bir artış vardır çünkü Na çıkışı, enerji bağımlı Na-K-ATPaz pompasının inaktivasyonu ile sınırlandırılır. Hücre içi sodyum artışı, kalsiyum girişine neden olan Na / Ca değiştiricisinin aktivasyonu ile gerçekleşen hücre içi kalsiyum artışıyla ilişkilidir. Bununla birlikte, iskeminin 10-20 dakikası içinde NHE-1 inhibe olur çünkü ekstrasellüler asidoz intrasellüler asidozdan daha belirgindir. Reperfüzyonda, ekstrasellüler hidrojenin hızlı bir biçimde uzaklaştırılması NHE-1'i tekrardan aktive eder. Bu da daha fazla hücre içi Na birikimine yol açarak Na / Ca değiştiricisinin aktivitesiyle sitozolik kalsiyum birikimine neden olur. Sitozolik kalsiyumun aşırı artışının mitokondriyal Ca artışına neden olduğu bunun da ATP sentezini bozduğuna inanılır.<sup>57</sup>

Kaslar farklı lif tiplerinden oluşmuştur. İskemi-reperfüzyon ile ilgili yapılan bazı deneysel hayvan çalışmalarında hasarın farklı kas liflerinde farklı olduğu görülmüştür. Tip II miyozin kas lifleri hasara tip I kas liflerinden daha dayanıklıdır. Tip II hızlı kasılan liflere sahip olan kaslar mitokondri, sarkoplazmik retikulum ve miyofibrillere olan hasara daha fazla dayanırlar ve iskemi-reperfüzyon sonrası iyileşmeleri gecikir. Benzer şekilde, tip II kas liflerine sahip olan kasların lif sayıları azalır ve iskemi-reperfüzyondan sonra nekroza, tip I kas lifine sahip kaslardan daha dayanıklıdır. Hızlı kasılan kas lifleri iskemik zararlara yavaş kasılan kas liflerinden daha dirençlidir.<sup>58</sup>

Crush sendromu, direk basınç ya da ezilmeden kaynaklanan kas hücre hasarının sistemik belirtisidir. Crush hasarının tam patofizyolojisi halen araştırılmaya devam edilmektedir fakat crush sendromundaki sistemik belirtiler rabdomiyoliz ve iskemi-reperfüzyon hasarı nedeniyledir. Crush hasarı nedeniyle oluşan mekanik stresin bir sonucu olarak kas hücreleri gerilirler ve sarkolemmal membranlar, içeriklerini hücre dışındaki dolaşıma doğru sızdırmaya başlarlar. Bu içerikler, sistemik olarak toksik olabilen miyoglobın, ürat, potasyum ve fosfatı içerir. Sarkolemmadan sızmalar nedeniyle ekstrasellüler alandan hücre içine su, kalsiyum ve sodyum sızıntısı olur ve bu da hücre şişmesine ve intravasküler volüm azalmasına neden olur. Kasa uygulanan basınç hafifletilip reperfüzyon tekrardan sağlandığında, etkilenen kastaki miyoglobın, ürat, potasyum ve fosfat dolaşıma salınır. Bunun yanında, büyük miktarda intravasküler sıvı artmış kapiller permeabilite nedeniyle ilgili kas içerisine sızar. Bu toksin salınımı ve hipovolemi, crush sendromunda görülen sistemik etkilere yol açar.<sup>58</sup>

Proinflamatuvar mediatörlere cevap olarak nötrofiller tarafından salgılanan matriks metalloproteinaz MMP-9'un iskemi-reperfüzyon hasarında da rolü olduğuyla ilgili önemli kanıtlar bulunmaktadır. MMP-9, bazal membranın en önemli bileşenlerinden biri olan kollajen-IV'ü yıkma yeteneğine sahiptir. MMP-9, cerebral

iskemi-reperfüzyon hasarı sonrası belirir ve onun belirmesi kan-beyin bariyerinin bozulmasıyla paraleldir. Benzer şekilde, kardiyak ve alveolar kapiller permeabiledaki artışla ilişkili olan pulmoner reperfüzyon hasarında MMP-9 düzeyinin yükseldiği gösterilmiştir. İskelet kası iskemi-reperfüzyon hasarından sonra MMP-9 düzeyindeki yükselmenin kollajen-IV yıkımıyla paralel olduğu rapor edilmiştir ve bu doku hasarı geniş spektrumlu bir MMP inhibitörü olan doksisiklinle azaltılmıştır.<sup>61</sup>

İskelet kası dokusunun uzamış iskemiye tolerans limitinin düşük olmasının nedeni; kapiller perfüzyonun yetersizliği ve dokunun tekrar oksijenlenmesindeki bozukluklardır. Bu durum doku nakillerinde total ya da kısmi başarısızlığa yol açabilir. Yapılan son çalışmalar, uzamış iskemi ve reperfüzyonla ilişkili olarak doku oksijenlenmesi ve hücrel değişimler arasında bir ilişki olduğunu göstermiştir. İskemik doku değişimleri; intrasellüler asidoz, hipoksi, özellikle fosfokreatin ve adenozin trifosfat gibi yüksek enerjili fosfat bileşiklerinin tükenmesi, hücrel volüm değişimleri ve cerrahi sonrası doku perfüzyonunu ve oksijenasyonunu olumsuz etkileyen olayların tümünü içerir.<sup>63</sup>

Reperfüzyonun takip ettiği uzamış iskemiler iskelet kası hücrelerinde yalnızca nekrozise neden olmaz aynı zamanda apoptozisi de hızlandırır. Hücre ölümünün düzenleyicileri olmalarının yanında enerji üreten rolleri nedeniyle mitokondriler hücre yaşamı için temeldir. Mitokondriler, reperfüzyon süresince üretilen toksik uyarılardan olan reaktif oksijen türlerinin ana kaynağıdır ve iskemi-reperfüzyon hasarının ana bileşenidir. İskemi-reperfüzyon, önemli mitokondriyal fonksiyon bozukluklarına neden olabilir ve bu da iskemi-reperfüzyonun neden olduğu hücre ölüm mekanizmasına zemin hazırlayabilir.<sup>65</sup>

İskeminin başlamasıyla kas metabolizması aerobikten anaerobike döner. Bu olay, laktat-pirüvat oranında değişmeye ile laktat üretiminde artışa yol açar. Bu

orandaki değişmeler, hidrojen iyon konsantrasyonunda artışa ve asidozise yol açar. İskemi uzadıkça, kalıcı kas hasarı meydana gelir. Hipoksik kas hasarı, ATP'nin tükenmesine ve ekstrasellüler kalsiyumun kas içine sızmasına neden olur. Sodyum-potasyum ATPaz ve kalsiyum-sodyum değiştiricisindeki fonksiyon bozuklukları bu olayda işe karışmaktadır. Serbest kalsiyum düzeyindeki artış sonucunda kalsiyum aktin, miyozin ve hücreyel proteazlarla etkileşir ve sonuç olarak iskelet kas liflerinde nekroza yol açar. Hücre içi potasyum, fosfat, kreatin kinaz ve miyogloblin mikrodolaşıma sızar ve sistemik dolaşıma döner. Bu olaylar reperfüzyonla artarak devam eder.<sup>67</sup>

İskemik ekstremitenin oksijenlenmiş kırmızı kan hücreleriyle reperfüzyonu, sitokin salınımı, lökosit aktivasyonu, adhezyon moleküllerinin ekspresyonunda artış, protrombotik eikosanoid üretimi, komplement yolağının aktivasyonu ve toksik oksijen metabolitlerinin oluşumuyla karakterizedir. Nitrik oksit gibi bazı düzenleyici moleküller, reperfüzyon öncesi iskeminin derecesine bağlı olarak sitotoksiteden sitoproteksiyona kadar değişen etkilere sahiptir. Bununla birlikte genel olarak bu hücreyel olaylar uzamış iskemiyle başlayan lokal hasarı arttırmırlar ve bunlar iskemi-reperfüzyona karşı oluşan sistemik cevabın kritik bileşenleridir. İskemi-reperfüzyon hasarının prosesleri birbirleriyle bağlantılı ve çoğunlukla sinerjistik olsa da onların etkilerini birbirinden ayırmak ve her bir bileşeni analiz etmek çok kolaydır.<sup>67</sup>

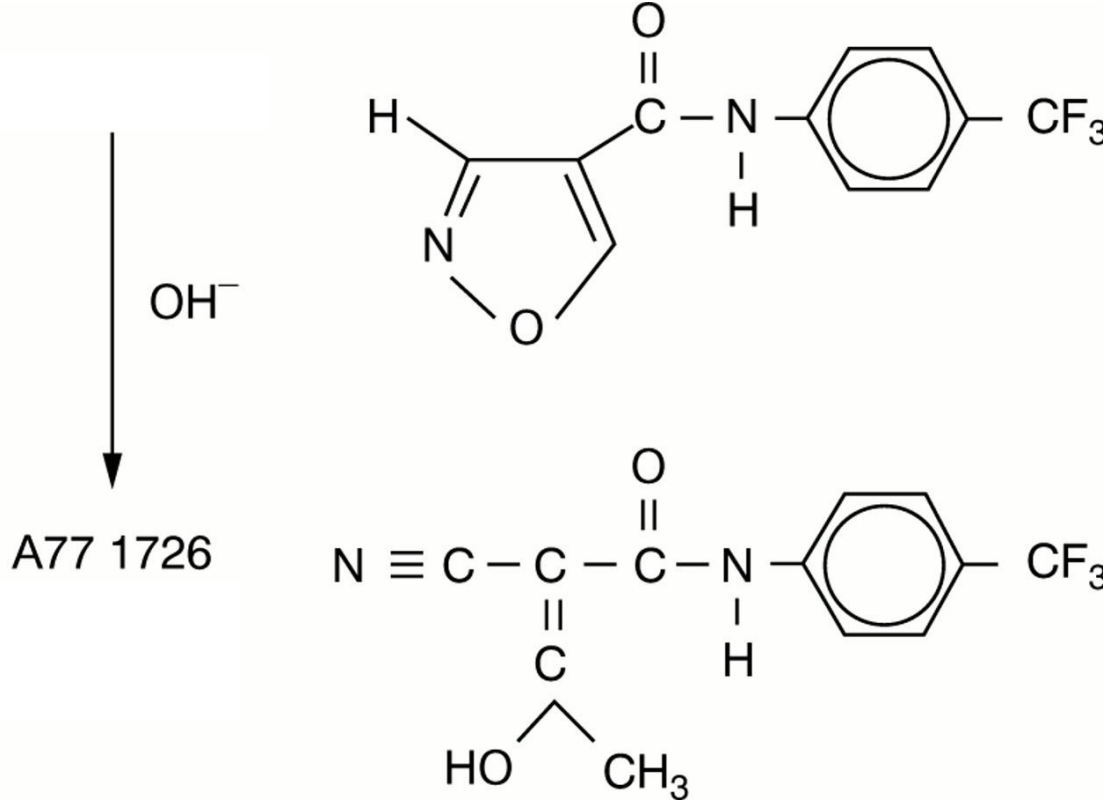
### **2.13. Leflunomid**

Bir izoksasol türevi olan ve eşsiz bir immunomodülatör ajan olarak etki gösteren leflunomid romatoid artiritte, aynı veya farklı türden yapılan doku nakillerinde, sistemik lupus erithematosusta ve kolon kanserinde kullanılır. Leflunomid bir ön ilaçtır ve hücrelerde hızlı bir şekilde aktif metaboliti olan A<sub>771726</sub>'e dönüşür. A<sub>771726</sub>'nin oluşması için izoksasol halkasının açılmasıyla ilişkili olan bu dönüşüm dolaşımdaki ilacın %95'inden fazlasını oluşturur (68). Leflunomidin aktif formu olan A<sub>771726</sub>, TNF-α ve

diğer inflamatuvar ajanlarla indüklenen NF-Kb aktivasyonunun potansiyel bir inhibitörüdür.<sup>69</sup>

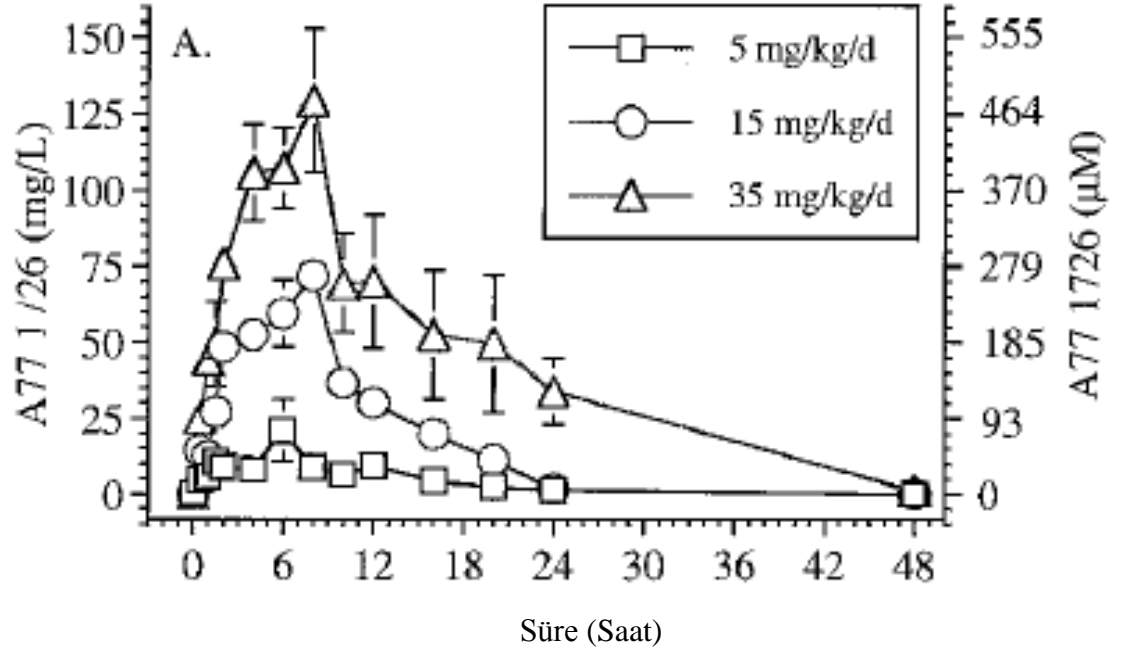
### Farmakolojisi

Leflunomid bir izoksasol türevidir. Etki modu tam olarak bilinmemektedir. Leflunomidin aktif metaboliti olan A<sub>771726</sub>, pirimidin senteziyle ilişkili bir enzim olan dihidro-orate dehidrogenaz'a bağlanır. Sonuç olarak, üridin trifosfat düzeyinde ve lenfositler ile diğer hızlı bölünen hücrelerdeki bir azalma meydana gelir. Bunun yanında tirozin kinaz enziminin de etkisi azalır. Bu etkiler, immunoglobulin üretiminin baskılanması ve hücre adhezyonuna müdahalenin yanında DNA ve RNA sentezi ve T ve B-hücre proliferasyonunda değişimlere yol açar. Leflunomidin anti-inflamatuvar aktivitesinin, histamin salınımı ve siklooksijenaz-2 inhibisyon yeteneğiyle gerçekleştiği in vitro olarak gösterilmiştir.<sup>70</sup>



Şekil 2.1. Leflunomid ve aktif metaboliti A<sub>771726</sub>'in kimyasal yapısı.<sup>71</sup>

## Farmakokinetiği



Şekil 2.2. Lewis ratlarda tek doz oral leflunomid uygulamasından sonra A<sub>771726</sub>'nın farmakokinetiği.<sup>72</sup>

### 3. MATERYAL VE METOT

#### 3.1. Deney Grupları

Çalışma ile ilgili etik kurul onayı, Atatürk Üniversitesi Rektörlüğü Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu Başkanlığı'ndan 24.02.2012 tarih ve B.30.2.ATA.0.23.85-15 sayı numarası ile alındı. Deneyde kullanılacak sıçanlar, Atatürk Üniversitesi Tıbbi Uygulama ve Araştırma Merkezi'nden (ATADEM) temin edilen sıçanlar, 12 saat karanlık 12 saat aydınlık, havalandırılmalı, sabit ısıda ve her kafese dörderli gruplar halinde yerleştirildi ve randomize olarak her grup için seçildi. Sıçanlar, standart pelet yemi ve musluk suyu kullanılarak beslendi. Deneyde ağırlıkları 250-300 gr olan 24 adet Sprague-Dawley cinsi erkek sıçan kullanıldı. Sıçanlar randomize olacak şekilde üç gruba ayrıldı.

