

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

**RAT İSKELET KASINDA İSKEMİ-REPERFÜZYON
HASARINDA FUROSEMİD'İN İN-VİVO
ANTİOKSİDAN ETKİNLİĞİNİN ARAŞTIRILMASI**

**UZMANLIK TEZİ
Dr. SEMİH YAYLI**

**TEZ DANIŞMANI
Doç. Dr. ABDULLAH ÖZER**

**YARDIMCI TEZ DANIŞMANI
Uzm. Dr. SERCAN TAK**

**ANKARA
EYLÜL 2022**

İÇİNDEKİLER

İÇİNDEKİLER	i
SİMGELER VE KISALTMALAR	ii
ŞEKİL, TABLO, GRAFİK VE RESİMLER	iii
1.GİRİŞ	1
2.GENEL BİLGİLER	3
2.1 Alt Ekstremitte Periferik Arter Hastalığı	3
2.1.1.Epidemiyoloji	3
2.1.2 Risk Faktörleri	4
2.1.3 Prognoz	6
2.1.4 Tanısal Çalışmalar	6
2.1.5 Tedavi	10
2.2 İskemi-Reperfüzyon (I/R) Hasarı	16
2.2.1 Hücre İçi Kalsiyum Birikimi	19
2.2.2 Reaktif Oksijen Türleri (ROS)/ Reaktif Nitrojen Türleri (RNS)	22
2.2.3 Organel Hasarı	27
2.2.4 Proteaz Aktivasyonu	30
2.2.5 Epigenetik Değişiklikler	31
2.2.6 İnflamatuar Cevap	31
2.2.7 Hücre ölüm mekanizmaları	38
2.2.8 Uzak Organ Hasarı	40
2.2.9 No-Reflow Fenomeni	41
2.3 Antioksidan Savunma Sistemi	42
2.3.1 Enzimatik antioksidan sistem	42
2.3.2 Non-enzimatik antioksidan sistemi	43
2.4 Furosemid	44
3.GEREÇ VE YÖNTEM	45
3.1 Gereç	45
3.1.1 Deney Hayvanları	45
3.1.2 Etik Beyanı	45
3.1.3 Deneyin Tasarımı	45
3.1.4 İlaç Pozolojisi	46

3.1.5 Atravmatik bulldog klemp	46
3.2 Yöntem.....	47
3.2.1 Deneysel iskemi-reperfüzyon hasarı oluşturulması	47
3.2.2 Kan örnekleme ve serum hazırlanması	51
3.2.3 Doku örnekleme	51
3.2.4 TNF α ölçümü.....	51
3.2.5 Lipid peroksidasyonu ölçümü	52
3.2.6 Glutasyon-S-Transferaz (GST) seviyesi ölçümü.....	52
3.2.7 Katalaz (CAT) aktivitesi ölçümü	53
3.2.8 Histopatolojik değerlendirme.....	53
3.2.9 İstatistiksel analiz.....	55
4. BULGULAR.....	56
4.1 Biyokimyasal Bulgular	56
4.2 Histopatolojik Bulgular	60
4.2.1 Grup 1: SHAM Kontrol	60
4.2.2 Grup 2: İskemi Reperfüzyon Grubu-IR.....	61
4.2.3 Grup 3: Furosemid Grubu	63
4.2.4 Grup 4: İskemi Reperfüzyon ve Furosemid Uygulanan Grup-IR+F	64
5. TARTIŞMA	69
6.SONUÇ	72
7. ÖZET.....	73
Anahtar kelimeler: iskemi-reperfüzyo hasarı, furosemid, antioksidan	74
8. SUMMARY.....	75
9. KAYNAKLAR.....	77

SİMGELER VE KISALTMALAR

AKİ : Ayak bileği-kol indeksi

CAT	: Katalaz
ER	: Endoplazmik retikulum
GPX	: Glutasyon peroksidaz
GR	: Glutasyon redüktaz
GSH	: Redükte glutasyon
GSSG	: Okside glutasyon
GST	: Glutasyon-S-transferaz
I/R	: İskemi-reperfüzyon
IL 1β	: İnterlökin 1 beta
KETİ	: Kronik ekstremitte tehdit edici iskemi
MPO	: Myeloperoksidaz
NOS	: Nitrik oksit sentaz
NOX	: NADPH oksidaz
PAH	: Periferik arter hastalığı
RNS	: Reaktif nitrojen türleri
ROS	: Reaktif oksijen türleri
SOD	: Süperoksit dismutaz
TNFα	: Tümör nekrozis faktör alfa

ŞEKİL, TABLO, GRAFİK VE RESİMLER

Şekil 1: İskemi-reperfüzyon hasarından sorumlu mekanizmalar

Şekil 2: I/R sırasında oluşan hücre içi iyon değişiklikleri ve sonuçları

Şekil 3: ROS ve RNS oluşumunda major yollar

Şekil 4: Ksantin oksidazın katalizlediği reaksiyon

Şekil 5: NADPH oksidazın katalizlediği reaksiyon ile başlayan respiratuar burst

Şekil 6: sit p450 oksidaz ürünleri

Şekil 7: Eşlenmemiş NOS sonucunda süperoksit anyonu oluşumu

Şekil 8: ETS sırasında aktarılan elektronların sistemin dışına sızarak oksijenle etkileşmesi ve süperoksit anyonu oluşturması

Şekil 9: RNS oluşumu ve hücredeki sonuçları

Şekil 10: ER stres cevabı olarak aktive olan UPR sistemi

Şekil 11: I/R hasarında mitokondriyal değişiklikler ve sonuçları

Şekil 12: I/R hasarında humoral mekanizmalar

Şekil 13: I/R hasarında endotel disfonksiyonu mekanizmaları

Şekil 14: I/R hasarında geç dönem hasardan sorumlu nötrofillerin aktive olarak dokuya göçü

Şekil 15: I/R hasarında hücre ölüm mekanizmaları

Şekil 16: Enzimatik ve enzimatik olmayan antioksidan sistemi

Tablo 1: AKİ ve TBI değerlerine göre klinik yorum

Tablo 2: 2016 AHA/ACC klavuzuna göre PAH hastalarında medikasyon önerileri

Tablo 3: Wifl sınıflaması

Tablo 4: Wifl sınıflamasına göre klinik evreleme

Tablo 5: Klinik evrelemeye göre 1 yıllık major amputasyon oranı

Tablo 6: GLASS sınıflaması

Tablo 7: GLASS sınıflamasına göre klinik skora

Tablo 8: Gruplar arası biyokimyasal sonuçların karşılaştırılması

Tablo 9: Histopatolojik skora sistemi sonuçları

Grafik 1: Gruplar arası katalaz düzeyi dağılımı

Grafik 2: Gruplar arası GST düzeyi dağılımı

Grafik 3: Gruplar arası MDA düzeyleri dağılımı

Grafik 4: Gruplar arası ödem düzeyi dağılımı

Grafik 5: Gruplar arası nötrofil infiltrasyonu düzeyi dağılımı

Grafik 6: Gruplar arası miyosit hasar düzeyi dağılımı

Grafik 7: Gruplar arası hemoraji düzeyi dağılımı

Resim 1 : Metal (a) ve disposable (b) atravmatik bulldog klemp

Resim 2-A: Laparotomi sonrası inferior vena cava (beyaz ok) ve abdominal aortanın (gri ok) bulunması

Resim 2-B: Abdominal aortaya bulldog klemp yerleştirilerek iskemi periyodunun başlatılması

Resim 3-1, 2: Sham grubunun ışık mikroskopisi görüntüleri

Resim 4-1, 2, 3: IR grubunun ışık mikroskopisi görüntüleri

Resim 5-1, 2: Furosemid grubunun ışık mikroskopisi görüntüleri

Resim 6-1, 2: IR+F grubunun ışık mikroskopisi görüntüleri

1.GİRİŞ

Alt ekstremitte periferik arter hastalığı dünya çapında 202 milyon erişkini etkilemektedir. Periferik arter cerrahisindeki gelişmeler sonucunda amputasyona gidebilecek birçok periferik arter hastası cerrahi revaskülarizasyon şansını kazanmaktadır. Fakat bu, giderek artan sıklıkta karşılaşılan bir klinik antiteye yol açmaktadır: İskemi reperfüzyon hasarı. İskemi reperfüzyon hasarı akut tromboembolik hadiseler, aterosklerotik plak komplikasyonu, hiperkoagülabilité, hiperviskozite gibi çeşitli etiyolojiler ile doku kan akımının ileri derecede azalması sonrası embolektomi, trombolitik uygulaması, kateter aracılı girişimler, periferik by-pass cerrahisi gibi tekniklerle doku kan akımının restorasyonu sonrası ortaya çıkan reaktif oksijen türlerinin lokal ve sistemik doku hasarına yol açmasıdır. Reaktif oksijen türlerinin lokal komplikasyonları; kompartman sendromuna gidebilecek doku ödemi gelişmesi, immün aracılı artan doku hasarı sonucu gelişen ve ekstremitte kaybına gidebilen doku nekrozu-rabdomiyoliz gelişmesi iken sistemik komplikasyonları; asidoz, hiperkalemi, hiperkalsemi, böbrek yetmezliği, karaciğer yetmezliği, pulmoner ödem, aritmi ve kardiyak arrest şeklinde multiorgan yetmezliği olmaktadır. Reperfüzyon sonrası dokulardaki ksantin oksidaz, NADPH oksidaz, mitokondride elektron transport sistemi ve nitrik oksit sentaz enzim aktiviteleri sonucu oluşan superoksit anyonu, hidrojen peroksit, peroksinitrit gibi reaktif oksijen türleri ve bunların tetiklediği lokal ve sistemik inflamatuvar cevap doku hasarında sorumlu tutulmakta ve yapılan araştırmalarda bu sistemler hedef alınarak tedavi modaliteleri oluşturulmaya çalışılmaktadır. İskemi-reperfüzyon hasarının mekanizmasının açıklanması ve

olası terapötik seçeneklerin değerlendirilmesi açısından deneysel hayvan modellerinin oluşturulması önem arz etmektedir. Furosemid, klinikte kalp yetmezliği, böbrek yetmezliği, pulmoner ödem gibi hastalıklarda uzun süredir yaygın olarak kullanılan bir diüretik olup, daha önce in-vitro yapılan çalışmalarda doku kültüründe, in-vivo olarak yapılan çalışmalarda ise ratlarda böbrek ve kalp dokusunda iskemi-reperfüzyon hasarını önleyici antioksidan etkinliği gösterilmiştir. Bu tez çalışmasında, Furosemid(LASIX®-Sanofi aventis Ltd.Şti.) isimli ilacın rat iskelet kasında iskemi-reperfüzyon hasarına karşı koruyucu etkisi araştırılmıştır.

2.GENEL BİLGİLER

2.1 Alt Ekstremitte Periferik Arter Hastalığı

2.1.1.Epidemiyoloji

Alt ekstremitte periferik arter hastalığı (PAH), aortoiliak segment ve pedal arterler arasındaki dolaşımın aterosklerotik zeminde darlığı-tıkanıklığı olarak ifade edilmektedir (1). Dünya genelinde 202 milyon insan alt ekstremitte periferik arter hastalığından etkilenmektedir (2). Genellikle 50 yaşın üzerinde ortaya çıkan bu hastalığın görülme sıklığı 65 yaşın üzerinde hızlı artış göstermektedir (2). Yüksek gelir düzeyli ülkelerde erkeklerde daha sık görülürken, orta ve düşük gelir düzeyli ülkelerde kadınlarda daha sık görülmektedir (2). Almanya’ da yapılan, 65 yaş üstü 6880 kişinin katıldığı bir kohort çalışmasında alt ekstremitte periferik arter hastalığı oranı %18 olarak bildirilmiştir (3). Periferik arter hastalığı ile ilgili ülkemiz kaynaklı veriler sınırlıdır, İzmir’de 45 yaş üstü 250 kişide yapılan taramada periferik arter hastalığı prevalansı %17.6 olarak bildirilmiştir (4).

2.1.1.a Kronik ekstremitte tehdit edici iskemi (KETİ)/Amputasyon

Daha önce kritik bacak iskemisi olarak tarif edilen bu tablo; kronik zeminde oluşan aterosklerotik darlığın ilerlemesi ile birlikte istirahat ağrısı, iyileşmeyen yara veya doku kaybı şeklinde kendini gösteren klinik durumdur (5). Kronik ekstremitte tehdit edici iskemi prevalansı %0,4 olarak bildirilmiş, diyabetik hastalarda bu oranın daha yüksek olduğu belirtilmiştir (6). Amputasyon sıklığı yılda 1 milyon kişide 120-500 arası olduğu, diz üstü ve diz altı eşit dağılım olduğu bildirilmiştir (6).

2.1.1.b Akut alt ekstremitte iskemisi

Periferik arter hastalığı seyri sırasında görülebilen akut alt ekstremitte iskemisi, bacağı giden kan akımında ani olarak gelişen azalma sonucu ekstremitede solukluk, soğukluk, siyanoz parestezi ve paralizisi şeklinde kendini gösteren, doku kaybı veya amputasyon ile sonuçlanabilen klinik durumdur (7). 13.885 periferik arter hastasının tikagrelor ve klopidoğrel şeklinde randomize edilerek karşılaştırıldığı EUCLID(Examining Use of Ticagrelor in Peripheral Artery Disease) çalışmasında, akut alt ekstremitte iskemisi gelişme sıklığı %1,7 olarak bildirilmiştir (7).

2.1.2 Risk Faktörleri

2.1.2.a Sigara

Sigara kullanımı, alt ekstremitte periferik arter hastalığı için major risk faktörlerinden olup, sigara içenlerde PAH gelişim sıklığı, içmeyenlere oranla 2 kat fazla bulunmuştur (8). 16 yaşından önce başlayanlar en yüksek riski taşımakla birlikte, PAH gelişim riski içilen sigara adedi ve başlama yaşı ile birlikte kümülatif olarak artmaktadır (9). PAH gelişme riski, sigara bırakıldıktan sonra da sebat etmekte (10), sigara içmeyen bireylerin PAH gelişim riskine ulaşması yaklaşık 30 yıl sürmektedir (11).

2.1.2.b Hipertansiyon

Kronik böbrek hastalığı, iskemik kalp hastalığı, kalp yetmezliği, atriyal fibrilasyon ve inme gibi diğer kardiyovasküler hastalıklarda risk artışına neden olan hipertansiyon, PAH gelişimi için güçlü bir risk faktörü olmaktadır. Yaşları 30 ila 90 arasında olan 4.2milyon kişinin araştırıldığı bir kohort çalışmasında, kan basıncında 20mmHg'lık artış, PAH gelişme riskinde %63 artış ile ilişkili bulunmuştur (12).

2.1.2.c Dislipidemi

Tüm aterosklerotik hastalıklarda olduğu gibi, hiperkolesterolemi PAH gelişimi için risk faktörü olmaktadır. Yaşları 40 ila 79 arasında olan 51.529 erkekte 20 yıldan uzun süreli olarak yapılan prospektif çalışmada hiperkolesterolemi ve PAH arasında güçlü, bağımsız ve dereceli bir ilişki olduğu gösterilmiştir (10). Tüm geniş epidemiyolojik çalışmalarda yüksek dansiteli lipoprotein (HDL) PAH gelişiminde koruyucu olduğu bildirilmekle birlikte, total kolesterol/HDL oranının, hastalığın gelişme riskinde daha güçlü bir belirleyici olduğu gösterilmiştir (13). Trigliserit ve lipoprotein(a), PAH gelişiminde bağımsız risk faktörü olarak karşımıza çıkmaktadır (14,15).

2.1.2.d Diyabet

Diyabet, sigarada olduğu gibi PAH gelişim riskini 2-4 kat arttırmaktadır (16). PAH gelişme riskini arttırmakla beraber, infrapopliteal arterlerin tutulumu ile birlikte kronik ekstremitte tehdit edici iskemi gelişimi, amputasyon ve mortaliteyi arttırarak hastalığın seyrini olumsuz yönde etkilemektedir (17). Amerika’da, travma dışı ekstremitte kaybının %70 i diyabetik hastalar tarafından oluşturulmaktadır (18). 2 yıllık takipte PAH olan ve tekli antiagregan alan hastaların dahil edildiği retrospektif bir çalışmada amputasyon için major risk faktörünün ayak bileği-kol indeksi (AKİ) $<0,4$ olması belirtilmiştir (19). Aynı zamanda diyabetik ayak ülseri olan hastaların yarısında PAH mevcut olduğu tespit edilmiştir (20).

2.1.2.e Diğer Risk Faktörleri

PAH, arter duvarında inflamasyon sonucu oluşan aterosklerotik plak ile gelişmektedir. Edinburg Arter Çalışmasında semptomatik PAH olan hastalarda c-

reaktif protein (CRP) ve interlökin 6(IL-6) seviyeleri yüksek olarak tespit edilmiştir (21). Bu nedenle sistemik lupus eritematozus, romatoid artit gibi otoimmün/inflamatuvar hastalıklar PAH gelişim riskini arttırmaktadır (22). Bir hemostatik faktör olan fibrinojen PAH gelişiminde güçlü bir prediktör olarak karşımıza çıkmaktadır (23).

Yine Edinburg Arter Çalışmasında PAH gelişim riski ile fiziksel aktivite arasında ters ilişki gözlenmiştir (24). 18.000 kişinin katıldığı toplum kaynaklı başka bir çalışmada şehirde yaşayanlarda PAH gelişim riski, kırsal alanlarda yaşayanlara göre 2-3 kat fazla gözlenmiş, bu durum hava kirliliğine bağlanmıştır (25).

2.1.3 Prognoz

16 adet toplum kaynaklı kohort çalışmasının meta-analizine göre; AKİ ölçümü 0,8-0,9 arasında olanlarda mortalitede 2 kat; 0,7 altında ölçülenlerde ise 4 kat artış olduğu gözlenmiştir (26). Periferik arter hastalığı, iskemik koroner arter hastalığı, inme ve abdominal aorta anevrizması gelişiminde risk artışına neden olmakta, bu durum ortak risk faktörlerine bağlanmaktadır (27). FOURIER(Further Cardiovascular Outcomes Research With PCSK9 İnhibition in Patients With Elevated Risk) çalışması sonuçlarına göre miyokardiyal infarktüs ve inmenin eşlik etmediği PAH hastalarında major kardiyovasküler olay sıklığı, PAH'ın eşlik etmediği miyokardiyal infarktüs ve inmedeki sıklığından fazla olduğu gözlenmiştir (28).

2.1.4 Tanısal Çalışmalar

2.1.4.a Öykü

İntermittan kladikasyo, PAH mevcut olan hastalarda sorgulanması gereken tipik semptom olup, yürümek ile ortaya çıkan, hızlı yürümek veya yokuş çıkmak gibi aktivitelerle artan, 10dakika istirahat sonrası geçen, istirahatte olmayan bacak ağrısı, bacakta halsizlik hissi ve kramp gelişmesi şeklinde tanımlanmaktadır. Özellikle proksimal femoral ve iliak segmentleri tutan PAH durumunda hastalarda egzersiz ile ortaya çıkan ve artrit, spinal stenoz gibi komorbid hastalıklar ile karıştırılabilen kalça ağrısı şikâyeti bulunabilmektedir (29). Kladikasyo, PAH için klasik bir semptom olsa da hastaların büyük çoğunluğunun asemptomatik olduğu bildirilmiştir (29). Bu durumun, hastaların fiziksel aktivitelerini kısıtlayarak veya yürüme hızlarını düşürerek iskemik semptomlardan kaçınma davranışı nedeniyle olduğu düşünülmektedir (29). 2 adet geniş çaplı gözlemsel çalışmada PAH ile uyumlu olarak ayak bileği-kol indeksinin $<0,9$ ölçülen bireylerin %65 inin asemptomatik olduğu gözlenmiş, fakat bu kişilerde normal popülasyona göre daha az fiziksel aktivite, daha yavaş yürüme hızı ve daha az yürüme mesafesi bulunduğu tespit edilmiştir (30). Ayrıca bu hastalarda tüm kardiyovasküler risk faktörlerinin sorgulanması önem arz etmektedir.

2.1.4.b Fizik Muayene

Ayak bileği-kol indeksi (AKİ), PAH şüphesi olan olgularda ölçülmesi gereken, birinci basamak non-invaziv testtir. 10 dk istirahat sonrası supin pozisyonunda yatan hastada dirsek ve ayak bileğinden 5 cm proximale yerleştirilen tansiyon aleti manşonu şişirilerek, gevşetildiğinde doppler probu ile brakial arter ve tibialis posterior/dorsalis pedis arteri üzerinde alınan ilk nabızda ölçülen sistolik kan basıncı değeri kaydedilerek birbirine oranlanır. AKİ değeri $<0,9$ değeri anormal olarak değerlendirilir (31) (Tablo 1). Görüntüleme

yöntemleri ile %50den fazla stenoz saptanan hastalarda AKİ'nin sensitivitesi %61, spesifitesi %92 olarak bildirilmiştir (32). PAH tanısının ötesinde, AKİ tüm kardiyovasküler olaylar için güçlü bir marker olarak karşımıza çıkmaktadır. AKİ değerinin <0,9 olması, kardiyovasküler olay ve ölüm riskinde 2-3 kat artış ile ilişkilendirilmiştir (33). AKİ değeri >1,4 olması, özellikle diyabetik ve kronik böbrek hastalığı olan hastalarda medyal arteriyel kalsifikasyon nedeniyle vasküler yapıların manşon ile sıkıştırılamaması ile ilişkilendirilmiştir (34). Bu hastalarda, dijital arterlerin kalsifikasyondan etkilenmemeleri sebebi ile, ayak parmağı-kol indeksi (toe-brachial index-TBI) ölçümü önerilmektedir. TBI<0,7 PAH için diagnostik kabul edilmekte (Tablo 1), özellikle diyabetik hastalarda kardiyovasküler hastalıklar açısından kötü prognostik faktör olarak değerlendirilmektedir (35). AKİ değeri 0,9-1 arasında yani sınırda olan hastalarda PAH tanısı dışlanamamakta olup, egzersiz sonrası AKİ<0,9 ölçülmesi veya ayak bileği basıncında >30mmHg düşüş gerçekleşmesi PAH açısından anlamlı kabul edilmektedir (36).

Tablo 1: AKİ ve TBI değerlerine göre klinik yorum

Ayak Bileği- Kol İndeksi	Klinik Yorum	Ayak Parmağı- Kol indeksi	Klinik Yorum
1.4-1	Normal	>0.7	Normal
1-0.9	Sınırdaki	0.7-0.4	PAH
0.9-0.7	Hafif PAH	<0.4	Ciddi PAH
0.7-0.4	Orta PAH		
<0.4	Ciddi PAH		

2.1.4.c Fonksiyonel Testler

6 dakika yürüme testi: Kişinin 30 metrelik bir koridorda 6 dakika boyunca yürütülerek ölçülen yürüme mesafesi olarak değerlendirilir. Test sonucunda yürüme mesafesi kısaltıkça, kardiyovasküler mortalite riskinin arttığı bildirilmiştir (36).

2.1.4.e Görüntüleme Yöntemleri

Doppler Ultrasonografi: PAH hastalarında kullanılan birinci basamak, non-invaziv test olmakla birlikte, kalsifikasyon ve multiple segment lezyonların varlığında güvenilir sonuçlar sunmamakta (37), aynı zamanda bağırsak gazı nedeniyle aortoiliak segment optimal olarak değerlendirilememektedir.

Bilgisayarlı Tomografik Anjiyografi (BTA): %50 ve üzeri darlıkları tespit etmede sensitivitesi %92, spesifitesi %93 (38) olmakla birlikte, kalsifikasyon ve multiple segment oklüzyonlar tanıyı güçleştirmektedir. Ayrıca iyotlu kontrast madde kullanımı nedeniyle $\text{gfr} < 60 \text{ ml/dk/1.73m}^2$ olan hastalarda önerilmemektedir.

Manyetik Rezonans Anjiyografi (MRA): PAH tanısında sensitivitesi ve spesifitesi %93-100 olduğu bildirilmiştir (39). Kalsifikasyondan etkilenmemeleri, eş zamanlı olarak kemik iliği ödemi ve osteomyelit açısından değerlendirilebilmeleri avantajları iken, Gadolinyum ilişkili nefrojenik fibrozis yapabilmeleri, metal implant ve ICD/pacemaker bulunan hastalara çekilememeleri dezavantajlarını oluşturmaktadır. $\text{gfr} < 30 \text{ ml/dk/1.73m}^2$ olan hastalara önerilmemektedir. Kalsifikasyondan etkilenmemekle birlikte, kalsifikasyonu göstermemeleri nedeniyle anastomoz bölgesi seçimi hakkında bilgi sağlamamaktadır (39).

Dijital Substraksiyon Anjiyografi (DSA): PAH tanısında altın standart tanı yöntemi olarak kabul edilmektedir. Eş zamanlı lezyona müdahale edilebilmesi, lezyonlar hakkında detaylı anatomik bilgi vermesi avantajları iken, daha fazla radyasyon ve iyotlu kontrast madde kullanımı, sheet aracılı vasküler erişim gerektirmesi dezavantajlarıdır. Özellikle akut alt ekstremité iskemisi gibi, diğer non-invaziv testlerle vakit kaybedilmemesi gereken durumlarda seçilmesi gereken modalite olmaktadır (40).

2.1.5 Tedavi

2.1.5.a Medikasyon

2016 yılında yayınlanan AHA/ACC PAH klavuzunda antiplatelet tedavi, statinler, antihipertansif ajanların kullanımı ve glisemik kontrol, sigara bırakılması klas 1 ve 2a öneri düzeyi şeklinde bahsedilmiştir (41) (Tablo 2).

Tablo 2: 2016 AHA/ACC klavuzuna göre PAH hastalarında medikasyon önerileri

Öneri Düzeyi	Kanıt Düzeyi	Öneriler
1	A	Semptomatik PAH hastalarında miyokard infarktüsü, inme ve vasküler ölüm riskini azaltmak için aspirin veya klopidogrel kullanımı
1	A	PAH olan tüm hastalarda statin kullanımı
1	A	Hipertansiyon ve PAH olan hastalarda miyokard infarktüsü, inme, kalp yetmezliği ve vasküler ölüm riskinin azaltılması için antihipertansif ajan kullanımı
1	A	PAH hastalarında sigara ve tütün kullanımının kesilmesi, Sigara kullanımının bırakılması için medikasyon (varenicline, bupropion, nikotin replasman tedavisi) veya sigara bırakma programı önerilmesi

Bu kanıta dayalı klavuz önerilerine rağmen PAH hastaları yeterli-uygun tedaviyi almamaktadırlar. ABI<0,9 olan, 40 yaşın üzerindeki 7458 PAH hastasının 1999-2004 yılları arasındaki National Health and Nutrition Examination Survey (NHANES) verilerini inceleyen bir çalışmada, hastalarda aspirin kullanımının %35.8, statin kullanımının %30.5, renin-anjiyotensin inhibitörü kullanımının ise %24.9 olduğu bildirilmiş (42).

