

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

RAT İSKELET KASINDA İSKEMİ REPERFÜZYON
HASARINDA EMODİN'İN İN-VİVO ANTİOKSİDAN ETKİSİ

UZMANLIK TEZİ

Dr. DİLARA YİĞİT

TEZ DANIŞMANI

Prof. Dr. GÜRSEL LEVENT OKTAR

YARDIMCI TEZ DANIŞMANI

Öğr. Gör. Dr. HÜSEYİN DEMİRTAŞ

ANKARA

NİSAN 2025

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

RAT İSKELET KASINDA İSKEMİ REPERFÜZYON
HASARINDA EMODİN'İN İN-VİVO ANTİOKSİDAN ETKİSİ

UZMANLIK TEZİ
Dr. DİLARA YİĞİT

TEZ DANIŞMANI
Prof. Dr. GÜRSEL LEVENT OKTAR

YARDIMCI TEZ DANIŞMANI
Öğr. Gör. Dr. HÜSEYİN DEMİRTAŞ

Bu tez Gazi Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi tarafından
TTU-2024-9231 proje kodu ile desteklenmiştir.

ANKARA
NİSAN 2025

KABUL ve ONAY

X X X X

TEŞEKKÜR

Uzun ve emek dolu ihtisas sürecimde mesleki birikimi ve engin bilgisiyle her zaman saygıyla andığım değerli hocam Prof. Dr. Levent Gökgöz'e şükranlarımı sunuyorum.

Mesleki gelişimime katkıları için değerli bölüm başkanım Prof. Dr. Volkan Sinci'ye, ihtisas sürecimde bana yol gösterici olan, desteğini her zaman hissettiren kıymetli tez hocam Prof. Dr. Gürsel Levent Oktar'a, bilgi ve deneyimlerini paylaşan, desteği ve ağabeyliği ile her zaman yanımda olan Prof. Dr. Abdullah Özer'e, birikimden ve tecrübelerinden faydalanmaktan onur duyduğum Prof. Dr. Erkan İriz'e, cerrahi yaklaşımı ve becerisiyle kendime örnek aldığım Prof. Dr. Mustafa Hakan Zor'a, cerrahi eğitimime değerli katkılarından dolayı Prof. Dr. Hikmet Selçuk Gedik'e, birlikte çalışma fırsatı bulduğum için şanslı hissettiğim, benim için çok değerli olan Prof. Dr. Dilek Erer'e gönülden teşekkür ederim.

Her zaman ağabeyliklerini hissettiren, aynı zamanda yardımcı tez hocam olan Öğr. Gör. Dr. Hüseyin Demirtaş'a ve Öğr. Gör. Dr. Sercan Tak'a teşekkür ederim.

Uzmanlık eğitimim boyunca, neredeyse günün her anını birlikte geçirdiğimiz, bir aileye dönüştüğümüz değerli asistan arkadaşlarıma, bu zorlu süreci güzelleştirdikleri için minnettarım.

Mesleğimizin en önemli ortamlarından olan ameliyathanede; özverili çalışmalarıyla sürecin önemli parçalarından biri olan anestezi ekibine, ameliyathane hemşirelerine, perfüzyonistlere ve personellere, yoğun bakım ve serviste birlikte çalışmaktan büyük keyif aldığım hemşirelere ve personellere teşekkür ederim.

Son olarak her adımda yanımda olduklarını hissettiren, sevgi ve destekleriyle bana güç veren canım anneme, kıymetli ağabeyime ve sevgili kız kardeşime sonsuz teşekkür ederim.

Bugün bir kadın cerrah olarak mesleğimi icra edebiliyor olmamı, bizlere bu imkânı ve yolu açan Gazi Mustafa Kemal Atatürk'e minnet ve saygıyla teşekkür ederim.

Dr. Dilara YİĞİT

Ankara, 2025

İÇİNDEKİLER

KABUL VE ONAY	i
TEŞEKKÜR	ii
İÇİNDEKİLER	iv
KISALTMALAR	viii
TABLolar	xi
ŞEKİLLER	xii
RESİMLER	xiii
GRAFİKLER	xiv
1. GİRİŞ	1
2. GENEL BİLGİLER	4
2.1 Periferik Arter Hastalığı	4
2.1.1 Etiyoloji ve risk faktörleri	4
2.1.2 Epidemiyoloji	6
2.1.3 Patofizyoloji	7
2.1.4 Tanısal yaklaşım	10
2.1.4.1 Tıbbi öykü	10
2.1.4.2 Fizik muayene	11
2.1.4.3 Fonksiyonel testler	13
2.1.4.4 Görüntüleme yöntemleri	13
2.1.5 Akut-kronik periferik arter hastalığı ayrımı	14
2.1.5.1 Akut alt ekstremitte iskemisi	14
2.1.5.2 Kronik alt ekstremitte iskemisi	15
2.1.5.3 Kronik ekstremitte tehdit edici iskemi	17
	iv

2.1.5.3.a PLAN kavramı	18
2.1.5.3.b Wifi sınıflaması	18
2.1.5.3.c GLASS sınıflaması	20
2.1.6 Tedavi yaklaşımı	22
2.1.6.1 Yaşam tarzı değişiklikleri ve risk faktörü yönetimi	22
2.1.6.2 Egzersiz terapisi	23
2.1.6.3 Farmakoterapi	23
2.1.6.4 Revaskülarizasyon	24
2.1.7 Komplikasyonlar	26
2.2 İskemi-Reperfüzyon Hasarı	27
2.2.1 İskemi-reperfüzyon hasarı mekanizması	28
2.2.2 İskemi-reperfüzyon hasarında oksidatif stres	31
2.2.3 Reaktif oksijen ve azot türleri	35
2.2.4 İskemi-reperfüzyon hasarında mitokondriyel ve hücrel kalsiyum birikimi	37
2.2.4.1 İyon Dengesizliği	38
2.2.4.2 Lipid Peroksidasyonu	38
2.2.4.3 Proteaz Aktivasyonu	39
2.2.4.4 DNA Hasarı	39
2.2.5 İskemi-reperfüzyon hasarında hücre hasarı	40
2.2.5.1 Apoptoz	41
2.2.5.2 Mitoptoz: Mitokondriye özel programlanmış hücre ölümü	43
2.2.5.3 Nekroz	43
2.2.5.4 Nekroptoz: İ/R hasarında düzenlenmiş nekroz	44

2.2.5.5 Otofaji: İ/R hasarında çift yönlü etki	44
2.2.6 İskemi-reperfüzyon hasarında inflamatuvar yanıt	45
2.2.6.1 Hücresel yanıt	46
2.2.6.1.a Nötrofiller	46
2.2.6.1.b Monositler ve Makrofajlar	47
2.2.6.1.c T Lenfositleri	48
2.2.6.1.d Mast Hücreleri	48
2.2.6.1.e Doğal katil hücreleri	49
2.2.6.1.f Endotel hücreleri	50
2.2.6.2 Humoral Yanıt	52
2.2.6.2.a Kompleman Sistemi	52
2.2.6.2.b Sitokinler ve Kemokinler	52
2.2.6.2.c Koagülasyon Sistemi ve Trombositlerin Rolü	53
2.2.7 No-reflow fenomeni	53
2.2.8 İskemi-reperfüzyon hasarında uzak organ hasarı	55
2.2.9 İskemi-reperfüzyon hasarında biyokimyasal belirteçler	56
2.3 Emodin	60
3.GEREÇ VE YÖNTEM	64
3.1 Gereç	64
3.1.1 Deney hayvanları	64
3.1.2 Etik beyanı	64
3.1.3 Deneyin tasarımı	64
3.1.4 İlaç pozolojisi	65
3.2 Yöntem	65

3.2.1 İskemi-reperfüzyon modeli, cerrahi prosedür ve ilaç uygulanması	65
3.2.2 Oksidatif stres belirteçlerinin ölçülmesi için doku örnekleme	68
3.2.2.1 Malondialdehit (MDA) tayini	68
3.2.2.2 Glutasyon (GSH) tayini	69
3.2.2.3 Superoksit dismutaz (SOD) aktivitesi tayini	69
3.2.2.4 Katalaz (CAT) aktivitesi tayini	70
3.2.2.5 Total protein tayini	71
3.2.3 Histopatolojik inceleme için doku örnekleme	71
3.2.4 İstatistiksel analiz	72
4. BULGULAR	74
4.1 Biyokimyasal Bulgular	74
4.2 Histopatolojik Bulgular	77
5. TARTIŞMA	85
6. SONUÇ	93
7. KAYNAKLAR	94
8. ÖZET	112
9. SUMMARY	114
10. EKLER	116
10. 1 Etik Kurul Onayı	116

KISALTMALAR

PAH: Periferik arter hastalığı

İ/R: İskemik-reperfüzyon

ROS: Reaktif oksijen türleri

NADPH: Nikotinamid adenin dinükleotid fosfat

CLTI: Kronik ekstremitte tehdit edici iskemi

LDL: Düşük yoğunluklu lipoprotein

HDL: Yüksek yoğunluklu lipoprotein

CRP: C-reaktif protein

ABI: Ayak bileği-kol indeksi

TBI: Ayak parmağı-kol indeksi

BTA: Bilgisayarlı tomografi anjiyografi

MRA: Manyetik rezonans anjiyografi

DSA: Dijital subtraksiyon anjiyografi

ALI: alt ekstremitte iskemisi

CLEI: Kronik alt ekstremitte iskemisi

WIFI: Yara, iskemi, ayak enfeksiyonu

GLASS: Global ekstremitte anatomik evreleme sistemi

TcPO₂: Transkütan oksijen basıncı

SIRS: Sistemik inflamatuvar yanıt sendromu

FP: Femoropopliteal

IP: İnfrapopliteal

TAP: hedef arteriyel yol

ACE: Anjiyotensin dönüştürücü enzim

ARDS: Akut solunum sıkıntısı sendromu

ATP: Adenozin trifosfat

NOS: Nitrik oksit sentaz

NOX: NADPH oksidaz

O₂⁻: Süperoksit anyonları

H₂O₂: Hidrojen peroksit

TNF- α : Tümör nekroz faktörü-alfa

IFN- γ : İnterferon-gama

HIF-1 α : Hipoksi ile indüklenen faktör-1 α

NO: Nitrik oksit

ONOO⁻: Peroksinitrit

BH₄: Tetrahidrobiopterin

SOD: Süperoksit dismutaz

•OH: Hidroksil radikalleri

SERCA: Sarkoplazmik/endoplazmik retikulum Ca²⁺ ATPaz

mPTP: Mitokondriyal geçiş gözenek komplekslerinin

MDA: Malondialdehit

Apaf-1: Apoptotik proteaz aktivasyon faktörü-1

Drp1: Dynamin ilişkili protein 1

AIF: Apoptoz indükleyici faktör

IL: İnterlökin

RIPK: Reseptörle ilişkili protein kinaz

ICAM-1: Hücreler arası yapışma molekülü-1

MCP-1: Monosit kemotaktik proteini-1

TGF- β : Transformasyon büyüme faktörü-beta

PAF: Trombosit aktive edici faktör

TF: Doku faktörü

MAC: Membran atak kompleksinin

NF- κ B: Nükleer faktör kappa B

vWF: Von Willebrand faktörü

CAT: Katalaz

GSH: Glutasyon

GSH-Px: Glutasyon peroksidaz

GST: Glutasyon S-transferaz

HMGB1: Yüksek mobilite grubu kutu 1

DAMP: Hasar ile ilişkili moleküler patern

MLKL: Mikst soy kinaz alanı benzeri protein

ATG: Otofaji ile ilişkili genler

TABLÖLAR

Tablo 1. ABI ve TBI değerleri ve klinik yorumları

Tablo 2. Rutherford sınıflaması

Tablo 3. Fontaine sınıflaması

Tablo 4. Wifl sınıflaması

Tablo 5. Wifl sınıflamasına göre klinik evreleme

Tablo 6. Klinik evrelemeye göre bir yıllık amputasyon oranı

Tablo 7. GLASS sınıflaması

Tablo 8. Enzimatik antioksidanlar ve fonksiyonları

Tablo 9. Non-enzimatik endojen antioksidanlar ve fonksiyonları

Tablo 10. Non-enzimatik eksojen antioksidanlar ve fonksiyonları

Tablo 11. Kas dokusu oksidan durum parametreleri [Ort±SS]

Tablo 12. Kas dokusu histopatolojik bulguları [Ortanca (%25-%75)]

ŞEKİLLER

Şekil 1. PAH risk faktörleri ve patofizyolojisi

Şekil 2. Damar oklüzyonu ve kollateral gelişimi

Şekil 3. İskemide gerçekleşen hücresel ve mitokondriyal disfonksiyon mekanizması

Şekil 4. İskemi-reperfüzyonda iyon kanallarının fonksiyonu

Şekil 5. İskemi-reperfüzyon hasarında ksantin metabolizması

Şekil 6. İskemi-reperfüzyon hasarı mekanizması

Şekil 7. Haber-Weiss ve Fenton tepkimeleri

Şekil 8. İskemi-reperfüzyon hasarında hücre hasarı ve ölümü

Şekil 9. İskemi-reperfüzyon hasarında nötrofillerin göçü

Şekil 10. İskemi-reperfüzyon hasarında vasküler remodelling

Şekil 11. Emodin'in kimyasal yapısı

RESİMLER

Resim 1. Laparotomi sonrası serbestleştirilen abdominal aorta ve inferior vena cava (ok işareti)

Resim 2. Abdominal aortaya atravmatik bulldog klemp (ok işareti) yerleştirilmesi

Resim 3. Sham (S) grubuna ait HE boyalı kas kesitlerinin küçük (A) ve büyük büyültme (B) mikrografları

Resim 4. Emodin (E) grubuna ait HE boyalı kas kesitlerinin küçük (A) ve büyük büyültme (B) mikrografları

Resim 5. İskemi-reperfüzyon (İR) grubuna ait HE boyalı kas kesitlerinin küçük (A) ve büyük büyültme (B) mikrografları

Resim 6. İskemi-reperfüzyon (İR) grubuna ait HE boyalı kas kesitlerinin küçük (A) ve büyük büyültme (B) mikrografları

Resim 7. Emodin uygulanan iskemi-reperfüzyon (İR+E) grubuna ait HE boyalı kas kesitlerinin küçük (A) ve büyük büyültme (B) mikrografları

GRAFİKLER

Grafik 1: Kas dokusu MDA düzeyi verileri

Grafik 2: Kas dokusu CAT aktivitesi verileri

Grafik 3: Kas dokusu SOD aktivitesi verileri

Grafik 4: Kas dokusu GSH aktivitesi verileri



1. GİRİŞ

Alt ekstremitelerin periferik arter hastalığı (PAH), dünya çapında 230 milyondan fazla yetişkini etkileyen yaygın bir vasküler bozukluktur. Bu hastalık, ateroskleroz, tromboz veya diğer arter daralmalarına bağlı olarak gelişir ve alt ekstremitelere yetersiz kan akışıyla sonuçlanır. PAH ilerledikçe, dokulara yeterli oksijen sağlanamaması iskeminin ortaya çıkmasına neden olur ve bu durum ekstremitte fonksiyonlarını ciddi şekilde bozar. Cerrahi müdahalelerdeki ilerlemeler, amputasyon gerektirebilecek vakalarda kan akışının yeniden sağlanmasına olanak tanımaktadır. Ancak, bu prosedürler sıklıkla ciddi doku hasarı ve sistemik etkilerle sonuçlanabilen iskemik-reperfüzyon (İ/R) hasarı gibi önemli komplikasyonlarla ilişkilidir.