**Grup I (8 adet): Kontrol Grubu:** Bu gruptaki sıçanlara iskemi-reperfüzyon yapılmadan sadece anestezi işlemi (4 saat) uygulandı. Anestezi işlemi, intraperitoneal olarak uygulanan ketamin (60 mg/kg) ve ksilazin (10 mg/kg) kokteyli ile gerçekleştirildi. Hayvanlar uyandıkça anestezik dozlar tekrarlandı.

**Grup II (8 adet): İ/R Grubu :** Anestezi altına alınan sıçanların sol alt ekstremitelerine turnike yardımıyla 2 saat iskemi, 2 saat reperfüzyon uygulandı.

**Grup III (8 adet): İ/R+LEF Grubu:** Bu gruptaki sıçanlara iskemi- reperfüzyon öncesi 8 saat ara ile 20 mg/kg dozunda intragastrik yolla üç doz leflunomid uygulandı. Bu gruptaki sıçanlar da anestezi altına alındıktan sonra, sol alt ekstremitelerine turnike yardımıyla 2 saat iskemi ve 2 saat reperfüzyon işlemi uygulandı.

### **3.2. Alt Ekstremitte Turnike İskemi Modeli ve İskeminin İndüksiyonu**

Sıçanlar anestezi altına alındıktan sonra sol alt ekstremiteleri, olabildiğince proksimalden elastik bir turnike yardımıyla sıkıca bağlanarak alt ekstremitte iskemi modeli oluşturuldu. Kan akımının kesilmesi, deride mor renk oluşumu ve ısı düşüşü ile doğrulandı. Sıçanlarda uyanma belirtileri görüldüğünde, anestezi dozları tekrarlandı. İki saatlik iskemi süresinin sonunda turnike çözülerek doku kan akımı tekrardan sağlandı.

### **3.3. Reperfüzyon İşlemi**

İki saatlik iskemi süresinin sonunda, turnike çözülerek doku kan akımı tekrardan sağlandı. Sıçanlara anestezi altında iki saat süreyle reperfüzyon işlemi uygulandı.

### **3.4. Leflunomidin Hazırlanması ve Uygulanması**

Leflunomidin ticari preparatı olan Arava, Sanofi-Aventis firmasından temin edildi. Leflunomid suda çözünmediği için %1'lik karboksi metil selüloz çözeltisi çözücü ortam olarak kullanıldı. Bunun için 1 gr karboksimetil selüloz tartılarak 100 ml suda çözüldü. Hazırlanan bu %1'lik 100 ml karboksimetil selüloz çözeltisi içinde 250 mg leflunomid çözülerek 1 mililitresinde 2,5 mg leflunomid içeren çözelti hazırlandı. Hazırlanan çözelti oral gavaj kullanılarak intragastrik yolla üç doz olacak şekilde sıçanlara uygulandı.

### **3.5. Sıçanların Batınlarının Açılması ve Kas ve Kan Örneklerinin Alınması**

Dört saatlik süre sonunda, abdominal insizyon ile sıçanların batınları açıldı. 5 ml'lik enjektör yardımıyla abdominal aortadan kan alındı. Sıçanların sol alt ekstremitte derileri soyulduktan sonra alt ekstremiteden gastrokinemius kas örnekleri alındı. Alınan örnekler, serum fizyolojikte yıkanarak alüminyum folyolara sarıldı ve -20 °C'lik derin dondurucuda muhafaza edildi. Deney sonunda, alınan kas örnekleri -80 °C'lik derin dondurucuya transfer edildi. Abdominal aortadan alınan kan örnekleri serum ayırma

tüplerine alınarak oda ısısında 30 dk bekletildi. Daha sonra 3000 rpm'de 10 dakika santrifüj edildi. Santrifüj sonunda serumlar ependorf tüplere alınarak -20 °C'lik derin dondurucuda muhafaza edildi. Deney sonunda serum örnekleri -80 °C'lik derin dondurucuya transfer edildi.

### **3.6. Biyokimyasal Prosedür**

#### **3.6.1. Dokuların Hazırlanması**

Deney günü tartılan dokular 0,2 mM pH: 7,4 Tris-HCl tamponuyla homojenize edildi (IKA Ultra-Turrax T25 basic homogenizer, Germany). Doku MDA ölçümleri bu örneklerde yapıldı. Homojenat daha sonra 4000 rpm'de 55 dk santrifüj edildikten sonra üst kısımda yer alan temiz süpernatant kısım SOD, CAT ve GSH-Px ölçümleri için ayrıldı. SOD ölçümü için süpernatantlar eşit hacim etanol-kloroform (5/3, v/v) karışımıyla ekstrakte edildi. Spektrofotometrik ölçümlerde uv-Shimadzu 1600 kullanıldı.

#### **3.6.2. Katalaz (CAT) Enzim Aktivitesi**

Katalaz (KAT, EC 1.11.1.6) enzim aktivitesi Aebi'nin metoduna göre<sup>73</sup> H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>'nin ortamdaki katalaz tarafından tüketilmesi prensibine göre spektrofotometrik olarak 240 nm'de ölçüldü. 50 mM fosfat tamponuna hidrojen peroksit eklenerek 0,500 OD'ye tampon ayarlandı. Numune eklenmesiyle birlikte düşüş her 15 sn'de bir kaydedildi. 1 dakikada tüketilen H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> hızı olarak k/g protein olarak ifade edildi ( $k = (2.3 \times \log (OD1/OD2)) / 30 \text{ sn}$ ).

### **3.6.3. Süperoksit Dismutaz (SOD) Enzim Aktivitesi**

Süperoksit dismutaz (SOD, EC 1.15.1.1) enzim aktivitesi ölçümü nitroblue tetrazolium (NBT) ile ortaya çıkan  $O_2^{\cdot-}$ 'nin indirgenmesi esasına dayanılarak spektrofotometrede 560 nm'de ölçülerek değerlendirildi.<sup>74</sup> Ortamda SOD enzimi bulunduğunda enzim miktarına bağlı olarak açık bir renk değişikliği meydana gelirken olmaması durumunda daha koyu renk vermektedir. Enzimin aktivitesini % 50 oranında NBT redüksiyonunu inhibe eden enzim aktivitesi olarak alındı ve U/mg protein olarak ifade edildi (Enzimin % inhibisyonu =  $(Abs_{k\ddot{o}r} - Abs_{num}) / Abs_{k\ddot{o}r} \times 100$ ).

### **3.6.4. Glutasyon Peroksidaz (GSH-Px) Enzim Aktivitesi**

Glutasyon peroksidaz (GSH-Px, EC 1.11.1.9) enzim aktivitesi Paglia ve arkadaşlarının metodu uygulanarak  $H_2O_2$  varlığında redükte glutasyonun (GSH) okside glutatyonu (GSSG) yükseltgenmesini katalizlemesi prensibine göre ölçüldü.<sup>75</sup> NADPH'ın  $NADP^+$ 'ya yükseltgenmesi sırasındaki absorbans azalmasının 340 nm'de spektrofotometrik olarak okunmasıyla enzim aktivitesi hesaplandı ve birim zamanda okside olan NADPH'ın mikromol miktarı U/mg protein olarak ifade edildi.

### **3.6.5. Tiyobarbitürük Asit Reaktif Maddeleri (TBARS) Miktarının Tayini**

Esterbauer ve Cheeseman'ın metoduna göre asidik ortamdaki tiyobarbitürük asitin 90-95 °C'de reaksiyona girmesi prensibine göre spektrofotometrik olarak çalışıldı.<sup>76</sup> 532 nm'de spektrofotometrik olarak okunan sonuçlar standart grafik sonuçlarına göre hesaplanarak nmol/g yaş doku olarak ifade edildi.

### **3.6.6. Protein Tayini**

Süpernatant ve ekstrakte edilen örneklerde protein analizleri Lowry ve ark. metoduna göre çalışıldı.<sup>77</sup>

### 3.6.7. Kreatin Kinaz ve Laktat Dehidrogenaz Enzim Düzeyleri

Serum kreatin kinaz ve laktat dehidrogenaz enzim düzeyleri rutin biyokimya laboratuvarında otoanalizör kullanılarak belirlendi.

### 3.7. Histopatolojik İnceleme

Tüm gruplardaki sıçanlardan alınan gastrokinemius kas dokuları etiket kod numaraları ve grup adları verilerek içinde % 10'luk formaldehit bulunan ve ağzı sızdırmayan özel şişelere bırakıldı.

Bu amaçla alınan kas dokuları sırasıyla şu işlemlerden geçirildi;

1. Akarsuda yıkama; dokular temiz ve akar haldeki çeşme suyu altında gün boyu yıkandı.

Daha sonra dehidratasyon işlemi için dokular alkol serilerinden geçirildi. Bunun için ise şu işlem basamakları takip edildi;

2. % 70'lik Etil Alkolde 1 gece (6-12 saat),

3. % 80'lik Etil Alkolde 60 dakika,

4. % 96'lık Etil Alkol'de 60 dakika,

5. % 96'lık Etil Alkolde 60 dakika,

6. % 100'lük Absolute Etil Alkolde 60 dakika,

7. % 100'lük Absolute Etil Alkol de 60 dakika bekletildi.

Dehidratasyon işleminin hemen ardından ksilen serilerinden geçirilen dokulara parlatma diğer adıyla şeffaflaştırma işlemi uygulandı. Bu işlemler için;

8. Ksilende (Xylol) 30 dakika,

9. Yeni bir ksilende 30 dakika bekletildi,

10. Boncuk parafinde oda sıcaklığında (19-22 °C) 1 gece yani yaklaşık 6-12 saat bekletildi,

11. Boncuk parafinde 56-60 °C'lik etüvde 1 saat,

12. 56-60 °C'lik etüvde yeni hazırlanmış boncuk parafinde 2 saat bekletildi.

13. Son işlem olarak beyin dokuları etiketlenerek parafin blok kaplarına gömüldü ve soğuması için dolap ortamına kaldırıldı.

Elde edilen parafin bloklardan (Leica RM2125RT) mikrotomda beş mikron kalınlığında kesilerek, boyama işlemlerine hazır hale getirildi. Daha sonra kesitler, ışık mikroskobu düzeyinde incelenmek üzere Hematoksilen-Eozin (H-E) boyaları ile boyandı.

Hematoksilen-Eozin (H-E) Boyama Prosedürü:

Bu işlemler aşağıda sırasıyla verildi;

1. Ksilol'de 20 dk bekletildi.
2. Ksilol ve Ksilol'de 10 dk bekletildi.
3. % 80'lik Alkolde 10 dk bekletildi.
4. İki ayrı % 96'lık Alkol serisinde 5 dk bekletildi.
5. Kesitler çeşme suyunda yıkandı
6. Hematoksilen boyasında 1 dk bekletildi.
7. Asit-Alkol karışımına batırılıp çıkarıldı.
8. Eozin solüsyonunda 1 dk bekletildi.
9. Suda 1 dk yıkandı.
10. % 80'lik Alkolde 10 dk bekletildi.
11. İki ayrı % 96'lık Alkol serisinde 10 dk bekletildi.
12. Ksilol, Ksilol ve Ksilol serilerinde 20 dk bekletildi.
13. Entellan ile kapatma işlemi gerçekleştirildi.

Kesitler boyama işlemlerinin ardından, incelemeye hazır hale gelen kesitler Olympus BH 40 marka kamera ataçmanlı ışık mikroskobu altında incelenerek ilgili tüm gruplara ait fotoğraflar çekildi.

İnfiltrasyonun bir göstergesi olarak, toplam lökosit sayısının histolojik olarak saptanmasında 5 µm kalınlığındaki kesitler kullanıldı. Kesitler hematoxilen eosin (H-E) boyası ile rutin histolojik işlemlere uygun şekilde boyandı. Kas lökosit infiltrasyonunun kantifikasyonu Walden ve arkadaşları<sup>78</sup> tarafından uygulanan metod modifiye edilerek kullanıldı. Kas lökosit infiltrasyonu için bir kas kesiti (10x oküler ve 4x, 10x, 20x 40x objektif lens) 40, 100, 200 ve 400 defa büyütmede incelendi. Beş kesitin toplam görüntü alanı birlikte (0.25 mm<sup>2</sup> görünüm alanı) hesaplanarak toplam lökosit sayısı bulundu. Bu işlem ikinci bir seri kesit ile tekrarlandı ve ikisinin ortalaması alındı.<sup>79</sup>

### **3.8. İstatistiksel Analiz**

Çalışmamız sonucunda elde edilen bulgular istatistiksel olarak değerlendirildi. Elde edilen sonuçlar ortalama ± standart sapma şeklinde verildi. Verilerimize Non-Parametrik testlerden Kruskal-Wallis varyans analiz testi uygulandı. İstatistiksel açıdan fark görülen parametrelerde, Mann Whitney-U testi ile ikili karşılaştırmalar yapıldı. P<0.05 anlamlı kabul edildi. Hesaplamalar Windows uyumlu SPSS 15.0 istatistik programı kullanılarak yapıldı.