2011-2015 yılları arasında, 16 vasküler tedavi merkezinde, yeni başlayan veya kötüleşen kladikasyo şikâyeti olan 1272 PAH hastasının dahil edildiği PORTRAIT (Patient-Centered Outcomes Related to Treatment Practices in Peripheral Arterial Disease: Investigating Trajectories) prospektif çalışmasında hastaların %37.3 ünün aktif sigara kullanıcısı olduğu, bunların sadece %16 sının sigara bırakma danışmalığına yönlendirildiği ve %11 ine sigara bırakması için medikal destek sağlandığı görülmüş. 12 aylık takip sonrasında ise hastaların %72 sinin sigara içmeye devam ettiği gözlenmiş (43).

2.1.5.b Egzersiz Tedavisi

Süpervizör eşliğinde egzersiz programı, PAH hastalarında yürüme mesafesini arttırmak için birinci basamak tedavi planı içerisinde yer almalıdır (41). 1996-2012 yılları arasında yayınlanan, toplam 1054 hastayı içeren 25 randomize kontrollü çalışmanın incelendiği bir meta analizde, egzersiz tedavisi uygulanmayan grup ile karşılaştırıldığında, egzersiz programına alınan grupta yürüyüş bandında yürüme mesafesinde ortalama 180 metre, ağrısız yürüme mesafesinde ise ortalama 128 metre artış olduğu belirtilmiş (44).

2.1.5.c Kronik Ekstremité Tehdit Edici İskemi (KETİ) de Revaskülarizasyon

Periferik arter hastalığının son dönemini ifade eden bu kavram daha önce kritik bacak iskemisi olarak tanımlanırken, tabloda sadece ciddi iskeminin olmaması nedeniyle KETİ olarak adlandırılmıştır. Bu tabloda;

-Ekstremité kaybını önlemek için tedavide ivedi davranılması gerekmektedir, fakat bazı hastalar, revaskülarizasyon olmaksızın yıllarca ekstremité kaybı yaşamadan hayatlarına devam edebilmektedirler

-Diyabetik hastalar çoğunlukta olup, vakaların %50-70 ini nöro-iskemik diyabetik ayak yarası oluşturmaktadır.

-Ampütasyon riski sadece iskeminin şiddetine bağlı olmayıp, yara ve enfeksiyon varlığına da bağlıdır.

Bu sebeple KETİ hastalarında tedavi optimizasyonu ve revaskülarizasyon sonuçlarının daha objektif karşılaştırılabilmesi için The Society for Vascular Surgery tarafından geliştirilen 2 skrolama sistemi mevcuttur; Wifl (Wound, Ischemia, food Infection) ve GLASS (Global Limb Anatomic Staging System).

Wifl sınıflaması:

KETİ hastalarında ekstremitenin iskemi derecesi ve ekstremitte kaybı riskinin değerlendirilmesi için kullanılmaktadır (45). Her faktör 4 kategori şeklinde değerlendirilmektedir (0: yok, 1: hafif, 2: orta, 3: şiddetli). Tablo 3 Wifl sınıflamasını, tablo 4 bu sınıflamaya göre yapılan klinik evrelemeyi, tablo 5 ise klinik evreye göre tahmin edilen 1 yıllık ampütasyon oranlarını göstermektedir (45).

Tablo 3: Wifl sınıflaması

Bileşen	Puan	Tanım		
Yara(W)	0	Ülser veya gangren yok (istirahat ağrısı +)		
	1	Gangren olmadan, ayak veya bacakta küçük veya yüzeysel ülser (basit dijital ampütasyon veya cilt flebi ile tedavi)		
	2	Ayak parmakları ile sınırlı, tendon, kemik veya eklemin açıkta olduğu derin ülser± Gangren (multiple parmak ampütasyonu veya standart transmetatars ampütasyonu ± cilt flebi ile tedavi)		
	3	Ayağın ön ve/veya orta bölümünü kapsayan derin, yaygın ülser ± kalkaneal tutulum ± geniş gangren (ayağın kompleks rekonstrüksiyonu veya geleneksel olmayan transmetatarsal ampütasyon ile tedavi)		
İskemi(I)		AKI (ayak bileği-kol indeksi)	Ayak bileği sistolik basıncı(mmHg)	Ayak başparmağı sistolik basıncı veya transkutanöz oksijen basıncı (mmHg)
	0	≥0,80	>100	≥60
	1	0,6-0,79	70-100	40-59

	2	0,4-0,59	50-70	30-39
	3	≤0,39	<50	<30
Ayak enfeksiyonu (f1)	0	Enfeksiyon yok		
	1	Sadece cilt-cilt altını tutan hafif, lokal enfeksiyon, eritem 0,5-2cm arası		
	2	Orta derecede lokal enfeksiyon ve eritem>2cm, veya daha derin yapıları tutan enfeksiyon		
	3	SIRS belirtileri gösteren ciddi lokal enfeksiyon		

Tablo 4: Wifl sınıflamasına göre klinik evreleme

	İskemi 0				İskemi 1				İskemi 2				İskemi 3			
W 0	1	1	2	3	1	2	3	4	2	2	3	4	2	3	3	4
W 1	1	1	2	3	1	2	3	4	2	3	4	4	3	3	4	4
W 2	2	2	3	4	3	3	4	4	3	4	4	4	4	4	4	4
W 3	3	3	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4
	f10	f11	f12	f13	f10	f11	f12	f13	f10	f11	f12	f13	f10	f11	f12	f13

Tablo 5: Klinik evrelemeye göre 1 yıllık major amputasyon oranı

Klinik evre 1	Çok düşük risk	%0.75
Klinik evre 2	Düşük risk	%5.9
Klinik evre 3	Orta risk	%8.4
Klinik evre 4	Yüksek risk	%25

GLASS sınıflaması:

KETİ hastalarında lezyonun yüksek kaliteli görüntüleme yöntemleri ile ortaya konularak, tedavide seçilen infrapopliteal artere uzanım gösterecek hedef arteriyel yolun belirlenmesine dayanmaktadır (46). Tablo 6’de GLASS sınıflaması ve Tablo 7’de bu sınıflamaya göre yapılan klinik skora gösterilmektedir.

Tablo 6: GLASS sınıflaması

FP Evre 0	Hafif veya önemsiz darlık (<%50)	İP Evre 0	Hedeflenen arteriyel yolda hafif veya önemsiz darlık
FP Evre 1	-Toplam uzunluğu SFA'nın 1/3'ünden kısa olan (<10cm) lezyon -<5cm olan fokal kronik tıkanıklık -Hafif ya da belirgin olmayan popliteal arter lezyonu	İP Evre 1	Tibial arterlerin 3cm den küçük olan fokal darlığı

FP Evre 2	- Toplam uzunluğu SFA'nın 1/3-2/3 ünü kapsayan lezyon (10-20cm) -Toplam uzunluğu SFA'nın 1/3'ünden az olan kronik tıkanıklık (<10cm) -Trifürkasyonu içermeyen, 2 cm den küçük popliteal arter darlıkları	İP Evre 2	-Damar uzunluğunun 1/3 ünü etkileyen darlık -<3cm olan kronik darlık -tibioperoneal kök ve tibial arter orijinini içermeyen darlık
FP Evre 3	-Toplam uzunluğu SFA'nın 2/3'ünden fazla olan lezyon(>20cm) -10-20cm uzunluğunda kronik tıkanıklık -trifürkasyonu içermeyen 2-5cm arası popliteal arter darlığı	İP Evre 3	-Damar uzunluğunun 2/3 ünü etkileyen darlık -Damar uzunluğunun 1/3 ünü geçmeyen kronik tıkanıklık (tibioperoneal kök tutulumu olmaz, tibial arter orijinini içerebilir)
FP Evre 4	-Uzunluğu >20cm olan SFA lezyonu -5cm den büyük veya trifürkasyona uzanım gösteren popliteal hastalık -Herhangi bir popliteal bölgenin kronik tıkanıklığı	İP Evre 4	-Damar uzunluğunun 2/3'ünden fazla diffüz darlık -Damar uzunluğunun 1/3'ünden fazla kronik tıkanıklık(tibial arter orijini içerebilir) -Anterior tibial arterin hedef yol olmadığı, tibioperoneal kökü tutan tüm kronik oklüzyonlar

Tablo 7: GLASS sınıflamasına göre klinik skorlama

	İP 0	İP 1	İP 2	İP 3	İP 4
FP 4	3	3	3	3	3
FP 3	2	2	2	3	3
FP 2	1	2	2	2	3
FP 1	1	1	2	2	3
FP 0		1	1	2	3

Fakat endovasküler girişimlerde tercih edilen hedef arteriyel yol ile by-pass cerrahisinde tercih edilen anastomoz bölgesi her zaman örtüşmemektedir. GLASS sistemi primer olarak endovasküler girişim sonuçlarının karşılaştırılması hedefi ile geliştirilmiş olup, by-pass cerrahisinin sonuçlarını etkileyen venöz konduit kalitesi, distal run-off olup-olmaması gibi durumları içermemektedir (46).

KETİ hastalarına gün geçtikçe daha fazla perkütan müdahale edilmektedir. 2003-2011 yılları arasında 642.433 KETİ hastasının başvurularını inceleyen gözlemsel çalışmada, cerrahi revaskülarizasyon oranlarının %13.9 dan %8.8 e düştüğü, endovasküler revaskülarizasyon oranlarının ise %5.1 den %11 e çıktığı gözlenmiştir. Cerrahi ile kıyaslandığında endovasküler girişimin daha az hastane içi

mortalite, daha az yatış süresi ve daha az hastane masrafına neden olduğu bildirilmiş. Major amputasyon oranları ise benzer olarak gözlenmiş (47).

Endovasküler revaskülarizasyonun artan oranlarda kullanımı, artan restenoz oranları ile sonuçlanmaktadır. Endovasküler prosedür sonrası restenoz nedeniyle by-pass cerrahisine giden hasta oranları giderek artmaktadır. 2003-2011 yılları arasında primer alt ekstremitte by-pass cerrahisi uygulanan 2350 hasta ile restenoz nedeniyle sekonder olarak alt ekstremitte periferik by-pass cerrahisi uygulanan 1154 hastanın karşılaştırıldığı bir çalışmada, 2. grubun major alt ekstremitte olayı olmadan 1 yıllık yaşam oranının daha düşük olduğu bildirilmiş (48).

Endovasküler girişim ve by-pass etkinliğini karşılaştıran, 2005 yılında yayınlanmış tek randomize kontrollü çalışma olan BASIL (Bypass versus Angioplasty in Severe Ischemia of the Leg) çalışmasında, iki grupta benzer sonuçlar elde edilirken, 2 yıldan fazla yaşayan hastalarda amputasyonsuz yaşam oranının by-pass grubu lehine olduğu bildirilmiş (49).

Tamamlanan The BEST-CLI (Best Endovascular vs Best Surgical Therapy for Patients with Critical Limb Ischemia) çalışma sonuçları, KETİ hastalarında tedavi stratejilerini optimize etmede faydalı olabilir.

2.1.5.d Akut Alt Ekstremitte İskemisinde Revaskülarizasyon

Akut alt ekstremitte iskemisi, tedavisiz bırakıldığında amputasyona giden, 2 hafta içerisinde gelişerek kötüleşen alt ekstremitte iskemisini tanımlamaktadır. Akut alt ekstremitte iskemisinde mortalite, KETİ ye oranla oldukça yüksek olarak bildirilmiştir (%15-20) (50). 30 günlük amputasyon oranı %10-30 olarak rapor edilmiştir (50).

2020 yılında yayınlanan Avrupa Damar Cerrahisi Derneği'nin klavuzunda akut alt ekstremitte iskemisine yaklaşım; bacağın ayrıntılı fizik muayene ile canlılığının değerlendirilmesi, ekstremitte canlılığı tehdit altında ise acilen heparinizasyona başlanılıp görüntüleme yapılması, sonrasında hızla revaskülarizasyon sağlanması(endovasküler veya cerrahi olarak)(sınıf 1 öneri düzeyi), bacağın canlılığı akut olarak tehdit altında değil ise tedavi yaklaşımı KETİ hastası gibi olması (sınıf 1 öneri düzeyi), acil embolektomi yapılan hastalarda emboli kaynağının araştırılması (sınıf 1 öneri düzeyi), acil embolektomi yapılan hastalarda işlem sonrası tamamlayıcı tanısal anjiyografi yapılması(sınıf 1 öneri düzeyi) şeklinde belirtilmiştir (51).

Akut ekstremitte iskemisinin acil revaskülarizasyonu sonrası yakın takip edilmesi de yaklaşımda önemli bir basamak olup, bu hastalar iskemi-reperfüzyon hasarı açısından oldukça yüksek risk altındadırlar.

2.2 İskemi-Reperfüzyon (I/R) Hasarı

Alt ekstremitte iskemi-reperfüzyon hasarı, dokuya giden kan akımının azalması-kesilmesi sonucunda iskemik doku hasarı ve nekrozun, kan akımının restorasyonu sonrasında artarak devam etmesi olarak tanımlanabilir. Reperfüzyon hasarı kavramı ilk kez Jennings ve ark. tarafından, köpeklerde koroner ligasyon sonrası reperfüzyonun miyokardiyal nekroz gelişimini hızlandırması ile ortaya konulmuştur.

Burada oluşan doku hasarı-nekrozun genişliği, esas olarak iskeminin süresi ve büyüklüğü tarafından belirlenmektedir. Bu nedenle revaskülarizasyonun

mümkün olan en erken dönemde yapılması, iskemi-reperfüzyon hasarının azaltılması ve önlenmesinde en etkili yaklaşımdır (52).

Reperfüzyon hasarı aşaması aktif bir aşama olup, reperfüzyondan sonra 3 güne kadar devam etmektedir. Altta yatan mekanizmanın tam olarak anlaşılması ile I/R hasarının azaltılmasının yanı sıra, reperfüzyon hasarı oluşmadan indüklenebilen iskemi süresinin uzatılmasını sağlayacak tedavi stratejileri gelişmesini de sağlayabilir (52).

İskemiye olan doku cevabı, dokunun tipine göre de değişmektedir. Burada belirleyici olan en önemli faktörler dokunun metabolik aktivitesi ve ihtiva ettikleri mikrovasküler yatağın yapısı ve fonksiyonudur. Beyin dokusu, ünite ağırlık başına en yüksek metabolik aktiviteye sahip olup, iskemiye en duyarlı doku olmaktadır, bunu kalp ve böbrek dokusu takip etmektedir. Bu dokuların aksine iskelet kası dokusunda iskemi daha iyi tolere edilebilmektedir. Beyin dokusunda 20 dakika iskemi sonrası geri dönüşsüz doku hasarı gelişimi başlarken, iskelet kası 1,5-2 saat iskemi süresini tolere edebilmektedir. Vasküler yapı içermeyen dokular ise iskemiden neredeyse hiç etkilenmemektedir. Örneğin kornea transplantları doku solüsyonlarında 3 hafta kadar, sadece minimal endotel hasarı oluşarak saklanabilmektedir (52).

I/R hasarında altta yatan mekanizma kompleks ve multifaktöriyel olup şunları içermektedir (Şekil 1)

-mitokondriyel ve hücrel kalsiyum birikimi

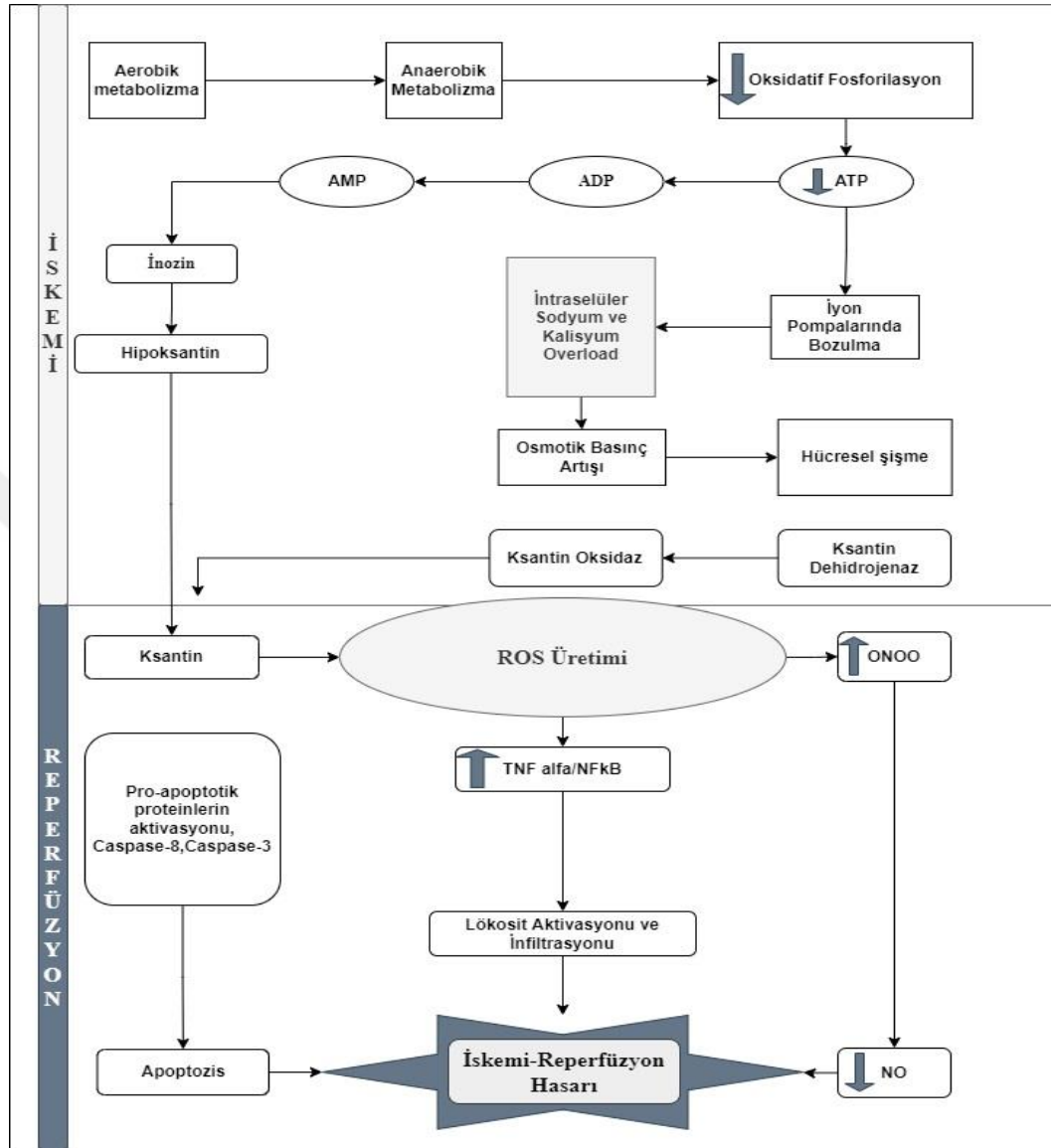
-dokuya tekrar oksijen sunumu sonrası artan reaktif oksijen türleri (ROS)

ve reaktif nitrojen türleri (RNS) üretimi

-organel hasarı

- proteaz aktivasyonu
- epigenetik değişiklikler
- inflamatuvar cevap

Şekil 1: iskemi-reperfüzyon hasarından sorumlu mekanizmalar



2.2.1 Hücre İçi Kalsiyum Birikimi

İskemi sırasında hücreye ulaşan oksijen miktarının azalması sonucu hücrede hazırda bulunan ATP depoları hızla tüketilir. Hücre, enerji ihtiyacını karşılamak için aneorobik glikoliz yapmaya yönelir. Bunun sonucunda hücrede biriken laktat, H, NAD sonucu hücresel pH düşmekte, hücre ise membranında bulunan sodyum/hidrojen (Na/H) değiştirici kanalı açarak hücre içi pH ı

dengelemeye çalışmaktadır. Bu ise hücrede Na birikimine ve hücrel ödeme neden olmaktadır. Hücre içi biriken sodyumu atabilmek için devreye giren sodyum/kalsiyum (Na/Ca) değıştirci kanal aktivitesinin artması, hücrel ATP depolarının tükenmesi sonrası, normalde sitozolde biriken kalsiyumu endoplazmik retikulum içine taşıyan ve aktif transport yapan SERCA (sarcoplasmic reticulum Ca ATPase) kanalının inaktive olması sonucu hücre içerisinde kalsiyum birikimi meydana gelmektedir. Reperfüzyon sırasında extraselüler H⁺ iyonlarının uzaklaştırılması sonucunda artan gradiyent nedeni ile Na/H değıştirci kanal aktivitesi artmakta, bu da reperfüzyon sırasında hücre içi kalsiyum birikimini büyük oranda arttırmaktadır (53). Hücre içi kalsiyum birikimi sonucu hücre ölümüne yol açan birçok mekanizma aktive olmaktadır (Şekil 2):

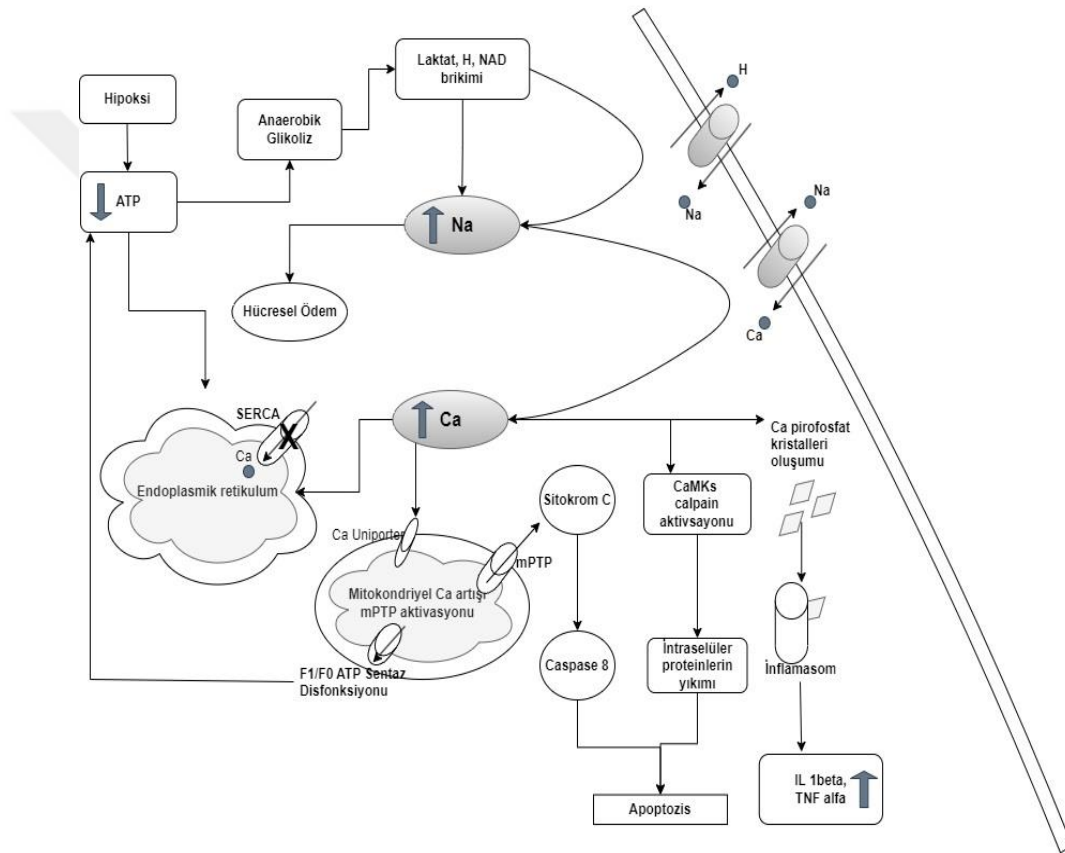
-Hücre, sitozolde biriken fazla kalsiyumu, mitokondriyel kalsiyum uniporter ile mitokondri içine sokmaktadır. Mitokondri içinde biriken kalsiyum, mitokondri iç zarında bulunan mPTP (mitochondrial permeability transition pore) açılmasına neden olmakta, bunun sonucunda mitokondrinin iç ve dış zarı arasında bulunan ve ATP üretimi için esansiyel olan elektrokimyasal hidrojen gradiyenti bozulmaktadır. Bu da hücrenin ATP üretimini ileri derecede bozmaktadır (54).

-Kalmodulin proteinine bağlanarak, Ca-kalmodulin bağımlı proteaz (CaMKs) aktivasyonuna ve bir sistein proteaz olan kalpain aktivasyonuna (55) neden olmaktadır. Aktive olan bu proteazlar hücre iskeleti, endoplazmik retikulum ve mitokondrideki proteinlerin yıkımına neden olmaktadır.

-Hücre içi kalsiyum pirofosfat kristalleri oluşumuna neden olmakta, bunlar da ürik asit kristalleri oluşturmaktadır. Oluşan ürik asit kristalleri inflamazom adı verilen hücre içi protein komplekslerine bağlanarak interlökin beta (IL-1beta) ve

tümör nekroz faktör alfa (TNF alfa) gibi proinflamatuvar sitokin üretimini arttırmakta, bu sitokinler ise nükleer faktör kappa beta (NFkB) gibi transkripsiyon faktörlerini arttırarak daha fazla sitokin ve kemokin üretimine neden olmaktadır (56).

Şekil 2: I/R sırasında oluşan hücre içi iyon değişiklikleri ve sonuçları



2.2.2 Reaktif Oksijen Türleri (ROS)/ Reaktif Nitrojen Türleri (RNS)

Reperfüzyon sırasında oksijenize kanın hücrelere ulaşması, ROS ve RNS üretimine neden olmaktadır. Bu moleküllerin yol açtığı oksidatif stres 3 komponentten oluşmaktadır

- Yüksek oranda aktif olan biyomoleküller olup, hücre içindeki DNA, protein, lipid ve karbonhidrat gibi makromoleküllerle etkileşerek hasara yol açarlar (57).

- Tiyol/disülfit redox sisteminde değişikliklere yol açarak bazı hücre içi sinyal yollarında disfonksiyona neden olurlar (57).

- Regülatör proteinlerde oksidatif/nitrozatif modifikasyon yaparak bazı sinyal yollarını modüle ederler (57).