İskemik-reperfüzyon hasarı, bir iskemik dönemin ardından dokulara kan akışının yeniden sağlanmasıyla ortaya çıkar. Reperfüzyon, doku yaşamını sürdürmek için gerekli olsa da, paradoksal olarak zararlı biyokimyasal reaksiyonların bir zincirini tetikler. Yeniden oksijenlenme sürecinde büyük miktarlarda reaktif oksijen türleri (ROS) üretilir ve bu durum oksidatif stres, inflamasyon ve hücrel hasara yol açar. Reperfüzyonla ilişkili oksidatif patlama, lipitler, proteinler ve DNA üzerinde hasar oluşturarak hücrel homeostazı bozar ve nihayetinde apoptoz ile nekroza neden olur. İ/R hasarının lokal etkileri arasında şiddetli ödem, kompartman sendromu, rabdomiyoliz ve doku nekrozu yer almakta olup, bazı durumlarda ekstremitenin amputasyonunu gerektirebilir. Daha ağır vakalarda metabolik asidoz, elektrolit dengesizlikleri, renal ve hepatik disfonksiyon, pulmoner ödem, kardiyak aritmiler ve hatta kardiyak arrest gibi

sistemik etkiler gelişebilir ve bu durum morbidite ve mortaliteyi önemli ölçüde artırır.

İ/R hasarının patolojik mekanizmaları, çeşitli biyokimyasal ve moleküler yolları içerir. Ksantin oksidaz, nikotinamid adenin dinükleotid fosfat (NADPH) oksidaz ve nitrik oksit sentaz gibi enzimler, ROS üretiminde kritik roller üstlenir. Bu ROS, hücrel membranları hedef alarak oksidatif hasarı tetikler, protein yapılarını değiştirir ve DNA parçalanmasına neden olur. Ek olarak, inflammatuar yanıt, nötrofiller ve makrofajların bölgeye göçüyle daha da şiddetlenir ve doku hasarı artar. Bu karmaşık mekanizmalar göz önünde bulundurulduğunda, İ/R kaynaklı hasarı azaltmaya yönelik çeşitli tedavi stratejileri araştırılmıştır. Antioksidan tedaviler, enzim inhibitörleri ve antiinflammatuar ajanlar bu stratejiler arasında yer almaktadır.

Son dönemde yapılan araştırmalar, doğal olarak bulunan biyoaktif bileşiklerin İ/R hasarını hafifletme potansiyeline sahip olduğunu göstermektedir. Bu bileşikler arasında, çeşitli farmakolojik özellikleri nedeniyle antrakınon türevleri dikkat çekmektedir. Rheum palmatum ve Polygonum cuspidatum gibi bitkilerde doğal olarak bulunan bir antrakınon türevi olan Emodin, güçlü antiinflammatuar ve antioksidan aktivitelere sahiptir. Başlangıçta laksatif etkisiyle bilinen Emodin, son yıllarda daha geniş bir terapötik potansiyele sahip olduğu yönünde araştırmalara konu olmuştur. Çalışmalar, Emodin'in ROS temizleme, inflammatuar yolları modüle etme ve oksidatif stres kaynaklı hücrel hasarı inhibe etme yoluyla koruyucu etkiler gösterdiğini ileri sürmektedir. Ayrıca, apoptoz ve

otofajik süreçleri etkileyerek hücrel homeostazı ve stres koşullarında hücre yaşamını desteklediği gösterilmiştir.

Emodin'in çeşitli İ/R modellerinde kardiyoprotektif ve hepatoprotektif etkileri üzerine kapsamlı araştırmalar yapılmış olmasına rağmen, iskelet kası İ/R hasarındaki potansiyel rolü yeterince araştırılmamıştır. Oksidatif stres ve inflamasyonun İ/R patofizyolojisindeki kritik etkileri göz önüne alındığında, Emodin'in iskelet kası üzerindeki koruyucu rolünün incelenmesi, yeni terapötik stratejilere dair önemli bilgiler sağlayabilir. Bu nedenle, bu tez çalışmasında, sıçan modelinde iskelet kası İ/R hasarında emodinin in vivo antioksidan etkilerinin değerlendirilmesi ve iskemik koşullarda koruyucu bir ajan olarak potansiyelinin ortaya konması amaçlanmaktadır.

2. GENEL BİLGİLER

2.1 Periferik Arter Hastalığı

Periferik arter hastalığı (PAH), koroner ve serebral dolaşım dışındaki arterlerin daralması veya tıkanması ile karakterize edilen kronik, ilerleyici bir vasküler bozukluktur. Hastalık en sık alt ekstremiteleri etkilemekle birlikte, diğer periferik arterleri de tutabilir (1). PAH'nin küresel prevalansı giderek artmakta olup, yaşlanan popülasyon ve risk faktörlerine uzun süreli maruziyet, bu artışa neden olmaktadır (2). PAH genellikle, eforla ortaya çıkan ve istirahatle geçen ağrı ile karakterize edilen aralıklı kladikasyon ile ilişkilendirilse de, birçok birey asemptomatik kalabilir veya spesifik olmayan semptomlar yaşayabilir. Hastalığın ileri evrelerinde, istirahat ağrısı, iyileşmeyen ülserler ve gangren ile seyreden kronik ekstremitte tehdit edici iskemi (CLTI) gelişebilir ve bu durum amputasyon gerektirebilir.

2.1.1 Etiyoloji ve risk faktörleri

Periferik arter hastalığı (PAH), esas olarak lipit birikimi, endotel disfonksiyonu ve kronik inflamasyonun arteriyel daralmaya ve tıkanıklığa yol açtığı ilerleyici bir durum olan aterosklerozdan kaynaklanır (3). PAH'nin patogenezi, genetik yatkınlık, metabolik bozukluklar ve çevresel faktörlerin karmaşık etkileşimini içerir. Periferik arterlerde gelişen ateroskleroz, vasküler hastalığın sistemik bir tezahürü olup, koroner ve serebrovasküler hastalıklarla ortak risk faktörlerini paylaşmaktadır.

PAH için en önemli risk faktörlerinden biri sigara kullanımıdır. Sigara, endotel hasarını indükleyerek, oksidatif stresi artırarak ve protrombotik bir durumu teşvik ederek aterosklerotik plak oluşumunu hızlandırır (4). Sigara içme süresi ve yoğunluğu doğrudan hastalığın şiddetiyle ilişkilidir. Sigaranın bırakılması hastalığın ilerlemesini yavaşlatsa da, vasküler sistemde oluşan hasarın etkileri on yıllarca devam edebilir.

Diyabetes mellitus, PAH gelişiminde bir diğer önemli etkindir. Kronik hiperglisemi, endotel disfonksiyonuna, artmış oksidatif strese ve inflamasyona yol açarak aterosklerotik süreci daha da şiddetlendirir. Ayrıca, diyabet mikrovasküler komplikasyonlarla ilişkilidir ve kollateral dolaşımı bozarak daha ağır iskemik tablolara neden olabilir. Diyabetin süresi ve şiddeti, PAH gelişme riskiyle doğrudan orantılıdır ve diyabetik hastalar genellikle hastalığın daha ileri ve agresif formlarıyla başvururlar (5).

Dislipidemi, özellikle düşük yoğunluklu lipoprotein (LDL) kolesterol ve trigliserid seviyelerinin yüksek, yüksek yoğunluklu lipoprotein (HDL) kolesterol seviyelerinin düşük olması, ateroskleroz ile güçlü bir ilişkiye sahiptir (6). Arter duvarlarında lipit birikimi, inflamatuvar yanıtı tetikleyerek plak oluşumuna ve vasküler tıkanıklığa yol açar. Dislipideminin yaşam tarzı değişiklikleri ve farmakoterapi ile kontrol altına alınması, iskemik komplikasyon riskinin azaltılmasında kritik öneme sahiptir (4).

Hipertansiyon, vasküler yeniden şekillenmeye, endotel disfonksiyonuna ve artmış arteriyel sertliğe neden olarak PAH gelişiminde rol oynar. Yüksek kan basıncı, arter duvarında kronik strese yol açarak inflamasyonu tetikler ve plak

rüptürünü kolaylaştırır. Boylamsal çalışmalar, hipertansiyonun şiddeti ile PAH insidansı arasında doğrudan bir ilişki olduğunu göstermiştir ve bu durum, kan basıncının kontrol altına alınmasının hastalık önlenmesindeki önemini vurgulamaktadır (5).

Bu iyi tanımlanmış risk faktörlerine ek olarak, obezite, sedanter yaşam tarzı ve kronik sistemik inflamasyon da PAH patogeneğinde rol oynamaktadır. C-reaktif protein (CRP) ve fibrinojen gibi inflamatuvar belirteçlerin yüksek seviyeleri, ateroskleroz ve trombotik olay riskinde artış ile ilişkilidir (7). Ayrıca, hiperkoagülabilité ve kan viskozitesindeki anormallikler, duyarlı bireylerde hastalığın ilerlemesini hızlandırabilir (8).

PAH, genellikle geleneksel kardiyovasküler risk faktörleriyle ilişkilendirilse de, yeni kanıtlar genetik yatkınlığın ve epigenetik değişimlerin de hastalığa duyarlılığı etkilediğini göstermektedir (9). Lipit metabolizması, endotel fonksiyonu ve inflamatuvar yolları etkileyen genetik varyasyonlar, PAH gelişiminde rol oynayan potansiyel etmenler olarak tanımlanmıştır (10).

2.1.2 Epidemiyoloji

Periferik arter hastalığının PAH görülme sıklığı coğrafi bölgelere ve sosyoekonomik düzeye bağlı olarak farklılık göstermektedir. Yüksek gelirli ülkelerde erkekler daha sık etkilenirken, orta ve düşük gelirli bölgelerde hastalığın kadınlarda daha yaygın olduğu görülmektedir (4). Popülasyon bazlı çalışmalarda, Avrupa kohortlarında 65 yaş üzerindeki bireylerde PAH prevalansının yaklaşık %18 olduğu, Türkiye’de ise 45 yaş üzerindeki bireylerde bu oranın yaklaşık %17,6

olduğu bildirilmiştir (4, 11). Bu veriler, PAH'nin önemli bir sağlık yükü oluşturduğunu ve erken tanı ile etkili yönetim stratejilerinin gerekliliğini ortaya koymaktadır.

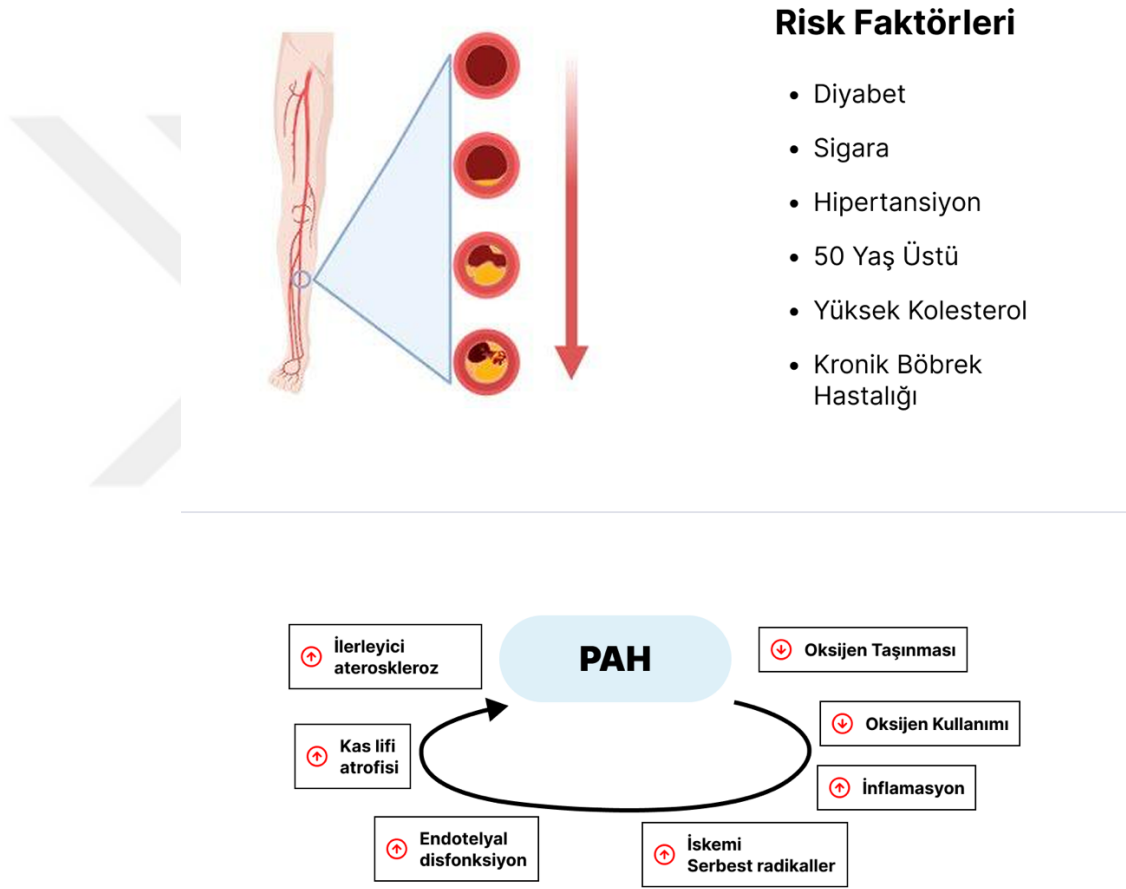
Hastalık yalnızca önemli bir morbidite nedeni olmakla kalmayıp, aynı zamanda kardiyovasküler mortalitenin de güçlü bir belirleyicisidir. PAH'li bireylerde miyokard enfarktüsü ve inme riski belirgin şekilde artmıştır (12). Ayrıca, hastalığın doğal seyri, mevcut risk faktörlerinin varlığı ve uygulanan tıbbi müdahalelerin etkinliğine bağlı olarak değişkenlik göstermektedir. PAH hastalarının belirli bir alt grubunda, ekstremitte kaybı ve ciddi sakatlık oranlarının yüksek olduğu CLTI gelişmektedir. Epidemiyolojik veriler, popülasyonun yaklaşık %0,4'ünün CLTI geliştirdiğini ve bu oranın diyabetik bireylerde daha yüksek olduğunu göstermektedir (5).