## 4. BULGULAR

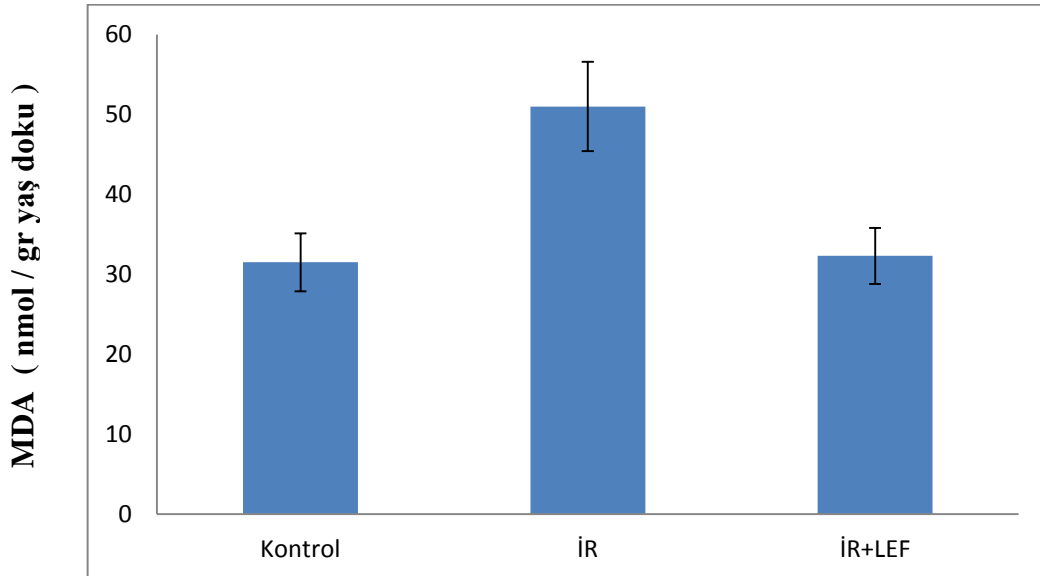
### 4.1. Gastrokinemius Kası Biyokimyasal Bulguları

#### 4.1.1. Malondialdehit

Yaptığımız çalışmada gruplara ait MDA değerleri tablo ve grafik halinde aşağıda verilmiştir. Gruplara ait değerler ortalama  $\pm$  standart sapma olarak verilmiştir. İR grubuna ait MDA değerinin kontrol grubuna göre anlamlı derecede yüksek olduğu tespit edilmiştir ( $P<0.05$ ). İR+LEF grubunda ise MDA değerinin azaldığı ve bu azalmanın istatistiksel olarak anlamlı olduğu tespit edilmiştir ( $P<0.05$ ).

**Tablo 4.1.** Gruplara ait MDA düzeyleri

Gruplar	n	MDA ( nmol / gr yaş doku )
Kontrol	8	31.51 $\pm$ 3.63
İ / R	8	50.99 $\pm$ 5.58
İ / R+LEF	8	32.30 $\pm$ 3.50



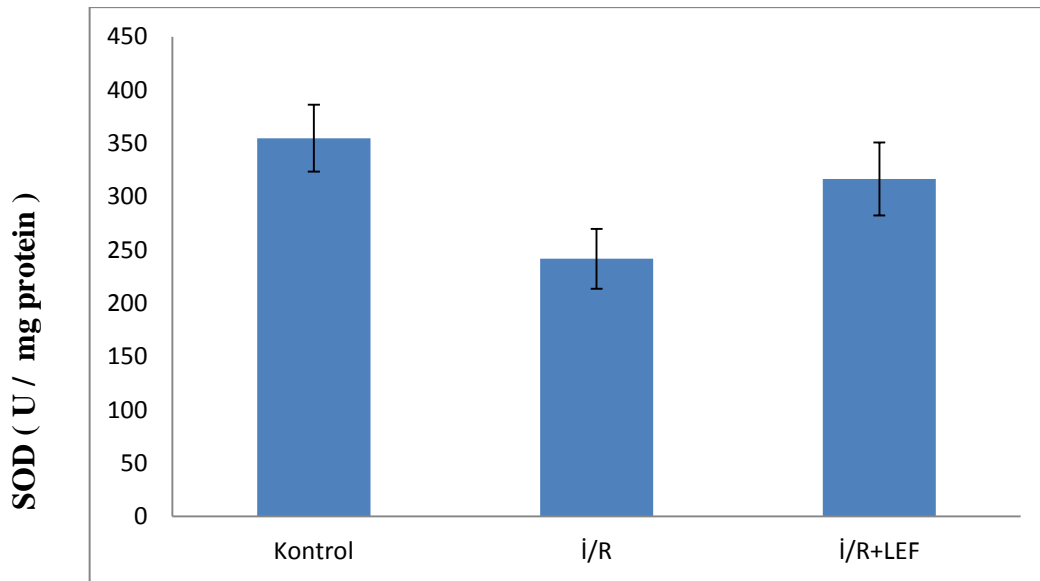
**Şekil 4.1.** MDA düzeyleri (Sonuçlar  $X \pm SD$  olarak verilmiştir. \*= Kontrol ile İR ve İR ile İR+LEF grupları arasındaki fark anlamlıdır.  $P<0.05$ )

#### 4.1.2. Süperoksit Dismutaz (SOD)

Yaptığımız çalışmada gruplara ait SOD aktivite değerleri tablo ve grafik halinde aşağıda gösterilmiştir. Gruplara ait değerler ortalama  $\pm$  standart sapma olarak verilmiştir. İR grubunda kontrol grubuna göre SOD aktivitesinde istatistiksel olarak anlamlı bir azalma tespit edilmiştir ( $p<0.05$ ). İR+LEF grubunda ise İR grubuna göre anlamlı derecede bir artış olduğu tespit edilmiştir ( $p<0.05$ ).

**Tablo 4.2.** Gruplara ait SOD değerleri

Gruplar	n	SOD ( U / mg protein )
Kontrol	8	354.79 $\pm$ 31.40
İ / R	8	241. 24 $\pm$ 28.11
İ / R+LEF	8	316. 57 $\pm$ 34.27



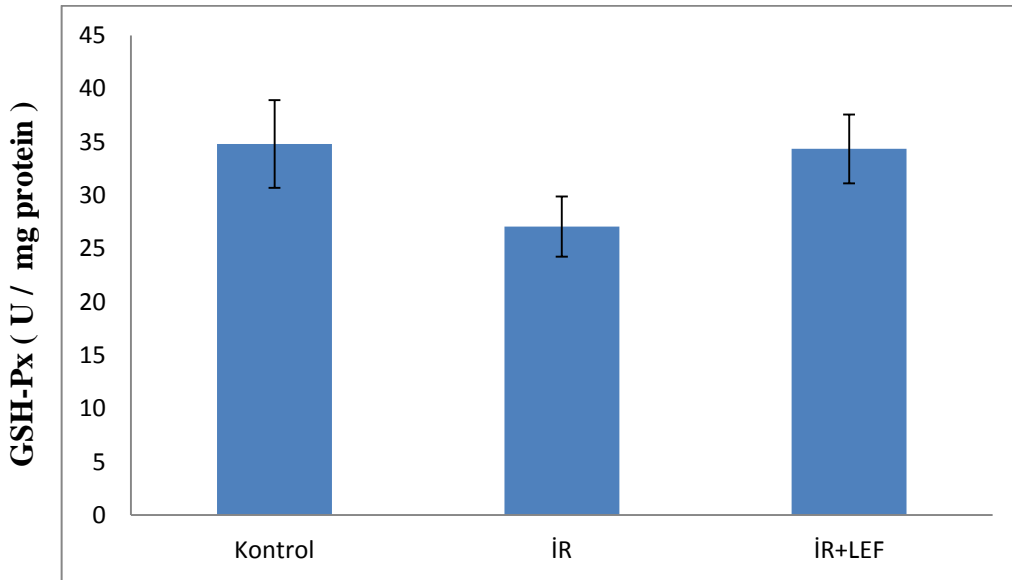
**Şekil 4.2.** SOD aktiviteleri (Sonuçlar  $X \pm SD$  olarak verilmiştir. \*= Kontrol ile İR ve İR ile İR+LEF grupları arasındaki fark anlamlıdır.  $P<0.05$ )

#### 4.1.3. Glutasyon Peroksidaz (GSH-Px)

Gruplara ait glutasyon peroksidaz enzimi aktivite değerleri tablo ve grafik halinde aşağıda verilmiştir. Gruplara ait değerler ortalama  $\pm$  standart sapma olarak verilmiştir. İR grubu glutasyon peroksidaz enzim aktivitesinde kontrol grubuna göre anlamlı derecede azalış meydana gelmiştir ( $p<0.05$ ). İR+LEF grubu glutasyon peroksidaz enzim aktivitesinde İR grubuna göre anlamlı derecede bir artış olduğu tespit edilmiştir ( $p<0.05$ ).

**Tablo 4.3.** Gruplara ait GSH-Px enzim aktiviteri

Gruplar	n	GSH-Px ( U / mg protein )
Kontrol	8	34.82 $\pm$ 4.11
İ / R	8	27.06 $\pm$ 2.82
İ / R+LEF	8	34.35 $\pm$ 3.23



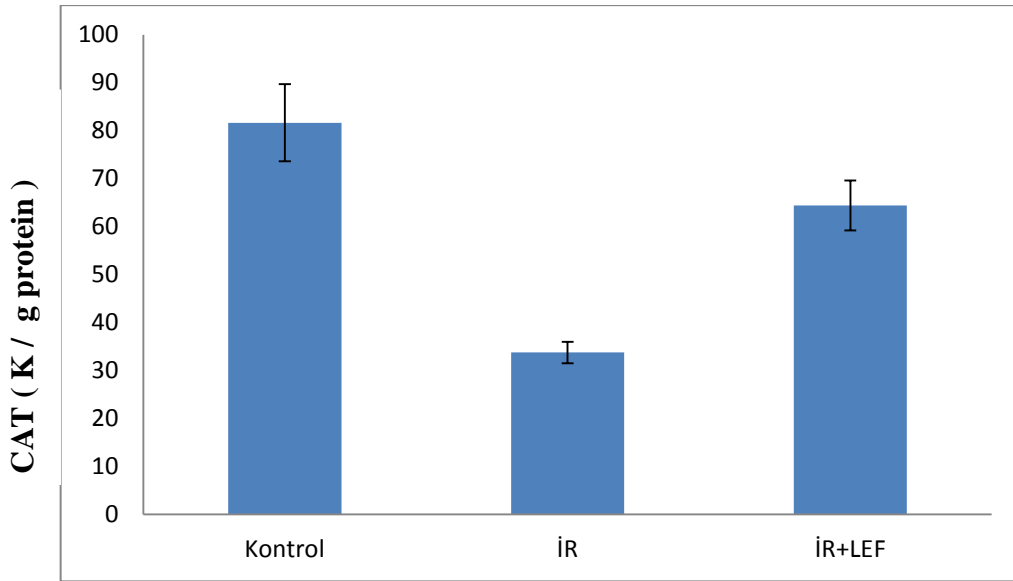
**şekil 4.3.** GSH-Px aktiviteri (Sonuçlar  $X \pm SD$  olarak verilmiştir. \*= Kontrol ile İR ve İR ile İR+LEF grupları arasındaki fark anlamlıdır.  $P<0.05$ )

#### 4.1.4. Katalaz (CAT)

Gruplara ait katalaz enzim aktiviteleri tablo ve grafik halinde aşağıda gösterilmiştir. Gruplara ait değerler ortalama  $\pm$  standart sapma olarak verilmiştir. İR grubu katalaz enzim aktivitesi kontrol grubuna göre anlamlı derecede azalma göstermiştir ( $p < 0.05$ ). İR+LEF grubu katalaz aktivitesinde İR grubuna göre anlamlı derecede artış olduğu tespit edilmiştir ( $p < 0.05$ ).

**Tablo 4.4.** Gruplara ait katalaz enzim aktiviteleri

Gruplar	n	CAT ( K / g protein )
<b>Kontrol</b>	8	81.65 $\pm$ 8.03
<b>İ / R</b>	8	33.76 $\pm$ 2.24
<b>İ / R+LEF</b>	8	64.40 $\pm$ 5.18



**Şekil 4.4.** Katalaz enzim aktiviteleri (Sonuçlar  $X \pm SD$  olarak verilmiştir. \*= Kontrol ile İR ve İR ile İR+LEF grupları arasındaki fark anlamlıdır.  $P < 0.05$ )

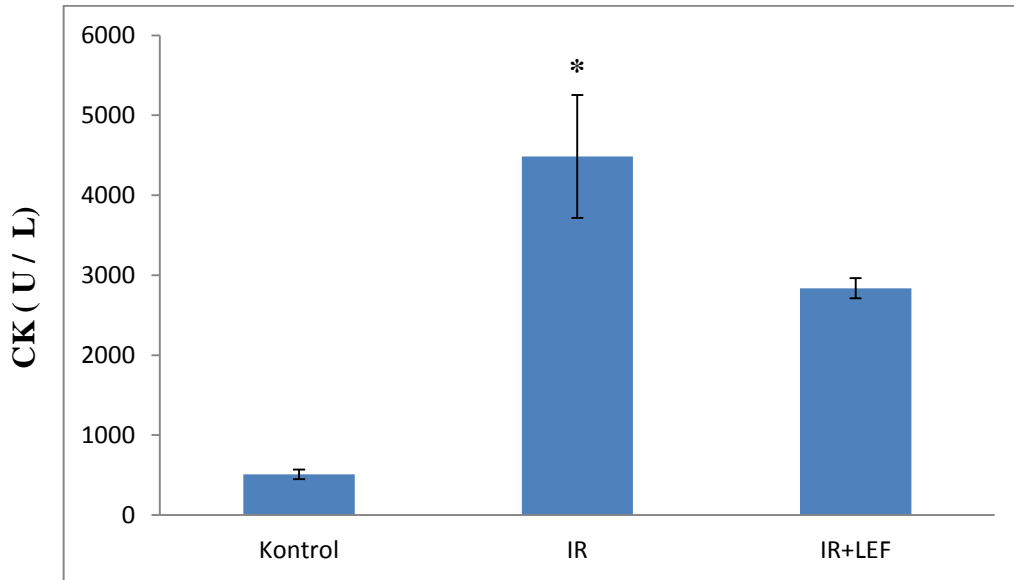
## 4.2. Serum Biyokimyasal Bulguları

### 4.2.1. Kreatin Kinaz (CK)

Gruplara ait serum kreatin kinaz düzeyleri tablo ve grafik halinde aşağıda gösterilmiştir. Gruplara ait değerler ortalama  $\pm$  standart sapma olarak verilmiştir. İR grubu serum kreatin kinaz düzeyi kontrol grubuna göre anlamlı derecede artış göstermiştir ( $p<0.05$ ). İR+LEF grubu kreatin kinaz düzeyinde İR grubuna göre anlamlı derecede azalma tespit edilmiştir ( $p<0.05$ ).