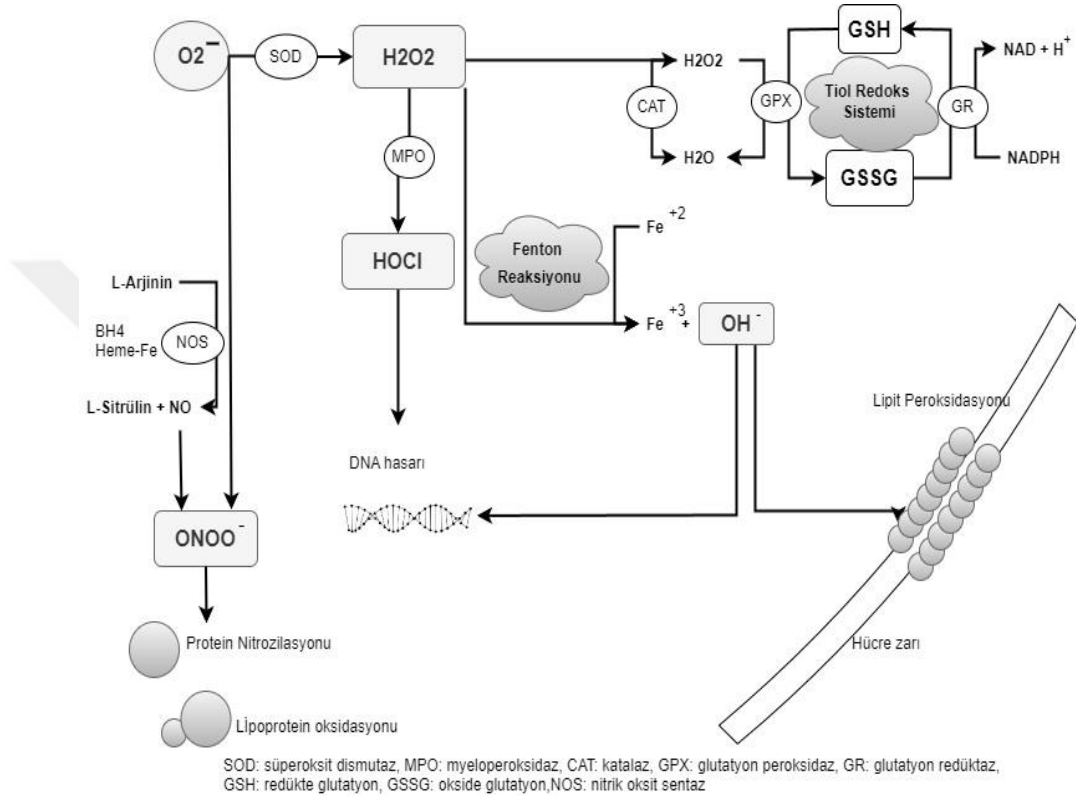
I/R hasarında öncelikli olarak üretilen ROS, süperoksit (O_2^-) anyonudur. Normalde hücrede oluşan süperoksit anyonu, süperoksit dismutaz (SOD) enzimi tarafından daha az reaktif olan hidrojen peroksit (H_2O_2) dönüştürülür. Reperfüzyon sırasında fazla miktarda oluşan süperoksit, SOD kapasitesini aşar, hücre içi düşük pH varlığında daha potent bir formu olan hidroperoksil (HO_2) radikaline dönüşür.

Hidrojen peroksit, her ne kadar daha az reaktif olsa da hücrede ikinci haberci molekül olarak sinyalizasyon modülasyonu yapar. Aynı zamanda fenton reaksiyonuna katılarak yüksek oranda reaktif olan hidroksil (OH) anyonu oluşumuna da neden olur. Hemoglobin, miyoglobin gibi hemoproteinlerin demir birimlerine bağlanarak disfonksiyonuna neden olur.

Süperoksit anyonu, nitrik oksit (NO) ile etkileşerek peroksinitrit ($ONOO^-$) oluşumuna neden olur. Peroksinitrit, hidrojen ile etkileşerek peroksinitröz asit

(ONOOH) oluşumuna neden olur ki bu molekül yüksek oranda sitotoksiktir (Şekil 3).

Şekil 3: ROS ve RNS oluşumunda major yollar

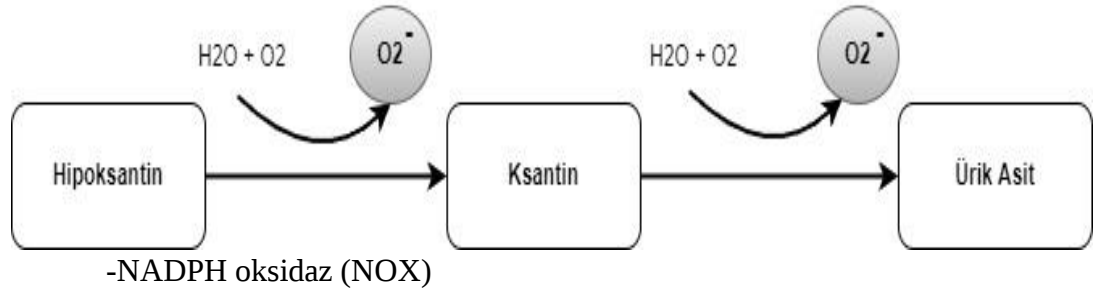


ROS üretiminde major enzimatik kaynaklar;

-Ksantin oksidaz (XO)

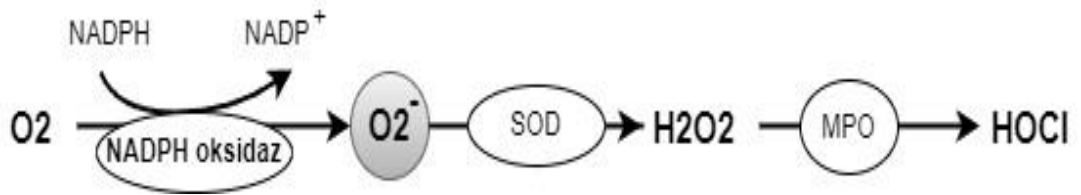
Birçok dokuda sentezlenmesine rağmen hepatosit, enterosit ve kapiller endotel hücrelerinde fazla oranda bulunur. Hipoksik koşullarda ksantin dehidrojenazdan sentezlenir, moleküler oksijen ve hipoksantin kullanarak süperoksit anyonu üretir (58) (Şekil 4).

Şekil 4: Ksantin oksidazın katalizlediği reaksiyon



2 major isoformu superoksit oluşumunda rol almaktadır. Birincisi fagositik lökositler (makrofaj, nötrofil gibi) de bulunur ve bu hücrelerin mikroorganizma veya inflamatuvar sitokinler ile uyarılması sonucu süperoksit üretiminde 50-100 kat artış olmasından sorumlu solunum patlaması (respiratuar burst) olayına neden olur. Üretilen süperoksit, SOD tarafından hızla hidrojen peroksit, daha sonra myeloperoksidaz enzimi tarafından hipokloröz asite (HOCL) dönüştürülür. Bu normal şartlarda konak savunması için oluşturulur, fagozom içine veya ekstraselüler alana salınır (58) (Şekil 5).

Şekil 5: NADPH oksidazın katalizlediği reaksiyon ile başlayan respiratuar burst



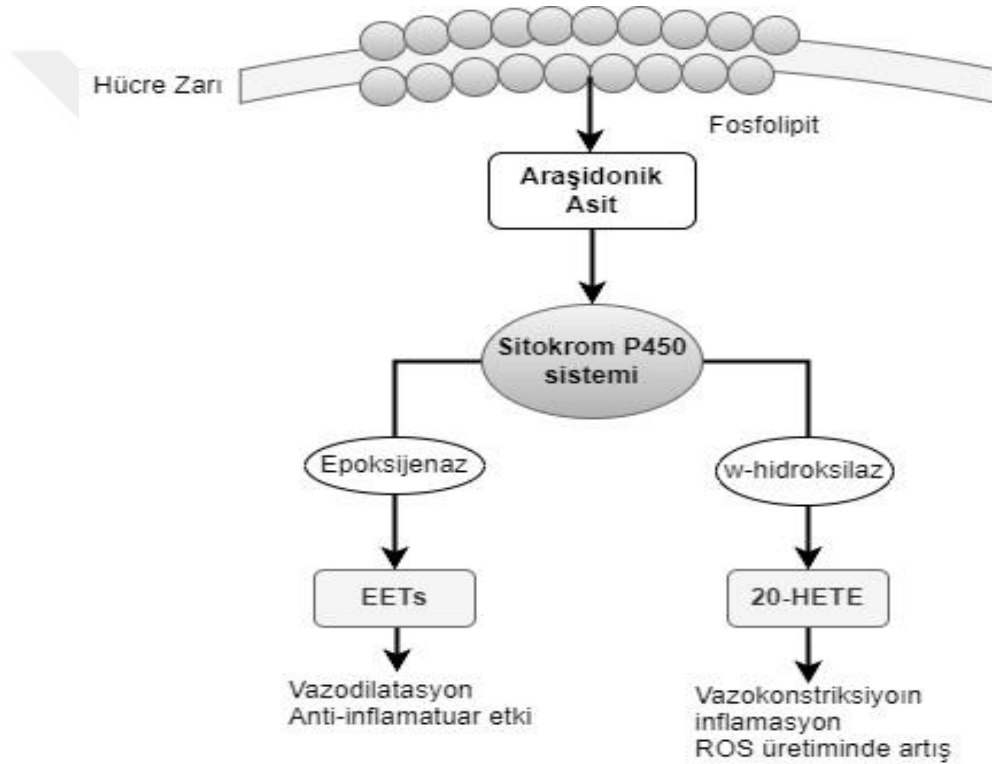
İkinci izoformu endotel hücrelerinde bulunan form olup, fizyolojik şartlarda hücre içi sinyalizasyonu için az miktarda süperoksit üretirken, I/R sırasında oksidatif strese yol açacak kadar üretimi artabilir.

-sit. P450 oksidaz

Membrana bağlı hemoksidazlar olup, oksijen veya NADPH kullanarak zenobiyotik bileşikler, steroidler, kolesterol, vitaminler gibi moleküllerin oksidasyon/redüksiyonunda rol alırlar. Temel olarak hepatositlerde bulunurlar.

Membran araşidonik asitlerini kullanarak; vazokonstrüktif etkileri olan 20-hidroksieikozatetraenoik asit (20-HETE), vazodilatör etkileri olan epoksieikozatrienoik asit (EET) üretirler. HETE nin I/R hasarını arttırıcı etkisi mevcutken, EET postiskemik inflamasyonu sınırlar. Bu nedenle bu enzimlerin I/R hasarı üzerine etkisi bimodaldır (52) (şekil 6).

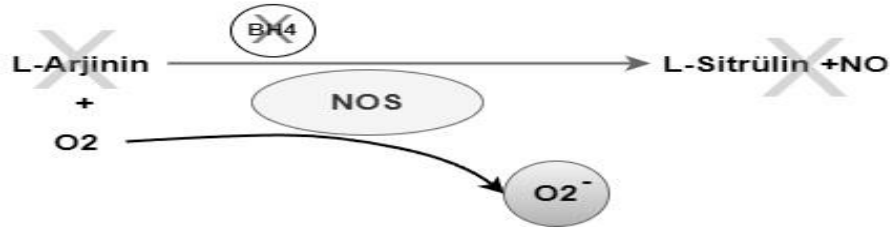
Şekil 6: sit p450 oksidaz ürünleri



-Eşlenmemiş nitrik oksit sentaz (NOS)

2 alt ünitesi mevcuttur; sitokrom p450benzeri redüktaz içeren ve demir oksidaz içeren altünite. L-arjinini okside ederek L-sitrülin ve NO oluşumunu katalizler. Kofaktör olarak tetrahidrobioferin (BH4) kullanır. Ortamda L-arjinin ve BH4 bulunmadığı zaman eşlenmeyen bu enzim, süperoksit radikali üretmeye başlar (52) (Şekil 7).

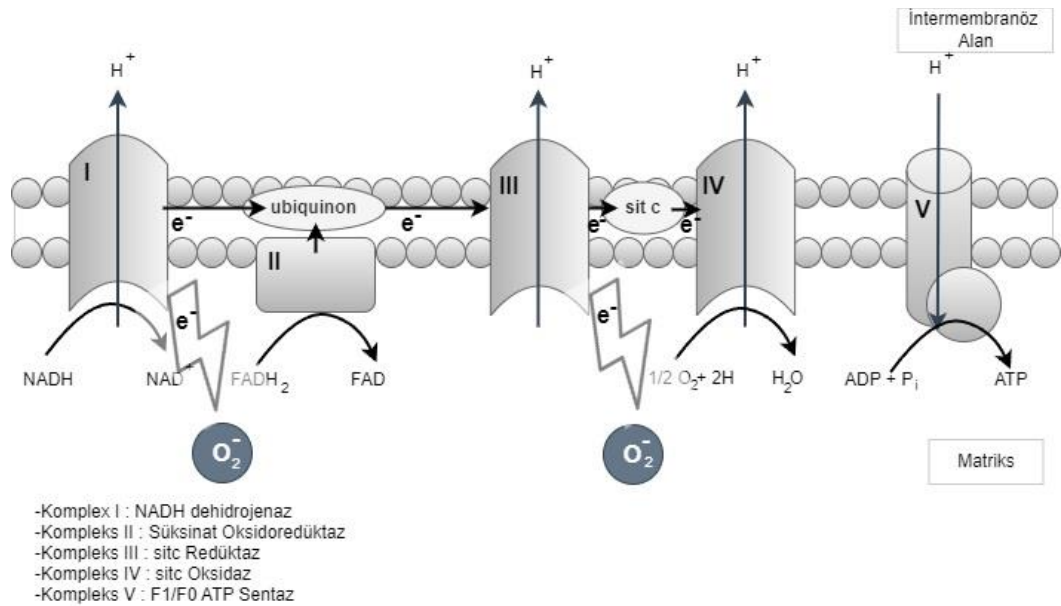
Şekil 7: Eşlenmemiş NOS sonucunda süperoksit anyonu oluşumu



-Mitokondrideki elektron transport sistemi (kompleks 1 ve 3)

Hücreye giren oksijenin %90 ı, mitokondriyal elektron transport sistemi (e.t.s) tarafından su molekülüne indirgenir. %1-2 kadarlık bir kısmı ise e.t.s de bulunan NADH ubiquinon oksidoredüktaz (kompleks 1) ve ubiquinon/sitokrom c redüktaz (kompleks 3) tarafından süperoksit anyonuna dönüştürülür (Şekil 8). Bunun dışında mitokondride bulunan p66Shc ve monoamin oksidaz sistemi de süperoksit anyonu üretmektedir. Mitokondri, I/R hasarında ROS üretiminin büyük bir kısmından sorumludur (59).

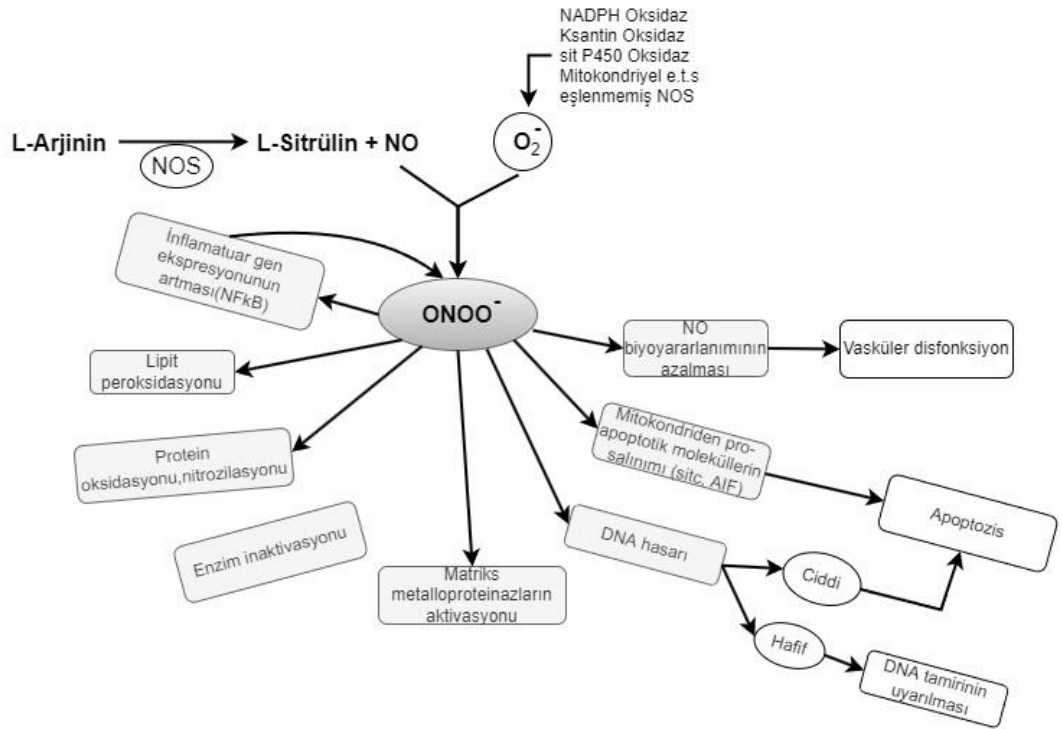
Şekil 8: ETS sırasında aktarılan elektronların sistemin dışına sızarak oksijenle etkileşmesi ve süperoksit anyonu oluşurması



RNS üretimi;

NO, temel olarak NOS tarafından L arjinin ve BH4 varlığında üretilmekte olup, nitrat ürünlerinden XO aracılığı ile ve hipoksik koşullarda mitokondriyal sitokrom c oksidaz tarafından da sentezlenmektedir. Normalde endotelden sentezlenen NO vazodilatasyon, platelet aggregasyon ve adezyonunun düzenlenmesi, lökosit-endotel etkileşiminin engellenmesi ve anjiyogenez gibi vazoprotektif etkileri olan bir mediyatördür. Fakat ortamda fazla miktarda süperoksit anyonu mevcut olduğunda (I/R hasarı), onunla etkileşerek sitotoksik peroksinitrit oluşumuna yol açar (60) (Şekil 9).

Şekil 9: RNS oluşumu ve hücredeki sonuçları

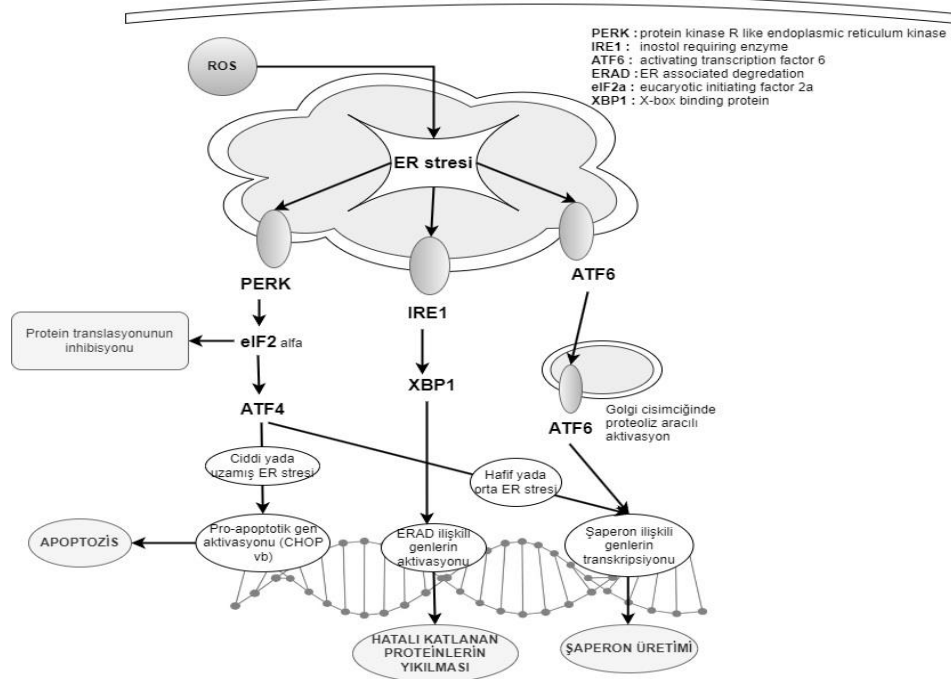


2.2.3 Organel Hasarı

-Endoplasmik Retikulum (ER) hasarı:

ER, hücrede protein katlanması, lipid biyosentezi ve kalsiyum depolanmasında rol alan kompleks membranöz ağ yapısıdır. Hipoksi, ROS, TNF alfa gibi uyaranlar ER stresine yol açarlar, bu da proteinlerde yanlış katlanma-katlanmama durumlarına yol açar. Bu proteinlerin birikimi transmembran reseptörler tarafından algılanarak katlanmamış protein cevabına (unfolded protein response-UPR) neden olur. Bu cevap ile birlikte ER; şaperonların üretimini artırır, protein translasyonunu artırır, katlanmamış-yanlış katlanmış proteinlerin yıkımını artırır. Sonuç olarak ER stresi azaltılmaya çalışılır. Fakat bu sistem başarısız olursa apoptozis indüklenir, hücre ölümü ile sonuçlanır (61) (Şekil 10).

Şekil 10: ER stres cevabı olarak aktive olan UPR sistemi



-Mitokondriyal hasar:

İskemi sırasında oksijen yetersizliği, mitokondrideki e.t.s sisteminde elektron transportunu durdurur, bunun sonucunda F1F0 ATP sentaz enzimi ADP yi fosforile ederek ATP sentezi gerçekleştiremez. Aynı zamanda mitokondri, zarları arasındaki elektrokimyasal gradiyenti koruyabilmek için F1F0 ATP sentaz enzimini ters yönde çalıştırır, ATP tüketir. Bu da iskemi sırasında ATP seviyelerinin hızla düşmesine yol açar (62).

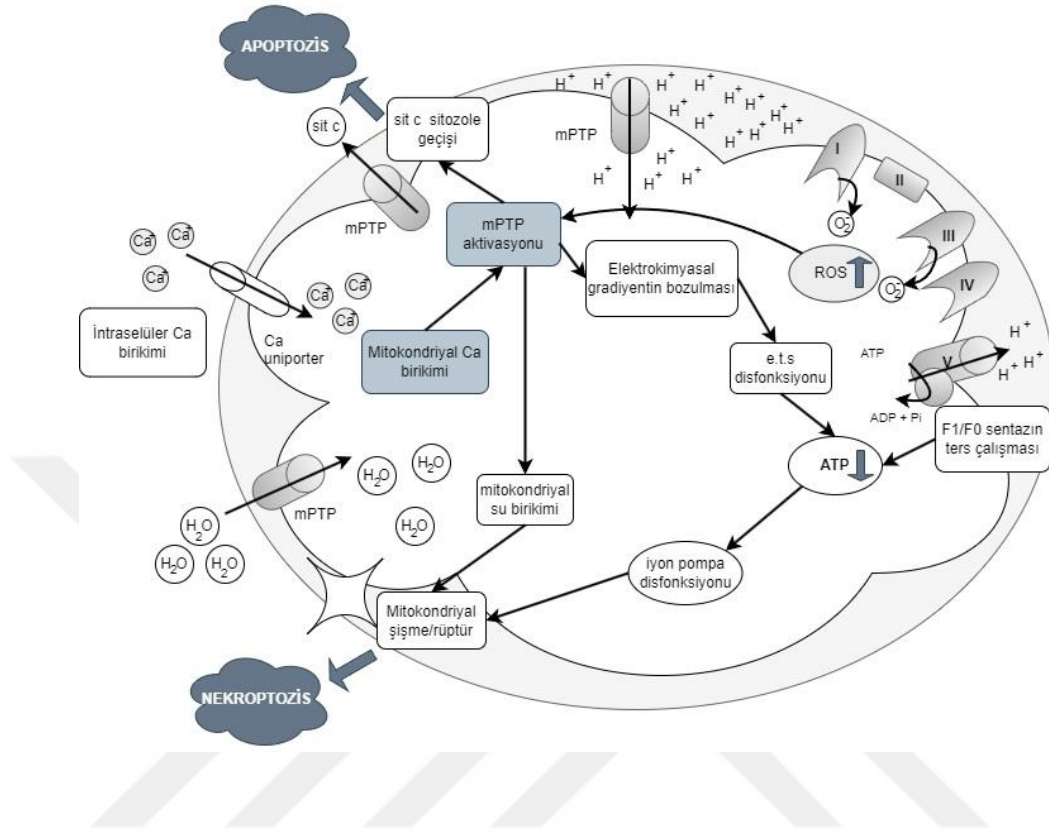
E.t.s sistemindeki kompleks 1 ve kompleks 3, p66Shc ve monoamin oksidaz sistemleri tarafından ROS üretimi artar (63).

İskemi sırasında düşük pH nedeni ile kapalı olan mPTP, reperfüzyon sırasında oluşan kalsiyum birikimi ve artan ROS üretimi ile birlikte açılır. Bu porların açılması ile mitokondri zarları arasındaki elektrokimyasal gradiyent bozulur, ATP üretimi azalır. Aynı zamanda büyük olan bu porlardan mitokondri içine su girişi olur, mitokondride şişme hatta rüptür meydana gelir (63).

Normalde dinamik olarak hücre ihtiyacına göre füzyon-fizyon yolu ile kompleks ağlar kuran mitokondriler, iskemi sırasında artan fizyon nedeniyle küçük-işlevsiz fragmanlara ayrılır (64).

Mitokondrideki tüm bu değişiklikler hücre içinde apoptozis/ nekroptozisi indükler (Şekil 11).

Şekil 11: I/R hasarında mitokondriyal değişiklikler ve sonuçları



2.2.4 Proteaz Aktivasyonu

Hücre içi sinyal iletiminde önemli görevleri olan proteazlardan bazılarının I/R hasarı patogenezinde rolleri mevcuttur.

-Ca-Kalmodulin bağımlı protein kinaz (CaMKs)

-Protein kinaz C (PKC)

2 izoformu I/R hasarında major rol oynamaktadır; PKCdelta I/R hasarına katkı sağlarken PKC epsilon izoformunun koruyucu etkisi mevcuttur (65).

-Mitojen aktive protein kinaz (MAPK)

Hücre büyümesi, proliferasyonu ve ölümünde önemli rol oynayan kinaz ailesidir. 3 major alt grubu mevcuttur; ekstraselüler sinyal-regüle kinazlar (ERKs)

alt grubunun koruyucu etkiler varken, c-Jun N-terminal kinaz (JNKs) ve p38 MAPKs alt gruplarının I/R hasarına katkısı mevcuttur (66).

-Reseptörle etkileşen protein kinazlar (RIPK)

RIPK1 ve RIPK3 isoformlarının I/R hasarı ve nekrotik hücre ölümünde rolleri mevcuttur.

2.2.5 Epigenetik Değişiklikler

-DNA metilasyonu sonrası birtakım koruyucu genlerin transkripsiyon aktivitelerinin baskılanarak inaktive olması, I/R hasarını indükleyen bazı genlerin ise demetilasyon ile aktive olması söz konusudur (67).

-Histon proteinlerinin, histon asetil transferaz enzimi aracılığı ile asetilasyonun I/R hasarında azaldığı görülmüştür (68).

-I/R hasarı sırasında artan non-coding RNA (ncRNA) nın mRNA translasyonunu inhibe edici etkisi mevcut. Yine I/R hasarı sırasında ekspresyonunda artış olan miRNA, mRNA ya bağlanarak gen ekspresyonunu inhibe etmektedir (69).