2.1.3 Patofizyoloji

PAH'nin patofizyolojisi, vasküler yatakta meydana gelen değişiklikler ve bunun dolaşım üzerindeki etkileri ile karakterizedir. Hastalığın temelinde endotel disfonksiyonu, kronik inflamasyon ve oksidatif stres yer almakta olup, bu faktörler vasküler yeniden şekillenmeye neden olarak damar lümeninin daralmasına yol açar ve etkilenen dokulara perfüzyonun azalması ile sonuçlanır (Şekil 1) (13).

PAH'nin temel patolojik süreci olan ateroskleroz, sigara kullanımı, diyabetes mellitus, hipertansiyon ve hiperlipidemi gibi risk faktörlerine bağlı olarak gelişen endotel hasarı ile başlar. Endotel fonksiyonunun bozulması, nitrik oksit üretiminin azalmasına neden olarak vazokonstrüksiyonu ve trombozu teşvik eder.

Ek olarak, LDL arter duvarında birikmesi, inflamatuvar yanıtı tetikleyerek monositlerin bölgeye göç etmesine ve makrofajlara dönüşmesine yol açar (14). Bu makrofajların köpük hücrelerine dönüşmesi, aterosklerotik plak oluşumunda rol oynar ve zamanla arteriyel akımın ilerleyici şekilde tıkanmasına neden olur (15).

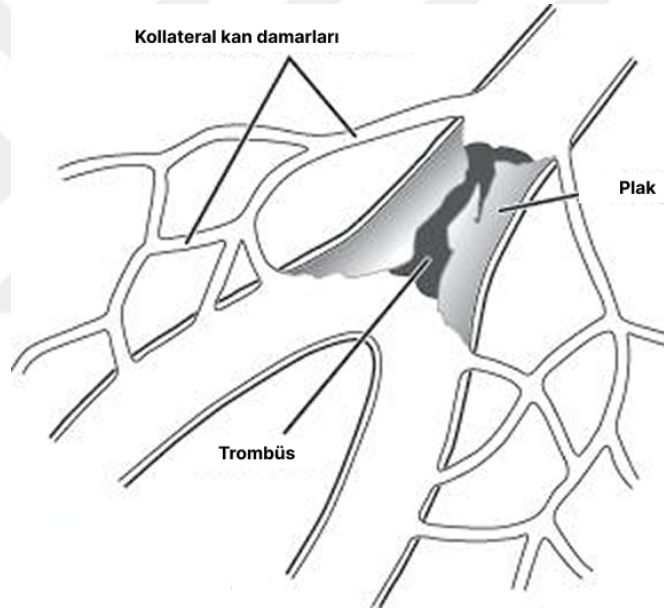


Şekil 1. PAH risk faktörleri ve patofizyolojisi

Hastalık ilerledikçe alt ekstremitelerde kronik iskemi gelişir ve klinik olarak aralıklı kladikasyon ile kendini gösterir; şiddetli vakalarda ise kritik ekstremit iskemisi ortaya çıkabilir. İskemik dokularda gelişen kompensatuvar yanıtlar,

anjiyogenez ve kollateral damar oluşumunu içerse de, bu mekanizmalar çoğu zaman normal perfüzyonu sağlamada yetersiz kalır (16).

Arteriyel daralmanın derecesine bağlı olarak ateroskleroz, hemodinamik açıdan önemli sonuçlar doğurur. Darlığın ilerlemesi veya tam tıkanıklık durumunda, kan akışı hastalıklı arterin etrafındaki kollateral damarlara yönlendirilir (Şekil 2). Ancak bu kollateral dolaşım, ana arterin sağladığı kan akımını tamamen karşılayamaz ve dokuların oksijen ihtiyacını karşılamakta yetersiz kalır.



Şekil 2. Damar oklüzyonu ve kollateral gelişimi

Oksijen arzı ile talebi arasındaki bu dengesizlik, iskelet kaslarında metabolik değişikliklere neden olarak mitokondriyal disfonksiyon ve anaerobik metabolizmaya artan bağımlılıkla ilişkilidir. Sonuç olarak, kas yorgunluğu ve egzersiz intoleransı belirgin hale gelir. İlerleyen evrelerde, perfüzyon eksikliği dinlenme sırasında bile dokuların metabolik ihtiyaçlarını karşılamaya yetmez ve

sinir iskemisine bağlı yanıcı istirahat ağrısı ortaya çıkar. Uzun süreli hipoksi doku nekrozunu tetikleyerek iyileşmeyen ülserler ve kangren gelişimine zemin hazırlar, bu da zamanında müdahale edilmezse amputasyon riskini önemli ölçüde artırır (17).

2.1.4 Tanısal yaklaşım

2.1.4.1 Tıbbi öykü

Periferik arter hastalığının teşhisinde en önemli aşamalardan biri, hastanın ayrıntılı tıbbi öyküsünün alınmasıdır (18). Özellikle, istirahatle geçen ve fiziksel aktiviteyle belirginleşen bacak ağrıları, PAH'ın tipik semptomlarından biri olarak değerlendirilmelidir. Ancak, bu tür yakınmalar artrit, nörolojik hastalıklar veya kas-iskelet sistemi bozukluklarıyla da ilişkili olabileceğinden, dikkatli bir ayırıcı tanı yapılmalıdır.

Tıbbi öykü sürecinde, hastaların yalnızca mevcut semptomları değil, aynı zamanda yaşam tarzları, kardiyovasküler risk faktörleri ve sigara kullanımı gibi alışkanlıkları da sorgulanmalıdır. Çünkü uzun dönemli takiplerde, başlangıçta asemptomatik olan bireylerin zaman içinde belirgin semptomlar geliştirdiği ve bu süreçte kardiyovasküler mortalite risklerinin yükseldiği gözlemlenmiştir (19). Çeşitli çalışmalar, PAH'ın kardiyovasküler komplikasyonlara bağlı mortalite riskini önemli ölçüde artırdığını ortaya koymaktadır (19).

Bunun yanı sıra, nadir görülen damar hastalıklarının tanısında da tıbbi öykünün detaylı olarak incelenmesi büyük önem taşır. Örneğın, Raynaud fenomeni, Buerger hastalığı ve vaskülitler, PAH ile benzer semptomlar gösterebilir ve bu nedenle dikkatli bir klinik değerlendirme gerektirir. Bu bağlamda, hastanın

öyküsünün titizlikle alınması, yalnızca tanıyı kesinleştirmek için değil, aynı zamanda hastalığın ilerleyişini ve risk faktörlerini daha iyi yönetmek için kritik bir adımdır.

2.1.4.2 Fizik muayene

Periferik arter hastalığının değerlendirilmesinde fizik muayene, erken tanı ve hastalığın şiddetinin belirlenmesi açısından önemli bir rol oynar. Muayene sırasında özellikle alt ekstremitelerdeki cilt değişiklikleri, nabız muayenesi ve dolaşım bozukluğuna işaret eden diğer bulgular dikkatle incelenmelidir. Soğuk ve parlak cilt, kılların seyrekleşmesi, kapiller dolum süresinde uzama ve ayak bileği seviyesinde nabızların azalması veya kaybolması, periferik arter hastalığının tipik bulguları arasında yer alır (17).

Hastanın alt ekstremitesi yükseltildiğinde solgunluk oluşması ve tekrar aşağıya indirildiğinde reaktif hiperemi gözlemlenmesi, arteriyel yetmezliği düşündüren diğer önemli belirtilerdendir. İleri evre hastalarda, uzun süre iyileşmeyen yaralar ve gangren gelişimi gözlemlenebilir. Ayrıca, femoral ve popliteal arterler üzerinde üfürüm duyulması, büyük damar düzeyinde stenoz veya oklüzyon varlığına işaret edebilir (17).

Fizik muayene kapsamında, ayak bileği-kol indeksi (ABI) ölçümü de önemli bir tarama ve tanı yöntemi olarak kullanılır. Üst ve alt ekstremiteden alınan sistolik kan basıncı ölçümleri karşılaştırılarak hesaplanan bu indeks, 0.9'un altında olduğunda arteriyel yetmezlik açısından anlamlı kabul edilir. Bunun yanı sıra, üst

ekstremiteler arasında 15 mmHg'den fazla kan basıncı farkı olması, uzun vadede artan kardiyovasküler hastalık riski ve mortalite ile ilişkilendirilmektedir (20).

ABI'nin 1.4'ün üzerinde olması, arterlerin sertleşmesi ve bu nedenle tam olarak kapanamaması ile bağlantılıdır. Bu durum sıklıkla diyabet veya kronik böbrek yetmezliği (KBY) hastalarında görülmektedir. Öte yandan, ayak bileği-kol indeksinin 0.9 veya daha düşük olması, kardiyovasküler hastalık riski açısından önemli bir belirtidir (4).

Asemptomatik hastalarda ABI kullanılarak yapılan taramaların periferik arter hastalığının tespitinde yeterli olmadığına dair bazı eleştiriler bulunmaktadır. Yapılan güncel bir meta-analiz, ABI ile ayak parmağı-kol indeksi (TBI) yöntemlerini karşılaştırmış ve belirli bir darlık seviyesinin tespitinde TBI'nin daha yüksek duyarlılığa sahip olduğunu ortaya koymuştur. Özellikle diyabet gibi tanı sürecinin daha karmaşık olduğu hasta gruplarında, TBI'nin tercih edilebilecek bir yöntem olduğu düşünülmektedir (Tablo 1) (21).

Tablo 1. ABI ve TBI değerleri ve klinik yorumları

ABI Değeri	Yorum	TBI Değeri	Yorum
1,4-1	Normal	>0,7	Normal
1-0,9	Sınırdan	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		

ABI: Ayak bileği brakiyal basınç indeksi, TBI: Ayak parmağı kol indeksi, PAH: periferik arter hastalığı

2.1.4.3 Fonksiyonel testler

Avrupa Kılavuzuna göre, periferik arter hastalığının değerlendirilmesinde yürüme bandı testleri belirli standartlara göre uygulanmalıdır. Testin başlangıcında, yürüme bandının hızı saatte 3 km olarak ayarlanmalı ve eğimi %10 olmalıdır. Test sırasında, hastanın ağrı nedeniyle yürümeyi bırakana kadar devam etmesi istenir ve bu sayede yürüme kapasitesi belirlenebilir. Egzersiz sonrasında ayak bileği kan basıncında 30 mmHg'den fazla bir düşüş meydana gelmesi veya ABI'nin %20'den fazla azalması, alt ekstremitedeki arterlerin tıkanıklığını düşündüren önemli bulgular arasında kabul edilir (4).

2.1.4.4 Görüntüleme yöntemleri

Doppler ultrasonografi (USG), yaygın olarak kullanılan, non-invaziv ve maliyet etkin bir teknik olup, darlık derecesi ve tıkanıklık uzunluğunun değerlendirilmesine yardımcı olur. Gerçek zamanlı, iki boyutlu görüntüleme sağlayan ve renkli Doppler fonksiyonu içeren bu yöntem, hemodinamik önemi ve plak özelliklerini değerlendirmeye olanak tanır. Ayrıca, cerrahi sonrası vasküler açıklığın takibinde yaygın olarak kullanılmakta ve ek müdahale gerekliliğinin belirlenmesine yardımcı olmaktadır (22).

Bilgisayarlı Tomografi Anjiyografi (BTA), yüksek çözünürlüklü vasküler görüntüleme sağlayan bir diğer önemli modalitedir ve %50'den büyük arteriyel darlıkların tespitinde yaklaşık %92 duyarlılık ve %93 özgüllüğe sahiptir (23). Ancak, ileri derecede vasküler kalsifikasyonlar ve hareket artefaktları tanısal

doğruluğunu olumsuz etkileyebilir. Bunun yanı sıra, iyotlu kontrast ajan kullanımı, böbrek fonksiyonu bozulmuş hastalarda kullanımını kısıtlamaktadır.

Manyetik Rezonans Anjiyografi (MRA), %93-100 arasında bildirilen duyarlılık ve özgüllük değerleriyle yüksek kaliteli vasküler görüntüleme sunmaktadır. BTA'nın aksine, MRA vasküler kalsifikasyonlardan etkilenmez, bu da ağır kalsifiye arterlere sahip hastalarda özellikle faydalı olmasını sağlar. Ancak, gadolinyum bazlı kontrast ajan kullanımı nefrojenik sistemik fibrozis riski taşıdığından, böbrek yetmezliği olan hastalarda dikkatli olunmalıdır (24). Ayrıca, metal implantlar veya kalp pili bulunan hastalarda kontrendike olması önemli bir kısıtlılıktır.

Dijital Subtraksiyon Anjiyografi (DSA), ayrıntılı anatomik bilgi sağlaması ve eş zamanlı terapötik girişime olanak tanınması nedeniyle vasküler görüntülemede altın standart olarak kabul edilmektedir. Bununla birlikte, iyotlu kontrast madde kullanımı gerektirmesi ve radyasyon maruziyeti nedeniyle invaziv bir yöntemdir. DSA, özellikle akut ekstremité iskemisi gibi acil revaskülarizasyon planlanan vakalarda, non-invaziv modalitelerin zamanında yeterli bilgi sağlayamayabileceği durumlarda tercih edilmektedir (25).