**Tablo 4.5.** Gruplara ait kreatin kinaz enzim düzeyleri

Gruplar	n	CK (U/L)
Kontrol	8	509.00 $\pm$ 60.30
İ / R	8	4485.75 $\pm$ 768.64
İ / R+LEF	8	2837.25 $\pm$ 126.75



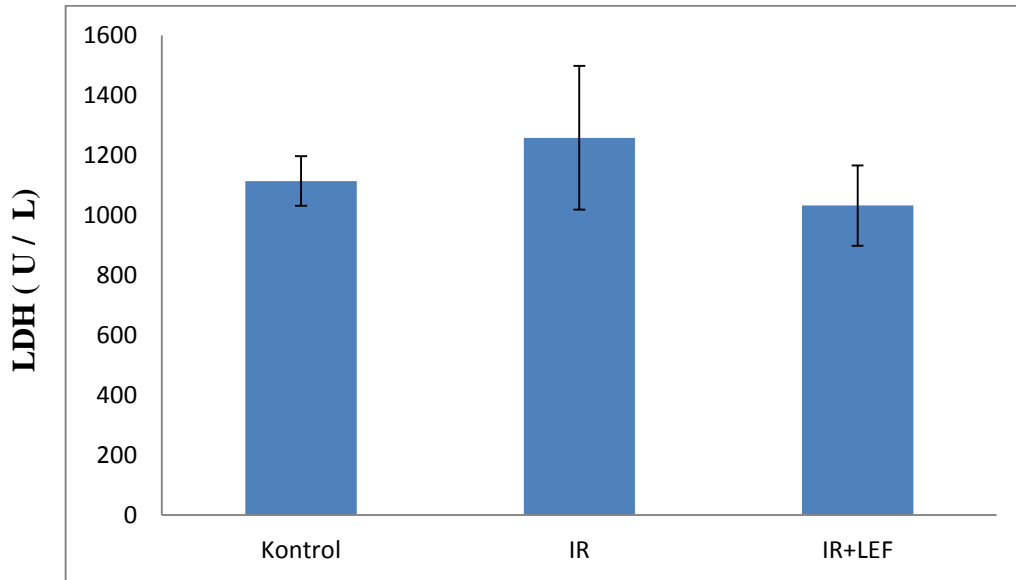
**Grafik 4.5.** Kreatin kinaz düzeyleri (Sonuçlar  $X \pm SD$  olarak verilmiştir. \*= Kontrol ile İR ve İR ile İR+LEF grupları arasındaki fark anlamlıdır.  $P<0.05$ )

#### 4.2.2. Laktat Dehidrogenaz (LDH)

Gruplara ait serum laktat dehidrogenaz düzeyleri tablo ve grafik halinde aşağıda verilmiştir. Gruplara ait değerler ortalama  $\pm$  standart sapma olarak verilmiştir. İR grubu LDH düzeyi kontrol grubuna göre artış göstermiştir. Fakat bu artış istatistiksel olarak anlamlı değildir ( $p>0.05$ ). İR+LEF grubu LDH düzeyinde İR grubuna göre bir azalma olduğu tespit edilmiştir. Fakat bu azalma da istatistiksel olarak anlamlı değildir ( $p>0.05$ ).

**Tablo 4.6.** Gruplara ait LDH düzeyleri

Gruplar	n	LDH (U/L)
Kontrol	8	1114.13 $\pm$ 81.89
İ / R	8	1218.38 $\pm$ 239.74
İ / R+LEF	8	1032.13 $\pm$ 133.57

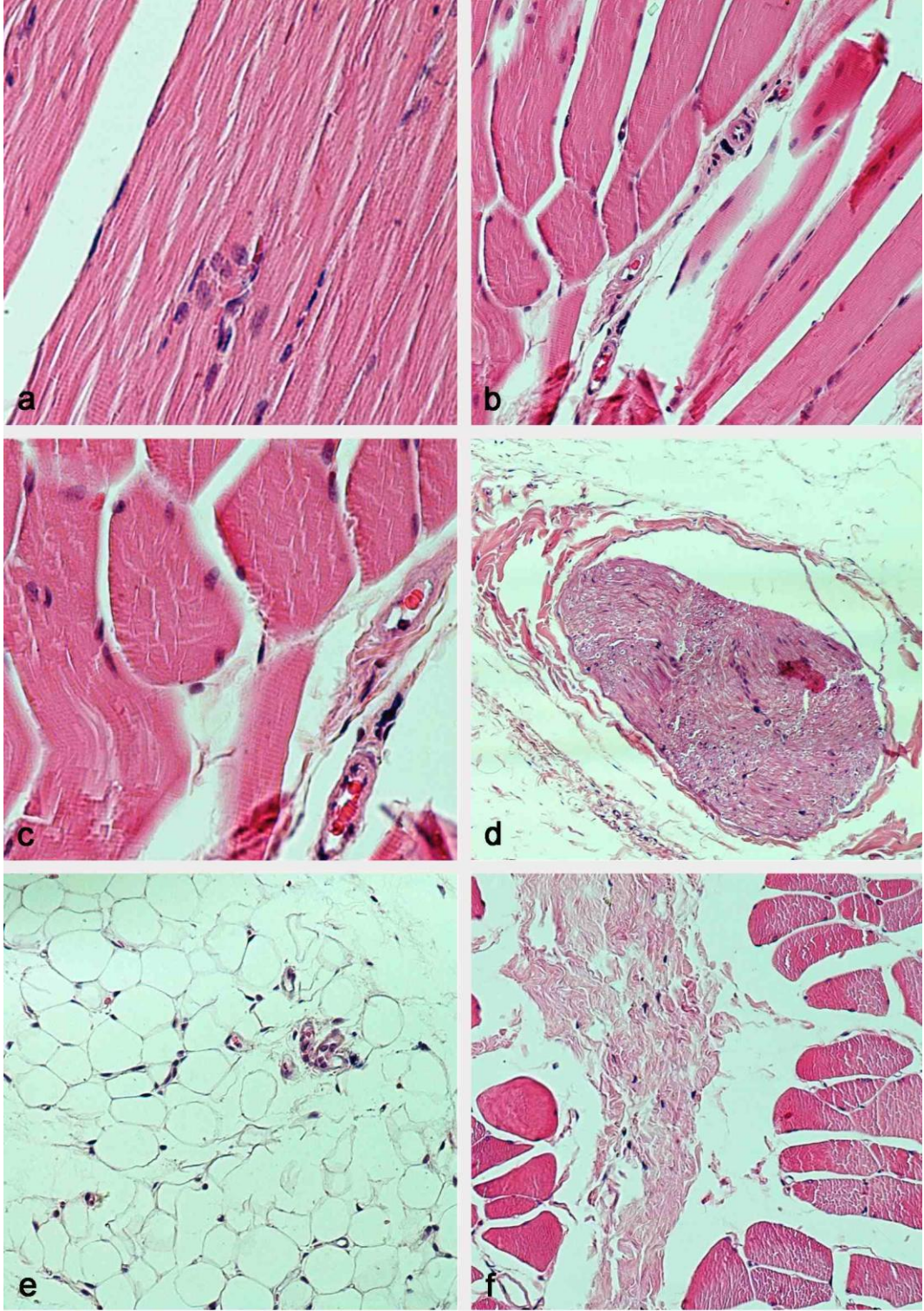


**Şekil 4.6.** LDH düzeyleri (Sonuçlar  $X \pm SD$  olarak verilmiştir.)

### **4.3. Histopatolojik Bulgular**

#### **4.3.1. Kontrol Grubu Bulguları**

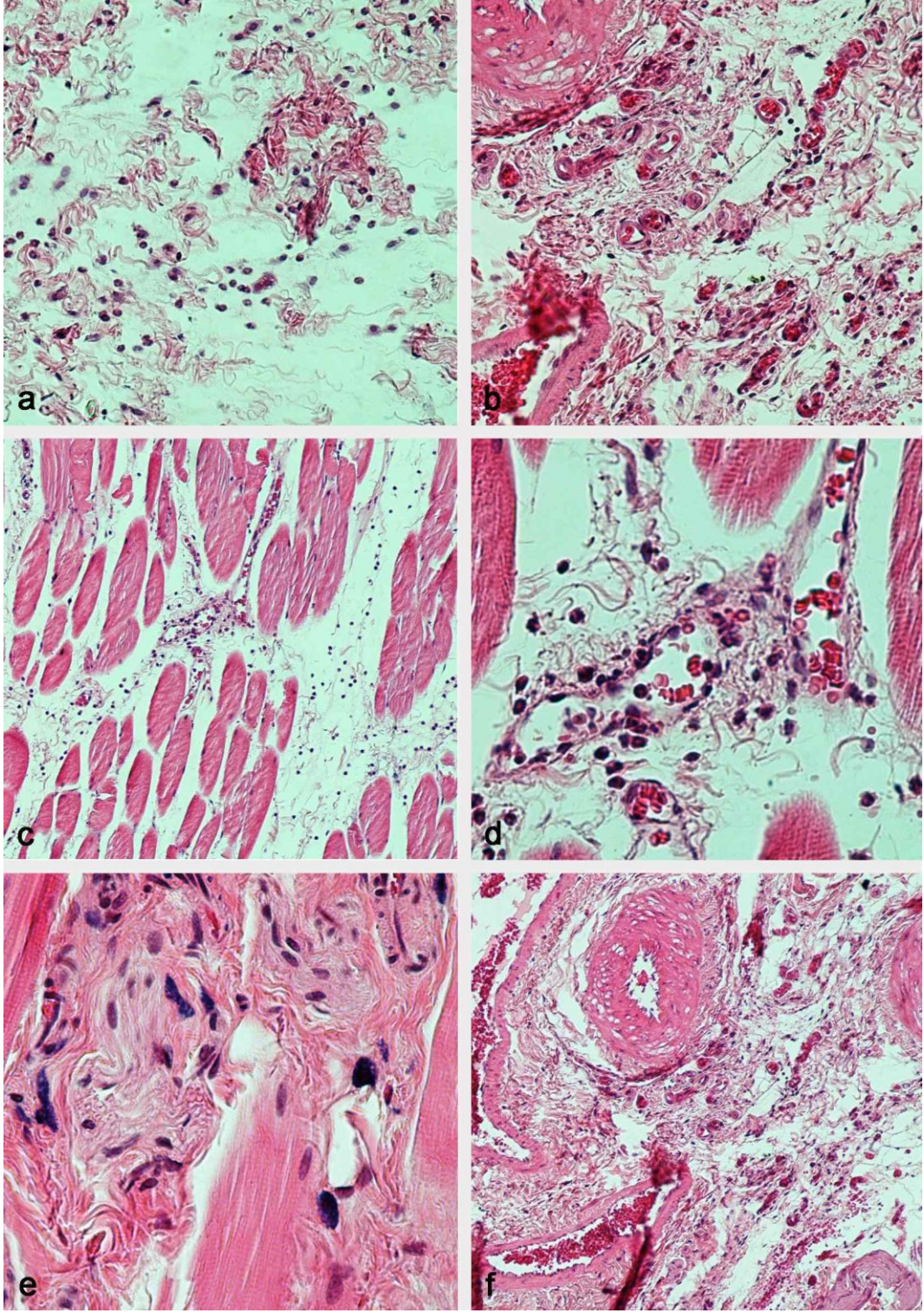
Kontrol grubunda çizgili kas liflerinin yapısı normaldi. Çekirdekleri periferde yerleşim gösteren kas liflerinin bütünlüğü vardı. A ve I bandlarının oluşturduğu çizgilenme belirgindi (Şekil 4.7.a). Perimisyumda gözlenen arteriyol ve venüllerin damar yapısı normaldi (Şekil 4.7.b). Damarların endoteli belirgin bir şekilde gözlenmekteydi (Şekil 4.7.c). Periferik sinirlerde herhangi bir hasar gözlenmez iken (Şekil 4.7.d) sinirlerin etrafında bulunan bağ ve yağ doku (Şekil 4.7.e) normaldi. Perimisyumda ise yoğun kollajen liflerin arasında seçilebilen bağ doku hücreleri normal (Şekil 4.7.f) görünümüne sahipti.