2.2.6 İnflamatuar Cevap

Normal şartlar altında mikroorganizmalara karşı savunma ve yara iyileşmesinde önemli rolü olan immün sistem, I/R hasarında da aktive olarak doku hasarının artmasından sorumlu tutulmaktadır. Bu tabloya steril inflamasyon adı verilmekte olup, iskemi sırasında gelişen nekroz ve hücre ölümü nedeniyle normalde hücre içinde bulunan ve immün sistem tarafından tanınmayan ATP, ısı-şok proteinleri, S100 proteinleri gibi moleküllerin ekstraselüler alana yayılması ve

immün sistemi aktive etmesi ile oluşmaktadır. Bu proteinler hasar ilişkili proteinler (damage associated molecular patterns-DAMPs) olarak adlandırılmaktadır. Aynı zamanda reperfüzyon sırasında dokuya gelen bol miktarda oksijen ve nötrofil lökositler, ROS üretimine neden olmaktadır. İskemik hücredeki kalsiyum birikimi ve oluşan ürik asit kristalleri-inflamazom etkileşimi sonrası salgılanan $TNF\alpha$ ve $IL-1\beta$ gibi proinflamatuvar sitokinler, bölgeye reperfüzyon sırasında gelen nötrofillerin aktive olması ve iskemik dokuya göç ederek daha fazla ROS üretimi ve salgıladıkları hidrolitik enzimler aracılığı ile artan doku hasarına neden olmaktadır (56,52).

I/R hasarı sırasında aktive olan ve hasarın artmasından sorumlu olan inflamatuvar sistem, 2 grupta incelenebilir;

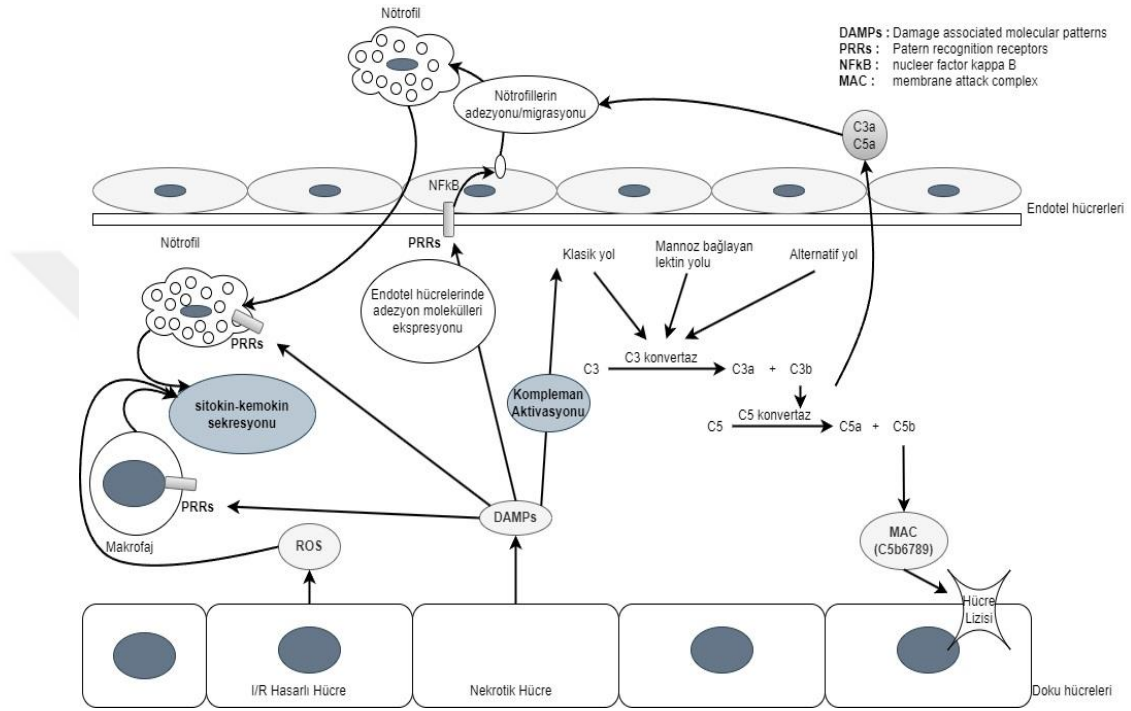
2.2.6.a Humoral Sistem:

Kompleman sistemi, sitokinler ve kemokinler bu grupta sayılabilir. I/R hasarı sırasında ortama salınan DAMPs molekülleri, kompleman sistemini klasik, alternatif ve mannoz bağlayan lektin yolları olmak üzere tüm yollardan aktive etmektedir. Bunun sonucunda membran atak kompleksi oluşturarak dokudaki makrofaj ve nötrofiller tarafından iskemik hücrenin lizisine neden olmaktadır. Aynı zamanda aktive olan kompleman elemanlarından $C3a$ ve $C5a$ güçlü nötrofil lökosit aktivatörleri olarak karşımıza çıkmaktadır (70).

$TNF\alpha$, I/R hasarı gelişiminde major rol oynayan pro-inflamatuvar sitokindir. İskemik hücrelerden ve aktive nötrofil lökositlerden de salınmakla birlikte major kaynağı dokuda bulunan makrofajlardır. Parakrin ve endokrin etkileri mevcuttur. Reseptörlerine bağlandığında daha fazla sitokin ve kemokin

üretimi, artmış ROS üretimi ve NFkB transkripsiyon faktörünü uyararak endotel hücrelerinde adezyon molekülü sentezini arttırmaktadır (71) (Şekil 12).

Şekil 12: I/R hasarında humoral mekanizmalar



2.2.6.b Hücresel Sistem:

b1 Endotel hücreleri:

Vasküler yatağın intima tabakasında bulunan endotelial hücrelerin homeostazisi sağlayan 4 ana fonksiyonu mevcut olup, I/R hasarında bu 4 fonksiyon da etkilenmektedir:

-Bariyer fonksiyonu: Kan ve doku arasında bariyer fonksiyonu gösteren endotel hücreleri, paraselüler geçirgenliği kontrol eden 2 major bağlantı ile birbirine bağlıdır; zonula occludens ve zonula adherens. I/R hasarı sırasında özellikle aktive lökositlerden salgılanan ROS, histamin, platelet aktive edici faktör (PAF), lökotrien B4 (LTB4), büyüme faktörleri ve proteazlar gibi moleküller bu

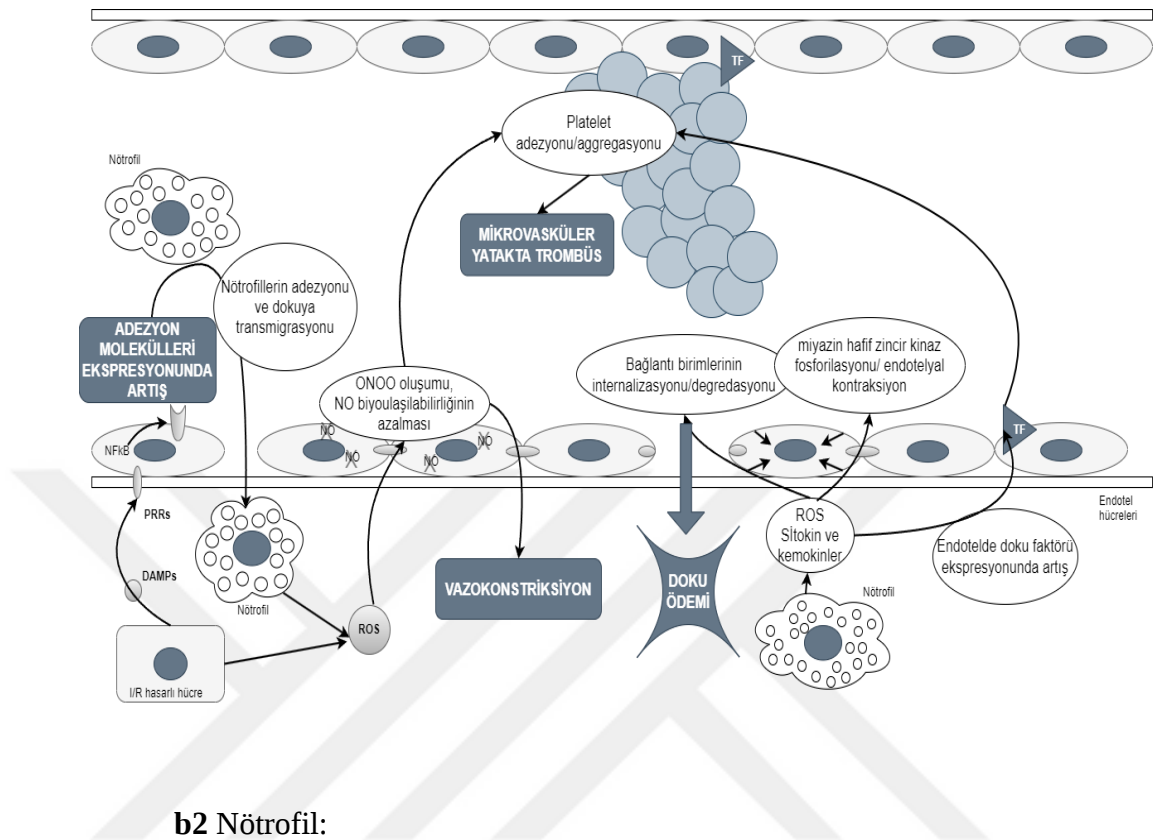
bağlantı noktalarının fosforilasyonu ile internalizasyonu-ayrışmasına neden olmaktadır. Aynı zamanda Ca bağımlı miyozin hafif zincir kinaz enzimini fosforile ederek hücresel kontraksiyona neden olmaktadır. Bu etkilerin birleşimi, endotel hücreleri arası boşlukların oluşmasına, bu da doku ödemi ve daha fazla inflamatuvar hücre göçü ile sonuçlanmaktadır (72) (Şekil 13) .

-Adezyon moleküllerinin ekspresyonu: I/R hasarının inflamatuvar ayağında rol oynayan en önemli hücre nötrofil olup, bunların iskemik dokuya migrasyonu, endotel hücrelerinin adezyon molekülü ekspresyonunu arttırması yolu ile olmaktadır (73) (Şekil 13) .

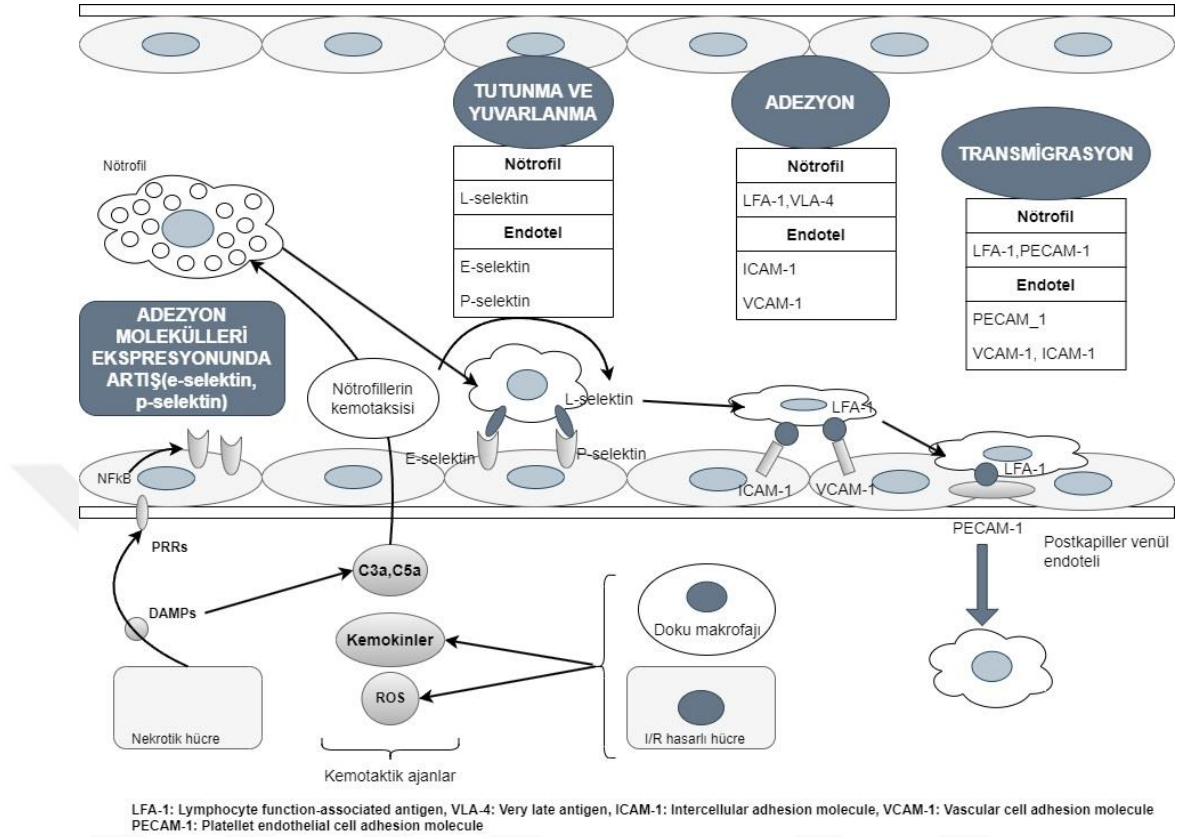
-Vasküler tonusun ayarlanması: Bu fonksiyonda rol oynayan en önemli molekül, endotel kaynaklı NO olup, I/R hasarında endotelial NOS aktivitesinde azalması ve NO moleküllerinin ROS tarafından toplanarak biyo-ulaşılabilirliğinin azalması sonucunda vasküler yatakta vazokonstriksiyon meydana gelmektedir (73) (Şekil 13).

-Hemostaz kontrolü: Normal şartlarda platelet ve koagülasyon faktörlerine bariyer görevi görerek ve fibrinolitik sistem aktivasyonu sayesinde antitrombotik bir ortam sağlayan endotel hücreleri, NO kaybı nedeniyle bu fonksiyonunu kaybetmektedir. Aynı zamanda inflamasyon ile uyarılan endotel hücrelerinde doku faktörü (TF) ekspresyonu artmaktadır. Bunun sonucunda platelet adezyon ve agregasyonu, pıhtılaşma faktörlerinin aktivasyonu gerçekleşmekte, mikrovasküler yatakta trombüs oluşumuna neden olmaktadır (74) (Şekil 13).

Şekil 13: I/R hasarında endotel disfonksiyonu mekanizmaları



I/R hasarının inflamasyon ayağında rol oynayan major hücreler olup, proinflamatuvar sitokinler tarafından uyarılan endotel hücreleri tarafından eksprese edilen adezyon molekülleri sayesinde adezyonu gerçekleştirmekte. Adezyon sonrası, perisitler ve endotel arası bağlantı bölgelerinde bulunan proteinler (JAM-A, JAM-C, PECAM-1) aracılığı ile postkapiller venüllerden dokuya migrasyonu gerçekleşmektedir. Aktive olarak dokuya göç eden bu nötrofiller tarafından salgılanan ROS, sitokin ve kemokinler (IL1, IL6, TNF α , IFN gama), lipid medyatörler (LTB4) ve proteazlar (elastaz, kollajenaz) doku hasarının artmasına neden olmaktadır (75) (Şekil 14).



b3 Platelet:

NO, prostasiklin gibi vazoprotektif medyatörlerin azalması, LTB4 gibi vazokonstriksiyona neden olan sitokinlerin artışı trombositlerde aktivasyon, Gp 1b ve Gp 2b/3a integrin reseptörleri aracılı adezyon ve agregasyonuna neden olmaktadır. Bölgeye gelen aktive trombositler salgıladıkları IL-1 β , hidrojen peroksit gibi sitotoksik moleküller, TGF β gibi proapoptotik moleküller nedeniyle doku hasarına katkıda bulunmaktadır. Aynı zamanda endotel hücrelerinden I/R sonrası yüzey ekspresyonu artan doku faktörü nedeniyle koagülasyon faktörlerinin aktivasyonu meydana gelmektedir (76).

b4 Mast Hücreleri:

Bünyesinde birçok metakromatik granül bulunduran mast hücreleri; ROS, kompleman komponentleri, LTB₄ gibi moleküller ile aktive olmaktadır. Aktive mast hücrelerinden salınan monoaminler (histamin, serotonin) doku ödeme, sitokinler (TNF α) artmış nötrofil göçüne, proteazlar ve heparin trombolizis ve hemorajiye neden olurken, salgıladığı IL10 gibi antiinflamatuvar sitokinler ile inflamasyonu sınırlandırmaktadır (77).

b5 Monosit-Makrofaj Hücreleri

I/R hasarında erken dönem doku hasarından sorumlu olan hücrelerdir. I/R sonrası oluşan ROS nedeniyle hücrelerden salgılanan High Mobility Group Box-1 (HMGB-1) ve onun ligandı olan Toll Like Receptör 4(TLR-4) etkileşimi ile aktive olurlar. Aynı zamanda C3a ve C5a elemanları tarafından da aktive olurlar. Aktive olduklarında ROS üretimi, proinflamatuvar sitokin üretimi ile doku hasarına neden olurlar (78).

Yüzeylerinde bulunan Fas ligandı (CD95L), nötrofiller üzerinde bulunan Fas (CD95) ile etkileşerek nötrofillerde apoptozisi başlatır. Aynı zamanda nötrofilleri fagosit eder. Bu etkileri ile birlikte nötrofil aracılı inflamasyonu sınırlandırır (78). Yüzeylerinde bulunan scavenger reseptörleri ile dokuya ekstravaze olup parçalanan eritrositlerdeki hem molekülünü toplar ve bünyesindeki hemoksijenaz enzimi ile parçalar, böylece hem aracılı oksidatif hasarı önler (79).

2.2.7 Hücre ölüm mekanizmaları

I/R hasarının indüklediği hücre ölümü, büyük oranda ekzojen faktörlere bağlı olan nekroz şeklinde olmakta olup, apoptozis ve otofaji gibi intrinsek mekanizmaların da katkısı söz konusu olmaktadır.

2.2.7.a Nekroz

Geri dönüşsüz hasar alan hücrelerde gerçekleşen hücresel şişme, mitokondriyal disfonksiyon, nükleer fragmentasyon kaybı, plazma zarı rüptürü ve intraselüler komponentin dışarı sızması ile karakterize olan hücre ölümüdür (80). Hücre dışına sızan ve normalde immün sistem tarafından tanınmayan damage associated molecular patterns(DAMPs), immün hücrelerde bulunan pattern recognition receptörs (PRRs) tarafından tanınarak inflamatuvar yanıtın tetiklenmesine yol açmaktadır. İyi tanımlanan DAMPs molekülleri; nükleer materyaller (HMBG1, IL1 α), sitoplazmik komponentler (ısı-şok proteinleri, ATP, S100 proteinleri) ve mitokondriyal bileşenler (mitokondriyal transkripsiyon faktör A,mtDNA) (81). Hücrenin baş edemediği stres mevcudiyetinde kontrolsüz bir şekilde olan bu sürecin, son yıllarda I/R sırasında RIPK1-RIPK3(receptor interacting protein kinase) nekrozom aracılı MLKL (mixed lineagekinase domain like) oligomerizasyonu sonrası hücre zarında permeabilite artışına neden olan porların oluşması ile programlı olarak da gerçekleştiği düşünülmekte, buna nekroptozis adı verilmektedir (82) (Şekil 15).

2.2.7.b Apoptozis

Programlı hücre ölümü olarak adlandırılan bu sürecin intrinsek ve ekstrinsek olarak 2 yolağı bulunmaktadır;

-İtrinsek yolak:

I/R hasarı nedeniyle oluşan oksidatif stresin oluşturduğu sitotoksik uyarı, hücre içinde Bcl2 (B-cell lymphoma-2) protein ailesi (Bax, Bak) aktivasyonuna ve mitokondri dış zarına yerleşmelerine neden olmakta. Sonuçta mitokondriden salınan pro-apoptotik moleküller (en önemlisi sitokrom c) sitozolik proteinlere bağlanarak apoptosome oluşumuna neden olmakta. Oluşan apoptozomlar caspase-9 ve caspase-3 proteaz sisteminin aktivasyonuna neden olarak hücre içindeki birçok proteinin proteolizine yol açmaktadır (83) (Şekil 15).

-Ekstresek yolak:

Hücre dışından gelen uyarılar ile Fas, TNF α ve TRAIL reseptörlerinin aktivasyonuna neden olmaktadır. Bu reseptör aktivasyonu, FADD, TRADD proteinlerine bağlanarak caspase-8 ve caspase-3 proteaz sisteminin aktivasyonuna neden olmakta, hücre içindeki birçok proteinin proteolizine yol açmaktadır (83) (Şekil 15).

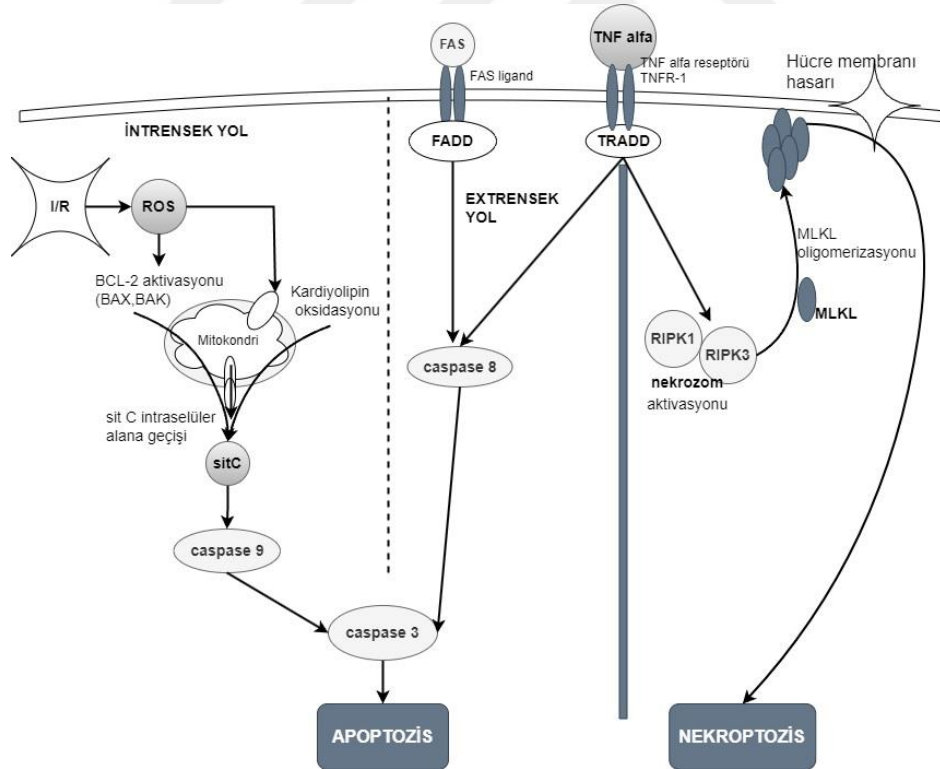
Bu yolaklar sonucunda hücre içi proteinleri ve organellerini kaybeden hücre küçülerek apoptotik cisimcik halini alır, makrofajlar tarafından fagosite edilerek temizlenir. Caspase yolağının inhibisyonu, hücreyi daha kaotik sonuçları olan nekrotik ölüme sürüklemektedir.

2.2.7.c Otofaji

Otofaji, hücrenin stresle karşılaştığında varlığını devam ettirebilmesi için temel olan bir mekanizmadır. Hücre hipoksi durumunda protein ve yağ asitlerini sindirerek enerji üretmesi, enfeksiyon durumunda mikroorganizmaların ortadan kaldırılması, hasarlı organellerin hücreden temizlenmesi durumlarında otofajiyi kullanmaktadır. Bu süreç, hücre ölümünden ziyade hücrenin hayatta kalma programıdır (84).

Ortadan kaldırılacak materyal etrafında oluşan membran katlantısı (fagofor) ile başlayan süreç, materyalin tamamen zarla kaplanması ile devam eder (otofagozom oluşumu). Oluşan otofagozom, lizozom ile birleşerek hidrolitik enzimler yardımı ile içeriğinin sindirilmesini sağlar. Bu yolağın temel kontrolörü mammalian target of rapamycin (mTOR) olup, otofajiyi inhibe etmektedir. I/R sırasında inhibe olan mTOR nedeniyle otofaji aktive olmaktadır. Artan otofajinin hücreyi ölüme götürdüğü yönünde görüşler mevcutken, otofaji inhibisyonu sonrası artan nekrotik hücre ölümünü gösteren çalışmalar da mevcuttur (84).

Şekil 15: I/R hasarında hücre ölüm mekanizmaları



2.2.8 Uzak Organ Hasarı

I/R hasarı sonrası doku hasarı sadece iskemiden etkilenen dokuda ile sınırlı kalmayıp, diğer organ ve sistemleri de etkilemektedir. Bu tablo akciğer, bağırsak,

karaciğer, böbrek, kalp ve iskelet kası gibi birçok organın I/R hasarından sonra oluşabilmektedir. Post-iskemik kan ile ilk karşılaşan yatak olması nedeniyle akciğer dokusu, uzak organ hasarına en yatkın doku olmaktadır (85).

İskemik dokudan ve lökosit gibi inflamatuvar hücrelerden salınan medyatörler bu tablodan sorumlu tutulmaktadır. İskemik dokudan dolaşıma salınan ksantin oksidaz enzimi (XO), uzak organ mikrovasküler yatağından reaktif oksijen türleri (reactive oxygen species-ROS) oluşumuna neden olmakta ve uzak organ hasarına yol açmaktadır. Yine iskemik dokudan dolaşıma katılan inflamatuvar sitokinler, uzak organda mikrovasküler yatak endotel hücrelerinde artan adezyon molekülü ekspresyonuna neden olmakta, bu da iskemik dokuda aktive olarak dolaşıma katılan lökositlerin uzak organa yerleşmesi ve immün hücre aracılı hasarı başlatmasına neden olmaktadır (85). Aynı zamanda, iskemik dokudaki TNF α aracılığı ile endotel hücreleri, plateletler ve lökositlerde oluşan; doku faktörü, PAF, kalpain gibi moleküller içeren membran kaynaklı mikropartiküller de dolaşıma katılarak uzak organ mikrovasküler yatağında proinflamatuvar ve trombojenik etkiler oluşturmaktadır (86).

2.2.9 No-Reflow Fenomeni

Dokuya yeterli kan akımının sağlanmasına rağmen büyük miktardaki kapiller yatağın reperfüze olamaması şeklinde ortaya çıkar. Bu fenomen, sadece I/R hasarının neden olduğu mikrovasküler yataktaki trombüs formasyonuna bağlanmamalıdır. No-reflow fenomeni ile ilişkili diğer mekanizmalar;

- Reperfüzyon sırasında aktive olan ve dokuya göç eden nötrofillerin mikrovasküler yatağı tıkaması (87),

-Endotelin bariyer fonksiyonunun bozulması ile birlikte doku hidrostatik basıncının artarak kapiller yatak ve postkapiller venüllerde kollapsa neden olması (87),

-Hücre içi artan Ca nedeniyle gelişen ve protektif NO kaybı nedeniyle artan perisit kontraksiyonu ile birlikte mikrovasküler yatağın çapının azalması şeklinde tanımlanabilir (87).

2.3 Antioksidan Savunma Sistemi

I/R sırasında oluşan ROS ve RNS karşı hücrelerin de enzimatik ve enzimatik olmayan antioksidan savunma sistemleri mevcuttur. I/R hasarını oluşmasında, bu antioksidan mekanizmaların kapasitelerinin aşılması söz konusudur.