2.1.5 Akut-kronik periferik arter hastalığı ayrımı

2.1.5.1 Akut alt ekstremité iskemisi

Akut alt ekstremité iskemisi (ALI), ekstremité perfüzyonunda ani bir azalma ile doku yaşamını tehdit eden ve acil müdahale gerektiren bir klinik durumdur. ALI'nin başlıca nedenleri arteriyel emboli, aterosklerotik plaktaki in situ tromboz

veya travmaya bağlı vasküler tıkanıklıktır. ALI'nin patofizyolojisi, kan akışının ani olarak kesintiye uğraması sonucu hücresel ve biyokimyasal süreçlerde meydana gelen değişiklikler ile karakterizedir ve bu durum geniş çaplı doku hasarına yol açabilir. Klinik olarak ALI, altı P belirtisi (pain – ağrı, pallor – solukluk, pulselessness – nabız kaybı, paresthesia – duyu kaybı, paralysis – felç ve poikilothermia – sıcaklık değişikliği) ile kendini gösterir ve iskemi şiddetine bağlı olarak değişen derecelerde semptomlar görülür (26).

2.1.5.2 Kronik alt ekstremite iskemisi

Kronik alt ekstremite iskemisi (CLEI), genellikle ateroskleroz kaynaklı uzun süreli arter tıkanıklığı sonucunda gelişen ilerleyici bir hastalıktır. Etkilenen ekstremitelerde yetersiz kan akışı ile karakterizedir ve ağrı, doku hasarı ve ileri vakalarda ekstremitte kaybı riskiyle seyreden kritik ekstremitte iskemisine yol açabilir.

CLEI'nin klinik tablosu, hastalığın şiddetine bağlı olarak değişkenlik göstermektedir. İlk belirtiler genellikle aralıklı kladikasyon şeklinde ortaya çıkar; bu durum, eforla ortaya çıkan ve istirahatle geçen bacak ağrısı ile karakterizedir. Hastalığın ilerlemesiyle birlikte, hastalarda iskemik istirahat ağrısı, iyileşmeyen ülserler ve kangren gelişebilir; bu bulgular CLTI varlığını düşündürmektedir.

Rutherford ve Fontaine sınıflamaları, iskeminin ciddiyetini değerlendirmek ve uygun tedavi stratejisini belirlemek için kullanılan önemli ölçeklerdir (27). Rutherford sınıflamasına göre, yürüyüş bozukluğu hafif, orta ve şiddetli aralıklı kladikasyo olarak kategorize edilir ve bu durum, saatte 2 mil hızla ve %12 eğimle

yapılan beş dakikalık koşu bandı testi ile değerlendirilir (Tablo 2). Fontaine sınıflamasında ise bu bozukluk, 200 metre yürüyüş mesafesi ile tanımlanmaktadır (Tablo 3).

Tablo 2. Rutherford sınıflaması

Evre	Kategori	Klinik Tanım	Objektif Kriterler
0	0	Asemptomatik	Normal yürüme bandı egzersiz testi
	1	Hafif kladikasyo	Yürüme bandı egzersizi sonrası ayak bileği basıncı >50 mmHg, ancak istirahatteki basınç değerinden en az 20 mmHg daha düşük
I	2	Orta derecede kladikasyo	1. ve 3. kategorilerin arasında kalan hastalar
	3	Ciddi kladikasyo	Yürüme bandı egzersizi sonrası ayak bileği basıncı <50 mmHg
II	4	İskemik istirahat ağrısı	İstirahatta ayak bileği basıncı <40 mmHg veya metatarsal nabız kontrolünde zor nabız alınır
III	5	Küçük doku kaybı, iyileşmeyen ülser	İstirahatta ayak bileği basıncı <60 mmHg veya metatarsal nabız kontrolünde zor nabız alınır
	6	Büyük doku kaybı, transmetatarsal seviyenin üstüne uzanır.	5. kategori ile aynı

Tablo 3. Fontaine sınıflaması

Evreler	Semptomlar
Evre I	Aseptomatik
Evre II	Hafif kladikasyo intermittant
Evre IIA	200 m'den fazla mesafede kladikasyo intermittant
Evre IIB	200 m'den az mesafede kladikasyo intermittant
Evre III	Dinlenme ağrısı, genellikle ayaklarda
Evre IV	Ekstremitelerde ülser, nekroz ve/veya kangren

2.1.5.3 Kronik ekstremitte tehdit edici iskemi

Kronik ekstremitte tehdit edici iskemi, PAH'ın en ileri evresini temsil etmekte olup, istirahatte devam eden iskemik ağrı, iyileşmeyen ülserler veya kangren gibi ciddi klinik belirtilerle karakterizedir. Uzun süreli aterosklerotik arter tıkanıklıkları sonucunda gelişen bu durum, etkilenen ekstremitelerde perfüzyonun yetersiz kalmasına neden olarak, tedavi edilmediğinde majör amputasyon riskini önemli ölçüde artırmaktadır.

Bununla birlikte, CLTI yalnızca ekstremitte kaybına neden olmakla kalmaz, aynı zamanda kardiyovasküler mortalite oranlarını da yükselterek hastanın yaşamını tehdit eden ciddi bir klinik tabloya yol açar (28). Bu yüzden, CLTI'nin yönetiminde yalnızca damar tıkanıklıkları değil, aynı zamanda ekstremitenin durumu, iskeminin ciddiyeti ve hastanın sistemik risk faktörleri de dikkate alınmalıdır. Geleneksel yaklaşımlar, çoğunlukla arteriyel tıkanıklığın derecesine odaklanırken, güncel klinik yaklaşımlar ekstremitenin fonksiyonel durumu ve iskeminin şiddetini bütüncül bir perspektifle ele almayı gerektirmektedir.

2.1.5.3.a PLAN kavramı

CLTI vakalarında, sistematik bir yaklaşım için önerilen PLAN kavramı şu şekildedir (29):

- Hastanın risk durumu (Patient risk): Hastanın genel durumu, yaşam beklentisi ve ekstremitenin kurtulma şansı değerlendirilir.
- Ekstremitenin durumu (Limb severity): Wifl (Yara, iskemi, ayak enfeksiyonu) sınıflaması ile iskemi ve ekstremita değerlendirilir.

Tıkanıklığın Anatomik Görüntüsü (Anatomic pattern): GLASS (Global ekstremita anatomik evreleme sistemi) evrelemesi kullanılarak tıkanıklığın anatomisi ve revaskülarizasyona uygunluğu değerlendirilir.

PLAN kavramı, hastayı bütüncül bir yaklaşımla değerlendirerek, iskekiye bağlı riskleri en aza indirmeyi ve en uygun tedavi seçeneğini belirlemeyi amaçlayan sistematik bir yöntem sunar (29).

2.1.5.3.b Wifl sınıflaması

Wifl sınıflaması, CLTI'nın şiddetini değerlendirmek ve tedavi kararlarını yönlendirmek amacıyla Vasküler Cerrahi Derneği (Society for Vascular Surgery - SVS) tarafından geliştirilmiş bir risk sınıflandırma sistemidir (30). Bu sınıflama, ekstremita kurtarma potansiyelini değerlendirmek için üç kritik parametreyi entegre eden yapılandırılmış bir yaklaşım sunar: yaranın boyutu ve derinliği, iskemi şiddeti ve ayaktaki enfeksiyonun varlığı ve derecesi (Tablo 4).

Yara (W) bileşeni, lezyonları boyut ve doku kaybına göre sınıflandırır ve küçük ülserlerden geniş ayak kangrenlerine kadar değişen dereceleri içerir.

İskemi (I) bileşeni, ABI, TBI ve transkütan oksijen basıncı (TcPO₂) ölçümleri kullanılarak kan akışının azalmasının ciddiyetini değerlendirir.

Ayak Enfeksiyonu (fI) bileşeni, lokal yüzeysel enfeksiyondan sistemik inflamatuvar yanıt sendromuna (SIRS) kadar değişen enfeksiyon derecelerini kapsar.

Tablo 4. WifI sınıflaması

Bileşen	Skor	Tanım		
Yara	0	Ülser veya kangren yok		
	1	Kangren olmadan, ayak veya bacakta küçük veya yüzeysel ülser		
	2	Ayak parmakları ile sınırlı, tendon, kemik veya eklemin açıkta olduğu derin ülser ± kangren		
	3	Ayağın ön ve/veya orta bölümünü kapsayan derin, yaygın ülser ± kalkaneal tutulum ± geniş kangren		
İskemi		ABI	Ayak bileği sistolik basıncı (mmHg)	Ayak başparmağı sistolik basıncı veya trans kutanöz 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	0	Enfeksiyon yok		
	1	Sadece cilt-cilt altını tutan hafif, lokal enfeksiyon, 0,5-2 cm arası eritem		
	2	Orta derecede lokal enfeksiyon ve >2cm eritem		
	3	SIRS belirtileri gösteren ciddi lokal enfeksiyon		

ABI: Ayak bileği-kol indeksi, WifI: Yara, iskemi, ayak enfeksiyonu

CLTI için uluslararası vasküler kılavuzlar, WifI sınıflamasını kullanarak ekstremitelerin klinik olarak evrenlenmesini tavsiye etmektedir (Tablo 5) (31).

Tablo 5. 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
	f1 0	f1 1	f1 2	f1 3	f1 0	f1 1	f1 2	f1 3	f1 0	f1 1	f1 2	f1 3	f1 0	f1 1	f1 2	f1 3

Klinik evreleme ile ekstremitenin kurtarılabilirliği hakkında öngörude bulunulabilir (Tablo 6).

Tablo 6. Klinik evrelemeye göre bir yıllık 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

2.1.5.3.c GLASS sınıflaması

Global ekstremita anatomik evreleme sistemi, CLTI durumunda arteriyel tıkanıklıkların ciddiyetini değerlendirmek ve en uygun revaskülarizasyon stratejisini belirlemek için geliştirilmiş standart bir sınıflamadır. Femoropopliteal (FP) ve infrapopliteal (IP) segmentleri değerlendirilerek, lezyonların yaygınlığı ve karmaşıklığını objektif bir şekilde analiz eder. FP (0-4) ve IP (0-4) evreleri, hastalığın şiddetini tanımlarken, hedef arteriyel yol (TAP) kavramı, ayağa en iyi kan akışını sağlayacak optimal vasküler rotayı belirlemeye yardımcı olur (29).

Tablo 7. GLASS sınıflaması (29)

FP Evre 0	-Hafif veya önemsiz darlık (<%50)	İP Evre 0	-Primer hedef arter yolunda hafif veya anlamlı hastalık yok
FP Evre 1	-Toplam uzunluk SFA hastalığı <1/3 (<10 cm) -Fokal tek bölge AFA (<5 cm) içerebilir -Hafif ya da belirgin olmayan popliteal arter hastalığı	İP Evre 1	-Tibial arterin bölgesel darlığı (<3 cm)
FP Evre 2	-Toplam SFA'nın hastalık bölgesi 1/3-2/3. (10-20 cm) -Toplam <1/3 (<10 cm) kronik tıkanıklık içerebilir. -Popliteal arter darlıkları <2 cm, ancak trifurkasyon içermeyen	İP Evre 2	- Toplam uzunluğu 1/3'ü içeren darlık -Bölgesel kronik darlık içerebilir (<3 cm) -TP gövdesini veya tibial arteri içermeyen
FP Evre 3	-SFA hastalıklı bölgesi toplam >2/3 (>20 cm) -<20 cm'den az tıkanıklık veya 10-20 cm uzunluğunda kronik tıkanıklık -Kısa popliteal darlık 2 cm arası, trifurkasyonu içermeyen	İP Evre 3	-2/3 damar uzunluğu tutan hastalık -Kronik tıkanıklığın 1/3 uzunluğa kadar (Tibial damar orijinini içerebilir ancak tibioperoneal gövdeyi içermeyebilir)
FP Evre 4	-Toplam SFA'nın tıkanıklığı >20 cm -Popliteal hastalık >5 cm veya daha uzun trifurkasyonu içine alan -Herhangi bir popliteal bölgenin kronik tıkanıklığı	İP Evre 4	-Yaygın darlık >2/3 -Kronik tıkanıklık >1/3 -Herhangi bir kronik tıkanıklık tibioperoneal gövdenin, AT arteri tutmayan

FP: Femoropopliteal; İP: infrapopliteal; SFA: Superfisiyal femoral arter; AFA: Ana femoral arter; DFA: Derin femoral arter, AT: Anterior tibial; TP: Tibioperoneal trunkus

Bu sistem, endovasküler veya cerrahi revaskülarizasyon kararlarını kişiselleştirmek ve girişim sonrası başarıyı öngörmek için kullanılır. Wifl sınıflamasıyla entegre edilerek CLTI'nin bütüncül değerlendirilmesine katkı sağlar. Ancak arteriyel kalsifikasyon, kollateral dolaşım veya hasta bazı komorbiditeleri doğrudan dikkate almaması ve öncelikli olarak endovasküler girişimler için optimize edilmesi gibi bazı kısıtlılıkları vardır.

2.1.6 Tedavi yaklaşımı

PAH yönetimi, arteriyel perfüzyonu iyileştirmeyi, hastalığın ilerlemesini önlemeyi ve kardiyovasküler komplikasyon riskini azaltmayı amaçlamaktadır. Tedavi stratejileri arasında risk faktörlerinin modifikasyonu, farmakolojik tedavi, egzersiz terapisi ve revaskülarizasyon yer almaktadır. Klinik çalışmalar ve popülasyon bazlı araştırmalar, multimodal yaklaşımların PAH hastalarında en iyi sonuçları sağladığını göstermektedir (32).

2.1.6.1 Yaşam tarzı değişiklikleri ve risk faktörü yönetimi

Modifiye edilebilir risk faktörleri arasında sigara kullanımı, diyabetes mellitus, hipertansiyon ve dislipidemi bulunmaktadır ve bu faktörler PAH progresyonunu önemli ölçüde etkilemektedir. Sigaranın bırakılması, hastalığın ilerlemesini yavaşlatmada kilit bir müdahale olup, yapılan çalışmalar sigara içen bireylerde PAH gelişme riskinin sigara içmeyenlere kıyasla iki ila dört kat arttığını göstermiştir (5).