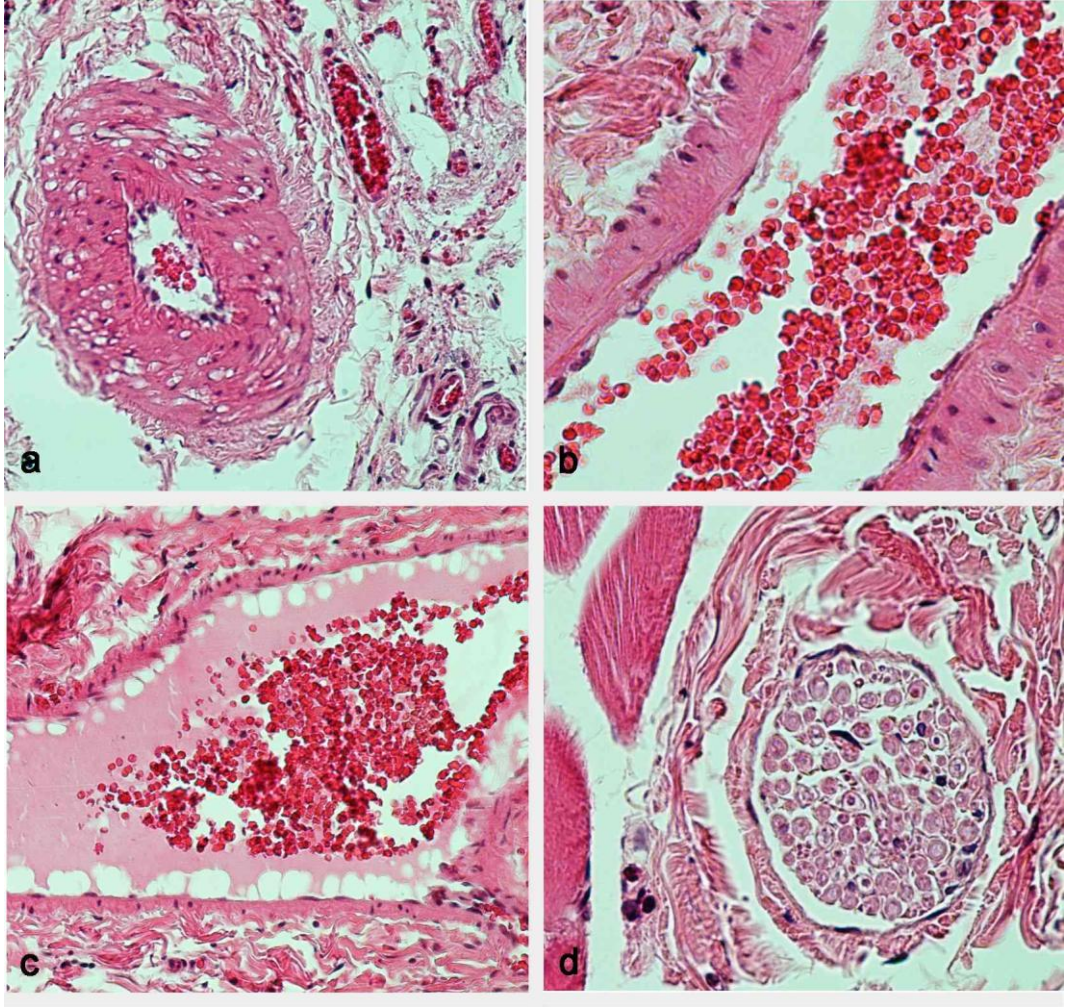
**Şekil 4.7.** Kontrol grubuna ait deneklerin gastrokinemius kası ışık mikroskopik görünümleri. a. Çizgili kas genel görünümü (Çizgilenme - 40X). b Perimisyumda yerleşik damarların görünümü (20X). c. Arteriyol damar endoteli genel görünümü (40X). d. Periferik sinir görünümü (10X). e. Epimisyum ve yağ dokunun genel yapısının görünümü (20X). f. Normal görünümlü perimisyum ve bağ doku hücreleri (20X). (Kesit 5 µm, Boya: H-E).

### 4.3.2. İR Grubu Bulguları

Epimisyumda kollajen liflerin ipliksi düzeni bozulmuş ve kollajen lifler arasında çok yoğun bir bağ doku hücresi artışı (Şekil 4.8.a) dikkati çekmekteydi. Kan damarlarından (arteriyol, venül ve kapilerden) epimisyuma yoğun bir lökosit göçü (Şekil 4.8.b) olduğu fark edilmekteydi. Benzer durum perimisyum içinde görülmekteydi. Perimisyumda kollajen liflerin ipliksi düzeni bozulmuş ve kollajen lifler arasında çok yoğun bir bağ doku hücresi artışı (Şekil 4.8.c) olduğu gözlenmekteydi. Kan damarlarından (arteriyol, venül ve kapilerden) perimisyuma yoğun bir lökosit göçü (Şekil 4.8.d) olduğu izlenmekteydi. Ayrıca sitoplazması bazofilik boyanan ve çekirdeği maskelemiş halde olan bağ doku (mastosit) (Şekil 4.8.e) hücreleri dikkat çekiciydi. Bunun yanı sıra damarlarda bir dilatasyon ve arterlerin duvar yapısında bir bozulma (Şekil 4.8.f) söz konusu idi. Muskuler arterlerin tunika mediya tabakasını meydana getiren düz kas hücrelerinde spongiyotik (Şekil 4.9.a) bir görünüm vardı. Arterlerde olan bu hasar venlerde gözlenmedi (Şekil 4.9.b). Bazı büyük venlerde kuagulasyon (Şekil 4.9.c) varlığı tespit edilmekteydi. Periferik sinirler de bir dejenerasyon (Şekil 4.9.d) varlığı gözlenmekteydi.



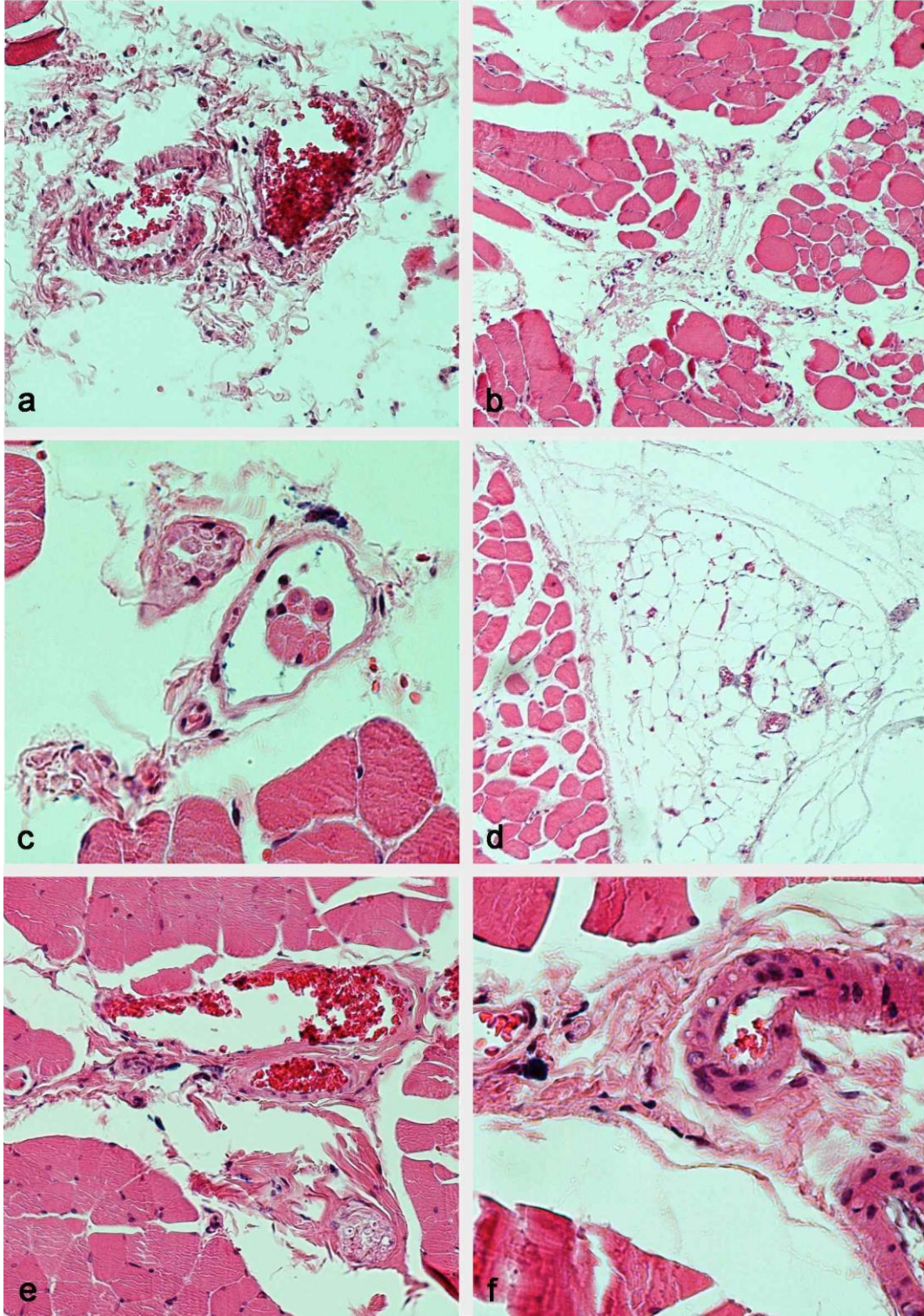
**Şekil 4.8.** İR grubuna ait deneklerin gastrokinemius kası ışık mikroskopik görünümleri. a. Epimisyumda kollajen liflerin ve bağ doku hücresi artışının görünümü (20X). b. Epimisyumda kan damarlarının (arteriyol, venül ve kapillerin) görünümü (20X). c. Perimisyumda hasar ve yoğun hücresel artışın görünümü (10X). d. Perimisyumda damarlarda gözlenen dilatasyonun ve kası lifleri arasında görülen lökosit hücreleri (40X). e. Kası lifleri arasında görülen mastosit ve fibroblast hücreleri (40X). f. Epimisyumda yerleşik arterlerin duvar yapısında bir bozulmanın görünümü (10X). (Kesit 5 µm, Boya: H-E).



**Şekil 4.9.** İR grubuna ait deneklerin gastrokinemius kası ışık mikroskopik görünümleri. a. Arterlerin duvar yapısında bir bozulmanın yakından görünümü (20X). b. Epimisyumda yerleşik venlerin duvar yapısının yakından görünümü (40X). c. Bazı venlerde koagulasyon görünümü (20X). d. Periferik sinirler (40X). (Kesit 5 µm, Boya: H-E).

### 4.3.3. İR+LEF Grubu Bulguları

LEF grubunda; epimisyumda kan (arter ve ven) damarları yapısal olarak dejenere (Şekil 4.10.a) olduğu gözlenmekteydi. Perimisyum hasar göstermekteydi. İnce ve yoğun kollajen liflerin arasında yoğun miktarda fibroblast ve kan kaynaklı bağ hücrelerinin (Şekil 4.10.b) varlığı fark edilmekteydi. Ancak kan (arteriyol ve venül) damarları yapısal olarak normal olduğu gözlenmekteydi. Bununla birlikte bazı venlerde dilatasyon ve damar içinde lökositler (Şekil 4.10.c) gözlenmekteydi. Kas dokunun etrafını saran bağ ve yağ dokuda (Şekil 4.10.d) bir hasar fark edilmezken periferik sınırlar (Şekil 4.10.e) normal görünümlü idi. Çok nadir olarak bazı arterlerin tunika mediya tabakasını meydana getiren düz kas hücrelerinde spongiyotik (Şekil 4.10.f) yapılar görülmekteydi.



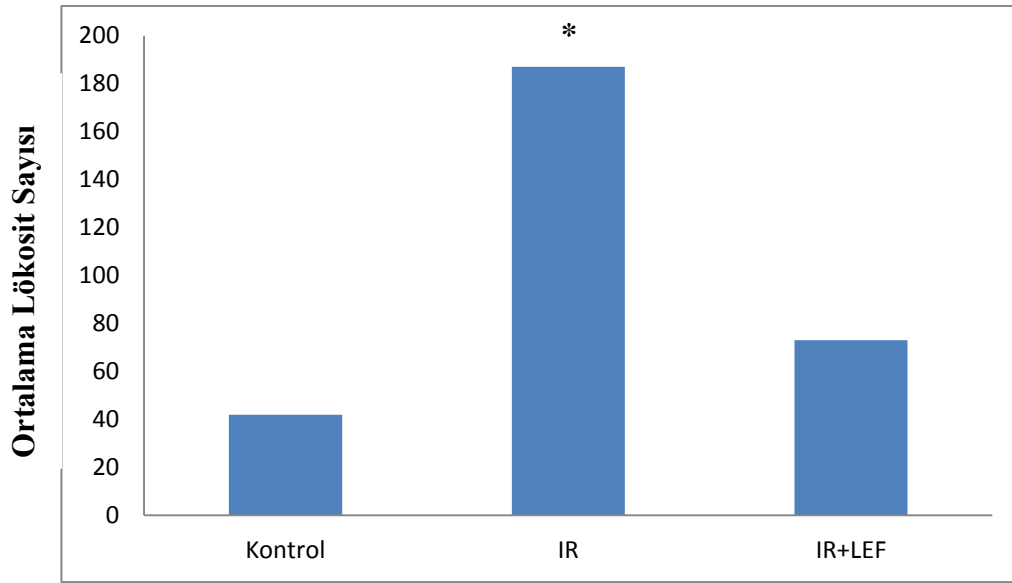
**Şekil 4.10.** İR+Lef grubuna ait deneklerin gastrokinemius kası ışık mikroskopik görünümleri. a. Gastrokinemius kası genel görünümü ve epimisyumda kan (arter ve ven) damarları yapısal olarak dejenerasyonun görünümü (20X). b Perimisyumda gözlenen hasar: bağ dokuda gözlenen ipliksel ve hücresel artışın görünümü (10X). c. Bazı venlerde dilatasyon ve damar içinde lökositlerin görünümü (20X). d. Epimisyum ve yağ dokunun genel görünümü (10X). e. Kas lifleri arasındaki damar ve sinirlerin görünümü (10X). f. Bazı arterlerin tunika mediya tabakasını meydana getiren düz kas hücrelerinde spongiyotik görünüm (40X). (Kesit 5 µm, Boya: H-E).

#### 4.3.4. Gastrokinemius Kası Lökosit İnfiltrasyonu

Sıçanların gastrokinemius kası lökosit infiltrasyonu istatistik sonuçları Tablo 4.7 ve Şekil 4.11’de gösterilmiştir.

**Tablo 4.7.** Sıçanların gastrokinemius kasındaki lökosit infiltrasyonu (alandaki ortalama lökosit sayıları). Sonuçlar  $X \pm SD$  olarak verildi. Gruplar Mann-Whitney U testi ile karşılaştırıldı,  $p < 0.05$  ise anlamlılık düzeyi kabul edildi.

Gruplar	Ort $\pm$ Sd
Kontrol	42 $\pm$ 6.82
İR	187 $\pm$ 7.56
İR+LEF	73 $\pm$ 6.37



**Şekil 4.11.** Sıçanların gastrokinemius kasındaki lökosit infiltrasyonu (alandaki ortalama lökosit sayıları). (Sonuçlar  $X \pm SD$  olarak verildi. \*= Kontrol ile İR ve İR ile İR+LEF grupları arasındaki fark anlamlıdır.  $P < 0.05$ )

#### 4.3.5. Gastrokinemius Kası İçin Histopatolojik Değerlendirme Skorlaması

Rat gastrokinemius kası için histopatolojik değerlendirme skorlaması tablo halinde aşağıda verilmiştir.