2.3.1 Enzimatik antioksidan sistem

ROS'a karşı en önemli savunma sistemi olan antioksidan enzimler katalaz (CAT) ve süperoksit dismutaz (SOD) olmaktadır (88).

2.3.1.a Süperoksit Dismutaz (SOD):

Süperoksit anyonunun su ve moleküler oksijene dismutasyonunu katalizleyen enzimdir. Sitozolde bulunan bakır-çinko içeren isoformu (Cu-Zn-SOD), mitokondride bulunan ve manganez gerektiren izoformu (Mn-SOD) ve ekstraselüler bakır-çinko içeren isoformu (EC-SOD) olmak üzere 3 izoformu bulunur (88) (Şekil 16).

2.3.1.b Katalaz (CAT):

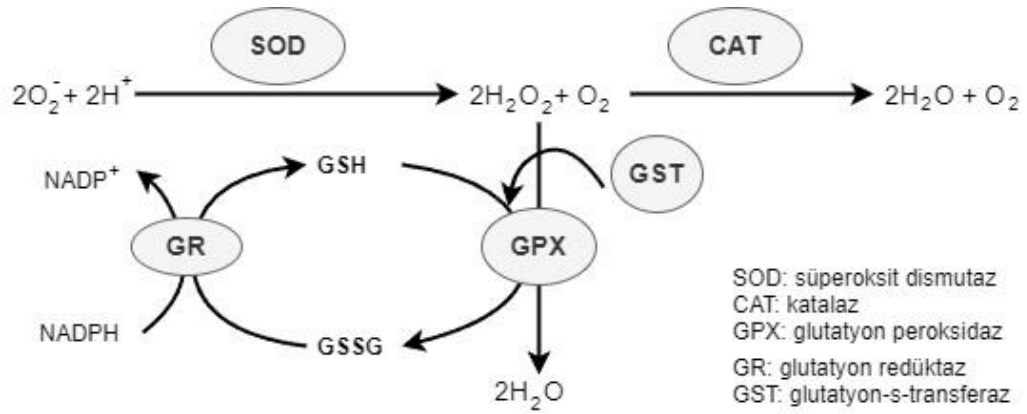
Hidrojen peroksitin hidrolizinden sorumlu olan birçok enzim mekanizması bulunurken, tetramerik hem proteini olan katalaz, konsantrasyon bağımlı hidroliz sağlamaktadır. I/R hasarında artan hidrojen peroksit ile birlikte katalazın indüklediği detoksifikasyon aktivitesi oldukça önemli hale gelmektedir (89) (Şekil 16).

2.3.2 Non-enzimatik antioksidan sistemi

Glutasyon, non-enzimatik antioksidan sistemde anahtar molekül olup, hücrede genellikle redükte halde bulunur (GSH). Glutasyon redüktaz (GPX) ve glutasyon-S-transferaz (GST) ile birlikte glutasyon sistemini oluştururlar. Bir tripeptit (gama glutamil-sisteinil-glisin) olan glutayon, sitozolde gama-glutamilsistein sentetaz ve glutasyon sentetaz enzimleri aracılığı ile üretilir. İçerdiği sistein nedeniyle proteinlerin disülfid bağlarının düzenlenmesinde büyük rol oynamaktadır ve potent bir antioksidan moleküldür (90).

Redükte glutasyon, oksidatif stres durumunda GST ve GPX enzimleri aracılığı ile okside olarak okside glutasyon (GSSG) formuna dönüşmekte, glutasyon redüktaz (GR) enzim aktivitesi ile ise redükte formuna geri dönmektedir. Bu geri dönüşümlü oksidasyon-redüksiyon tepkimeleri, hücrenin uygun redox dengesinin sağlanmasına önemli bir faktör olmaktadır (90) (Şekil 16).

Şekil 16: Enzimatik ve enzimatik olmayan antioksidan sistemi



2.4 Furosemid

Furosemid, 4-chloro-N-(2-furyl-methyl)-5-sulfamoyl-an-thranilic asit, zayıf organik asit yapısında olan potent bir loop diüretiktir. %85 kadarı böbrekler tarafından metabolize edilerek ve sekrete edilerek vücuttan atılır. Büyük oranda plasma proteinlerine bağlanır (>%98), bu nedenle hipoalbuminemi gibi hipoproteinemiler ve proteine bağlanan diğer medikasyonlarla birlikte tübüler sekresyonu ve diüretik etkinliği azalır. Henle kulbunun çıkan kolunda intralüminal yüzeye yerleşimli Na-K-2Cl kotransporterını inhibe ederek diüretik etkisini gösterir (91). Pik diüretik etkisini oral alımdan 1- 1.5 saat sonra, iv uygulamadan 10-30dk sonra göstermekte olup yarı ömrü 1- 1.5 saat olmaktadır (92).

3.GEREÇ VE YÖNTEM

3.1 Gereç

3.1.1 Deney Hayvanları

Erişkin, dişi Wistar cinsi, ortalama 300gr ağırlıkta 24 adet rat deney için kullanıldı. Hayvanlar GÜDAM- Laboratuvar Hayvanları Yetiştirme ve Deneysel Araştırma Merkezi' nden temin edildi.

3.1.2 Etik Beyanı

Deneysel çalışmanın tasarımı ve hayvanlar üzerinde uygulanacak prosedürler Gazi Üniversitesi Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurul Başkanlığı tarafından onaylanmıştır (kod numarası: G.Ü.ET-22.058, onay tarihi: 27.04.2022). Deneyler sırasında kullanılan hayvan sayısını minimize etmek ve acı çekmelerini engellemek için yüksek düzeyde çaba gösterilmiştir.

3.1.3 Deneyin Tasarımı

Ratlar rastgele olarak 4 gruba ayrıldı (n=6);

Grup 1: sham opere (SHAM)

Grup 2: 45 dakika iskemi-2 saat reperfüzyon (IR)

Grup 3:4mg/kg iv furosemid,(Furosemid)

Grup 4: 45 dakika iskemi- 2 saat reperfüzyon + 4mg/kg iv furosemid
(IR+F)

3.1.4 İlaç Pozolojisi

Furosemid ile yapılan daha önceki I/R çalışmaları oral, intraperitoneal, iv infüzyon şeklinde farklı veriliş yolları ve farklı pozolojiler kullanılmış olup, bu çalışmada karar verilen 4mg/kg intravenöz furosemid uygulaması, veterinerlik textbooklarında yer alan terapötik dozlara göre ayarlanmıştır (93). Furosemid, Sanofi Aventis firması tarafından üretilen ticari formu (LASIX®) şeklinde temin edilmiştir.

3.1.5 Atravmatik bulldog klemp

Bulldog klemp, ilk kez Johann Dieffenbach ve Robert Liston isimli cerrahlar tarafından geliştirilmiş olan, genellikle vasküler cerrahilerde kullanılan, koyulan damarın kan akışını keserek üzerinde cerrahi işlem yapmayı sağlayan bir forseps çeşididir. Atravmatik kavramı koyulan damara, içindeki kan akışını kesecek minimal kuvvet uygulaması, damar duvarına minimal hasar oluşturması, kaldırıldığında ise tekrar kan akışına izin vermesi nedeni ile kullanılmaktadır. Yapıldığı materyallere göre metal ve disposable (Resim 1) şeklinde çeşitleri mevcuttur. Bu çalışmada disposable olanlar kullanılmıştır.

Resim 1: Metal (a) ve disposable (b) atravmatik bulldog klemp



3.2 Yöntem

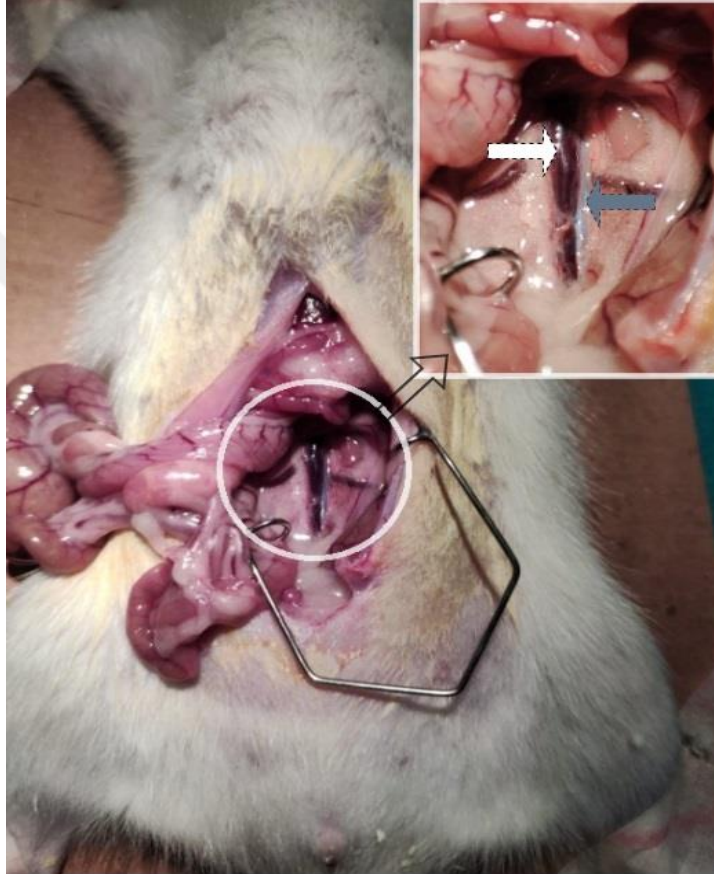
3.2.1 Deneyel iskemi-reperfüzyon hasarı oluşturulması

Institutional Animal Care and Use Comitte kılavuz önerisine göre ratlara açlık uygulanmamıştır, suya sınırsız erişim sağlanmıştır. Ratlara, yine kılavuz önerisine göre 90mg/kg ketamin+5mg/kg ksilazin kombinasyonun intraperitoneal olarak uygulanarak anestezi sağlanmış, anestezi derinliği başını kaldıramaması, göz kırpmaya refleksinin kaybolması ve alt ekstremiteler başparmağına uygulanan kısma refleksine yanıtsızlık ile değerlendirilmiştir. Daha sonra ratlar, vücut ısılarını 37 C°'de tutmak için ısıtıcı masaya alınmıştır. Deney süresince anestezi derinliği, solunum paterni ve hızı (inspeksiyon ile), kalp hızı (palpasyon ile) aralıklı olarak değerlendirilmiştir. Karın bölgesindeki tüylerin tıraşı sonrası baticon ile cilt antisepsisi sağlandı. Ardından gruplar halinde deney prosedürü aşağıdaki şekilde uygulandı;

Grup 1-SHAM: Medyan laparotomi ile batin açılarak abdominal aorta ve inferior vena cava bulundu (Resim 2-A), abdominal aortanın çevresi serbestleştirildi. 45 dk sonra 0,3 cc %0,9 NaCl insülin enjektörü ile kuyruk veninden enjekte edildi, deneyin 2 saat 45.dakikasında rat yüksek doz anestezi+ kalpten alınan kan ile(exanguisyon) sakrifiye edilerek bilateral gastrokinemus kasları çıkartıldı. Toplanan kan örnekleri sarı kapaklı tüpler ile biyokimya laboratuvarına gönderilerek, santrifüj sonrası elde edilen serumdan TNF α ölçümü yapıldı. Sol gastrokinemus kası, histopatolojik inceleme için %10 formaldehit ile muamele edildi. Sağ gastrokinemus kası, doku homojenatında malondialdehit(MDA) değeri ile katalaz (CAT) ve glutatyon-s-transferaz (GST)

enzim aktivitesi değerlendirilmesi için %0,9 NaCl ile yıkandıktan sonra -80°C 'de dondurularak biyokimya laboratuvarına gönderildi.

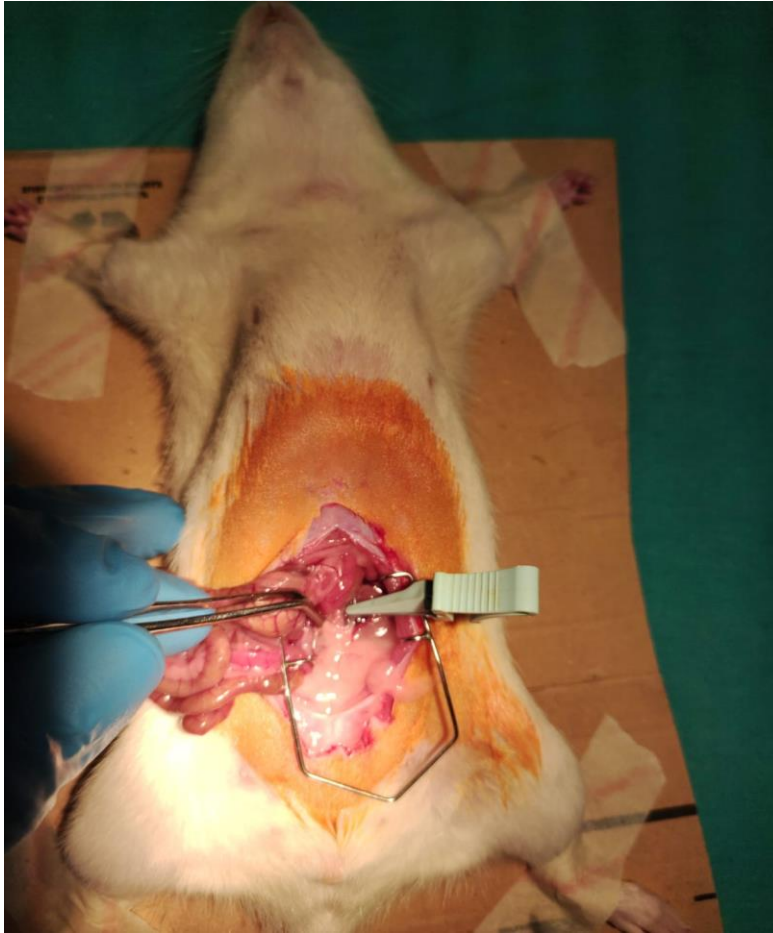
Resim 2-A: Laparotomi sonrası inferior vena cava (beyaz ok) ve abdominal aortanın (gri ok) bulunması



Grup 2-IR: Medyan laparotomi ile batın açılarak abdominal aorta ve inferior vena cava bulundu, abdominal aortanın çevresi serbestleştirildi. Aortaya atravmatik bulldog klemp yerleştirilerek (Resim 2-B) 45 dakika sürecek iskemi periyodu başlatıldı. 45. dakikada 0,3 cc %0,9 NaCl insülin enjektörü ile kuyruk veninden enjekte edildi, sonrasında bulldog klemp kaldırılarak 2 saat reperfüzyon sağlandı. Deneyin 2 saat 45.dakikasında rat yüksek doz anestezi+ kalpten alınan kan ile(exanguisyon) sakrifiye edilerek bilateral gastrokinemus kasları çıkartıldı.

Toplanan kan örnekleri sarı kapaklı tüpler ile biyokimya laboratuvarına gönderilerek, santrifüj sonrası elde edilen serumdan TNF α ölçümü yapıldı. Sol gastrokinemus kası, histopatolojik inceleme için %10 formaldehit ile muamele edildi. Sağ gastrokinemus kası, doku homojenatında malondialdehit(MDA) değeri ile katalaz (CAT) ve glutatyon-s-transferaz (GST) enzim aktivitesi değerlendirilmesi için %0,9 NaCl ile yıkandıktan sonra -80°C 'de dondurularak biyokimya laboratuvarına gönderildi.

Resim 2-B:Abdominal aortaya bulldog klem yerleştirilerek iskemi periyodunun başlatılması



Grup 3-Furosemid: Medyan laparotomi ile batın açılarak abdominal aorta ve inferior vena cava bulundu, abdominal aortanın çevresi serbestleştirildi. 45.

dakikada 4mg/kg furosemid(LASIX®) insülin enjektörü ile kuyruk veninden enjekte edildi, deneyin 2 saat 45.dakikasında rat yüksek doz anestezi +kalpten alınan kan ile(exanguisyon) sakrifiye edilerek bilateral gastrokinemus kasları çıkartıldı. Toplanan kan örnekleri sarı kapaklı tüpler ile biyokimya laboratuvarına gönderilerek, santrifüj sonrası elde edilen serumdan TNF α ölçümü yapıldı. Sol gastrokinemus kası, histopatolojik inceleme için %10 formaldehit ile muamele edildi. Sağ gastrokinemus kası, doku homojenatında malondialdehit(MDA) değeri ile katalaz (CAT) ve glutatyon-s-transferaz (GST) enzim aktivitesi değerlendirilmesi için %0,9 NaCl ile yıkandıktan sonra -80°C 'de dondurularak biyokimya laboratuvarına gönderildi.

Grup 4-IR+F: Medyan laparotomi ile batın açılarak abdominal aorta ve inferior vena cava bulundu, abdominal aortanın çevresi serbestleştirildi. Aortaya atravmatik bulldog klemp yerleştirilerek 45 dakika sürecek iskemi periyodu başlatıldı. 45. dakikada 4mg/kg furosemid(LASIX®) insülin enjektörü ile kuyruk veninden enjekte edildi, 45 dakika iskemi periyodu tamamlandıktan sonra bulldog klemp kaldırılarak 2 saat reperfüzyon sağlandı. Deneyin 2 saat 45. Dakikasında rat yüksek doz anestezi + kalpten alınan kan ile(exanguisyon) sakrifiye edilerek bilateral gastrokinemus kasları çıkartıldı. Toplanan kan örnekleri sarı kapaklı tüpler ile biyokimya laboratuvarına gönderilerek, santrifüj sonrası elde edilen serumdan TNF α ölçümü yapıldı. Sol gastrokinemus kası, histopatolojik inceleme için %10 formaldehit ile muamele edildi. Sağ gastrokinemus kası, doku homojenatında malondialdehit(MDA) değeri ile katalaz (CAT) ve glutatyon-s-transferaz(GST) enzim aktivitesi değerlendirilmesi için %0,9 NaCl ile yıkandıktan sonra -80°C 'de dondurularak biyokimya laboratuvarına gönderildi.

3.2.2 Kan örnekleme ve serum hazırlanması

Reperfüzyon periyodunun sonunda, rat kalbinden alınan kanlar sarı biyokimya tüplerine konularak 3.500 rpm de 15 dk santrifüj edildi, ayrılan serum örneklerinden TNF α ölçümü yapıldı.

3.2.3 Doku örnekleme

Sakrifiye edilen ratların bilateral gastrokinemus kası çıkartıldı. Sol gastrokinemus kası histopatolojik inceleme için %10 formaldehit çözeltisine konularak histoloji laboratuvarına gönderildi. Sağ gastrokinemus kası soğuk SF ile yıkandıktan sonra alüminyum folyoya sarılıp sıvı azotta donduruldu ve analizlerin yapılacağı güne kadar -80 °C’de muhafaza edildi. Deney günü kas dokuları hassas terazide tartılarak 1/6 oranında (m/v) SF içerisinde yaklaşık 2 dk homojenize edildi. Elde edilen homojenat, +4 °C’de 10 dk 3000 rpm de santrifüj edildi. Süpernatantlar porsiyonlanarak eppendorf tüplere alındı. Deney aşamasında lipid peroksidasyonunu değerlendirmek amacıyla malondialdehit (MDA) seviyesi ile serbest radikal metabolizmasında etkin olan enzimlerden katalaz (CAT) ve glutatyon-s-transferaz (GST) enzim aktivite ölçümleri yapıldı.

3.2.4 TNF α ölçümü

TNF α , santrifüj edilen kandan ayrılan plazmadan ELISA tekniği kullanılarak ölçüldü. Sonuçlar pg/ml cinsinden ifade edildi.

3.2.5 Lipid peroksidasyonu ölçümü

Lipid peroksidasyonu sırasında oluşan bir yan ürün olan ve oksidatif stres belirteci olan malondialdehit (MDA), Van Ye TM ve arkadaşlarının (1993) metodu ile analiz edildi. TBARS ölçümü, 2 mol TBA ve 1 mol MDA' nın asidik ortamda birleşerek oluşturduğu mor renkli TBA-MDA kompleksinin absorbans değerinin 532 nm'de spektrofotometrik ölçümü ile yapıldı.

Reaktifler

1. Fosfat Tamponu (100 mM, pH:6,0)

1.%20'lik TCA Çözeltisi

3.%2'lik TBA Çözeltisi

Sonuçlar, MDA standartı olarak kullanılan 1,1,3,3- Tetraetoksi propanla çizilen standart grafiğin eğiminden yararlanılarak nmol/mg protein olarak verildi.

3.2.6 Glutasyon-S-Transferaz (GST) seviyesi ölçümü

GST aktivite tayini Habig ve arkadaşlarının (1974) tarif ettiği metoda göre GST' nin katalizlediği bir reaksiyon olan, $CDNB + GSH \rightarrow CDGNS + H^+ + Cl^-$ esnasında oluşan CDGNS bileşiğinin 340 nm dalga boyundaki absorbans artışından hesaplandı.

Reaktifler

1.Fosfat Tamponu (100 mM, pH: 6,0)

2.CDNB Çözeltisi

3.GSH Çözeltisi

Sonuçlar, CDNB-GS kompleksinin ϵ değerinden yararlanılarak (ϵ : 10 M⁻¹ cm⁻¹) IU/mg protein olarak ifade edildi.

3.2.7 Katalaz (CAT) aktivitesi ölçümü

Katalaz tarafından katalizlenen $\text{H}_2\text{O}_2 \rightarrow \text{O}_2 + \text{H}_2\text{O}$ reaksiyonu sonucunda moleküler oksijen ve suya dönüşen hidrojen peroksitin 240 nm'deki absorbans değişimi Aebi yöntemi (1984) esas alınarak spektrofotometrik olarak takip edildi. Her bir numune için absorbans değişimi hesaplanarak H_2O_2 'nin ϵ değerinden enzim aktivitesi hesaplamaları yapıldı. Sonuçlar IU/mg protein olarak verildi.

Reaktifler

- 1.Fosfat Tamponu (50mM, pH:7,0)
- 2.Tamponlanmış H_2O_2 Çözeltisi

3.2.8 Histopatolojik değerlendirme

Deneklerden alınan gastrokinemus kas dokusu örnekleri %10 nötral formaldehit solüsyonunda 72 saat tespit edilerek rutin takip işlemlerinin ardından parafin bloklar elde edildi.

Histokimyasal olarak Hematoksilen-Eozin boyama gerçekleştirildi ve kesitler çizgili kas dokusu üzerinde histopatolojik olarak değerlendirildi. Çalışmanın histopatolojik inceleme süreci Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı bünyesindeki imkanlar ile yürütülmüş olup, tüm deneysel protokoller için gerekli teçhizat ilgili laboratuvarlarda bulunmaktadır.

3.2.8.a Işık mikroskopisi takip basamakları ve bloklama:

Deneklerin diseksiyonu sonrasında çıkarılan dokular %10'luk formaldehitte tespit edildi.

Ardından aşağıdaki işlem basamaklarına riayet edilerek dokular takibe alındı.

1. Tespit solüsyonun uzaklaştırılması-yıkama
2. %50 etil alkol (20 dk)
3. % 70 etil alkol (20 dk)
4. % 80 etil alkol (20 dk)
5. % 96 etil alkol (20 dk)
6. Aseton I (20 dk)
7. Aseton II (20 dk)
8. Aseton III (20 dk)
9. Aseton IV (20 dk)
10. Ksilol I (30 dk)
11. Ksilol II (30 dk)
12. 60°C derecelik etüvde erimiş parafin I’de (1 saat)
13. Parafin II (1 saat) de bekletildi ve bloklama yapıldı.
14. Parafin içinde bloklama

Hazırlanan bloklardan 4 mikron kalınlığında kesitler alınarak histokimyasal boyama ve işaretlemeler yapma aşamasına geçildi.

3.2.8.b Hematoksilen-Eozin boyama protokolü

Lama alınan kesitlerin üzerindeki parafinin erimesi için etüvde 70 °C’de 20 dakika ya da 60 °C’de bir gece boyunca bekletildi. Hazırlanan parafin bloklardan 4 µm kalınlığındaki gastrokinemus kası dokuları polilizinli lamlara alınarak 62°C’ deki etüvde 1 saat bekletildi. Lamlar deparafinizasyonu tamamlamak için 2 kez 15’şer dakika ksilende bekletildi. Daha sonra 10’ar dakika

sırasıyla %100, %96, %90, %80 ve %70'lik alkol serilerinden geçirildi. Boyama işlemine hazırlamak için dehidrate edilen dokuları alkolden arındırmak için kesitler önce havada alkol uçana kadar kurutulduktan sonra 10 dakika akar suda yıkandı. Ardından 10-15 dakika Harris Hematoksilen'de bekletildi ve 10 dakika akar suda yıkandı. Yıkama sonrası asit alkol karışımına (%70 alkol + 2-3 damla Glasiyal asetik asit) batırılarak 2-3 dip yapıldı ve 10 dakika akar suda yıkandı. Ardından 5-10 dakika Eozin'de bekletildi ve 10 dakika akar suda yıkandı. Yıkama sonrası 2'şer dakika artan alkol serileride (sırasıyla % 50-70-80-96-100 etil alkol) bekletildi. Alkolden alınan preparatlar havada alkolü uçuncaya kadar kurutulup 2 kez 15'er dakika Ksilolde bekletildi ve Entellan ile kapatılıp daimî hale getirildi. Dokuda bulunan hücrelerin nükleusu Harris hematoksilen ile mor, sitoplazmik kısımları eozin ile pembe boyandı.

Kesitler Leica DM 4000 (Germany) bilgisayar destekli görüntüleme sisteminde, Leica Q Vin 3 programında fotoğrafları çekilerek değerlendirildi. Değerlendirmeler sonunda Çizgili kas dokusu preparatları üzerinde kas kalınlığı ölçümü yapıldı ve meydana gelen histopatolojik parametreler incelenerek doku ödemi, lökosit infiltrasyonu, hemoraji ve miyosit hasarı açısından değerlendirilerek doku hasarı negatif (0), zayıf (1), orta (2) ve şiddetli (3) olmak üzere skora yapıldı.

3.2.9 İstatistiksel analiz

Çalışmanın analizleri SPSS 21.0 paket programında yapılmıştır. Kategorik değişkenler sayı, yüzde, sürekli sayısal değişkenler ortalama $\pm$ standart sapma, median (minimum – maksimum) değerleri ile özetlenmiştir. Kategorik

değişkenlerin gruplar arasında karşılaştırmasında Ki-kare testi testi kullanılmıştır. Sürekli sayısal değişkenlerin normal dağılıma uygunluğu Shapiro Wilk testi ile kontrol edilmiştir. Gruplar arasında sayısal verilerin normal dağılmadığı belirlenmiştir. Sürekli sayısal değişkenlerin ikiden fazla grup arasında karşılaştırmasında Kruskal Wallis testi kullanılmıştır. İstatisel olarak anlamlılığın kaynaklandığı grupların belirlenmesinde Bonferroni düzeltmesi yapılarak p değerleri sunulmuştur. İstatistiksel olarak p değerinin 0,05'ten küçük olması anlamlılık sınırı olarak kabul edilmiştir.