Diyabetik hastalarda glisemik kontrolün sağlanması ve renin-anjiyotensin sistem inhibitörleri ile kan basıncının optimal yönetimi, ateroskleroz progresyonunun yavaşlatılmasında kritik rol oynamaktadır (33, 34). Yapılan çalışmalar, statin tedavisinin PAH hastalarında kardiyovasküler olayları önemli ölçüde azalttığını ve ekstremité prognozunu iyileştirdiğini ortaya koyarak, lipid düşürücü tedavilerin önemini vurgulamaktadır (35, 36).

2.1.6.2 Egzersiz terapisi

Supervizyonlu yürüme programlarının, ağrısız yürüme mesafesini ve fonksiyonel kapasiteyi artırdığı gösterilmiştir. Bir meta-analizde, yapılandırılmış egzersiz programlarının ağrısız yürüme mesafesini ortalama 82 metre, maksimum yürüme mesafesini ise 120 metre artırdığı saptanmıştır (37).

CLEVER çalışması, supervizyonlu egzersiz ile primer stentleme uygulamalarını karşılaştırmış ve egzersizin, yalnızca endovasküler girişime kıyasla yürüme süresinde daha fazla iyileşme sağladığını göstermiştir (38). Egzersiz, kollateral damar oluşumunu teşvik ederek, endotel fonksiyonunu artırarak ve kas metabolizmasını iyileştirerek yürüme verimliliğini artırır ve semptomları azaltır.

2.1.6.3 Farmakoterapi

Farmakolojik tedavi, tromboz, inflamasyon ve endotel disfonksiyonunu yöneterek hastalığın ilerlemesini önlemeyi hedefler. PAH hastaları, aterosklerotik süreç nedeniyle yüksek kardiyovasküler olay riski taşımaktadır. CAPRIE çalışması, klopidoğrelın aspirine kıyasla iskemik olayları azaltmada üstün olduğunu

göstermiştir (39). EUCLID çalışmasında ise yeni dönem antiagreganlardan tikagrelor ile klopidoğrel arasında anlamlı bir fark bulunamamıştır (40). Antikoagülanlar ile antiagreganların birlikte kullanımını değerlendiren COMPASS ve VOYAGER çalışmalarında, düşük doz (2,5 mg) rivaroksaban, asetilsalisilik asit kombinasyonunun, majör kardiyovasküler ve büyük ekstremitte tehdit edici olaylarını belirgin şekilde azalttığını ortaya koymuştur (41, 42). Ancak, tam doz antikoagülasyonun sağladığı potansiyel kardiyak ve ekstremitte korumasına rağmen, artan kanama riski nedeniyle genellikle tercih edilmemektedir (43). İntermittant kladikasyon tedavisi için fosfodiesteraz-3 inhibitörü olan silostazolun, yürüme mesafesini belirgin artırarak fonksiyonel kapasiteyi iyileştirdiği gösterilmiştir. Ancak konjestif kalp yetmezliği olanlarda kullanılmamalıdır (44). Statinler ve anjiyotensin dönüştürücü enzim (ACE) inhibitörleri, vasküler koruma sağlayarak ve ekstremitte perfüzyonunu iyileştirerek özellikle yüksek riskli bireylerde fayda sağlamaktadır.

2.1.6.4 Revaskülarizasyon

Revaskülarizasyon, özellikle CLTI bulunan ve medikal ile egzersiz tedavisine dirençli şiddetli aralıklı kladikasyon gösteren hastalar için PAH'ın temel tedavi yaklaşımlarından biridir. Arteriyel perfüzyonu yeniden sağlayarak semptomları hafifletmek, yara iyileşmesini desteklemek ve majör amputasyonu önlemek temel hedeflerdir. Revaskülarizasyon kararı, klinik tablo, ekstremitte tehdidinin derecesi ve hastaya özgü risk faktörleri doğrultusunda verilir. Günlük aktiviteleri belirgin şekilde kısıtlayan aralıklı kladikasyon, iskemik istirahat ağrısı,

iyileşmeyen ülserler ve kangren ile başvuran CLTI hastaları, öncelikli revaskülarizasyon adaylarıdır. Tedavi seçimi, anatomik faktörler ve hastalığın şiddetine göre şekillenirken, Wifl sınıflaması ile GLASS gibi değerlendirme sistemleri, revaskülarizasyon ihtiyacını belirleme ve girişim sonuçlarını öngörme konusunda yol gösterici bir rol üstlenmektedir (29).

Endovasküler tedavi, minimal invaziv yapısı, daha düşük perioperatif risk ve kısa iyileşme süresi nedeniyle birçok hasta için ilk basamak tedavi olarak tercih edilmektedir. Anjiyoplasti, stentleme ve atarektomi gibi teknikler kullanılarak daralmış arterler açılmaya çalışılır. Ancak, endovasküler müdahalelerin uzun süreli dayanıklılığı sınırlıdır ve tedavi edilen segmentin üst veya alt bölgelerinde hastalığın ilerleme riski bulunmaktadır. Özellikle çok segmentli endovasküler girişimlerde, daha düşük greft açıklığı ve tekrarlayan revaskülarizasyon ihtiyacı gibi dezavantajlar ortaya çıkmaktadır (29).

BASIL çalışması, yüksek cerrahi risk taşıyan hastalarda anjiyoplastinin daha avantajlı olduğunu, ancak bypass cerrahisinin uzun vadede ekstremitte kurtarma açısından daha iyi sonuçlar sunduğunu göstermiştir (45). Vasküler Kalite Girişimi analizine göre, CLTI hastalarında perioperatif mortalite, eşlik eden morbidite yoksa anlamlı bir fark göstermezken, morbidite varlığında endovasküler tedavinin mortaliteyi azalttığı belirlenmiştir (46). BEST-CLI çalışması ise uzun dönem sonuçlar açısından en iyi revaskülarizasyon seçeneğinin safen ven ile yapılan bypass olduğunu ortaya koymuştur. Bununla birlikte, hastaların yaklaşık %40'ında uygun otolog ven bulunmaması, tedavi planlamasını daha karmaşık hale getirmektedir. (47).

Cerrahi revaskülarizasyon, kompleks veya uzun segment arter tıkanıklıkları bulunan hastalarda altın standart olarak kabul edilmektedir. Özellikle otolog ven grefti kullanılarak yapılan bypass cerrahisi, uzun dönem açıklık oranları açısından avantaj sağlasa da, daha yüksek perioperatif morbidite ile ilişkilidir. Bu nedenle, hasta seçimi kritik bir öneme sahiptir. Randomize kontrollü çalışmalar, kritik ekstremité iskemisi bulunan hastalarda cerrahi bypass sonrası bir yıl içinde hastaların yaklaşık %25'inin amputasyona giderek hayatını kaybettiğini göstermektedir (48). Bu yüksek risk nedeniyle, daha az invaziv olan endovasküler tedaviler giderek daha yaygın hale gelmiş ve cerrahi bypass, yalnızca belirli hasta grupları için tercih edilir olmuştur (49).

Akut ekstremité iskemisi durumlarında revaskülarizasyon, hızla uygulanması gereken kritik bir tedavi yöntemidir. Cerrahi veya endovasküler tekniklerin seçimi, hastanın genel durumu, iskeminin süresi, eşlik eden hastalıklar ve mevcut tıbbi olanaklar doğrultusunda yapılır (50). Erken dönemde cerrahi trombektomi veya bypass gibi açık cerrahi işlemler uygulanabilirken, uygun hastalarda minimal invaziv endovasküler yöntemler de başarılı sonuçlar vermektedir.

2.1.7 Komplikasyonlar

Revaskülarizasyon sonrası gelişen en önemli komplikasyonlardan biri iskemi-reperfüzyon hasarıdır. Uzun süreli iskemi sonrası tekrar kan akımının sağlanması, lokal ve sistemik inflamatuvar süreçleri tetikleyerek ciddi komplikasyonlara neden olabilir. Reperfüzyon sonrası ortaya çıkan ROS, endotel

hücrelerinde hasar oluşturarak damar geçirgenliğini artırır, ödem oluşumuna ve hücresel disfonksiyona yol açar. Bu süreç, miyosit nekrozunu tetikleyerek kas dokusunda yaygın hasara ve oksidatif stres nedeniyle mitokondriyal disfonksiyona neden olabilir.

Lokal düzeyde, iskemi sonrası reperfüzyonun ani gerçekleşmesi, kas içi basıncın artmasına ve kompartman sendromuna yol açabilir. şiddetli vakalarda bu durum, doku nekrozu nedeniyle uzuv kaybı riskini artırabilir. Ayrıca, vasküler permeabilitenin artmasıyla oluşan interstisyel ödem, mikrosirkülasyonu bozarak iskemik dokuların iyileşmesini geciktirebilir (51).

Sistemik düzeyde ise İ/R hasarı, inflamatuvar sitokinlerin (IL-6, TNF- ) aşırı salınımı ile SIRS'ı tetikleyebilir. Bu, akciğerlerde kapiller kaçak sendromu ile akut solunum sıkıntısı sendromuna (ARDS) yol açabilirken, böbreklerde akut tübüler nekroz ve karaciğerde hepatosit disfonksiyonuna sebep olabilir. Reperfüzyon sırasında hücre içi potasyum kaybı ve dolaşıma ani potasyum salınımı ise ağır hiperkalemiye neden olarak potansiyel olarak ölümcül kardiyak aritmilere yol açabilir. Laktat birikimi ile metabolik asidoz gelişebilir ve bu da dolaşım instabilitesine neden olabilir (51).

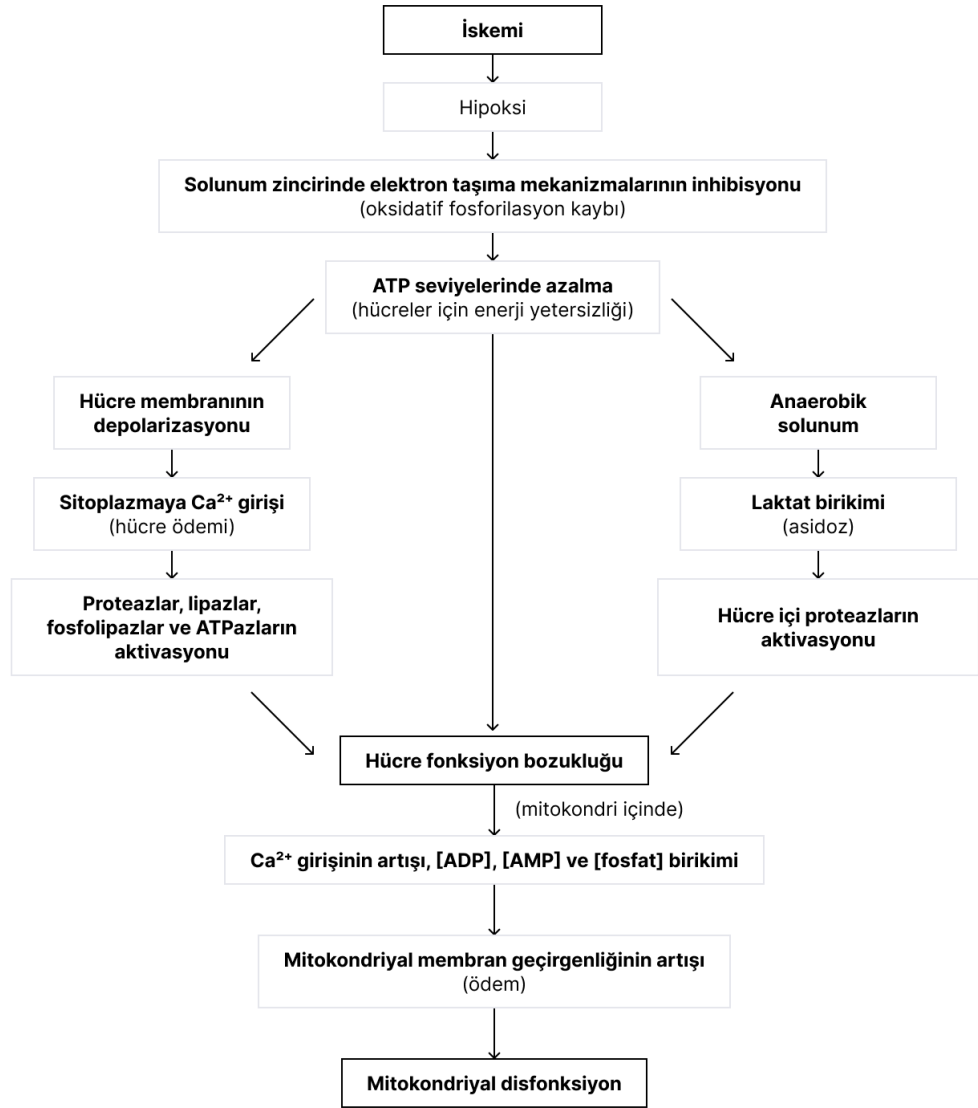
2.2 İskemi-Reperfüzyon Hasarı

İ/R hasarı, iskemiye maruz kalan dokulara kan akışının yeniden sağlanmasıyla ortaya çıkan karmaşık bir patolojik süreçtir. Reperfüzyon, doku canlılığını sürdürebilmek için gerekli olmakla birlikte, ani oksijen ve besin akışı hücresel hasarı daha da derinleştirerek ciddi fonksiyonel bozukluklara ve hücre

ölümüne yol açabilir. İ/R hasarı, akut koroner sendrom, serebral iskemi, organ nakli ve ekstremitte iskemisi gibi birçok klinik durumda gözlemlenmektedir (52). Üstelik bu hasarın etkileri yalnızca iskemiyeye uğramış dokuyla sınırlı kalmayıp, sistemik inflamatuvar yanıtları tetikleyerek çoklu organ yetmezliğine neden olabilir. İ/R hasarı, özellikle cerrahi revaskülarizasyon işlemleri sonrası önemli bir klinik zorluk oluşturmaktadır. Akut iskemik olaylar (ör. miyokard enfarktüsü veya inme) sonrasında uygulanan tedavi yaklaşımları, yeterli doku oksijenlenmesini sağlarken reperfüzyonun zararlı etkilerini en aza indirmeyi hedeflemektedir. İ/R hasarının hücresel ve moleküler düzeyde daha iyi anlaşılması, hedefe yönelik tedavi yaklaşımlarının geliştirilmesi açısından kritik öneme sahiptir.