**Tablo 4.8.** Rat gastrokinemius kası için histopatolojik değerlendirme skoru

	Kontrol	İR	İR+LEF
Epimisyumda bozulma	-	+++	+
Perimisyumda bozulma	-	+++	+
Perimisyumda hücresel artış	-	+++	++
Arter duvarında dejenerasyon	-	+++	+
Damarlarda dilatasyon	-	+++	+
Venlerde kuagülasyon	-	++	-
Yok/Normal = -; Hafif = +; Orta = ++; Şiddetli = +++			

## 5. TARTIŞMA

Bir iskemi periyodundan sonra kan akımının onarılması iskemi-reperfüzyon hasarına neden olur. İskemi-reperfüzyon hasarı miyokard enfarktüsü, travma, bazı nöromusküler hastalıkların yanında turnike uygulaması gibi çoğu hastalıklarda ortaya çıkan bir problemdir. Hücresel ve gen terapilerinin yanında, iskemi-reperfüzyon hayvan modelleri iskemi-reperfüzyon hasarının patofizyolojisini ve sonuçlarını çalışmak için yaygın biçimde kullanılmıştır. İskemi-reperfüzyon hasarı vasküler sızmalara, nöromusküler fonksiyondaki sürekli azalmayla sinir ve iskelet kası hasarına neden olur. Mast hücreleri, nötrofiller, inflamatuvar sitokinler, nitrik oksit ve reaktif oksijen türleri iskelet kasında gözlenen nihai hasarda büyük olasılıkla rol oynarlar.<sup>51</sup>

Doku iskemi-reperfüzyonu, büyük oranda nötrofillerin neden olduğu inflamatuvar yolak vasıtasıyla lokal ve sistemik dokularda derin hasara yol açar. Dokuda hipoksinin bir sonucu olarak endotelial fonksiyon bozuklukları meydana gelir ve sonradan gelen reperfüzyonda sitokinler ve adhezyon moleküllerinin düzeyi yükselerek nötrofillerin kemotaksisine ve infiltrasyonuna yol açar. Nötrofil miyeloperoksidazı ve diğer enzimlerin oluşturduğu reaktif oksijen türleri ile hasarlı dokunun nekrozisi gerçekleşerek iskemik hasar yayılabilir.<sup>52</sup>

Yapılan çalışmalar, iskemi-reperfüzyon hasarında nötrofillerin anahtar rolünü doğrulamaktadır. İmmünolojik yöntemlerle nötrofillerin hemofiltrasyon ya da adhezyon yoluyla sayılarının azaltılması iskemi-reperfüzyon hasarını önemli ölçüde azaltır. Benzer şekilde, çeşitli iskemi-reperfüzyon modellerinde antioksidanların uygulanması nötrofil kaynaklı oksijen serbest radikallerinin neden olduğu hasarı azaltır.<sup>52</sup>

İskemi-reperfüzyon hasarları, dokulara ya da organlara giden kan akımının kesilmesi ve sonrasında kan akımının tekrardan sağlanmasıyla karakterizedir. Başlangıç iskemi periyodu, sırasıyla sinyal yollarını ve moleküler ekspresyonları değiştiren

moleküler değişimlere yol açar. İskemi süresince azalan ATP glikoliz tarafından sağlanır ve bu da laktik asit oluşumunda artışa yol açar ve pH düşer. Bu süreçte fosfolipaz A2, hücre membranındaki fosfolipidleri araşidonik asite dönüştürür ve bu da lökotrienlerin ve prostoglandinlerin biyosentezi için bir öncül olarak işlev görür. Polimorfonükleer lökositlerin aktivasyonu, eikosanoidler, sitokinler, reaktif oksijen türleri ve komplement ürünlerinin bu başlangıç fazıyla ilişkili olduğu pekçok grup tarafından gösterilmiştir. Bu ürünlerin intraselüler ve ekstraselüler birikimi nekrozis, apoptozis ve muhtemel otofaji ile ilgili homeostatik yolları başlatır.<sup>60</sup>

Oksijen düzeyindeki azalma, nötrofillerin endotelial hücelere yapışmasına neden olur. Reperfüzyon periyodunun bir özelliği, lökositlerin vasküler endotelyuma tutunmasındaki artışla karakterize olmasıdır. İskemi periyodu süresince, lökosit adhezyon moleküllerinin ekspresyonu P ve L selektin yoluyla vasküler endotelyuma sabitlenmesinin artmasını sağlar. Reperfüzyon süresince, lökosit birikimi post kapiller venüllerin permeabilitesinde ve toksik ürün depolanmasında önemli bir artışa neden olur.<sup>60</sup>

İskemi-reperfüzyon hasarındaki hasarın ana kaynağı, kan akımının tekrardan sağlanmasıyla başlayan oksidatif patlamanın neden olduğu oksidatif streştir. Bunun yanında, inflamatuvar cevabın gelişimi kadar polimorfonükleer lökositlerin neden olduğu oksidatif hasar da bulunmaktadır.<sup>62</sup>

İskelet kasında iskemi-reperfüzyon hasarının gelişimini açıklamak için farklı mekanizmalar ileri sürülmüştür. Süperoksit oluşumunun uyarılması ve nitrik oksit üretiminin azalmasının bu süreçte anahtar rol oynadığına inanılmaktadır. Reperfüzyon hasarında meydana gelen moleküler etkileşimlerin reaktif oksijen türlerinin oluşumu, lipid peroksidasyonu, eikosanoid oluşumu, nötrofil aktivasyonu, infiltrasyon, komplement aktivasyonu ve sitokin oluşumunu kapsadığı bilinmektedir. Hidroksil

radikali, süperoksit anyon radikali, singlet oksijen, hidrojen peroksit ve nitrik oksitten oluşan reaktif oksijen ürünleri aşırı bir biçimde oluşursa hücre hasara neden olabilir ve lipitlere, proteinlere, karbonhidratlara ve nükleik asitlere zarar verebilir.<sup>64</sup>

İskemi-reperfüzyon hasarı, mikrovasküler kanlanmanın kesilmesinden sonra lökosit ve endotelyum arasındaki etkileşim ve reaktif oksijen türlerinin salınımıyla ilişkili olan hücre apoptozisini içerir. Doğal antioksidanlar, insan vücudunu serbest radikallerden korur ve oksidatif stres ve ilişkili hastalıkları önler. Bu yüzden antioksidanlar insan sağlığında önemli role sahiptir. Son yıllarda, hasarın nedeninin serbest oksijen türevleri tarafından uyarılan nötrofiller, endotelyumda hasara neden olan bazı enzimler, sitokinler ve kapiller obstrüksiyon olduğu iddia edilmektedir. Bu yüzden, iskemi-reperfüzyon hasarından korunmak için antioksidan, antikoagülan, anti-inflamatuvar ve anti-apoptozis ajanlar tedavide denenmeye başlanmıştır.<sup>66</sup>

İskelet kasında iskemi-reperfüzyon hasarı, hastaların sakatlığı veya ölümü gibi istenilmeyen sonuçlar doğurabilen önemli bir klinik durumdur. Bu yüzden, bu patolojik durumu önlemede yeni ilaçlar geliştirebilmek için iskemi-reperfüzyon hasarından sorumlu mekanizmalara aydınlatmak önemlidir. İskelet kası iskemi-reperfüzyon hasarıyla ilgili kabul gören mekanizmalardan biri oksijen serbest radikallerinin neden olduğu hücre hasarıdır.<sup>11</sup>

İskemi-reperfüzyon hasarının bir diğer önemli mediatörü reaktif oksijen türlerinin aşırı bir biçimde oluşmasıdır. Hasarsız hücre sistemlerinde reaktif oksijen türleri ve antioksidan enzimler arasında bir denge vardır. Çünkü düşük düzeyde ROS normal vasküler fonksiyonun düzenlenmesinde gerekli bir bileşendir. İskemi sonrası oksijen zengin kanla reperfüzyon bu dengenin bozulmasına yol açar. Vasküler endotelyumda ve iskelet kası hücrelerindeki değişimlerin yanında nötrofil ve monositlerin sitokinlerle aktivasyonu aşırı ROS üretimine katkıda bulunur. Bunlar

arasında süperoksit, hidrojen peroksit, hidroksil radikali ve peroksinitritler bulunmaktadır ve bunların hepsi vasküler hücre hasarında işe karışır. İskemi-reperfüzyon hasarında, reaktif oksijen türlerinin çarpıcı aktivite mekanizmasını anlamının en iyi yolu belki de istilacı mikroorganizmaların fagositozunda kullanılan aktive edilmiş nötrofillerdeki oksidatif patlamadır. İskemi-reperfüzyon hasarı süresince meydana gelen nötrofilik degranülasyon da benzer şekilde iskelet kası miyositlerinin ölümüne yol açabilir. Aşırı ROS üretiminin diğer zararlı etkileri; vasküler tonusda değişimler, inflamasyonun ileri derecede artışı ve hatta endotelial hücre apoptozis ya da nekrozisinin indüksiyonunu içerir.<sup>67</sup>

Kan akımının yeniden sağlanması iskeminin geriye dönüşü için temeldir fakat bu durum şaşırtıcı bir biçimde doku hasarının daha da artmasına yol açar. İskemiden sonra, dokularda ksantin oksidaz birikimi olduğu görülmüştür. Bu enzim, son elektron alıcısı olarak bulunan moleküler oksijeni kullanır. Bu reaksiyon son derece kararsız olan singlet oksijen molekülünün oluşturur. Bu moleküllerin kullanılmasıyla gerçekleşen sekonder kimyasal reaksiyonlar süperoksit, hidrojen peroksit ve hidroksil radikali oluşturur. Reaktif oksijen türleri, özellikle hidroksil radikali fosfolipidlerle, proteinlerle ve nükleik asitlerle etkileşerek lipid peroksidasyonuna yol açar ve bunun sonucunda da membran bütünlüğü kaybolur. Post-iskemik endotelium süperoksit radikalinin ana kaynağıdır. Süperoksit radikali de dolaylı olarak hidroksil radikali üretiminden sorumludur. ROS üretiminin neden olduğu doku hasarı çeşitli savunma mekanizmalarını başlatabilir. İlk savunma mekanizması süperoksit dismutaz, katalaz ve glutatyon peroksidaz gibi antioksidanları içerir. Bu enzimler ROS'un daha az reaktif türlere dönüşümünü katalizler.<sup>10</sup>

Oksidatif stres, sağlıklı hücrelerde prooksidan / oksidan sistemin denge durumunda bir bozulma olarak tanımlanmaktadır. İskemi-reperfüzyon süresince

meydana gelen ROS'un kas hasarı oluşumunda büyük rol oynadığı ifade edilmiştir. İskelet kasının iskemi-reperfüzyonu süresince oluşan ROS, kas kontraksiyonunun zayıflaması, kas nekrozisi, endotelyal hücre şişmesi, hücrel proteinlerin salınımı ve proteinlerin mikrovasküler permeabilitesinin artması gibi olaylara neden olur. İskemi-reperfüzyon süresince cerebral veya kas hasarını azaltmada veya önlemede vitamin E, vitamin C, yeşil çay ekstraktı, melatonin, karbenoksolon ve propolis gibi besinlerin veya ajanların yararlı etkilerinin olduğunu gösteren çok sayıda çalışma bulunmaktadır. Oksijen serbest radikallerinden kaynaklanan hasar reperfüzyon sonrası iskelet kası gibi çok sayıda dokuda gösterilmiştir. Reperfüzyon iskemik dokuda aktive olmuş nötrofillerin birikmesine ve endotelyal hücrelerde ksantin oksidaz enziminin aktivasyonuna yol açarak toksik reaktif oksijen türlerinin üretimine bir artışa yol açar. Serbest radikallerin dokulardaki en önemli zararlı etkisi lipid peroksidasyonudur. Hücre membranı yağ asitleri ve fosfolidlerden oluşmuştur. Serbest oksijen radikalleri lipid peroksidasyonunu indükleyerek hücrel hasara neden olurlar ve fonksiyonel ve yapısal hücre değişimlerine yol açarlar. Lipid peroksidasyonunun bir ürünü olan malondialdehit, hücre membranındaki doymamış yağ asitlerinin aktif oksijen radikalleriyle tahrip edilmesi sonucu oluşur.<sup>3,10,14</sup>

Lipid peroksidasyonu hücrel hasarın önemli bir belirteçidir. Hücrel hasar membran lipidlerinin yıkımına yol açar ve onların lipid peroksitlerinin ve aldehit son ürünlerinin oluşmasına neden olur. Bu ürünler lipid peroksidatif hasarının oranı için bir indeks olarak kullanılabilir.<sup>5</sup>

Çalışmamızda iskemi-reperfüzyon grubunda malondialdehit düzeyinin kontrol grubuna göre anlamlı derecede yüksek olduğu tespit edilmiştir. Bu da bize lipidlerde bir bozulma olduğunu göstermektedir. Bu bulgu literatürdeki diğer çalışmalarla uyumludur.<sup>5,10,11</sup>

İskemi-reperfüzyon hasarının ana temeli, iskemi sonrası dokuya oksijenin tekrar sunulmasından sonra oksijen radikallerinin oluşması esasına dayanmaktadır. Nötrofil aktivasyonu bu süreçte merkezi bir rol oynar. Bu noktada çoğu araştırmacı süperoksit dismutaz ve ksantin oksidaz inhibitörleri gibi enzimatik süpürücüler ve mannitol, dimetil sülfoksit, dimetilüre ve demir şelatörleri gibi non-enzimatik süpürücüler alanına yoğunlaşmışlardır.<sup>5</sup>

Yaptığımız çalışmada kullandığımız leflunomid, anti-inflamatuvar ve immunomodülatör özelliklerinin yanında güçlü antioksidan özelliğe sahip olan bir ajandır. Leflunomid güçlü antioksidan özelliği sayesinde, iskemi reperfüzyon süresince oluşan serbest radikalleri ortamdan süpürerek lipidlerde hasar oluşumunu azaltmıştır. Jeffrey ve arkadaşları<sup>5</sup> yaptıkları çalışmada iki saatlik iskemi süresi sonrasında reperfüzyon süresine bağlı olarak MDA düzeyinin arttığını göstermişlerdir. Avcı ve arkadaşları<sup>10</sup> yaptıkları çalışmada, 4 saat iskemi ve iki saatlik reperfüzyon süresi sonrası MDA düzeyinde belirgin bir artış olduğunu tespit etmişlerdir. Yapılan başka bir turnike iskemi-reperfüzyon hasarı modelinde üç saat iskemi ve iki saat reperfüzyon süresi sonunda gastrokinemius kası MDA düzeyinde kontrol grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı bir artış olduğu tespit edilmiştir.<sup>11</sup>