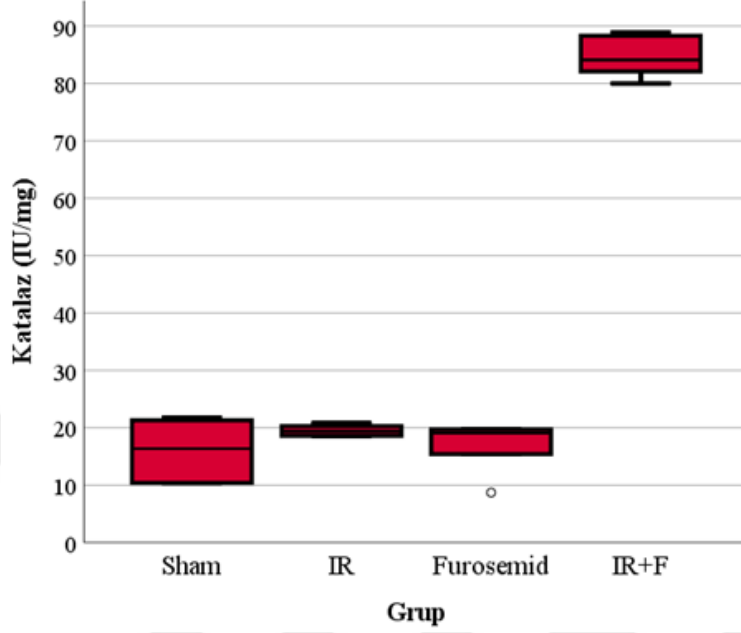
4. BULGULAR

4.1 Biyokimyasal Bulgular

TNFalfa sonuçları eşik değerin altında çıkmış olup, kit tarafından ölçülememiştir.

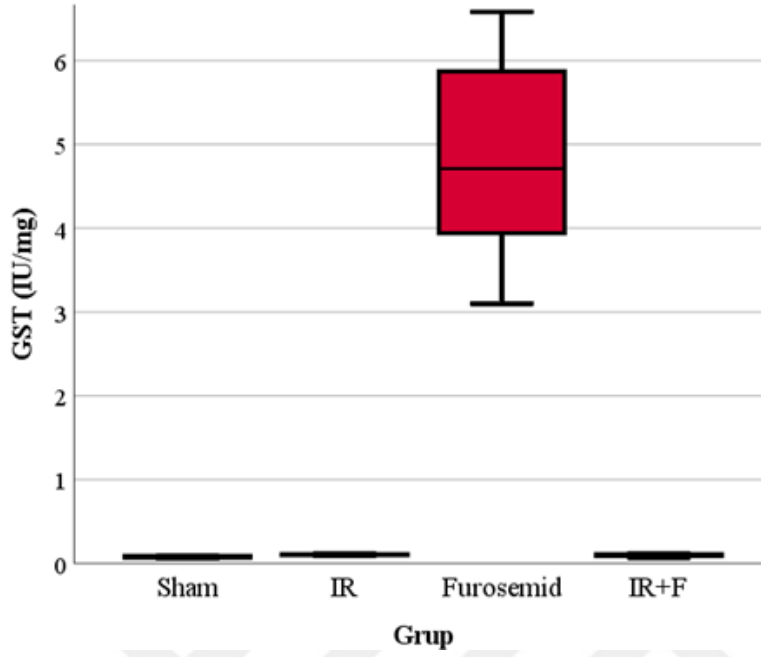
Sham grubu ve Furosemid grubu ile karşılaştırıldığında IR+F grubunda katalaz düzeyi istatistiksel olarak anlamlı düzeyde daha fazlaydı (sırasıyla $p = 0,002$, $p = 0,002$). IR grubu ile karşılaştırıldığında IR+F grubunda katalaz düzeyi istatistiksel olarak anlamlı düzeyde fazlaydı ($p = 0,002$). Diğer gruplar arasında katalaz düzeyi bakımından anlamlı fark yoktu ($p > 0,05$) (Grafik 17) (Tablo 8).

Grafik 1: Gruplar arası katalaz düzeyi dağılımı



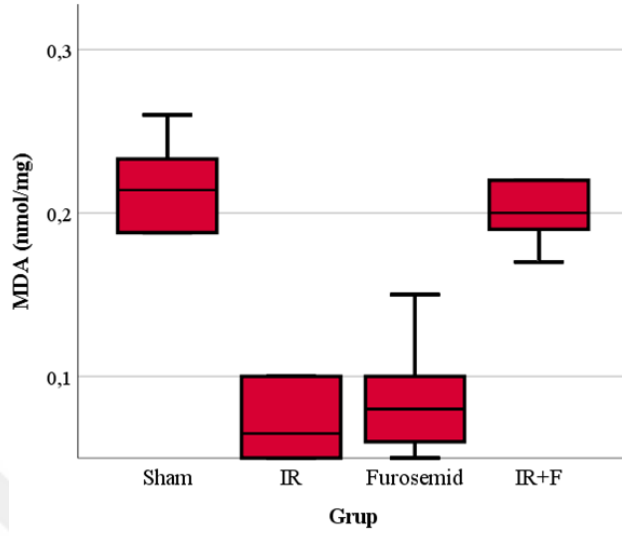
Sham grubu ile karşılaştırıldığında Furosemid grubunda GST düzeyi istatistiksel olarak anlamlı düzeyde daha fazlaydı ($p=0,002$). GST düzeyi açısından karşılaştırıldığında IR grubu ve IR+F grubu arasında istatistiksel olarak anlamlı fark bulunmadı ($p=0,699$). Diğer gruplar arasında GST düzeyi bakımından anlamlı fark yoktu ($p>0,05$) (Grafik 18) (Tablo 8).

Grafik 2: Gruplar arası GST düzeyi dağılımı



Sham grubu ile karşılaştırıldığında IR ($p = 0,002$) ve furosemid grubunda ($p = 0,002$) MDA düzeyi istatistiksel olarak anlamlı düzeyde daha azdı. IR grubu ile karşılaştırıldığında IR+F grubunda MDA düzeyi anlamlı düzeyde daha fazlaydı ($p = 0,002$). Diğer gruplar arasında MDA düzeyi bakımından anlamlı fark yoktu ($p > 0,05$) (Grafik 19) (Tablo 8).

Grafik 3: Gruplar arası MDA düzeyleri dağılımı



Tablo 8: Gruplar arası biyokimyasal sonuçların karşılaştırılması

Parametreler	Sham (n = 6)	IR (n = 6)	Furosemid (n = 6)	IR+F (n = 6)	p
Katalaz (IU/mg)	16,1 ± 5,13a	19,52 ± 0,91a	16,93 ± 4,35a	84,58 ± 3,47b	0,003
	16,35 (10,4 - 21,8)	19,4 (18,6 - 20,8)	19,05 (8,7 - 19,7)	84,1 (80 - 88,9)	
GST (IU/mg)	0,08 ± 0,01a	0,1 ± 0,01a,b	4,82 ± 1,27b	0,1 ± 0,02a,b	0,001
	0,08 (0,06 - 0,09)	0,1 (0,09 - 0,12)	4,71 (3,1 - 6,58)	0,1 (0,07 - 0,12)	
MDA (nmol/mg)	0,22 ± 0,03a	0,07 ± 0,02b	0,09 ± 0,04b,c	0,2 ± 0,02a,c	0,001
	0,21 (0,19 - 0,26)	0,07 (0,05 - 0,1)	0,08 (0,05 - 0,15)	0,2 (0,17 - 0,22)	

Veriler ortalama ± standart sapma ve median (minimum – maksimum) değerleri ile özetlenmiştir.

Karşılaştırmalarda Kruskal Wallis testi kullanılmıştır. İkili karşılaştırmalarda Bonferroni düzeltmesi yapılmıştır.

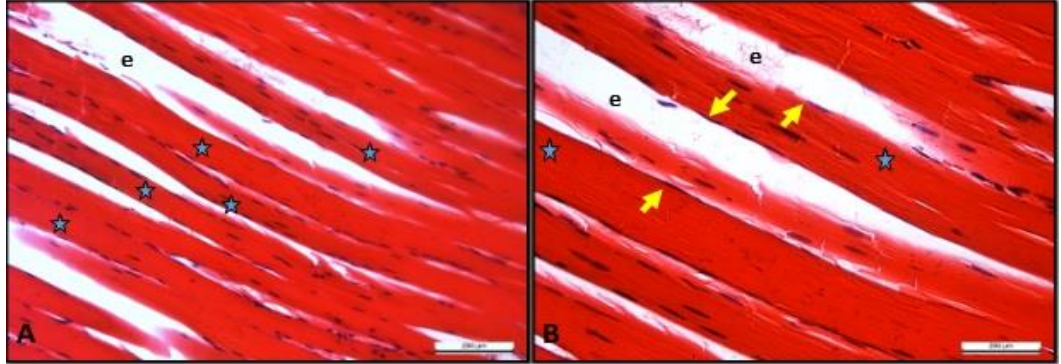
a,b,c: Farklı harfle gösterilen kategoriler arasında istatistiksel olarak anlamlı fark vardır(p<0,005).

GST: Glutasyon-s-transferaz, MDA: Malondialdehit

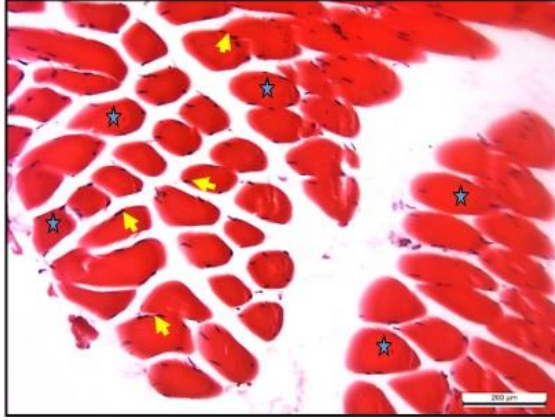
4.2 Histopatolojik Bulgular

4.2.1 Grup 1: SHAM Kontrol

Sham opere grubu gastrokinemius kasına ait longitudinal ve enine alınan kesitler üzerinde yapılan küçük ve büyük büyütme incelemelerde uzun kas liflerinin normal histolojik görüntüleri ile örtüşen şekilde birbirleriyle paralel yerleşim gösterdikleri, hücre çekirdeklerinin sarkolemma altında yerleştirdikleri ve normal miyofibril organizasyonlarının bir göstergesi olarak sarkoplazmanın enine çizgilenme gösterdiği ayırt edildi. Kas liflerini çevreleyen endomisyum yapısı normal görünümdeydi (Resim 3-1 ve 3-2).



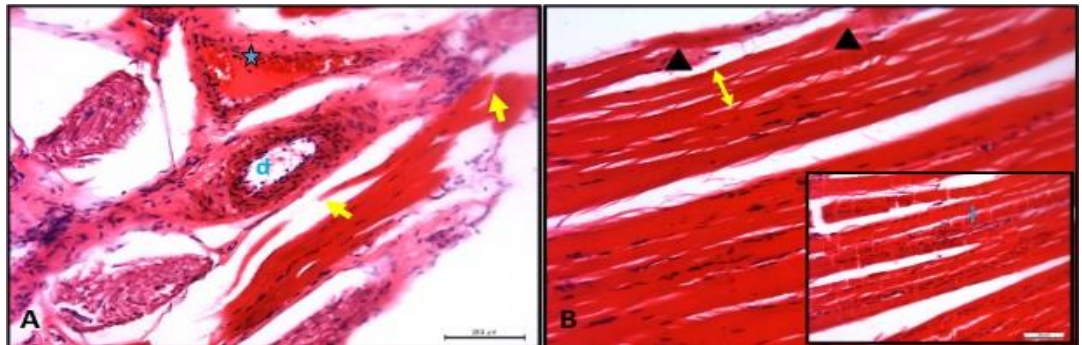
Resim 3-1: Sham opere grubu gastrokinemius kasına ait longitudinal kesitte birbirleri ile paralel yerleşimli normal histomorfolojik görünümdeki kas lifleri, (E: endomisyum, → : sarkolemma altında yerleşim gösteren nükleus, *: miyofibril) (Hematoksilen-Eozin boyama, A resmi için 200x büyütme, B resmi için 400x büyütme)



Resim 3-2: Sham opere grubu gastrokinemius kasına ait enine kesitte normal histomorfolojik görünümdeki kas fasikülleri (→ : sarkolemma altında yerleşim gösteren nükleus, *: miyofibril) (Hematoksilen-Eozin boyası, 200x büyütme)

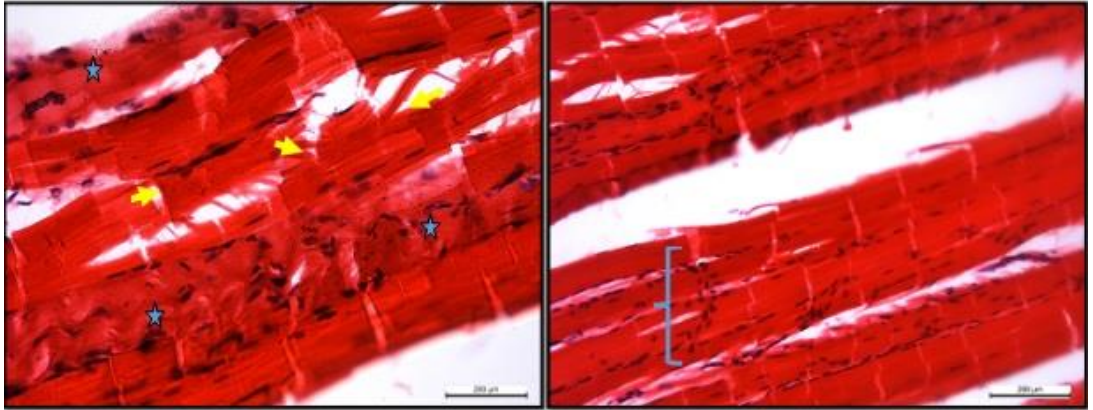
4.2.2 Grup 2: İskemi Reperfüzyon Grubu-IR

İskemi reperfüzyon grubu gastrokinemius kasına ait longitudinal ve enine kesitler üzerinde yapılan küçük büyütme incelemelerde kas liflerini çevreleyen bağ dokuda kas lifinin normal organizasyonunu bozacak şekilde yoğun fibrozis tespit edildi. Bağ dokuda yoğun infiltrasyon, vasküler dilatasyon ve bazı damarlarda hemoraji dikkati çekti (Resim 4-1)

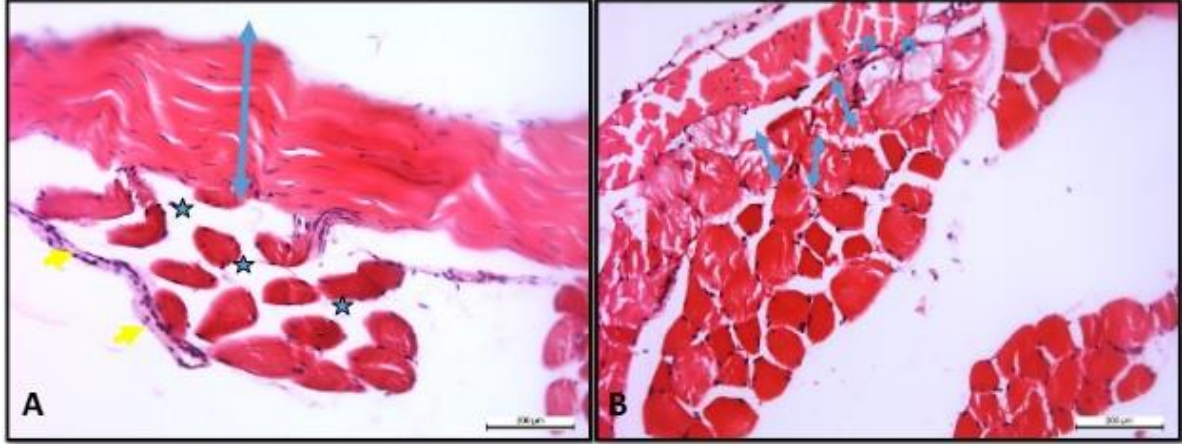


Resim 4-1: İskemi reperfüzyon grubu gastrokinemius kasına ait longitudinal kesitte normal histomorfolojik görünümü bozulmuş kas lifleri(→), vasküler dilatasyon (d) ve hemoraji ile nükleus kaybı olan kas lifleri(↔), periferde yerleşim gösteren kas lifinde hasar (▲) ve yoğun infiltrasyon (i) (Hematoksilen-Eozin boyası, 200x büyütme)

Bazı kas liflerinde nükleus kaybı bu gruptaki en dikkat çekici bulgulardan biri olarak nitelendirildi. Özellikle periferde yerleşim gösteren kas liflerinde hasar dikkati çekti. Bu grupta yapılan büyük büyütme incelemelerde miyositlerde yoğun dejenerasyon, miyofibril organizasyonunda bozulmaya bağlı olarak sarkoplazmada dejeneratif değişimler görüldü. Kas liflerinin normal paralel seyrinden ayrıldıkları tespit edildi. Periferde yerleşim gösteren kas liflerinde nekrozis ile uyumlu nükleer şişme dikkati çekti. Bazı kas liflerinde amitotik nükleer bölünme tespit edildi. Amitotik nükleer bölünme ve nükleuslarının hücrenin merkezine göçü izlendi (Resim 4-2). Bu grupta enine kesitlerde yapılan incelemelerde ödem en dikkat çekici bulgu olarak izlendi. Perimisyumda infiltrasyon görüldü. Longitudinal kesitler ile uyumlu şekilde özellikle periferik yerleşimli kas liflerinde nekrozis ile uyumlu hücre görüntüsü dikkati çekti. Yine kas liflerinin çoğunda miyofibril organizasyonunda bozulma ve dejenerasyon dikkati çekti (Resim 4-3).



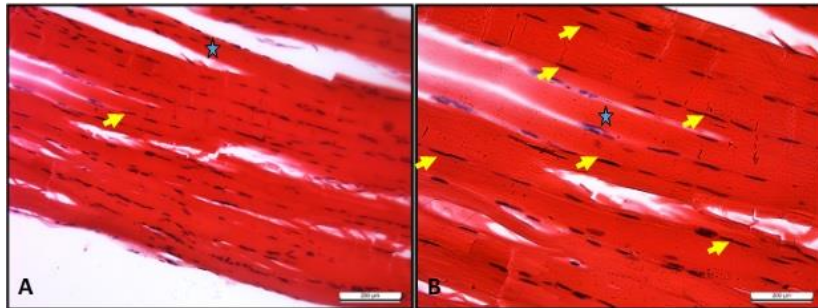
Resim 4-2: İskemi reperfüzyon grubu gastrokinemius kasma ait longitudinal kesitte miyositlerde yoğun dejenerasyon, miyofibril organizasyonunda bozulma (*), normal paralel seyrinden ayrılan kas lifleri (→) ve amitotik nükleer bölünme ve nükleuslarının hücrenin merkezine göçü ({) (Hematoksilen-Eozin boyası, 200x büyütme)



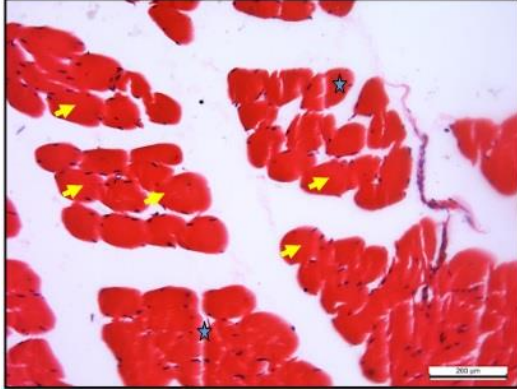
Resim 4-3: İskemi reperfüzyon grubu gastrokinemius kasına ait enine kesitte ödem(*) ile perimisyumda infiltrasyon (→) (A resmi); periferik yerleşimli kas liflerinde nekrosis (n), miyofibril organizasyonunda bozulma ve dejenerasyon (↔) (Hematoksilen-Eozin boyası, 200x büyütme)

4.2.3 Grup 3: Furosemid Grubu

Furosemid grubu gastrokinemius kasına ait longitudinal ve enine kesitlerin küçük ve büyük büyütme incelemelerinde genel görünüm ve histolojik özelliklerin kontrol grubu ile eşdeğer olduğu tespit edildi. Enine kesitlerde gözlenen birkaç dejeneratif miyositin, grubun tüm deneklerine ait kesitlerdeki incelemeler sonucunda uygulanan ajana spesifik bir özellik olmadığı düşünüldü (Resim 5-1, 2).



Resim 5-1: Furosemid grubu gastrokinemius kasına ait longitudinal ve enine kesitlerin küçük ve büyük büyütme incelemelerinde (→ : sarkolemma altında yerleşim gösteren nükleus, *: miyofibril) (Hematoksilen-Eozin boyası, A resmi için 200x ve B resmi için 400x büyütme)

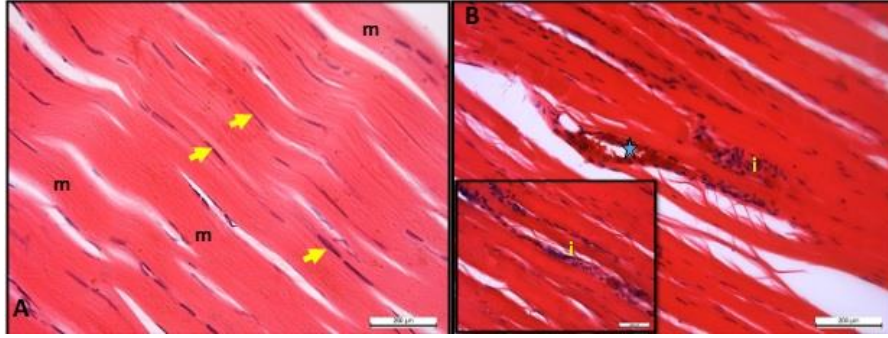


Resim 5-2: Furosemid grubu gastrokinemius kasına ait enine kesitlerin büyük büyütme incelemelerinde normal görünümlü miyositler (→) ile birkaç dejeneratif miyosit grubu (*) (Hematoksilen-Eozin boyası, A resmi için 200x büyütme)

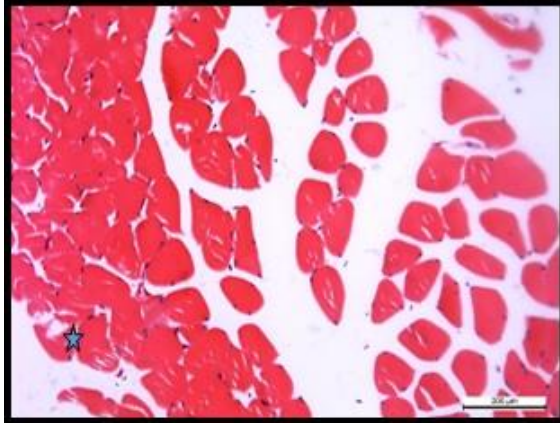
4.2.4 Grup 4: İskemi Reperfüzyon ve Furosemid Uygulanan Grup-

IR+F

İskemi reperfüzyon ve furosemid uygulanan grubun gastrokinemius kasının longitudinal kesitlerinin büyük büyütme incelemelerinde kas liflerinin normal paralel seyrinde olduğu, miyofibril organizasyonunun düzene girdiği ve multinükleer yapıdaki nükleusların sarkolemma altında yerleştiği, miyositler açısından değerlendirildiğinde iskemi-reperfüzyon grubuna kıyasla hücrelerin normal görünüm aldığı tespit edildi. Buna karşılık yapılan büyük büyütme incelemelerde kas liflerini çevreleyen bağ dokuda infiltrasyonun iskemi-reperfüzyon grubu kadar olmamakla birlikte halen devam ettiği ve yer yer hemoraji gösteren dilate damarların halen bulunduğu dikkati çekti. Enine kesitlerde yapılan incelemeler de bu bulgular ile uyumluydu. Fasiküllerin periferine yerleşmiş miyositlerde yer yer dejenerasyon dikkati çekti ancak nekrotik bir bulgu saptanmadı (Resim 6-1, 2)



Resim 6-1 :İskemi reperfüzyon ve ardından furosemid uygulanan grubun gastrokinemius kasının longitudinal kesitlerinin büyük ve küçük büyütme incelemelerinde düzenli yapıdaki miyofibriller (m), sarkolemma altında yerleşim gösteren nükleus (→), yer yer infiltrasyon (i) ile hemoraji ve dilate damar yapısı (*) (Hematoksilen-Eozin boyası, A resmi için 200x ve B resmi için 400x büyütme)



Resim 6-2 : İskemi reperfüzyon ve ardından furosemid uygulanan grubun gastrokinemius kasının enine kesitlerinin büyük ve küçük büyütme incelemelerinde az miktarda bulunan dejenerasyona uğrayan miyositler (*) (Hematoksilen-Eozin boyası, A resmi için 200x büyütme)

Sham, Furosemid ve IR+F grubu ile karşılaştırıldığında IR grubunda ödem düzeyi ($p < 0,001$) (Grafik 20), nötrofil infiltrasyon düzeyi ($p = 0,007$) (Grafik 21) ve miyosit hasar düzeyi ($p = 0,001$) (Grafik 22) istatistiksel olarak anlamlı düzeyde daha fazlaydı. IR ve IR+F grubu ile karşılaştırıldığında Sham grubunda hemoraji düzeyi istatistiksel olarak anlamlı düzeyde daha azdı ($p < 0,001$) (Grafik 23) (Tablo 9).