2.2.1 İskemi-reperfüzyon hasarı mekanizması

İ/R hasarı, geçici kan akımı kısıtlanmasını takiben dokulara kan akışının yeniden sağlanmasıyla tetiklenen karmaşık bir patolojik süreçtir. İskemik faz, hipoksi ve hipoperfüzyon ile karakterizedir ve hücresel düzeyde metabolik bozukluklara yol açar (53). Oksijen ve besin maddelerinin yetersizliği, mitokondriyal fonksiyonun bozulmasına neden olarak adenosin trifosfat (ATP) üretiminde azalmaya yol açar. Hücreler anaerobik metabolizmaya yönelmek zorunda kalır, bu da laktik asit birikimi ve metabolik asidoz gelişimi ile sonuçlanır. Ayrıca, sodyum-potasyum ATPaz pompalarının yetersiz çalışması, iyon dengesinin bozulmasına neden olarak hücre içinde sodyum birikimi ve potasyum kaybına yol açar, bu durum da hücre membran bütünlüğünü tehlikeye atar (Şekil 3) (54).



Şekil 3. İskemide gerçekleşen hücresel ve mitokondriyal disfonksiyon mekanizması

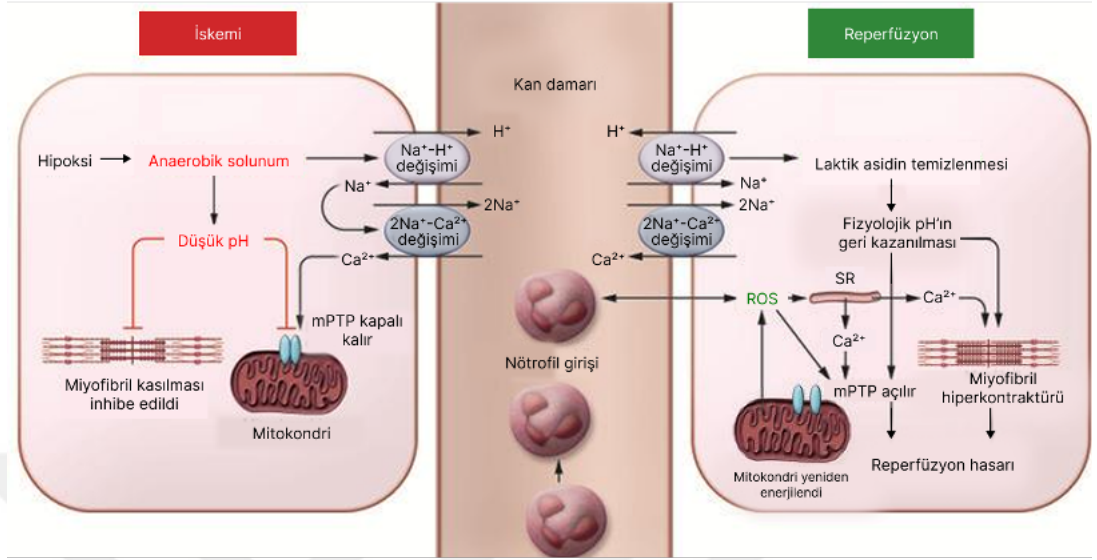
İskemi sırasında, antioksidan savunma mekanizmalarının tükenmesi nedeniyle oksidatif stres artar, bu da hücresel hasarı daha da şiddetlendirir. Endoplazmik retikulumdan ribozomların ayrılması, protein sentezini azaltarak hücresel onarım mekanizmalarını zayıflatır. İskemi süreci uzadıkça, ROS üretimi başlangıçta sınırlıdır, ancak reperfüzyon sırasında ani bir artış gösterir. Oksijenin

aniden geri akışı, hücrenin antioksidan kapasitesini aşarak şiddetli oksidatif strese yol açar. ROS, sadece endotel fonksiyonlarını bozmakla kalmaz, aynı zamanda DNA hasarı, lipid peroksidasyonu ve protein oksidasyonu gibi süreçleri tetikleyerek hücresel fonksiyon kaybına ve hücre ölümüne neden olur (55).

İnflamatuar yanıt, İ/R hasarı patogenezinde kritik bir rol oynar. Reperfüzyon, proinflamatuar sitokinlerin salınımını tetikleyerek doku hasarını daha da artırır. Bu inflammatuar yanıt, sitokin fırtınası gelişimine yol açarak hücresel hasarı şiddetlendirir. Nötrofillerin bölgeye göçü ve aktivasyonu, proteolitik enzimlerin ve ek ROS üretiminin artmasına neden olarak endotel disfonksiyonunu derinleştirir ve damar geçirgenliğini artırır (55).

İ/R hasarının bir diğer önemli bileşeni, kalsiyum homeostazındaki bozulmadır. Endoplazmik retikulumda bulunan kalsiyum ATPaz pompalarının işlev kaybı, hücre içi kalsiyum seviyelerinde aşırı yükselmeye neden olur. Bu durum, mitokondriyal fonksiyon bozukluğunu artırarak, hücre iskeletini parçalayan proteazları aktive eder ve çekirdek kromatin yoğunlaşmasına sebep olarak gen ekspresyonunu ve hücre hayatta kalma mekanizmalarını bozar (Şekil 4) (56).

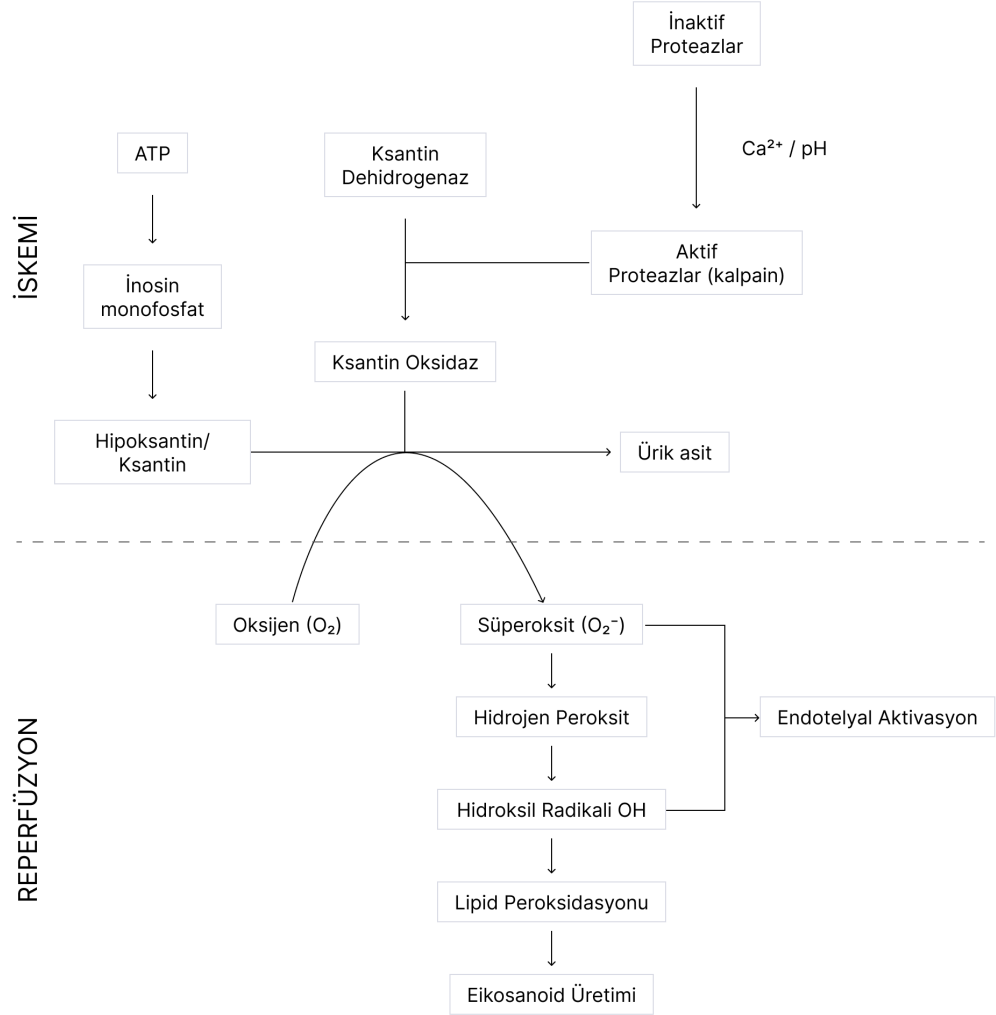
Reperfüzyon hasarının dinamik yapısı, kan akışı yeniden sağlandıktan sonra da doku hasarının devam etmesine neden olur. Persistan oksidatif stres, inflammatuar aktivasyon ve endotel disfonksiyonu, günler boyunca sürebilir ve ilerleyici doku hasarına yol açabilir. Hasarın şiddetli olması durumunda, süreç çoklu organ disfonksiyonuna kadar ilerleyebilir (56).



Şekil 4. İskemi-reperfüzyonda iyon kanallarının fonksiyonu

2.2.2 İskemi-reperfüzyon hasarında oksidatif stres

Oksidatif stres, hücrelerde dengeyi bozan ve çeşitli hastalıklara zemin hazırlayan bir süreçtir. Bu stresin oluşumunda enzimatik ve enzimatik olmayan mekanizmalar rol oynar. Enzimatik kaynaklar arasında ksantin oksidaz, NADPH oksidaz, mitokondriyal elektron taşıma zinciri ve eşleşmemiş nitrik oksit sentaz (NOS) gibi sistemler yer alır. Bu sistemler, başta kalp, beyin, karaciğer, böbrek ve akciğer olmak üzere birçok organ ve dokuda oksidatif yükün artmasına neden olabilir (57). Enzimatik olmayan mekanizmalar ise özellikle ekstremitelerdeki hasarı gibi durumlarda miyogloblin ve hemoglobinin oksidatif reaksiyonlara katılımıyla sınırlı bir etkiye sahiptir. İ/R hasarında ksantin oksidaz, NADPH oksidaz (NOX) ve NOS gibi enzimatik sistemler ROS üretimine katkıda bulunur ve oksidatif stresin ilerlemesine yol açar.



Şekil 5. İskemi-reperfüzyon hasarında ksantin metabolizması

Ksantin oksidaz, pürin metabolizmasının önemli bir enzimi olup, İ/R hasarında majör ROS kaynaklarından biri haline gelir (58). Normal koşullarda, ksantin dehidrojenaz formunda NAD^+ kullanarak hipoksantini ksantine ve ardından ürik aside oksitler. Ancak iskemi sırasında ATP seviyelerinin azalması ve kalsiyuma bağımlı proteazların aktivasyonu, ksantin dehidrojenazın ksantin oksidaza

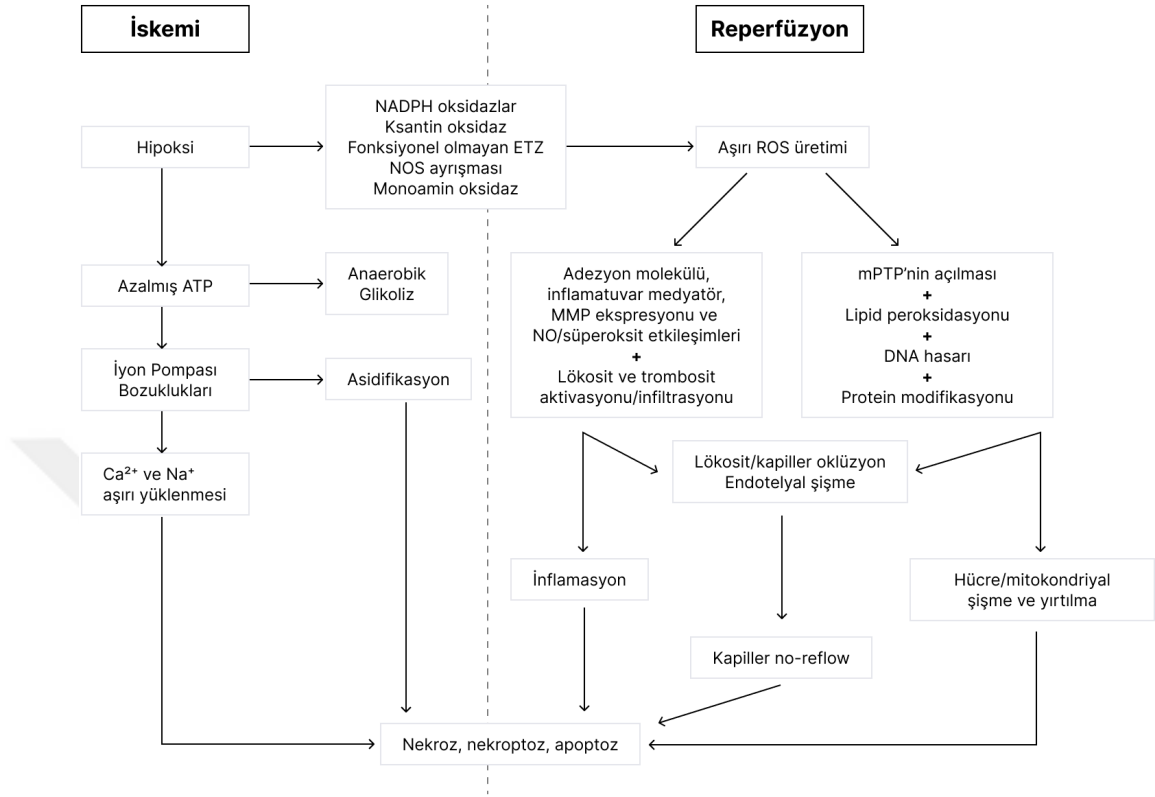
dönüşmesine neden olur. Reperfüzyonla birlikte oksijenin hızla geri akışı, ksantin oksidazın hipoksantini oksitlemesine olanak tanır ve süperoksit anyonları (O_2^-) ile hidrojen peroksit (H_2O_2) aşırı miktarda üretilir. Bu reaktif türler, hücrel bileşenlerin oksidatif hasara uğramasına, endotel disfonksiyonunun artmasına ve inflamatuvar süreçlerin tetiklenmesine neden olur (59). Ksantin oksidaz inhibitörleri olan allopurinol ve oksipurinol, ksantin oksidaz aktivitesini baskılayarak ROS üretimini azaltabilir; ancak araştırmalar, ksantin oksidaz inhibisyonunun tek başına oksidatif stres kaynaklı hasarı tamamen önleyemediğini göstermektedir (Şekil 5) (60).