Normal fizyolojik koşullarda,  $O_2^-$ ,  $H_2O_2$  ve  $OH^-$  biyokimyasal süreçlerde üretilen başlıca oksijen serbest radikalidir. Bununla birlikte onların düzeyi doğal antioksidan sistem tarafından hücrelerin canlılığını tehdit etmeyecek biçimde kolaylıkla korunur. Memeli dokuları doğal yapılarında büyük miktarda SOD enzimi ihtiva ederler ve bu enzim  $O_2^-$ 'i hızlı bir biçimde  $H_2O_2$ 'ye dönüştürür.  $H_2O_2$  de katalaz ve glutatyon peroksidaz tarafından  $H_2O$  ve  $O_2$ 'ye dönüştürülür. Diğer taraftan,  $H_2O_2$  demir ve bakır gibi geçiş metalleri tarafından  $OH^-$ 'e dönüştürülür. İskemi-reperfüzyon süresince

oksijen serbest radikallerinin aşırı üretimi bu endojen süpürücü antioksidanların azalmasını ve tükenmesini de beraberinde getirir.<sup>11</sup>

Çalışmamızda süperoksit dismutaz enzim aktivitesinin İR grubunda kontrol grubuna göre azalma gösterdiği tespit edildi. Altı saat iskemi ve dört saat reperfüzyonun uygulandığı alt ekstremite turnike modelinde süperoksit dismutaz aktivitesinin İR grubunda kontrol grubuna göre azaldığı tespit edilmiştir.<sup>35</sup> Dört saat iskemi ve iki saat reperfüzyonun uygulandığı başka bir alt ekstremite turnike iskemi modelinde süperoksit dismutaz enzim aktivitesinin kontrol grubuna göre anlamlı derecede azaldığı tespit edilmiştir.<sup>10</sup>

Aynı şekilde yaptığımız çalışmada katalaz enzim aktivitesinde İR grubunda kontrol grubuna göre azaldığı görüldü. Dört saat iskemi ve iki saat reperfüzyonun uygulandığı bir çalışmada katalaz aktivitesinin kontrol grubuna göre anlamlı derecede azaldığı tespit edilmiştir.<sup>10</sup> Yapılan başka bir çalışmada alt ekstremitelerine turnike yardımıyla üç saat iskemi ve iki saat reperfüzyon uygulanan sıçanların gastrokinemius kaslarında katalaz enzim aktivitesinin kontrol grubuna göre azaldığı tespit edilmiştir.<sup>11</sup> Çalışmamızda glutatyon peroksidaz enzim aktivitesinde İR grubunda kontrol grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı bir azalma olduğu tespit edilmiştir. Hidrojen peroksitin detoksifiye edilmesinde görev alan bu enzimin aktivitesindeki azalma iskemi-reperfüzyon süresince yoğun biçimde serbest oksijen radikali oluştuğunu göstermektedir.

Kas hasarının bir göstergesi olan ve çarpma, ağır egzersiz gibi durumlarda kandaki düzeyi artan kreatin kinaz enzimi düzeyinde yaptığımız çalışmada İR grubunda kontrol grubuna göre büyük artış olduğu tespit edilmiştir. Jeffrey ve arkadaşlarının<sup>5</sup> yaptıkları çalışmada iki saat iskemi ve iki saat reperfüzyon süresi sonunda kreatin kinaz düzeyinde kontrol grubuna göre dört kat bir artış olduğunu tespit etmişlerdir. Yapılan

başka bir çalışmada alt ekstremitelerine turnike yardımıyla dört saat iskemi, dört saat reperfüzyon uygulanan sıçanların serum keratin kinaz düzeylerinin kontrol grubuna göre önemli ölçüde artış gösterdiği tespit edilmiştir.<sup>14</sup>

İskemi sonrası dokularda oluşan hipoksik koşullarda hücreler enerji eldesi için anerobik metabolizmayı kullanırlar. Anerobik metabolizma sonrası dokularda laktik asit birikimi meydana gelir ve buna bağlı olarak serum laktat dehidrogenaz enzim düzeyinde bir artış meydana gelir. Laktat dehidrogenaz enzimi, anerobik metabolizma sonrası oluşan pirüvik asitin laktik aside dönüştüren reaksiyonu katalizler. Yaptığımız çalışmada İR grubu serum laktat dehidrogenaz enzim düzeyinin kontrol grubuna göre artış gösterdiği tespit edildi fakat bu artış istatistiksel olarak önemli değildi. Turnike yardımıyla dört saat iskemi ve dört saat reperfüzyonun gerçekleştirildiği bir çalışmada serum laktat dehidrogenaz enzim düzeyinin kontrol grubuna göre yüksek olduğu tespit edilmiştir.<sup>14</sup>

## 6. SONUÇ VE ÖNERİLER

Sonuç olarak turnike uygulaması sonucu meydana gelen iskemi ve bunu takip eden reperfüzyon iskelet kası dokusunda bir oksidatif stres tablosu oluşturmaktadır. Lipid peroksidasyonunun artması ve antioksidan enzim aktivitelerinde meydana gelen azalma, kas içine lökosit infiltrasyonu artışı bunu doğrulamaktadır. Leflunomid uygulaması ile lipid peroksidasyonda düşme, antioksidan enzim aktivitelerinde artma, kas içi lökosit infiltrasyonunda azalma meydana gelmiştir. Bu çalışmamızın bulguları, turnike kullanılan cerrahi müdahaleler öncesinde, örneğin iskemi-reperfüzyonun söz konusu olduğu alt ekstremitte ortopedik operasyonlarında, antioksidan kullanımının iskemi-reperfüzyona bağlı olarak ortaya çıkabilecek oksidatif kas hasarını azaltabileceği veya önleyebileceğini düşündürmüştür.

## KAYNAKLAR

1. Nehler MR. Diagnosis and treatment of acute limb ischemia. *Journal of Vascular Surgery*, 2007, 45: 5-67.
2. Hirose J, Yamaga M, Ide J, Tanoue M, Takagi M. Reduced ischemia-reperfusion injury in muscle. *Acta Orthopaedica Scandinavica*, 2007, 68: 369-373.
3. Ozyurt H, Ozyurt B, Koca K, Ozgocmen S. Caffeic acid phenethyl ester (CAPE) protects rat skeletal muscle against ischemia–reperfusion-induced oxidative stress. *Vascular Pharmacology*, 2007, 47: 108–112.
4. Tran TP, Tu H, Pipinos II, Muelleman RL, Albadavi H, Li YL. Tourniquet-induced acute ischemia–reperfusion injury in mouse skeletal muscles: Involvement of superoxide. *European Journal of Pharmacology*, 2011, 650: 328-334.
5. Prem JT, Eppinger M, Lemmon G, Miller S. The Role of Glutamine in Skeletal Muscle Ischemia/Reperfusion Injury in the Rat Hind Limb Model. *The American Journal of Surgery*, 1999, 178: 148-8.
6. Kadambi A, Skalak TC. Role of leukocytes and tissue-derived oxidants in short-term skeletal muscle ischemia-reperfusion injury. *Heart and Circulatory Physiology*, 2000, 278: 435–443.
7. Woodruff TM, Arumugam TV, Shiels IA, Reid RC. Protective Effects of a Potent C5a Receptor Antagonist on Experimental Acute Limb Ischemia-Reperfusion in Rats. *Journal of Surgical Research*, 2004, 116: 81–90.
8. Andrade-Silva AR, Ramalho FS, Ramalho LNZ. Effect of NF\_Β Inhibition by CAPE on Skeletal Muscle Ischemia-Reperfusion Injury. *Journal of Surgical Research*, 2009, 153: 254–262.

9. Homer-Vanniasinkam S, Rowlands TE, Hardy SC, Gough MJ. Skeletal Muscle Ischaemia-reperfusion Injury: Further Characterisation of a Rodent Model. *European Journal of Vascular and Endovascular Surgery*, 2001, 22: 523–527.
10. Avci G, Kadioglu H, Sehirli AO, Bozkurt S. Curcumin Protects Against Ischemia/Reperfusion Injury in Rat Skeletal Muscle. *Journal of Surgical Research*, 2011, 10: 1–8.
11. Atahan E, Ergun Y, Kurutas EB, Cetinus E, Ergun UG. Ischemia-Reperfusion Injury in Rat Skeletal Muscle is Attenuated by Zinc Aspartate. *Journal of Surgical Research*, 2007, 137: 109–116.
12. Chen HY, Hung YC, Lee EJ, Chen TY. The protective efficacy of magnolol in hind limb ischemia-reperfusion injury. *Phytomedicine*, 2009, 16: 976–981.
13. Yavuz C, Çakır Ö, Göz M, Kale E, Uzunlar AK. Effects Of Sodium Nitroprusside On Ischemia-Reperfusion Injury. *European Journal of Medical Genetics*, 2010, 7: 76-80.
14. Ozkan F, Senayli Y, Ozyurt H, Erkorkmaz U, Bostan B. Antioxidant Effects of Propofol on Tourniquet-Induced Ischemia-Reperfusion Injury: An Experimental Study. *Journal of Surgical Research*, 2011, 16: 1–7.
15. Karaman A, Fadillioglu E, Turkmen E, Tas E. Protective effect of leflunomide against ischemia-reperfusion injury of the rat liver. *Pediatric Surgery International*, 2006, 22: 428-434.
16. Karaman A, Turkmen E, Gursul C, Tas E, Fadillioglu E. Prevention of renal ischemia/reperfusion-induced injury in rats by leflunomide. *International Journal of Urology*, 2006, 13: 1434-1441.
17. Yildiz Y, Kose H, Cecen S, Ergin K, Demir EM, Serter M. Protective effect of leflunomide on intestinal ischemia-reperfusion injury. *Digestive Diseases and Sciences*, 2010, 55: 245-252.

18. Gimenez J, Puig P. Pharmacologically induced ischemia-reperfusion syndrome in the rat small intestine. *Journal of Surgical Research*, 2011, 168: 34-41.
19. Ergun Y, Oksuz H, Atli Y, Kılınc M, Darendeli S. Ischemia-reperfusion injury in skeletal muscle: comparison of the effects of subanesthetic doses of ketamine, propofol and etomidate. *Journal of Surgical Research*, 2010, 159: 1-10.
20. Khanna A, Cowled PA, Fitridge RA. Nitric oxide and skeletal muscle reperfusion injury: current controversies. *Journal of Surgical Research*, 2005, 128: 98-107.
21. Tapuria N, Kumar Y, Habib MM, Amara MA, Seifalian AM, Davidson BR. Remote ischemic preconditioning: A novel protective method from ischemia reperfusion injury. *Journal of Surgical Research*, 2008, 150: 304-330.
22. Nematollahi S, Nematbakhsh M, Haghjooyjavanmard S, Khazaei M, Salehi M. Inducible nitric oxide synthase modulates angiogenesis in ischemic hindlimb of rat. *Biomedical papers of the Medical Faculty of the University Palacky*, 2009, 153: 125-130.
23. Seekamp A, Mulligan MS, Till GO, Ward PA. Requirement for neutrophil products and L-arginine in ischemia-reperfusion injury. *American Journal of Pathology*, 1993, 124: 1217-1226.
24. Erdem M, Bostan B, Güneş T, Özkan F, Şen C, Özyurt H, Köseoğlu RD, Erdoğan H. Melatoninin iskelet kası iskemi-reperfüzyon yaralanması üzerine koruyucu etkisi. *Eklemler Hastalıkları ve Cerrahisi*, 2010, 21: 166-171.
25. Lee KR, Cronenwett JL, Schlafer M, Corpron C, Zelenock GB. Effect of superoxide dismutase plus catalase on  $Ca^{2+}$  transport in ischemic and reperfused skeletal muscle. *Journal of Surgical Research*, 1987, 42: 24-32.

26. Cunha MS, Silva JCF, Nakamoto HA, Ferreira MC. Study of warm ischemia followed by reperfusion on a lower limb model in rats: Effect of allopurinol and streptokinase. *Clinics*, 2005, 60: 213-220.
27. Cuzzocrea S, Riley DP, Caputi AP, Salvemini D. Antioxidant therapy: A new pharmacological approach in shock, inflammation, and ischemia / reperfusion injury. *Pharmacological Reviews*, 2001, 53: 135-159.
28. Belkin M, LaMorte WL, Wright JG, Hobson RW. The role of leukocytes in the pathophysiology of skeletal muscle ischemic injury. *Journal of Vascular Surgery*, 1989, 10: 14-19.
29. Zweier JL, Talukder H. The role of oxidant and free radicals in reperfusion injury. *Cardiovascular Research*, 2006, 70: 181-190.
30. Appell HJ, Glöser S, Soares JMC, Duarte JA. Structural alteration of skeletal muscle induced by ischemia and reperfusion. *Basic and Applied Myology*, 1999, 9: 263-268.
31. Margaritis EV, Yanni AE, Agrogiannis G, Liarakos N, Pantopoulou A, Vlachos I, Papachristodoulou A, Korkolopoulou P, Patsouris E, Kostakis M, Perrea DN, Kostakis A. Effect of oral administration of L-arginine, L-NAME and allopurinol on intestinal ischemia / reperfusion injury in rats. *Life Sciences*, 2011, 88: 1070-1076.
32. Walker PM. Ischemia / reperfusion injury in skeletal muscle. *Annals of Vascular Surgery*, 1991, 5: 399-402.
33. Liu Y, Steinacker JM. Changes in skeletal muscle heat shock proteins: Pathological significance. *Frontiers in Bioscience*, 2001, 6: 12-25.
34. Blaisdell FW. The pathophysiology of skeletal muscle ischemia and the reperfusion syndrome: a review. *Cardiovascular Surgery*, 2002, 10: 620-630.