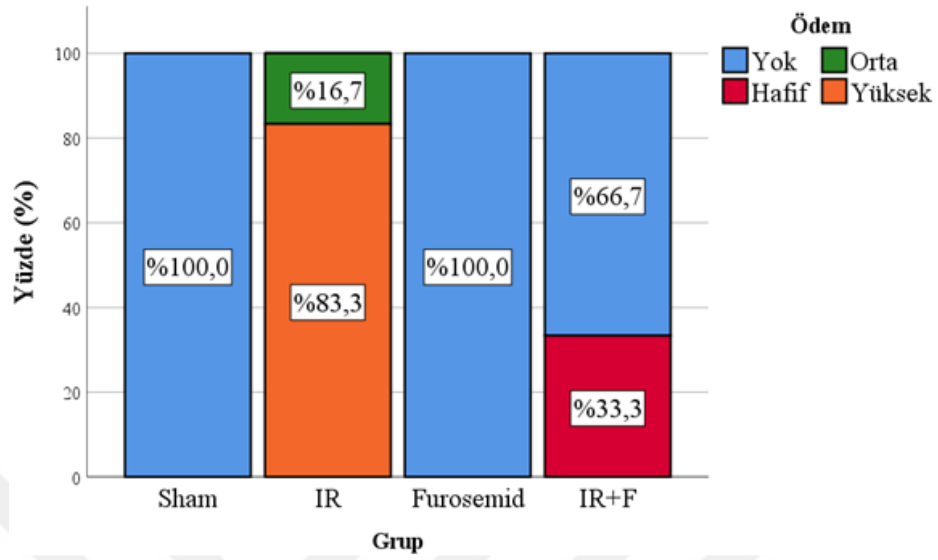
Tablo 9: Histopatolojik skorlama sistemi sonuçları

Bulgu	Sham (n = 6)		IR (n = 6)		Furosemid n = 6)		IR+F (n = 6)		p
	Sayı	Yüzde	Sayı	Yüzde	Sayı	Yüzde	Sayı	Yüzde	
Ödem									
Yok	6	100,0	0	0,0	6	100,0	4	66,7	<0,001
Hafif	0	0,0	0	0,0	0	0,0	2	33,3	
Orta	0	0,0	1	16,7	0	0,0	0	0,0	
Yüksek	0	0,0a	5	83,3b	0	0,0a	0	0,0a	
Nötrofil infiltrasyonu									
Yok	5	83,3	0	0,0	3	50,0	3	50,0	0,007
Hafif	1	16,7	0	0,0	2	33,3	2	33,3	
Orta	0	0,0	1	16,7	1	16,7	1	16,7	
Yüksek	0	0,0a	5	83,3b	0	0,0a	0	0,0a	
Hemoraji									
Yok	6	100,0a	0	0,0b	2	33,3a,b	0	0,0 b	<0,001
Hafif	0	0,0	0	0,0	3	50,0	3	50,0	
Orta	0	0,0	3	50,0	1	16,7	3	50,0	
Yüksek	0	0,0	3	50,0	0	0,0	0	0,0	
Miyosit hasarı									
Yok	5	83,3	0	0,0	3	50,0	0	0,0	0,001
Hafif	1	16,7	0	0,0	2	33,3	3	50,0	
Orta	0	0,0	0	0,0	0	0,0	2	33,3	
Yüksek	0	0,0a	6	100,0b	1	16,7a	1	16,7a	

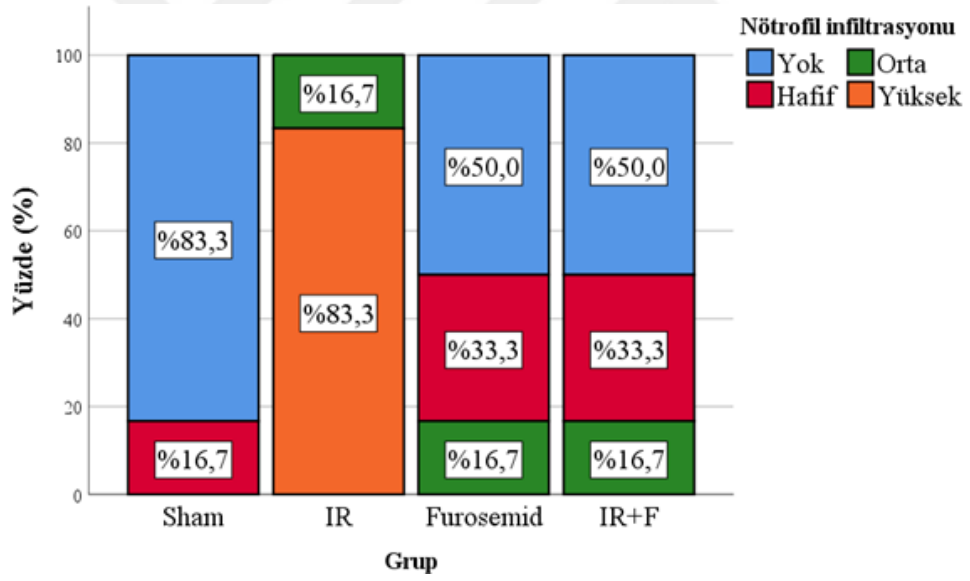
*Karşılaştırmalarda Ki-kare testi kullanılmıştır. İkili karşılaştırmalarda Bonferroni düzeltmesi yapılmıştır.

a,b: Farklı harfle gösterilen kategoriler arasında istatistiksel olarak anlamlı fark vardır(p<0,005).

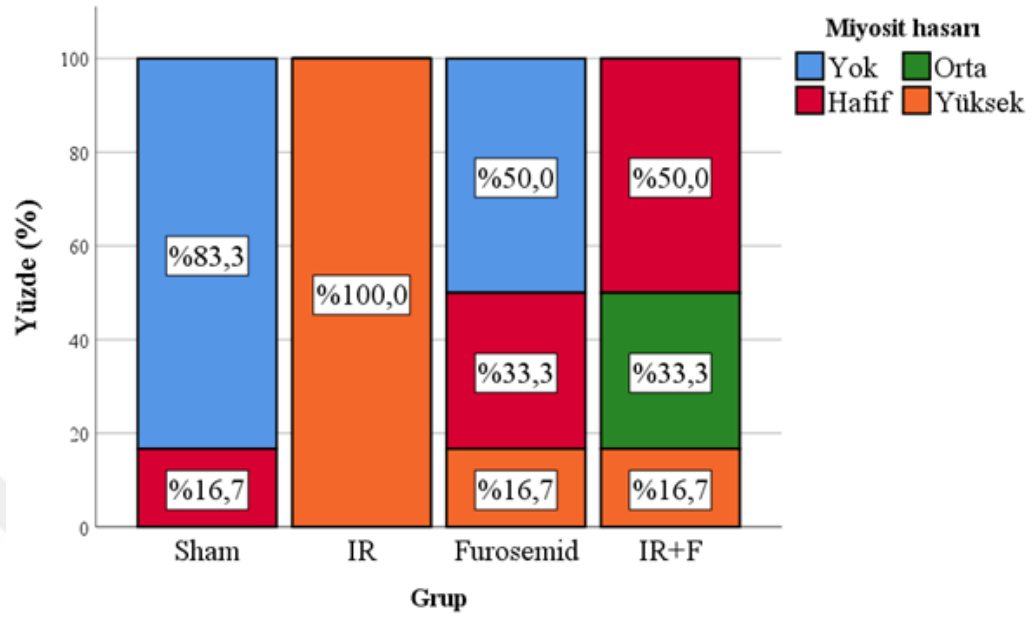
Grafik 4: Gruplar arası ödem düzeyi dağılımı



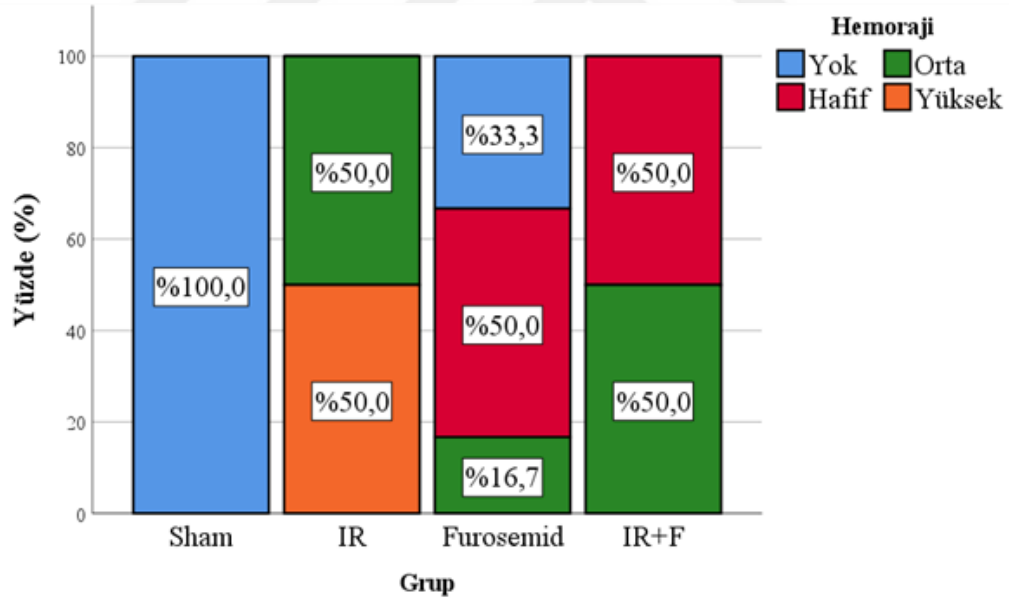
Grafik 5: Gruplar arası nötrofil infiltrasyonu düzeyi dağılımı



Grafik 6: Gruplar arası miyosit hasar düzeyi dağılımı



Grafik 7: Gruplar arası hemoraji düzeyi dağılımı



5. TARTIŞMA

Akut alt ekstremitte iskemisi hastalarında revaskülarizasyon sonrası gelişen I/R hasarı, yüksek mortalite ve ekstremitte kaybı ile seyretmektedir. Burada belirleyici olan faktör iskemi süresi olup, 12 saatten kısa süren iskemide mortalite %19, ekstremitte kurtulma oranı %93 iken 12 saatten uzun süren iskemide mortalite %31 e çıkmakta, ekstremitte kurtulma oranı ise %78 e düşmektedir (94). Revaskülarizasyona rağmen yüksek ekstremitte kaybına yol açan I/R hasarı patogenezinde ROS/RNS oluşumu temel mekanizma olup, bu molekülleri toplayıcı etki gösteren antioksidan terapiler, I/R hasarının önlenmesinde uzun süre çalışılmış ve başarılı sonuçlar alınmıştır (95). Klinikte kalp yetmezliği, böbrek yetmezliği, pulmoner ödem gibi hastalıklarda yaygın olarak kullanılan ve potent bir diüretik olan Furosemid'in daha önce yapılan in-vitro çalışmalarda antioksidan etkinliği gösterilmiştir (96). Bu sebepe çalışmamızda Furosemid'in deneysel olarak oluşturulan rat iskelet kasında iskemi-reperfüzyon hasarında koruyucu etkisi araştırılmıştır.

1995 yılında yayınlanan çalışmada endotelial hücre kültürü üzerine furosemidin etkileri araştırılmış, furosemidin endotelial hücrelerde bradikinin sentez ve salınımını arttırdığı, bradikinin ise $\beta 2$ kinin reseptörleri üzerinden endotelial otakoidlerin (NO, prostasiklin) oluşumunu arttırdığı gözlenmiştir (97). Bu medyatörlerin I/R hasarında endotelial disfonksiyonu önleyici etkileri olup, çalışmamızda endotel hasarının bir göstergesi olan doku ödemi açısından IR grubu ile IR+F grubu karşılaştırıldığında, IR+F grubunda ödem gelişimi istatistiksel olarak anlamlı düşük bulunmuştur (Şekil 20) (Tablo 9). Fakat yine

endotel hasarını gösteren doku hemorajisi açısından IR grubu ve IR+F grubu arasında istatistiksel olarak anlamlı fark saptanmamıştır (Şekil 23) (Tablo 9).

2003 yılında yayınlanan bir in-vitro çalışmada insan eritrosit hücrelerinden oluşturulan hücre kültüründe AAPH (2,2V-azobis(2-amidinopropane) hydrochloride) aracılı oksidatif stres oluşturulmuş, sonra artan dozlarda uygulanan furosemid in antioksidan etkinliği allofikosiyenin testi ile değerlendirilmiştir. Sonuçta furosemidin doza bağlı artan serbest radikal toplayıcı etkisi olduğu gözlenmiştir. Aynı zamanda eritrosit membranının akışkanlığını değiştirerek serbest oksijen radikallerine olan duyarlılığını azalttığı hipotezi öne sürülmüş (98). Fakat çalışmamızda lipid peroksidasyonunu gösteren, dolayısıyla oksidatif stres aracılı membran hasarını yansıtan MDA seviyeleri açısından karşılaştırıldığında, IR+F grubunda MDA seviyeleri IR grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı yüksek saptanmıştır (Şekil 19) (Tablo 8).

2007 yılında yayınlanan in-vivo çalışmada furosemidin, ratlarda oluşturulan iskemik akut böbrek yetmezliği modeli sonrası apoptozis üzerine etkileri araştırılmış. Çalışma sonucunda furosemidin, I/R hasarı ile indüklenen apoptozisde ciddi azalma sağladığı gözlenmiştir (99). Bununla uyumlu olarak, çalışmamızın histopatolojik incelemesinde IR grubunda miyosit hasarının SHAM grubuna göre anlamlı yüksek olduğu, IR+F grubunda ise IR grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı düşük olduğu gözlenmiştir (Şekil 22) (Tablo 9).

2015 yılında yayınlanan in-vivo çalışmada ise ratlarda renal I/R modeli oluşturulmuş, furosemid ve sitagliptinin renal ve uzak organ hasarı olarak miyokardiyal I/R hasarını azaltıcı etkileri araştırılmış. Çalışma sonucunda I/R grubunda artan doku MDA ve NO seviyeleri, azalan GSH düzeyi ile azalan GST,

SOD ve CAT enzim aktivitelerinde furosemid uygulaması sonrası düzelme olduğu gözlenmiştir. Bu etkileri prostaglandin dehidrojenaz enzim inhibisyonu sonrası seviyesi artan ve potent bir vazodilatör olan prostaglandin E2 (PGE2) ile gelişen renal kan akımı artışına, NA-K-2CL kotransport inhibisyonu sonrası renal tübüler oksijen tüketiminde azalmaya ve anti-apoptotik etkilerine bağlanmıştır (100). Bununla uyumlu olarak çalışmamızda CAT düzeyleri açısından karşılaştırıldığında, IR+F grubunda CAT düzeyleri IR grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı yüksek bulunmuştur (Şekil 17) (Tablo 8). Fakat GST düzeyleri açısından karşılaştırıldığında, IR grubu ile IR+F grubu arasında istatistiksel olarak anlamlı fark saptanmamıştır (Şekil 18) (Tablo 8).

I/R hasarlı hücrelerden salgılanan kemotaktik ajanlar, aktive olan kompleman sistemi, endotel yüzeyinde eksprese olan adezyon molekülleri dolaşımdaki nötrofillerin aktivasyonu ve dokuya migrasyonuna neden olmakta, aktive olan nötrofillerden salgılanan sitokinler, kemokinler ve ROS ise artan doku hasarı ve inflamatuvar cevaptan sorumlu tutulmaktadır (101). Çalışmamızın histopatolojik incelemesi sonucunda, IR grubunda SHAM grubuna göre nötrofil infiltrasyonunun istatistiksel olarak anlamlı yüksek olduğu, IR+F grubunda ise IR grubuna göre anlamlı düşük olduğu gözlenmiştir (Şekil 21) (Tablo 9). Bu bulgular Furosemid'in I/R hasarında kilit rol üstlenen nötrofillerin dokuda infiltrasyonunu ve doku hasarını önlediğini göstermektedir.

6.SONUÇ

Furosemid, antioksidan enzim aktivitesini yansıtan CAT düzeylerini arttırarak, prostasiklin-NO gibi koruyucu mediyatörlerin salınımı aracılığı ile endotel hasarını azaltarak, geç dönem doku hasarından sorumlu olan nötrofillerin dokudaki infiltrasyonunu azaltarak I/R sonucu oluşan miyosit hasarını-nekrozunu sınırlayıcı etkileri mevcut olup, klinikte diüretik olarak yaygın kullanımı olan bu ilacın iskelet kasında I/R hasarını engellemek amacıyla kullanımı için daha fazla çalışmaya ihtiyaç vardır.

7. ÖZET

Rat İskelet Kasında İskemi Reperfüzyon Hasarında Furosemid'in İn-vivo Antioksidan Etkinliğinin Araştırılması

Alt ekstremitte periferik arter hastalığı dünya genelinde 202 milyon hastayı etkilemekte olup, kronik ekstremitte tehdit edici iskemi ve akut alt ekstremitte iskemisi gibi kliniklere ilerleyerek ekstremitte kaybı ile sonlanmaktadır. Kan akımının ani ve total olarak kesilmesi olarak tanımlanan akut bacak iskemisinde ekstremitenin kurtulmasındaki en önemli belirleyici en kısa sürede müdahale ile iskemi süresinin en aza indirilmesidir. Bu hastalarda kan akışının tekrar sağlanması sonrası gelişen, iskeminin oluşturduğu hasarın artarak ilerlemesi ve ekstremitte kaybı ile sonlanabilen iskemi-reperfüzyon hasarı olarak adlandırılan tablo ile karşılaşilmektedir. Bu tablonun gelişiminde iskemi sırasında pH ve iyon dengesi bozulan hücrelerin, reperfüzyon sırasında gelen oksijen ile reaktif oksijen türleri (ROS) üretmesi ve bunun aracılığı ile artan doku hasarı lokal ve sistemik inflamatuvar yanıt sorumlu tutulmaktadır. Deneysel iskemi-reperfüzyon modellerinde antioksidan ajanların koruyucu rolleri birçok çalışma ile tespit edilmiştir. Çalışmamızda, in-vitro olarak hücre kültüründe ve in-vivo olarak rat böbrek ve kalp dokusunda antioksidan etkinlik ile I/R hasarını azalttığı gösterilen Furosemid isimli diüretik ratlarda alt ekstremitte oluşturulan iskemi-reperfüzyon modeli sonrası iskelet kasındaki koruyucu etkinliği araştırılmıştır. Anestezi altındaki Wistar cinsi ratlarda medyan laparotominin ardından abdominal aortanın 45 dk klemplenmesi ile oluşturulan iskemi sonrası 2 saat reperfüzyon uygulanmış, reperfüzyon başlangıcında ratlara 4mg/kg iv furosemid uygulanmıştır. Furosemid uygulanan grupta, antioksidan enzim aktivitesini

gösteren katalaz düzeyinde artış, endotel hasarını gösteren doku ödeminde azalma, ROS tarafından aktive edilen inflamatuvar kaskadın ana hücresi olan nötrofillerin dokudaki infiltrasyonunda azalma sağlayarak iskemi-reperfüzyon hasarını sınırladığı gözlenmiştir. Klinikte diüretik olarak yaygın kullanım olan bu ilacın I/R hasarını azaltmada ümit verici bir ajan olabileceği kanısına varılmıştır.

Anahtar kelimeler: iskemi-reperfüzyo hasarı, furosemid, antioksidan

8. SUMMARY

In-vivo Antioxidant Properties of Furosemide on Ischemia-Reperfusion Injury of Rat's Skeletal Muscle

202 million adults are affected by lower extremity peripheral artery disease worldwide. It can progress into chronic limb threatening ischemia and acute limb ischemia clinic, resulting extremity loss. Urgent intervention and shortening ischemic period is crucial for survival of the extremities in acute limb ischemia which is defined as acute and total obstruction of supplying blood flow. After restoration of blood flow, this patients can experience ischemia-reperfusion injury (I/R) resulting with extremity loss. Altered ion and pH balance during ischemic period in the cell causes reproduction of reactive oxygen species with reperfusion, which then triggers local and systemic inflammatory response and progresses the tissue damage. In this study, we investigated in-vivo antioxidant properties of furosemide, which showed in-vitro antioxidant effects on cell culture and in-vivo antioxidant effect on I/R injury of rat's renal and cardiac tissue in early studies, on I/R injury of rats's skeletal muscle. Ischemia was initiated by occluding abdominal aorta with atraumatic bulldog clomp for 45 minutes followed by 2 hour reperfusion period. Furosemide 4mg/kg applied intravenously at the beggining of reperfusion period. Compared with ischemia-reperfusion group, administration of furosemide resulted with significantly reduced tissue eudema formation and neutrophil infiltration ($P<0,005$) as well increased level of catalase enzyme activity. In the light of these results, administration of furosemide, which is widely used potent diüretic agent, for reducing I/R injury after revascularisation of lower ekstremities looks promising.

Keywords: ischemia-reperfusion injury, furosemid, antioxidant



9. KAYNAKLAR

1. Gerhard-Herman MD, Gornik HL, Barrett C, Barshes NR, Corriere MA, Drachman DE, Fleisher LA, Fowkes FG, Hamburg NM, Kinlay S, et al. 2016 AHA/ACC guideline on the management of patients with lower extremity peripheral artery disease: a report of the American College of Cardiology/American Heart Association Task Force on Clinical Practice Guidelines. *Circulation*. 2017;135:e726–e779.
2. Fowkes FG, Rudan D, Rudan I, Aboyans V, Denenberg JO, McDermott MM, Norman PE, Sampson UK, Williams LJ, Mensah GA, Criqui MH. Comparison of global estimates of prevalence and risk factors for peripheral artery disease in 2000 and 2010: a systematic review and analysis. *Lancet* 2013 ;382:1329–40.
3. Diehm C, Schuster A, Allenberg JR, Darius H, Haberl R, Lange S, Pittrow D, von Stritzky B, Tepohl G, Trampisch HJ. High prevalence of peripheral arterial disease and co-morbidity in 6880 primary care patients: cross-sectional study. *Atherosclerosis* 2004 ;172:95–105.
4. Karabay Ö, Karaçelik M, Yılık L, Tekin N, İriz AB, Kumdereli S, et al. İskemik periferik arter hastalığı: Bir tarama çalışması. *Turk Gogus Kalp Dama* 2012;20:450-7
5. Mustapha JA, Katzen BT, Neville RF, Lookstein RA, Zeller T, Miller LE, Driver VR, Jaff MR. Critical limb ischemia: a threat to life and limb. *Endovasc Today*. 2019;18:80–82.
6. Norgren L, Hiatt WR, Dormandy JA, Nehler MR, Harris KA, Fowkes FG. Inter-Society Consensus for the Management of Peripheral Arterial Disease (TASC II). *J Vasc Surg* 2007;45(Suppl S):S5–67.
7. Hess CN, Huang Z, Patel MR, Baumgartner I, Berger JS, Blomster JJ, et al. Acute limb ischemia in peripheral artery disease. *Circulation* 2019;140:556-65.
8. Willigendael EM, Teijink JA, Bartelink ML, Kuiken BW, Boiten J, Moll FL, Büller HR, Prins MH. Influence of smoking on incidence and prevalence of peripheral arterial disease. *J Vasc Surg*. 2004;40:1158–1165. doi: 10.1016/j.jvs.2004.08.049
9. Huxley RR, Yatsuya H, Lutsey PL, Woodward M, Alonso A, Folsom AR. Impact of age at smoking initiation, dosage, and time since quitting on cardiovascular disease in African Americans and Whites: the Atherosclerosis Risk in Communities study. *Am J Epidemiol*. 2012;175:816–826.
10. Joosten MM, Pai JK, Bertola ML, Rimm EB, Spiegelman D, Mittleman MA, Mukamal KJ. Associations between conventional cardiovascular risk factors and risk of peripheral artery disease in men. *JAMA* 2012;308:1660–7.
11. Ding N, Sang Y, Chen J, Ballew SH, Kalbaugh CA, Salameh MJ, Blaha MJ, Allison M, Heiss G, Selvin E, et al. Cigarette smoking, smoking cessation, and long-term risk of 3 major atherosclerotic diseases. *J Am Coll Cardiol*. 2019;74:498–507.

12. Emdin CA, Anderson SG, Callender T, Conrad N, Salimi-Khorshidi G, Mohseni H, Woodward M, Rahimi K. Usual blood pressure, peripheral arterial disease, and vascular risk: cohort study of 4.2 million adults. *BMJ* 2015;351:h4865.
13. Ridker PM, Stampfer MJ, Rifai N. Novel risk factors for systemic atherosclerosis: a comparison of C-reactive protein, fibrinogen, homocysteine, lipoprotein(a), and standard cholesterol screening as predictors of peripheral arterial disease. *JAMA* 2001;285:2481–5
14. Gurdasani D, Sjouke B, Tsimikas S, Hovingh GK, Luben RN, Wainwright NW, Pomilla C, Wareham NJ, Khaw KT, Boekholdt SM, et al. Lipoprotein(a) and risk of coronary, cerebrovascular, and peripheral artery disease: the EPIC-Norfolk prospective population study. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2012;32:3058–3065. doi: 10.1161/ATVBAHA.112.255521
15. Criqui MH, Aboyans V. Epidemiology of peripheral artery disease. *Circ Res* 2015;116:1509–26.
16. Campia U, Gerhard-Herman M, Piazza G, Goldhaber SZ. Peripheral artery disease: Past, present, and future. *Am J Med* 2019;132:1133–41.
17. Ding N, Kwak L, Ballew SH, Jaar B, Hoogeveen RC, Ballantyne CM, Sharrett AR, Folsom AR, Heiss G, Salameh M, et al. Traditional and nontraditional glycemic markers and risk of peripheral artery disease: the Atherosclerosis Risk in Communities (ARIC) study. *Atherosclerosis.* 2018;274:86–93. doi: 10.1016/j.atherosclerosis.2018.04.042
18. Geiss LS, Li Y, Hora I, Albright A, Rolka D, Gregg EW. Resurgence of diabetes-related nontraumatic lower-extremity amputation in the young and middle-aged adult U.S. population. *Diabetes Care.* 2019;42:50–54. doi: 10.2337/dc18-1380
19. Higashi Y, Miyata T, Shigematsu H, Origasa H, Fujita M, Matsuo H, et al. Evaluation of risk factors for major amputation in patients with diabetes and peripheral artery disease receiving antiplatelet therapy - post hoc analysis of a Prospective Observational Multicenter Cohort Study (SEASON)
20. Hinchliffe RJ, Forsythe RO, Apelqvist J, Boyko EJ, Fitridge R, Hong JP, Katsanos K, Mills JL, Nikol S, Reekers J, et al. Guidelines on diagnosis, prognosis, and management of peripheral artery disease in patients with foot ulcers and diabetes (IWGDF 2019 update). *Diabetes Metab Res Rev.* 2020;36(suppl 1):e3276. doi: 10.1002/dmrr.3276
21. Tzoulaki I, Murray GD, Lee AJ, Rumley A, Lowe GD, Fowkes FG. Inflammatory, haemostatic, and rheological markers for incident peripheral arterial disease: Edinburgh Artery Study. *Eur Heart J.* 2007;28:354–362. doi: 10.1093/eurheartj/ehl441
22. Chuang YW, Yu MC, Lin CL, Yu TM, Shu KH, Huang ST, Kao CH. Risk of peripheral arterial occlusive disease in patients with rheumatoid arthritis. A nationwide population-based cohort study. *Thromb Haemost* 2016;115:439–45
23. Smith FB, Lee AJ, Hau CM, Rumley A, Lowe GD, Fowkes FG. Plasma fibrinogen, haemostatic factors and prediction of peripheral arterial disease in the Edinburgh Artery Study. *Blood Coagul Fibrinolysis.* 2000;11:43–50.