İ/R hasarında NOX da önemli bir ROS kaynağıdır (61). NOX enzimi, elektron transferi yoluyla O_2^- üretir ve bu H_2O_2 gibi diğer reaktif türlere dönüşerek oksidatif doku hasarına neden olur (62). İskemi sırasında tümör nekroz faktörü-alfa (TNF- α), interlökin-1 beta (IL-1 β), interferon-gama (IFN- γ) ve anjiyotensin II gibi inflamatuvar mediyatörler NOX ekspresyonunu ve aktivasyonunu artırırken, hipoksi ile indüklenen faktör-1 α (HIF-1 α) da NOX aktivitesini teşvik ederek ROS üretiminin devamlılığını sağlar. NOX'un aşırı aktivitesi lipid peroksidasyonu, protein oksidasyonu ve mitokondriyal disfonksiyona neden olarak doku hasarını şiddetlendirir (63, 64). Ek olarak, NOX kaynaklı O_2^- , nitrik oksit (NO) ile etkileşime girerek peroksinitrit ($ONOO^-$) oluşumuna yol açar. Peroksinitrit, protein nitrolasyonu yaparak hücrel sinyal yollarını bozar ve inflamatuvar yanıtı artırarak endotel disfonksiyonunu ağırlaştırır (62).

NOS enzimleri, İ/R hasarında hem koruyucu hem de oksidatif stres kaynağı olarak işlev görür. Endotelial NOS (eNOS) vazodilatasyonu destekler ve vasküler

homeostazı sağlar, nöronal NOS (nNOS) sinir iletiminde görev alır, indüklenebilir NOS (iNOS) ise inflamasyon sırasında aktive olur ve bağışıklık yanıtına katkıda bulunur (65). Normal koşullarda NOS enzimleri, damar genişlemesini destekleyen, trombosit agregasyonunu inhibe eden ve inflamasyonu azaltan NO üretir. Ancak İ/R hasarında oksidatif stres, NOS fonksiyonunu bozarak “bağlantısız (uncoupled)” hale gelmesine neden olur. Bu durumda, NO üretimi yerine O_2^- oluşumu artar ve oksidatif stres daha da şiddetlenir. NOS’un bu patolojik dönüşümünün en önemli nedenlerinden biri, tetrahidrobiopterin (BH4) kofaktörünün oksidatif degradasyonudur. BH4 seviyelerinin azalması, NO üretiminin düşmesine ve süperoksit üretiminin artmasına neden olarak mikrovasküler disfonksiyon, endotel hasarı ve doku perfüzyonunun bozulmasıyla sonuçlanır. Bu nedenle, BH4 seviyelerinin restorasyonu veya NOS bağlantısızlığının önlenmesine yönelik terapötik yaklaşımlar, oksidatif stresin azaltılmasına katkı sağlayabilir. BH4 takviyesi ve NOS düzenleyici antioksidan tedaviler, deneysel çalışmalarda oksidatif hasarın azaltılmasında başarılı sonuçlar göstermiştir (58).

Oksidatif stres, İ/R hasarının merkezinde yer alan bir mekanizmadır ve ksantin oksidaz, NOX ve NOS disfonksiyonu, ROS üretiminde kritik roller üstlenir (Şekil 6). Ksantin oksidaz, erken reperfüzyon sürecinde ROS üretiminden sorumluyken, NOX inflamatuvar sinyal yolları aracılığıyla oksidatif hasarı şiddetlendirir. Ayrıca, NOS disfonksiyonu NO üretimini bozarak süperoksit oluşumunu artırır ve endotel fonksiyonlarını olumsuz yönde etkiler.



Şekil 6. İskemi-reperfüzyon mekanizması

2.2.3 Reaktif oksijen ve azot türleri

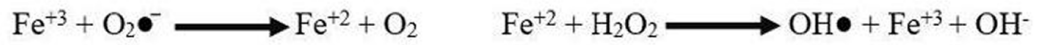
İ/R hasarı, ROS ve RNS aşırı üretimine yol açarak belirgin oksidatif stres ve hücre hasar oluşturur. İskemi sırasında mitokondriyal disfonksiyon, kısmen indirgenmiş oksijen türlerinin birikmesine neden olur ve reperfüzyonla birlikte bu bileşiklerin seviyeleri hızla artar. Mitokondriler, NOX ve ksantin oksidaz ROS üretiminin en büyük paya sahip başlıca sistemlerdir ve oksidatif stres ile inflamasyon süreçlerini şiddetlendirirler (58).

ROS bileşenlerinden O_2^- , öncelikle mitokondriyal elektron taşıma zincirinde üretilir ve süperoksit dismutaz (SOD) enzimi tarafından H_2O_2 'e

dönüştürülür. H₂O₂ nispeten daha stabil bir bileşik olmasına rağmen, Fenton reaksiyonları aracılığıyla demir iyonlarıyla etkileşime girerek son derece reaktif hidroksil radikalleri (•OH) üretir (Şekil 7). Bu radikaller, yaygın lipid peroksidasyonu, protein oksidasyonu ve DNA parçalanmasına yol açarak hücrel bütünlüğü bozar (58).



Haber-Weiss Tepkimesi



Fenton Tepkimesi

Şekil 7. Haber-Weiss ve Fenton tepkimeleri

NO, başlıca NOS izoformları tarafından üretilir ve İ/R hasarında çift yönlü bir rol oynar. Fizyolojik koşullarda, NO vasküler tonusu düzenleyerek inflamatuvar yanıtları modüle eder. Ancak oksidatif stres sırasında, NOS bağlantısız hale gelerek süperoksit üretimine neden olur ve NO yerine peroksinitrit oluşumu artar. Bu süreç, endotel disfonksiyonunu şiddetlendirir (58).

Aşırı ROS ve RNS üretimi, hücrel homeostazı bozarak antioksidan savunma mekanizmalarını etkisiz hale getirir ve inflamatuvar süreçleri tetikler. Oksidatif stres ve inflamatuvar mediyatörlerin etkileşimi, iyon dengesizlikleri, lipid

peroksidasyonu, proteaz aktivasyonu ve DNA bütünlüğünün bozulması gibi hücresel süreçleri bozarak yaşam kapasitesini ve fonksiyonlarını tehlikeye atar. Hücresel seviyede başlayan bu hasar, zamanla iskemik dokularda kalıcı yapısal ve fonksiyonel bozulmalara yol açar (58).

2.2.4 İskemi-reperfüzyon hasarında mitokondriyel ve hücrel kalsiyum birikimi

İ/R hasarı, hücrel ve mitokondriyel düzeyde belirgin kalsiyum homeostazı bozukluklarına yol açar. İskemi sırasında ATP tükenmesi, hücre içi kalsiyum dengesini koruyan iyon pompalarının işlevini bozar. Sodyum-potasyum ATPaz (Na^+/K^+ ATPaz) ve sodyum-kalsiyum değiştiricilerinin ($\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ değiştiricileri) fonksiyon kaybı, hücre içinde sodyum birikimine ve sekonder kalsiyum girişine neden olur. Ek olarak, sarkoplazmik/endoplazmik retikulum Ca^{2+} ATPaz (SERCA) işlevinin bozulması, kalsiyumun endoplazmik retikulumda tutulmasını engelleyerek sitozolik kalsiyum seviyelerini daha da artırır (66).

Reperfüzyon sırasında oksijen sunumunun yeniden sağlanması, ROS'un aşırı üretimine neden olarak mitokondriyal kalsiyum alımını artırır. Aşırı yüklenen mitokondrilerde mitokondriyal geçiş gözenek komplekslerinin (mPTP) açılması, membran potansiyel kaybı, ATP tükenmesi ve hücre ölümüne yol açar. mPTP açılması, oksidatif stres, kalsiyum aşırı yüklenmesi ve enerji metabolizması bozukluklarını birbirine bağlayan kritik bir olay olup, apoptoz veya nekroz süreçlerini tetikler.

2.2.4.1 İyon Dengesizliği

İ/R hasarı, ATP'ye bağımlı iyon pompalarının yetersiz çalışması nedeniyle ciddi iyon dengesizliklerine yol açar. Na^+/K^+ ATPaz fonksiyonunun bozulmasıyla sodyum birikimi meydana gelir ve bu durum hücre içine su girişine neden olarak hücre şişmesi ve artmış hücre içi basınca yol açar. Kalsiyum aşırı yüklenmesi, bu süreci daha da kötüleştirerek fosfolipazları, proteazları ve endonükleazları aktive eder; böylece hücre membranı bütünlüğü bozulur, iskelet yapısı zarar görür ve DNA fragmantasyonu meydana gelir.

Reperfüzyon sırasında oksijenin hızla geri dönüşü, iyon kanallarını daha da bozarak iyon dengesizliklerini şiddetlendirir. Sonuçta gelişen sitotoksik kalsiyum aşırı yüklenmesi, mitokondriyal disfonksiyonu tetikleyerek hücre ölüm yollarını başlatır ve doku nekrozu ile inflamasyona neden olur (67).

2.2.4.2 Lipid Peroksidasyonu

İ/R hasarında oksidatif stres, lipid peroksidasyonunu tetikler. ROS, hücre zarındaki çoklu doymamış yağ asitlerine saldırarak malondialdehit (MDA) ve diğer reaktif aldehitlerin oluşumuna neden olur. Bu bileşikler proteinlerle çapraz bağlanarak hücre bütünlüğünü bozar. Lipid peroksidasyonu, zar akışkanlığını bozar ve geçirgenliği artırarak hücre şişmesi, membran potansiyel kaybı ve hücre lizisine yol açar.

Ayrıca lipid peroksidasyonu mitokondriyal disfonksiyonu kötüleştirir, çünkü oksitlenmiş lipidler elektron taşıma zinciri bileşenlerine zarar vererek ROS

üretimini daha da artırır ve oksidatif hasar döngüsünü hızlandırır. Bu süreç, İ/R hasarında hücrel ve organ düzeyinde harabiyeti artırır (58).

2.2.4.3 Proteaz Aktivasyonu

İ/R hasarında kalsiyum aşırı yüklenmesi, proteolitik enzimleri, özellikle kalpainler ve kaspazları aktive eder ve bu enzimler hücrel iskelet proteinlerini ve organelleri parçalayarak doku yıkımını hızlandırır.

Kalpainler, kalsiyuma bağımlı sistein proteazları olup, hücre iskeletini parçalayıp membran stabilitesini bozarak hücre geçirgenliğini artırır ve nekroz gelişimini tetikler (58).

Buna ek olarak, mitokondriyal proteazlar, mitokondriyal proteinleri yıkarak enerji üretimini bozar. Mitokondriden sitokrom c'nin sitozole salınımı, kaspaz kaskadını aktive ederek apoptozu başlatır ve doku hasarını derinleştirir (58).

2.2.4.4 DNA Hasarı

İ/R hasarı, hidroksil radikalleri ve peroksinitrit gibi reaktif moleküller aracılığıyla yaygın oksidatif DNA hasarına yol açar. Bu serbest radikaller, DNA zincir kırıkları, baz modifikasyonları ve kromozomal instabilite oluşturur ve hücrel onarım mekanizmalarını aktive eder. Ancak aşırı DNA hasarı, onarım sistemlerini aşarak hücre döngüsünün durmasına, apoptoz veya nekroza neden olur (58).

Mitokondriyal DNA (mtDNA), ROS üretim bölgelerine yakın konumu ve sınırlı onarım kapasitesi nedeniyle özellikle savunmasızdır. mtDNA hasarı,

mitokondriyal gen ekspresyonunu bozarak ATP üretimini engeller ve hücrel disfonksiyonu kötüleştirir. Persistan DNA hasarının, İ/R hasarını takiben fibrozis ve organ yetmezliği gibi uzun vadeli komplikasyonlarla ilişkili olduğu gösterilmiştir (58).

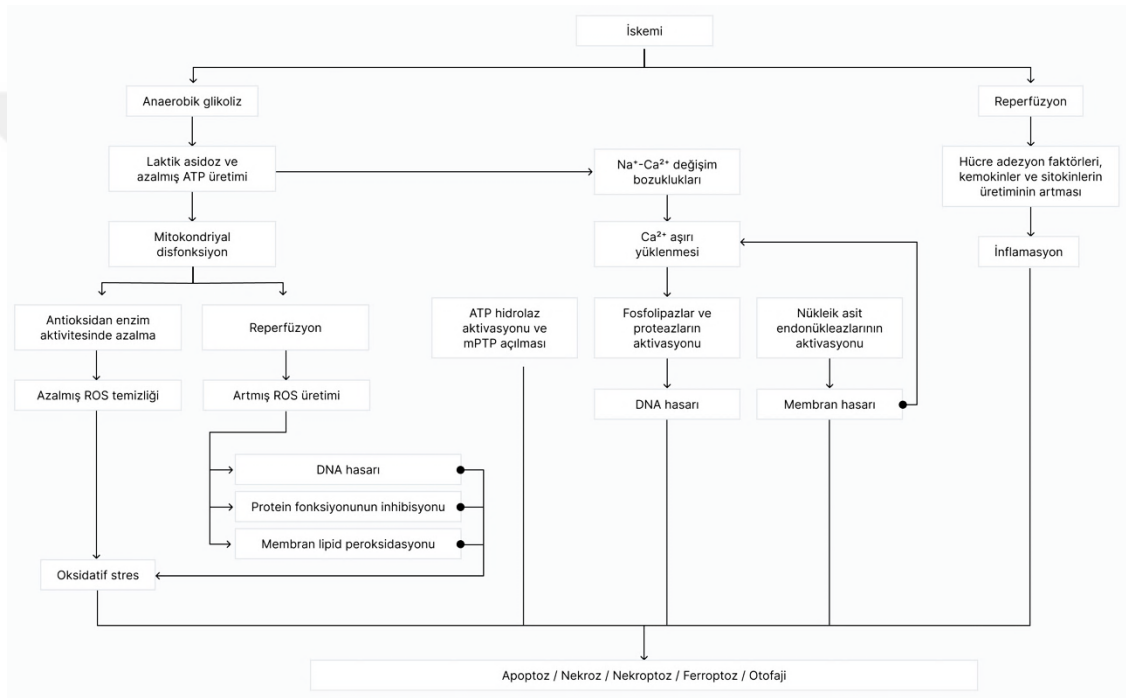
Mitokondriyal ve hücrel kalsiyum birikimi, İ/R hasarının patogeneğinde merkezi bir rol oynar ve oksidatif stres, lipid peroksidasyonu, proteaz aktivasyonu ve DNA hasarı gibi süreçleri şiddetlendirir. Bu mekanizmalar hücrel disfonksiyon ve doku nekrozuna yol açarak İ/R hasarının klinik sonuçlarını belirler.