35. Kanko M, Maral H, Akbas MH, Ozden M, Bulbul S, Omay O, Yavuz S, Berki KT. Protective effect of clopidogrel on oxidant damage in a rat model of acute ischemia. *Tohoku Journal of Experimental Medicine*, 2005, 205: 133-139.
36. Charles AL, Guilbert AS, Bouitbir J, Goette P, Enache I, Zoll J, Piquard F, Geny B. Effect of postconditioning on mitochondrial dysfunction in experimental aortic cross-clamping. *British Journal of Surgery*, 2010, 10: 73-84.
37. Thaveau F, Zoll J, Rouyer O, Chafke N, Kretz JG, Piquard F, Geny B. Ischemic preconditioning specifically restores complexes I and II activities of the mitochondrial respiratory chain in ischemic skeletal muscle. *Journal of Vascular Surgery*, 2007, 16: 541-547.
38. Ruiz M, Garcia D. Pathophysiology of ischemia-reperfusion injury: New therapeutic options for acute myocardial infarction. *Revista Espanola de Cardiologia*, 2009, 62: 199-209.
39. Skyschally A, Schulz R, Heusch G. Pathophysiology of myocardial infarction. *Herz*, 2008, 33: 88-100.
40. Monassier JP. Reperfusion injury in acute myocardial infarction. *Archives of Cardiovascular Disease*, 2008, 101: 491-500.
41. Aycan İÖ, Ayhan B, Uzun Ş, Sarıcaoğlu F, Atay ÖA, Doral MN, Kılınç K, Aypar Ü. Siyatik-femoral sinir bloğu ile spinal anestezinin, turnikeye bağlı gelişen iskemi-reperfüzyon hasarı üzerindeki etkileri. *Türk Anesteziyoloji ve Reanimasyon Derneği Dergisi*, 2010, 38: 331-338.
42. Bulkley GB. Free radical-mediated reperfusion injury: A selective review. *British Journal of Cancer*, 1987, 55: 66-73.
43. Erkut B, Özyazıcıoğlu A, Karapolat BS, Koçoğulları CU, Keles S, Ateş A, Gundogdu C, Kocak H. Effect of ascorbic acid, alpha-tocopherol and allopurinol on

- ischemia-reperfusion injury in rabbit skeletal muscle: An experimental study. *Drug Target Insights*, 2007, 2: 249-258.
44. Siemionow M, Arslan M. Ischemia / reperfusion injury: A review in relation to free tissue transfers. *Wiley InterScience*, 2004, 10: 468-475.
45. Weiser MR, Williams JP, Moore FD, Kobzik L, Ma M, Hechtman HB, Carrol MC. Reperfusion injury of ischemic skeletal muscle is mediated by natural antibody and complement. *The Journal of Experimental Medicine*. 1996, 183: 2343-2348.
46. Padilla AM, Padilla JM. Lung preservation: Current practices. *Archivos de Bronconeumologia*, 2004, 40: 86-93.
47. Aydoğdu N, Kaymak K, Yalçın Ö. Sıçanlarda böbrek iskemi / reperfüzyon hasarında n-asetilsisteinin etkileri. *Fırat Tıp Dergisi*, 2005, 10: 151-155.
48. Dilek I, Baysefer A, Gezen F, Çıkkatekerlioğlu Ö, Kayalı H, Şirin S. The protective effect of allopurinol on neural tissue on regional cerebral ischemia: An experimental study on rats. *Turkish Neurosurgery*, 1995, 5: 39-44.
49. Toklu H, Deniz M, Yüksel M, Keyer M, Şener G. The protective effect of melatonin and amlodipine against cerebral ischemia / reperfusion-induced oxidative brain injury in rats. *Marmara Medical Journal*, 2009, 22: 34-44.
50. Wang WZ, Baynosa RC, Zamboni WA. Therapeutic interventions against reperfusion injury in skeletal muscle. *Journal of Surgical Research*, 2011, 171: 175-182.
51. Wignaud A, Hourde C, Medja F, Agbulut O, Butler G, Ferry A. Impaired skeletal muscle repair after ischemia-reperfusion injury in mice. *Journal of Biomedicine and Biotechnology*, 2010, 10: 1155-1165.

52. Kearns SR, Moneley D, Murray P, Kelly C, Daly AF. Oral vitamin C attenuates acute ischemia-reperfusion injury in skeletal muscle. *The Journal of Bone and Joint Surgery*, 2001, 83: 1202-1206.
53. Lindsay TF, Liauw S, Romaschin AD, Walker PM. The effect of ischemia / reperfusion on adenine nucleotide metabolism and xanthine oxidase production in skeletal muscle. *Journal of Vascular Surgery*, 1990, 12: 8-15.
54. Kauvar DS, Baer DG, Walters TJ. Influence of systemic hypotension on skeletal muscle ischemia-reperfusion injury after 4-hour tourniquet application. *Journal of Surgical Education*, 2007, 64: 273-277.
55. Sternbergh WC, Adelman B. The temporal relationship between endothelial cell dysfunction and skeletal muscle damage after ischemia and reperfusion. *Journal of Vascular Surgery*, 1992, 16: 30-39.
56. Dillon JP, Laing AJ, Chandler JRS, Wang JH, McGuinness A, Redmond HP. *Acta Orthopaedica*, 2006, 77: 27-32.
57. McAllister SE, Moses MA, Jindal K, Ashrafpour H, Cahoon NJ, Huang N, Neligan PC, Forrest CR, Lipa JE, Pang CY.  $\text{Na}^+ / \text{H}^+$  exchange inhibitor cariporide attenuates skeletal muscle infarction when administered before ischemia or reperfusion. *Journal of Applied Physiology*, 2009, 106: 20-28.
58. Gillani S, Cao J, Suzuki T, Hak DJ. The effect of ischemia reperfusion injury on skeletal muscle. *International Journal of The Care of Injured*, 2012, 43: 670-675.
59. Patel R, Albadawi H, Steudel W, Hashmi FF, Kang J, Yoo HJ, Watkins MT. Inhalation of carbon monoxide reduces skeletal muscle injury after hind limb ischemia-reperfusion injury in mice. *The American Journal of Surgery*, 2012, 203: 488-495.
60. Gorsuch WB, Chrysanthou E, Schwaeble WJ, Stahl GL. The complement system in ischemia-reperfusion injuries. *Immunobiology*, 2012, 217: 1026-1033.

61. Cowled PA, Khanna A, Laws PE, Field JBF, Varelias A, Fitridge RA. Statins inhibit neutrophil infiltration in skeletal muscle reperfusion injury. *Journal of Surgical Research*, 2007, 141: 267-276.
62. Ritenour AE, Christy RJ, Roe JL, Baer DG, Dubick MA, Wade CE, Holcomb JB, Walters TJ. The effect of a hypobaric, hypoxic, environment on acute skeletal muscle edema after ischemia-reperfusion injury in rats. *Journal of Surgical Research*, 2010, 160: 253-259.
63. Troitzsch D, Vogt S, Abdulkhalig H, Moosdorf R. Muscle tissue oxygen tension and oxidative metabolism during ischemia and reperfusion. *Journal of Surgical Research*, 2005, 128: 9-14.
64. Haidong L, Fang Y, Zhihong T, Huanwei S, Tiehui Z. Use of combinations of gum arabic, maltodextrin and soybean protein to microencapsulate ginkgo leaf extracts and its inhibitory effect on skeletal muscle injury. *Carbohydrate Polymers*, 2012, 88: 435-440.
65. Wang WZ, Fang XH, Stephenson LL, Zhang X, Khiabani KT, Zamboni WA. Melatonin attenuates I/R-induced mitochondrial dysfunction in skeletal muscle. *Journal of Surgical Research*, 2011, 171: 108-113.
66. Akdemir O, Hede Y, Zhang F, Lineaweaver WC, Arslan Z, Songur E. Effect of taurine on reperfusion injury. *An International Journal of Surgical Reconstruction*, 2011, 64: 921-928.
67. Eliason JL, Wakefield TW. Metabolic consequences of acute limb ischemia and their clinical implications. *Seminars in Vascular Surgery*, 2009, 10: 29-33.
68. Yao H, Li J, Chen J, Xu S. Inhibitor effect of leflunomide on hepatic fibrosis induced by CCl<sub>4</sub> in rats. *Acta Pharmacologica Sinica*, 2004, 25: 915-920.

69. Kutluana U, Oruc N, Nart D, Kaptanoglu B, Yonetcı N, Ozutemiz O. Leflunomide is a new oral agent in treatment of acute pancreatitis. *Pancreas*, 2010, 39: 237-242.
70. Holders B. Leflunomide. *United Kingdom Drug Information Pharmacists Group*, 2000, 4: 1-6.
71. Breedveld FC, Dayer JM. Leflunomide: mode of action in the treatment of rheumatoid arthritis. *Annals of the Rheumatic Diseases*, 2000, 59: 841-849.
72. Chong SF, Huang W, Liu W, Luo J, Shen J, Xu W, Ma L, Blinder L, Xiao F, Xu X, Clardy C, Foster P, Williams JA. In vivo activity of leflunomide. *Transplantation*, 1999, 68: 100-109.
73. Aebi H. Catalase. *Methods of Enzymatic Analysis*, 1974, 10: 673-677.
74. Sun Y, Oberley LW, Li Y. A simple method for clinical assay of superoxide dismutase. *Clinical Chemistry*, 1988, 34: 497-500.
75. Paglia DE, Valentine WN. Studies on the quantitative and qualitative characterization of erythrocyte glutathione peroxidase. *Journal of Laboratory and Clinical Medicine*, 1967, 70: 158-169.
76. Esterbauer H, Cheeseman KH. Determination of aldehydic lipid peroxidation products: Malonaldehyde and 4-hydroxynonenal. *Methods in Enzymology*, 1990, 186: 407-421.
77. Lowry OH, Rosebrough NJ, Farr AL, Randall RJ. Protein measurement with the folin phenol reagent. *The Journal of Biological Chemistry*, 1951, 183: 265-275.
78. Walden DL, McCutchan HJ, Enquist EG, Schwappach JR, Shanley PF, Reiss OK, Terada LS, Leff JA, Repine JE. Neutrophils accumulate and contribute to skeletal muscle dysfunction after ischemia-reperfusion. *American Journal of Physiology*, 1990, 259: 1809-1812.

79. Tiidus PM, Holden D, Bombardier E, Zajchowski S, Enns D, Belcastro A. Estrogen effect on post-exercise skeletal muscle neutrophil infiltration and calpain activity. *Canadian Journal of Physiology and Pharmacology*, 2001, 79: 400-406.

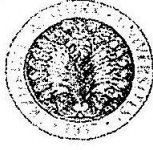
## EKLER

### EK-1. ÖZGEÇMİŞ

<b>KİŞİSEL BİLGİLER</b>	
Adı Soyadı	Cebrail GÜRSUL
Doğum Tarihi	18.08.1979
Doğum Yeri	Malatya
Medeni Hali	Evli
Uyruğu	T.C.
Adres	Erzincan Üniversitesi Tıp Fakültesi Fizyoloji ABD 24100 ERZİNCAN
Tel	0539 607 88 65 -0446 226 18 18
Fax	0446 226 18 19
Email	cebrailgursul@yahoo.com
<b>EĞİTİM</b>	
Lise	Malatya Lisesi (1997)
Lisans	İnönü Üniversitesi Fen Edebiyat Fakültesi (1998-2002)
Yüksek Lisans	İnönü Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Fizyoloji AD (2004-2006)
Doktora	Atatürk Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Fizyoloji AD (2009-2012)
<b>YABANCI DİL BİLGİSİ</b>	
İngilizce	(ÜDS:63,75 2007 Sonbahar)

## **EK-2. ETİK KURUL ONAY FORMU**

Bu çalışma, Atatürk Üniversitesi Rektörlüğü Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu'nun 24.02.2012 tarih ve 15 sayılı yazısında belirtilen Etik Kurul Raporunun 6 nolu kararı ile onaylandı.



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



Sayı : B.30.2.ATA.0.23.85-15  
Konu : Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurul Kararı.

24.02.2012  
ERZURUM

ATATÜRK ÜNİVERSİTESİ  
TIP FAKÜLTESİ DEKANLIĞINA

25240 – Kampus / ERZURUM

İlgi : 10.02.2012 tarih ve B.30.2.ATA.0.01.02/674 sayılı yazı.

İlgide kayıtlı yazıda belirtildiği üzere, Fakülteniz Fizyoloji Anabilim Dalı öğretim üyesi Prof.Dr.Mustafa GÜL'ün yürütücülüğünde, Atatürk Üniversitesi Tıp Fakültesi Dekanlığının Fizyoloji Anabilim Dalı Laboratuvarlarında yürütülecek olan "Sıçanlarda Deneysel Oluşturulan Alt Ekstremitte İskemi-Reperfüzyon Hasarında Leflunomid'in Koruyucu Etkinliği" başlıklı araştırma çalışması, Atatürk Üniversitesi Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulumuzun 24.02.2012 tarih ve 2 sayılı Oturumunda Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu Başvuru Formu ve ekli belgeleri, gerekçe, amaç, yaklaşım ve yöntemler dikkate alınarak incelenmiş ve aşağıya çıkarılan 6 no'lu kararı ile sözkonusu araştırma çalışmasının yürütülmesinin etik kurallarına uygun olduğuna mevcudun oy birliğiyle karar verilmiştir.

Bilgilerinizi ve gereğini arz ederim.

Prof. Dr. Mustafa ATASEVER  
Başkan

*28 Ocak 2012*

*Prof. Dr. Cemal GÜNDÜZÜ*  
Dekanlık Yazı İşleri

ATATÜRK ÜNİVERSİTESİ	
TIP FAKÜLTESİ DEKANLIĞI	
Kayıt No	941
Tarih	27.02.2012
Dosya No	

Toplantı Tarihi : 24.02.2012

Toplantı Sayısı : 2

**KARAR NO : 6-** Atatürk Üniversitesi Tıp Fakültesi Dekanlığı, Fizyoloji Anabilim Dalı öğretim üyesi Prof.Dr.Mustafa GÜL'ün yürütücülüğünde, Atatürk Üniversitesi Tıp Fakültesi Dekanlığının Fizyoloji Anabilim Dalı Laboratuvarlarında yürütülecek olan "Sıçanlarda Deneysel Oluşturulan Alt Ekstremitte İskemi-Reperfüzyon Hasarında Leflunomid'in Koruyucu Etkinliği" başlıklı araştırma çalışması ile ilgili Tıp Fakültesi Dekanlığının 10.02.2012 tarih ve B.30.2.ATA.0.01.02/674 sayılı yazıları ile ekleri görüşüldü.

Yapılan görüşmelerden sonra; adı geçen araştırma çalışmasının yürütülmesinin, etik kurallarına uygun olduğunun, mevcut oy birliği ile kabulüne; karar verildi.

Adres : Atatürk Üniversitesi Veteriner Fakültesi Dekanlığı. 25240 – Kampus/ERZURUM

Telefon : 0-442-236 08 80

Fax : 0-442-236 08 81

e-mail: hadyek@atauni.edu.tr