24. Housley E, Leng GC, Donnan PT, Fowkes FG. Physical activity and risk of peripheral arterial disease in the general population: Edinburgh Artery Study. *J Epidemiol Community Health*. 1993;47:475–480. doi: 10.1136/jech.47.6.475
25. An W, Xian L, Zhao L, Detrano R, Criqui MH, Wu Y. Distribution of the ankle-brachial index and peripheral arterial disease in middle-aged and elderly Chinese: a population-based study of 18,000 men and women. *Circulation*. 2010;122:e43.
26. Fowkes FG, Murray GD, Butcher I, Heald CL, Lee RJ, Chambless LE, Folsom AR, Hirsch AT, Dramaix M, deBacker G, et al. Ankle brachial index combined with Framingham Risk Score to predict cardiovascular events and mortality: a meta-analysis. *JAMA*. 2008;300:197–208. doi: 10.1001/jama.300.2.197
27. Grenon SM, Hiramoto J, Smolderen KG, Vittinghoff E, Whooley MA, Cohen BE. Association between depression and peripheral artery disease: insights from the Heart and Soul Study. *J Am Heart Assoc*. 2012;1:e002667. doi: 10.1161/JAHA.112.002667
28. Bonaca MP, Nault P, Giugliano RP, Keech AC, Pineda AL, Kanevsky E, Kuder J, Murphy SA, Jukema JW, Lewis BS, et al. Low-density lipoprotein cholesterol lowering with evolocumab and outcomes in patients with peripheral artery disease: insights from the FOURIER trial (Further Cardiovascular Outcomes Research With PCSK9 Inhibition in Subjects With Elevated Risk). *Circulation*. 2018;137:338–350. doi: 10.1161/CIRCULATIONAHA.117.032235
29. McDermott MM, Greenland P, Liu K, Guralnik JM, Criqui MH, Dolan NC, Chan C, Celic L, Pearce WH, Schneider JR, et al. Leg symptoms in peripheral arterial disease: associated clinical characteristics and functional impairment. *JAMA*. 2001;286:1599–1606. doi: 10.1001/jama.286.13.1599
30. Broderick C, Forster R, Abdel-Hadi M, Salhiyyah K. Pentoxifylline for intermittent claudication. *Cochrane Database Syst Rev* 2020;10:CD005262.
31. Firmhaber JM, Powell CS. Lower Extremity Peripheral Artery Disease: Diagnosis and Treatment. *Am Fam Physician*. 2019 Mar 15;99(6):362-369. Erratum in: *Am Fam Physician*. 2019 Jul 15;100(2):74. PMID: 30874413.
32. Herraiz-Adillo Á, Cavero-Redondo I, Álvarez-Bueno C, Pozuelo-Carrascosa DP, Solera-Martínez M. The accuracy of toe brachial index and ankle brachial index in the diagnosis of lower limb peripheral arterial disease: a systematic review and meta-analysis. *Atherosclerosis*. 2020;315:81–92. doi: 10.1016/j.atherosclerosis.2020.09.026
33. Aboyans V, Ricco JB, Bartelink MEL, Björck M, Brodmann M, Cohnert T, Collet JP, Czerny M, De Carlo M, Debus S, Espinola-Klein C, Kahan T, Kownator S, Mazzolai L, Naylor AR, Roffi M, Röther J, Sprynger M, Tendera M, Tepe G, Venermo M, Vlachopoulos C, Desormais I; ESC Scientific Document Group. 2017 ESC Guidelines on the Diagnosis and Treatment of Peripheral Arterial Diseases, in collaboration with the European Society for Vascular Surgery (ESVS): Document covering atherosclerotic disease of extracranial carotid and vertebral, mesenteric, renal, upper and lower extremity arteries Endorsed by: the European Stroke Organization (ESO) The Task Force for the Diagnosis and Treatment of Peripheral Arterial Diseases of the European Society of Cardiology (ESC) and of the European Society for

- Vascular Surgery (ESVS). *Eur Heart J*. 2018 Mar 1;39(9):763-816. doi: 10.1093/eurheartj/ehx095. PMID: 28886620.
34. Potier L, Abi Khalil C, Mohammedi K, Roussel R. Use and utility of ankle brachial index in patients with diabetes. *Eur J Vasc Endovasc Surg*. 2011 Jan;41(1):110-6. doi: 10.1016/j.ejvs.2010.09.020. Epub 2010 Nov 20. PMID: 21095144.
 35. Hyun S, Forbang NI, Allison MA, Denenberg JO, Criqui MH, Ix JH. Ankle-brachial index, toe-brachial index, and cardiovascular mortality in persons with and without diabetes mellitus. *J Vasc Surg*. 2014 Aug;60(2):390-5. doi: 10.1016/j.jvs.2014.02.008. Epub 2014 Mar 21. PMID: 24657294; PMCID: PMC4112146.
 36. Aboyans V, Criqui MH, Abraham P, Allison MA, Creager MA, Diehm C, Fowkes FG, Hiatt WR, Jönsson B, Lacroix P, Marin B, McDermott MM, Norgren L, Pande RL, Preux PM, Stoffers HE, Treat-Jacobson D; American Heart Association Council on Peripheral Vascular Disease; Council on Epidemiology and Prevention; Council on Clinical Cardiology; Council on Cardiovascular Nursing; Council on Cardiovascular Radiology and Intervention, and Council on Cardiovascular Surgery and Anesthesia. Measurement and interpretation of the ankle-brachial index: a scientific statement from the American Heart Association. *Circulation*. 2012 Dec 11;126(24):2890-909. doi: 10.1161/CIR.0b013e318276fbc. Epub 2012 Nov 16. Erratum in: *Circulation*. 2013 Jan 1;127(1):e264. PMID: 23159553.
 37. Allard L, Cloutier G, Durand LG, Roederer GO, Langlois YE. Limitations of ultrasonic duplex scanning for diagnosing lower limb arterial stenoses in the presence of adjacent segment disease. *J Vasc Surg*. 1994 Apr;19(4):650-7. doi: 10.1016/s0741-5214(94)70038-9. PMID: 8164280.
 38. Heijnenbroek-Kal MH, Kock MC, Hunink MG. Lower extremity arterial disease: multidetector CT angiography meta-analysis. *Radiology*. 2007 Nov;245(2):433-9. doi: 10.1148/radiol.2451061280. Epub 2007 Sep 11. PMID: 17848679.
 39. Olinic DM, Stanek A, Tătaru DA, Homorodean C, Olinic M. Acute Limb Ischemia: An Update on Diagnosis and Management. *J Clin Med*. 2019 Aug 14;8(8):1215. doi: 10.3390/jcm8081215. PMID: 31416204; PMCID: PMC6723825.
 40. Natarajan B, Patel P, Mukherjee A. Acute Lower Limb Ischemia-Etiology, Pathology, and Management. *Int J Angiol*. 2020 Sep;29(3):168-174. doi: 10.1055/s-0040-1713769. Epub 2020 Jun 27. PMID: 33100802; PMCID: PMC7577793.
 41. Gerhard-Herman MD, Gornik HL, Barrett C, Barshes NR, Corriere MA, Drachman DE, Fleisher LA, Fowkes FGR, Hamburg NM, Kinlay S, Lookstein R, Misra S, Mureebe L, Olin JW, Patel RAG, Regensteiner JG, Schanzer A, Shishehbor MH, Stewart KJ, Treat-Jacobson D, Walsh ME. 2016 AHA/ACC Guideline on the Management of Patients With Lower Extremity Peripheral Artery Disease: Executive Summary: A Report of the American College of Cardiology/American Heart Association Task Force on Clinical Practice Guidelines. *J Am Coll Cardiol*. 2017 Mar 21;69(11):1465-1508. doi: 10.1016/j.jacc.2016.11.008. Epub 2016 Nov 13. Erratum in: *J Am Coll Cardiol*. 2017 Mar 21;69(11):1520. PMID: 27851991.
 42. Pande RL, Perlstein TS, Beckman JA, Creager MA. Secondary prevention and mortality in peripheral artery disease: National Health and Nutrition Examination Study, 1999 to 2004.

Circulation. 2011 Jul 5;124(1):17-23. doi: 10.1161/CIRCULATIONAHA.110.003954. Epub 2011 Jun 20. PMID: 21690489; PMCID: PMC3139992.

43. Patel KK, Jones PG, Ellerbeck EF, Buchanan DM, Chan PS, Pacheco CM, Moneta G, Spertus JA, Smolderen KG. Underutilization of Evidence-Based Smoking Cessation Support Strategies Despite High Smoking Addiction Burden in Peripheral Artery Disease Specialty Care: Insights from the International PORTRAIT Registry. *J Am Heart Assoc.* 2018 Oct 16;7(20):e010076. doi: 10.1161/JAHA.118.010076. PMID: 30371269; PMCID: PMC6474973.
44. Fakhry F, van de Luijngaarden KM, Bax L, den Hoed PT, Hunink MG, Rouwet EV, Spronk S. Supervised walking therapy in patients with intermittent claudication. *J Vasc Surg.* 2012 Oct;56(4):1132-42. doi: 10.1016/j.jvs.2012.04.046. PMID: 23026425.
45. Mills JL Sr, Conte MS, Armstrong DG, Pomposelli FB, Schanzer A, Sidawy AN, Andros G; Society for Vascular Surgery Lower Extremity Guidelines Committee. The Society for Vascular Surgery Lower Extremity Threatened Limb Classification System: risk stratification based on wound, ischemia, and foot infection (WIFI). *J Vasc Surg.* 2014 Jan;59(1):220-34.e1-2. doi: 10.1016/j.jvs.2013.08.003. Epub 2013 Oct 12. PMID: 24126108.
46. Conte MS, Bradbury AW, Kolh P, White JV, Dick F, Fitridge R, Mills JL, Ricco JB, Suresh KR, Murad MH; GVG Writing Group. Global vascular guidelines on the management of chronic limb-threatening ischemia. *J Vasc Surg.* 2019 Jun;69(6S):3S-125S.e40. doi: 10.1016/j.jvs.2019.02.016. Epub 2019 May 28. Erratum in: *J Vasc Surg.* 2019 Aug;70(2):662. PMID: 31159978; PMCID: PMC8365864.
47. Agarwal S, Sud K, Shishehbor MH. Nationwide Trends of Hospital Admission and Outcomes Among Critical Limb Ischemia Patients: From 2003-2011. *J Am Coll Cardiol.* 2016 Apr 26;67(16):1901-13. doi: 10.1016/j.jacc.2016.02.040. Epub 2016 Mar 21. PMID: 27012780.
48. Jones DW, Schanzer A, Zhao Y, MacKenzie TA, Nolan BW, Conte MS, Goodney PP; Vascular Study Group of New England. Growing impact of restenosis on the surgical treatment of peripheral arterial disease. *J Am Heart Assoc.* 2013 Nov 25;2(6):e000345. doi: 10.1161/JAHA.113.000345. PMID: 24275626; PMCID: PMC3886769.
49. Adam DJ, Beard JD, Cleveland T, Bell J, Bradbury AW, Forbes JF, Fowkes FG, Gillespie I, Ruckley CV, Raab G, Storkey H; BASIL trial participants. Bypass versus angioplasty in severe ischaemia of the leg (BASIL): multicentre, randomised controlled trial. *Lancet.* 2005 Dec 3;366(9501):1925-34. doi: 10.1016/S0140-6736(05)67704-5. PMID: 16325694.
50. Norgren L, Hiatt WR, Dormandy JA, Nehler MR, Harris KA, Fowkes FG; TASC II Working Group. Inter-Society Consensus for the Management of Peripheral Arterial Disease (TASC II). *J Vasc Surg.* 2007 Jan;45 Suppl S:S5-67. doi: 10.1016/j.jvs.2006.12.037. PMID: 17223489.
51. Björck M, Earnshaw JJ, Acosta S, Bastos Gonçalves F, Cochennec F, Debus ES, et al. Editor's choice - European Society for Vascular Surgery (ESVS) 2020 clinical practice guidelines on the management of acute limb ischaemia. *Eur J Vasc Endovasc Surg* 2020;59:173-218.
52. Kalogeris T, Baines CP, Krenz M, Korthuis RJ. Cell biology of ischemia/reperfusion injury. *Int Rev Cell Mol Biol.* 2012;298:229-317. doi: 10.1016/B978-0-12-394309-5.00006-7. PMID: 22878108; PMCID: PMC3904795.

53. Sanada S, Komuro I, Kitakaze M. Pathophysiology of myocardial reperfusion injury: preconditioning, postconditioning, and translational aspects of protective measures. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 2011 Nov;301(5):H1723-41. doi: 10.1152/ajpheart.00553.2011. Epub 2011 Aug 19. PMID: 21856909.
54. Contreras L, Drago I, Zampese E, Pozzan T. Mitochondria: the calcium connection. *Biochim Biophys Acta*. 2010 Jun-Jul;1797(6-7):607-18. doi: 10.1016/j.bbabi.2010.05.005. Epub 2010 May 12. PMID: 20470749.
55. Croall DE, Ersfeld K. The calpains: modular designs and functional diversity. *Genome Biol*. 2007;8(6):218. doi: 10.1186/gb-2007-8-6-218. PMID: 17608959; PMCID: PMC2394746.
56. Toldo S, Mauro AG, Cutter Z, Abbate A. Inflammasome, pyroptosis, and cytokines in myocardial ischemia-reperfusion injury. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 2018 Dec 1;315(6):H1553-H1568. doi: 10.1152/ajpheart.00158.2018. Epub 2018 Aug 31. PMID: 30168729; PMCID: PMC6336966.
57. Forrester SJ, Kikuchi DS, Hernandez MS, Xu Q, Griendling KK. Reactive Oxygen Species in Metabolic and Inflammatory Signaling. *Circ Res*. 2018 Mar 16;122(6):877-902. doi: 10.1161/CIRCRESAHA.117.311401. PMID: 29700084; PMCID: PMC5926825.
58. Canton M, Sánchez-Rodríguez R, Spera I, Venegas FC, Favia M, Viola A, Castegna A. Reactive Oxygen Species in Macrophages: Sources and Targets. *Front Immunol*. 2021 Sep 30;12:734229. doi: 10.3389/fimmu.2021.734229. PMID: 34659222; PMCID: PMC8515906.
59. Tauffenberger A, Magistretti PJ. Reactive Oxygen Species: Beyond Their Reactive Behavior. *Neurochem Res*. 2021 Jan;46(1):77-87. doi: 10.1007/s11064-020-03208-7. Epub 2021 Jan 13. PMID: 33439432; PMCID: PMC7829243.
60. Pacher P, Beckman JS, Liaudet L. Nitric oxide and peroxynitrite in health and disease. *Physiol Rev*. 2007 Jan;87(1):315-424. doi: 10.1152/physrev.00029.2006. PMID: 17237348; PMCID: PMC2248324.
61. Minamino T, Komuro I, Kitakaze M. Endoplasmic reticulum stress as a therapeutic target in cardiovascular disease. *Circ Res*. 2010 Oct 29;107(9):1071-82. doi: 10.1161/CIRCRESAHA.110.227819. PMID: 21030724.
62. Grover GJ, Atwal KS, Sleph PG, Wang FL, Monshizadegan H, Monticello T, Green DW. Excessive ATP hydrolysis in ischemic myocardium by mitochondrial F1F0-ATPase: effect of selective pharmacological inhibition of mitochondrial ATPase hydrolase activity. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 2004 Oct;287(4):H1747-55. doi: 10.1152/ajpheart.01019.2003. Erratum in: *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 2006 Jul;291(1):H484. PMID: 15371268.
63. Di Lisa F, Kaludercic N, Carpi A, Menabò R, Giorgio M. Mitochondria and vascular pathology. *Pharmacol Rep*. 2009 Jan-Feb;61(1):123-30. doi: 10.1016/s1734-1140(09)70014-3. PMID: 19307700.
64. Ong SB, Subrayan S, Lim SY, Yellon DM, Davidson SM, Hausenloy DJ. Inhibiting mitochondrial fission protects the heart against ischemia/reperfusion injury. *Circulation*. 2010 May 11;121(18):2012-22. doi: 10.1161/CIRCULATIONAHA.109.906610. Epub 2010 Apr 26. PMID: 20421521.

65. Koponen S, Goldsteins G, Keinänen R, Koistinaho J. Induction of protein kinase Cdelta subspecies in neurons and microglia after transient global brain ischemia. *J Cereb Blood Flow Metab.* 2000 Jan;20(1):93-102. doi: 10.1097/00004647-200001000-00013. PMID: 10616797.
66. Murayama T, Tanabe M, Matsuda S, Shimazu M, Kamei S, Wakabayashi G, Kawachi S, Matsumoto K, Yamazaki K, Matsumoto K, Koyasu S, Kitajima M. JNK (c-Jun NH2 terminal kinase) and p38 during ischemia reperfusion injury in the small intestine. *Transplantation.* 2006 May 15;81(9):1325-30. doi: 10.1097/01.tp.0000209167.48030.6b. PMID: 16699462.
67. Endres M, Meisel A, Biniszkiwicz D, Namura S, Prass K, Ruscher K, Lipski A, Jaenisch R, Moskowitz MA, Dirnagl U. DNA methyltransferase contributes to delayed ischemic brain injury. *J Neurosci.* 2000 May 1;20(9):3175-81. doi: 10.1523/JNEUROSCI.20-09-03175.2000. PMID: 10777781; PMCID: PMC6773114.
68. Crosson CE, Mani SK, Husain S, Alsarraf O, Menick DR. Inhibition of histone deacetylase protects the retina from ischemic injury. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 2010 Jul;51(7):3639-45. doi: 10.1167/iovs.09-4538. Epub 2010 Feb 17. PMID: 20164449; PMCID: PMC2904015.
69. Ghafouri-Fard S, Shoorei H, Taheri M. Non-coding RNAs participate in the ischemia-reperfusion injury. *Biomed Pharmacother.* 2020 Sep;129:110419. doi: 10.1016/j.biopha.2020.110419. Epub 2020 Jun 18. PMID: 32563988.
70. Hu ZG, Zhou Y, Lin CJ, Yuan GD, He SQ. Emerging recognition of the complement system in hepatic ischemia/reperfusion injury, liver regeneration and recovery (Review). *Exp Ther Med.* 2021 Mar;21(3):223. doi: 10.3892/etm.2021.9654. Epub 2021 Jan 18. PMID: 33603832; PMCID: PMC7851628.
71. Saini HK, Xu YJ, Zhang M, Liu PP, Kirshenbaum LA, Dhalla NS. Role of tumour necrosis factor-alpha and other cytokines in ischemia-reperfusion-induced injury in the heart. *Exp Clin Cardiol.* 2005 Winter;10(4):213-22. PMID: 19641672; PMCID: PMC2716235.
72. Kumar P, Shen Q, Pivetti CD, Lee ES, Wu MH, Yuan SY. Molecular mechanisms of endothelial hyperpermeability: implications in inflammation. *Expert Rev Mol Med.* 2009 Jun 30;11:e19. doi: 10.1017/S1462399409001112. PMID: 19563700; PMCID: PMC2828491.
73. Gourdin MJ, Bree B, De Kock M. The impact of ischaemia-reperfusion on the blood vessel. *Eur J Anaesthesiol.* 2009 Jul;26(7):537-47. doi: 10.1097/EJA.0b013e328324b7c2. PMID: 19412112.
74. Colling ME, Tourdot BE, Kanthi Y. Inflammation, Infection and Venous Thromboembolism. *Circ Res.* 2021 Jun 11;128(12):2017-2036. doi: 10.1161/CIRCRESAHA.121.318225. Epub 2021 Jun 10. PMID: 34110909; PMCID: PMC8202069.
75. Rodrigues SF, Granger DN. Role of blood cells in ischaemia-reperfusion induced endothelial barrier failure. *Cardiovasc Res.* 2010 Jul 15;87(2):291-9. doi: 10.1093/cvr/cvq090. Epub 2010 Mar 17. PMID: 20299333; PMCID: PMC2895540.
76. Koupenova M, Clancy L, Corkrey HA, Freedman JE. Circulating Platelets as Mediators of Immunity, Inflammation, and Thrombosis. *Circ Res.* 2018 Jan 19;122(2):337-351. doi: 10.1161/CIRCRESAHA.117.310795. PMID: 29348254; PMCID: PMC5777300.

77. Sobiepanek A, Kuryk Ł, Garofalo M, Kumar S, Baran J, Musolf P, Siebenhaar F, Fluhr JW, Kobiela T, Plasenzotti R, Kuchler K, Staniszevska M. The Multifaceted Roles of Mast Cells in Immune Homeostasis, Infections and Cancers. *Int J Mol Sci.* 2022 Feb 17;23(4):2249. doi: 10.3390/ijms23042249. PMID: 35216365; PMCID: PMC8875910.
78. Peet C, Ivetic A, Bromage DI, Shah AM. Cardiac monocytes and macrophages after myocardial infarction. *Cardiovasc Res.* 2020 May 1;116(6):1101-1112. doi: 10.1093/cvr/cvz336. PMID: 31841135; PMCID: PMC7177720.
79. Duvigneau JC, Esterbauer H, Kozlov AV. Role of Heme Oxygenase as a Modulator of Heme-Mediated Pathways. *Antioxidants (Basel).* 2019 Oct 11;8(10):475. doi: 10.3390/antiox8100475. PMID: 31614577; PMCID: PMC6827082.
80. Eltzschig HK, Eckle T. Ischemia and reperfusion--from mechanism to translation. *Nat Med.* 2011 Nov 7;17(11):1391-401. doi: 10.1038/nm.2507. PMID: 22064429; PMCID: PMC3886192.
81. Dwyer GK, Turnquist HR. Untangling Local Pro-Inflammatory, Reparative, and Regulatory Damage-Associated Molecular-Patterns (DAMPs) Pathways to Improve Transplant Outcomes. *Front Immunol.* 2021 Feb 23;12:611910. doi: 10.3389/fimmu.2021.611910. PMID: 33708206; PMCID: PMC7940545.
82. Galluzzi L, Kepp O, Chan FK, Kroemer G. Necroptosis: Mechanisms and Relevance to Disease. *Annu Rev Pathol.* 2017 Jan 24;12:103-130. doi: 10.1146/annurev-pathol-052016-100247. Epub 2016 Dec 5. PMID: 27959630; PMCID: PMC5786374.
83. Wu MY, Yiang GT, Liao WT, Tsai AP, Cheng YL, Cheng PW, Li CY, Li CJ. Current Mechanistic Concepts in Ischemia and Reperfusion Injury. *Cell Physiol Biochem.* 2018;46(4):1650-1667. doi: 10.1159/000489241. Epub 2018 Apr 20. PMID: 29694958.
84. Del Re DP, Amgalan D, Linkermann A, Liu Q, Kitsis RN. Fundamental Mechanisms of Regulated Cell Death and Implications for Heart Disease. *Physiol Rev.* 2019 Oct 1;99(4):1765-1817. doi: 10.1152/physrev.00022.2018. PMID: 31364924; PMCID: PMC6890986.
85. Carden DL, Granger DN. Pathophysiology of ischaemia-reperfusion injury. *J Pathol.* 2000 Feb;190(3):255-66. doi: 10.1002/(SICI)1096-9896(200002)190:3<255::AID-PATH526>3.0.CO;2-6. PMID: 10685060.
86. Šibíková M, Živný J, Janota J. Cell Membrane-Derived Microvesicles in Systemic Inflammatory Response. *Folia Biol (Praha).* 2018;64(4):113-124. PMID: 30724157.
87. Niccoli G, Burzotta F, Galiuto L, Crea F. Myocardial no-reflow in humans. *J Am Coll Cardiol.* 2009 Jul 21;54(4):281-92. doi: 10.1016/j.jacc.2009.03.054. PMID: 19608025.
88. Bhattacharyya A, Chattopadhyay R, Mitra S, Crowe SE. Oxidative stress: an essential factor in the pathogenesis of gastrointestinal mucosal diseases. *Physiol Rev.* 2014 Apr;94(2):329-54. doi: 10.1152/physrev.00040.2012. PMID: 24692350; PMCID: PMC4044300.
89. Dubois-Deruy E, Peugnet V, Turkieh A, Pinet F. Oxidative Stress in Cardiovascular Diseases. *Antioxidants (Basel).* 2020 Sep 14;9(9):864. doi: 10.3390/antiox9090864. PMID: 32937950; PMCID: PMC7554855.

90. Marí M, Morales A, Colell A, García-Ruiz C, Fernández-Checa JC. Mitochondrial glutathione, a key survival antioxidant. *Antioxid Redox Signal*. 2009 Nov;11(11):2685-700. doi: 10.1089/ARS.2009.2695. PMID: 19558212; PMCID: PMC2821140.
91. Ho KM, Power BM. Benefits and risks of furosemide in acute kidney injury. *Anaesthesia*. 2010 Mar;65(3):283-93. doi: 10.1111/j.1365-2044.2009.06228.x. Epub 2010 Jan 19. PMID: 20085566.
92. Oh SW, Han SY. Loop Diuretics in Clinical Practice. *Electrolyte Blood Press*. 2015 Jun;13(1):17-21. doi: 10.5049/EBP.2015.13.1.17. Epub 2015 Jun 30. PMID: 26240596; PMCID: PMC4520883.
93. Jepson L. *Exotic Animal Medicine. A Quick Reference Guide*. New York: WB Saunders Co; 2009:93–173.
94. Beyersdorf F, Schlensak C. Controlled reperfusion after acute and persistent limb ischemia. *Semin Vasc Surg*. 2009 Mar;22(1):52-7. doi: 10.1053/j.semvasc.2009.01.005. PMID: 19298937.
95. Zhou T, Prather ER, Garrison DE, Zuo L. Interplay between ROS and Antioxidants during Ischemia-Reperfusion Injuries in Cardiac and Skeletal Muscle. *Int J Mol Sci*. 2018 Jan 31;19(2):417. doi: 10.3390/ijms19020417. PMID: 29385043; PMCID: PMC5855639.
96. Kang MY, Tsuchiya M, Packer L, Manabe M. In vitro study on antioxidant potential of various drugs used in the perioperative period. *Acta Anaesthesiol Scand*. 1998 Jan;42(1):4-12. doi: 10.1111/j.1399-6576.1998.tb05073.x. PMID: 9527743.
97. Wiemer G, Fink E, Linz W, Hropot M, Schölkens BE, Wohlfart P. Furosemide enhances the release of endothelial kinins, nitric oxide and prostacyclin. *J Pharmacol Exp Ther*. 1994 Dec;271(3):1611-5. PMID: 7996475.
98. Lahet JJ, Lenfant F, Courderot-Masuyer C, Ecarnot-Laubriet E, Vergely C, Durnet-Archeray MJ, Freysz M, Rochette L. In vivo and in vitro antioxidant properties of furosemide. *Life Sci*. 2003 Jul 11;73(8):1075-82. doi: 10.1016/s0024-3205(03)00382-5. PMID: 12818359.
99. Aravindan N, Aravindan S, Riedel BJ, Weng HR, Shaw AD. Furosemide prevents apoptosis and associated gene expression in a rat model of surgical ischemic acute renal failure. *Ren Fail*. 2007;29(4):399-407. doi: 10.1080/08860220701263671. PMID: 17497460.
100. Youssef MI, Mahmoud AA, Abdelghany RH. A new combination of sitagliptin and furosemide protects against remote myocardial injury induced by renal ischemia/reperfusion in rats. *Biochem Pharmacol*. 2015 Jul 1;96(1):20-9. doi: 10.1016/j.bcp.2015.04.010. Epub 2015 Apr 23. PMID: 25912235.
101. Carbone F, Bonaventura A, Montecucco F. Neutrophil-Related Oxidants Drive Heart and Brain Remodeling After Ischemia/Reperfusion Injury. *Front Physiol*. 2020 Feb 4;10:1587. doi: 10.3389/fphys.2019.01587. PMID: 32116732; PMCID: PMC7010855.