2.2.5 İskemi-reperfüzyon hasarında hücre hasarı

İskemi-reperfüzyon hasarı, iskemi hasarı ve reperfüzyon hasarı olmak üzere iki temel aşamada gerçekleşen bir süreçtir. İskemi sırasında, dokulara yeterli oksijen ve besin ulaşamaz, bu da hücrel işlevlerin bozulmasına ve metabolik atıkların birikmesine yol açarak asidotik bir ortam oluşturur. Uzun süreli iskemi, hücrelerde ciddi hasara neden olurken, reperfüzyon süreci oksijenin yeniden sağlanmasıyla birlikte başlar. Ancak bu aşamada ROS üretimi artar ve inflamatuvar yanıt tetiklenerek ek doku hasarına sebep olur (68).

İ/R hasarının şiddeti ve süresi, hücrel yanıtı belirleyen en önemli faktörlerdir. Orta dereceli İ/R hasarında hücreler otofaji mekanizmalarını devreye sokarak hayatta kalma ve onarım süreçlerini başlatabilir. Ancak hasarın derecesi arttıkça, hücre ölümü kaçınılmaz hale gelir ve apoptoz, nekroz, nekroptoz veya mitoptoz gibi farklı ölüm mekanizmaları tetiklenebilir (69, 70). Reperfüzyon sırasında oksijenin yeniden dokulara ulaşması, ROS'un aşırı üretimini

hızlandırarak hücre ölüm yollarını daha da aktif hale getirir. Sürecin ilerlemesine bağlı olarak, oksidatif stres, kalsiyum aşırı yüklenmesi ve inflamatuvar yanıtlar birleşerek doku fonksiyonlarını bozabilir ve organ yetmezliği riskini artırabilir. İ/R hasarının patogenezi, farklı hücreölüm yolları ile şekillenerek doku ve organ düzeyinde ciddi sonuçlara yol açabilir (Şekil 8) (71).



Şekil 8. İskemi-reperfüzyon hasarında hücre hasarı ve ölümü

2.2.5.1 Apoptoz

Apoptoz, hücrelerin kontrollü bir şekilde parçalanarak fagositoz yoluyla ortadan kaldırılmasını sağlayan programlanmış hücre ölümü mekanizmasıdır. Bu süreç, nekrozun aksine inflamasyona yol açmaz ve hücresel dengeyi korumaya yardımcı olur (72). İ/R hasarında apoptoz, intrinsik (mitokondriyal) ve ekstrinsik (ölüm reseptörü aracılı) olmak üzere iki temel yol üzerinden düzenlenir. Bu iki yol

birbiriyle etkileşim halinde olup, hücrel stres seviyesine bağı olarak birbirini tetikleyebilir.

İntrinsik (Mitokondriyal) Yol: İskemi sırasında mitokondriyal fonksiyon bozulur, ATP üretimi azalır ve ROS birikerek oksidatif stresi artırır. Bu durum, mitokondri dış zarının bütünlüğünü bozarak sitokrom c'nin salınımına yol açar. Sitokrom c, apoptotik proteaz aktivasyon faktörü-1 (Apaf-1) ile birleşerek apoptozom kompleksini oluşturur ve pro-kaspaz-9'un aktif hale gelmesini sağlar. Kaspaz-9 daha sonra kaspaz-3'ü aktive ederek hücrel proteinleri parçalar ve apoptozu ilerletir (73). Bu süreç, pro-apoptotik proteinler (Bax, Bak) ile anti-apoptotik proteinler (Bcl-2, Bcl-xL) arasındaki denge tarafından düzenlenir. Ayrıca, ROS kaynaklı DNA hasarı, tümör baskılayıcı p53 proteini aracılığıyla PIDosome kompleksini aktive edebilir ve kaspaz-2 üzerinden apoptozu tetikleyebilir (71).

Ekstrinsik (Ölüm Reseptörü Aracılı) Yol: Bu yol, hücre yüzeyinde bulunan ölüm reseptörlerinin ligandlar tarafından aktive edilmesiyle başlar. TNF- α , FasL, TRAIL ve TL1A gibi ligandlar, TNF reseptörü-1, Fas ve TRAIL reseptörlerine bağlanarak ölüm sinyali kompleksi oluşturur. Bu sinyal, kaspaz-8'in aktivasyonunu tetikler ve kaspaz-3'ü doğrudan aktive ederek hücre ölüm sürecini başlatır. Ayrıca, kaspaz-8'in Bid proteininin parçalanmasını sağlaması, mitokondriyal apoptoz yolunu da harekete geçirerek intrinsik ve ekstrinsik yolların birleşmesine neden olabilir (71).

İ/R hasarı sırasında apoptoz, özellikle kardiyomiyositler ve endotel hücrelerinde kayıplara yol açarak damar fonksiyonlarını bozar ve doku onarım sürecini aksatır. Nekroza kıyasla daha kontrollü bir hücre ölümü mekanizması olsa

da, yaygın hücre kaybı organ fonksiyonlarında ciddi bozulmalara neden olabilir. Bununla birlikte, apoptoz genellikle inflamatuvar bir yanıt oluşturmada gerçekleşir ve hücrel enkaz, fagositik hücreler tarafından temizlenir.

2.2.5.2 Mitoptoz: Mitokondriye özel programlanmış hücre ölümü

Mitoptoz, hasarlı mitokondrilerin seçici olarak elimine edilmesini sağlayan bir süreçtir (74). Klasik apoptozdan farklı olarak, hücre ölümüne doğrudan neden olmaktan ziyade, hücrel koruyucu bir mekanizma olarak işlev görür ve aşırı ROS üreten mitokondrileri ortadan kaldırır. İ/R hasarı sırasında kalsiyum aşırı yüklenmesi ve oksidatif stres, mitokondriyal füzyonu tetikleyerek dynamin ilişkili protein 1 (Drp1) aracılığıyla mitokondri fragmentasyonuna neden olur (75). Hasar onarılamayacak kadar ilerlemişse, mPTP açılır ve sitokrom c ile apoptoz indükleyici faktör (AIF) serbest bırakılarak hücre ölüm süreci başlar. Bazı durumlarda, mitoptozu otofajik yıkım (mitofaji) takip eder ve hasarlı mitokondriler otofagozomlar tarafından parçalanarak lizozomlarda sindirilir. Ancak aşırı mitoptoz, enerji tükenmesine neden olarak apoptoz veya nekroz süreçlerini tetikleyebilir ve İ/R hasarını daha da kötüleştirir (75).

2.2.5.3 Nekroz

Nekroz, plazma membranının bütünlüğünün kaybolması, hücrel şişme ve hücre içeriğinin çevre dokuya salınması ile karakterize edilen kontrolsüz bir hücre ölümüdür. Apoptozdan farklı olarak, nekroz kaspaz aktivasyonu içermez ve genellikle mitokondriyal yetmezlik, ATP tükenmesi, kontrolsüz kalsiyum girişi ve

ROS kaynaklı protein oksidasyonu nedeniyle meydana gelir. Reperfüzyon sürecinde, nekrotik hücrelerden salınan yüksek mobilite grubu kutu 1 (HMGB1), ATP ve ısı şok proteinleri gibi hasar ile ilişkili moleküler paternler (DAMP) bağışıklık sistemini aktive eder ve inflamasyonu tetikler. Bu durum, sekonder doku hasarını artırarak hasarın kendini devam ettiren bir döngüye dönüşmesine neden olur (71).

2.2.5.4 Nekroptoz: İ/R hasarında düzenlenmiş nekroz

Nekroptoz, kaspaz bağımsız, düzenlenmiş bir nekroz biçimi olup inflamatuvar etkiler açısından klasik nekroza benzese de moleküler olarak kontrol edilen bir süreçtir. Reseptörle ilişkili protein kinaz 1 (RIPK1) ve RIPK3, nekrozom kompleksi oluşturarak mikst soy kinaz alanı benzeri protein (MLKL) fosforilasyonuna neden olur (76). MLKL, plazma membranına entegre olarak membran perforasyonu ve hücre lizisine yol açar. Apoptozdan farklı olarak, nekroptoz DAMP'lerin ve proinflamatuvar sitokinlerin (IL-1 β , TNF- α) salınımına neden olarak inflamasyonu artırır. Özellikle kardiyomiyositler ve nöronlarda nekroptozun inhibe edilmesinin doku hasarını azalttığı ve organ fonksiyonlarını koruduğu gösterilmiştir (76).

2.2.5.5 Otofaji: İ/R hasarında çift yönlü etki

Otofaji, hücre içi bileşenlerin lizozomal yıkımı yoluyla temizlenmesini sağlayarak homeostazı koruyan bir mekanizmadır ve otofaji ile ilişkili genler (ATG) ve mTOR sinyal yolu tarafından düzenlenir. Hafif otofaji, hasarlı mitokondrilerin

mitofaji yoluyla ortadan kaldırılmasını sağlayarak ROS üretimini ve kalsiyum yüklenmesini azaltır, aynı zamanda hücresel enerji dengesini koruyarak hücreyi iskemik hasara karşı dayanıklı hale getirir. Ancak aşırı otofaji, hücresel bileşenlerin aşırı yıkımına neden olarak otofajik hücre ölümüne yol açabilir. Otofajinin kontrolsüz aktivasyonu özellikle kalp ve sinir dokusunda lizozomal bozulmaya ve hücresel dengenin bozulmasına neden olur, bu da doku kaybını artırır (71).

İ/R hasarı, apoptoz, mitoptoz, nekroz, nekroptoz ve otofaji gibi çok yönlü hücre ölüm mekanizmaları tarafından şekillendirilen kompleks bir süreçtir. Apoptoz ve mitoptoz, hücre veya mitokondriyi düzenlenmiş yollarla elimine ederek doku hasarını sınırlarken, nekroz ve nekroptoz enflamasyonu artırarak sekonder doku hasarına neden olur. Otofaji ise hücresel koruyucu bir mekanizma olarak başlayıp aşırı aktivasyonu halinde yıkıcı etkilere yol açabilir (71).

2.2.6 İskemi-reperfüzyon hasarında inflamatuvar yanıt

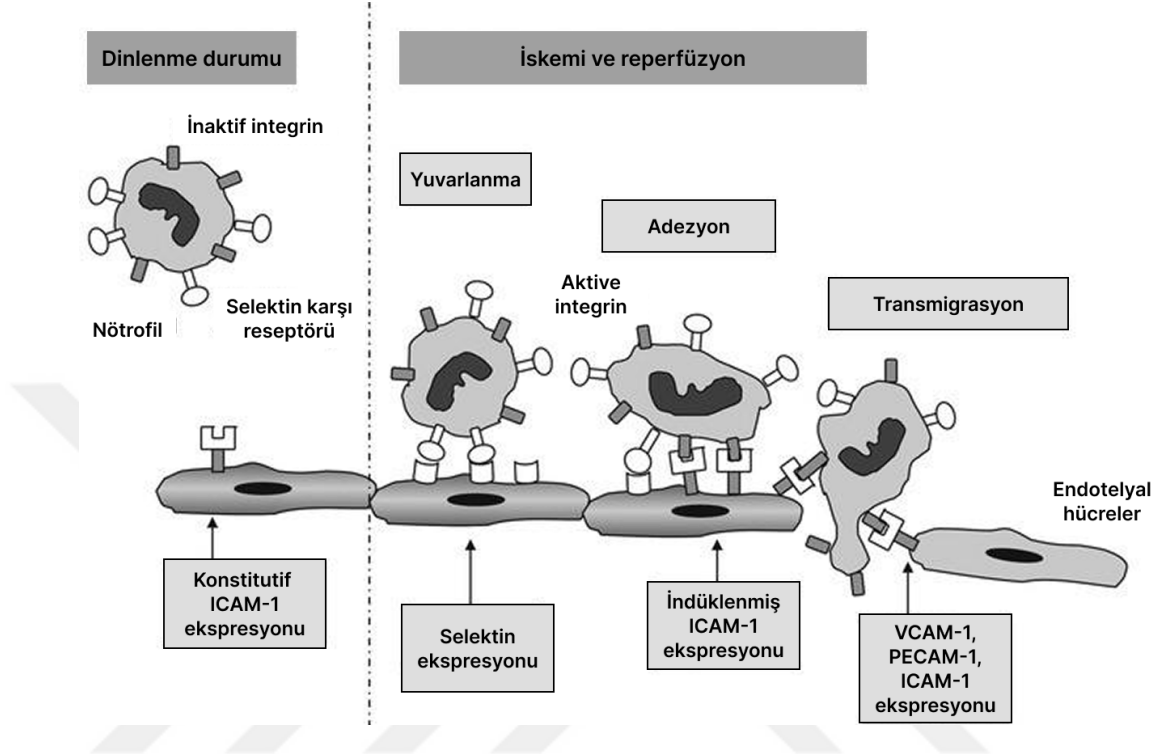
İ/R hasarı, hücresel ve humoral mekanizmaları içeren karmaşık bir inflamatuvar yanıtı tetikler. İskemik dokulara kan akışının yeniden sağlanması, bağışıklık hücrelerinin aktivasyonuna, inflamatuvar mediyatörlerin salınımına ve oksidatif strese yol açarak iyileşme sürecini desteklemek yerine doku hasarını artırabilir. Bu mekanizmaların anlaşılması, İ/R hasarını azaltmaya yönelik terapötik stratejilerin geliştirilmesi açısından kritik öneme sahiptir.

2.2.6.1 Hücresel yanıt

İ/R hasarının patofizyolojisinde nötrofiller, monositler, makrofajlar, T lenfositleri, dendritik hücreler, doğal katil hücreleri, mast hücreleri, endotel hücreleri önemli roller üstlenir (77). Bu hücreler inflamatuvar sürecin farklı aşamalarında aktif olarak görev alarak hem doku hasarına hem de onarımına etki ederler. Enflamatuvar yanıtın bu çift yönlü etkisi, hücresel araçların spesifik rollerinin anlaşılmasını ve İ/R hasarının olumsuz etkilerini azaltmaya yönelik potansiyel tedavi stratejilerinin geliştirilmesini önemli hale getirmektedir.

2.2.6.1.a Nötrofiller

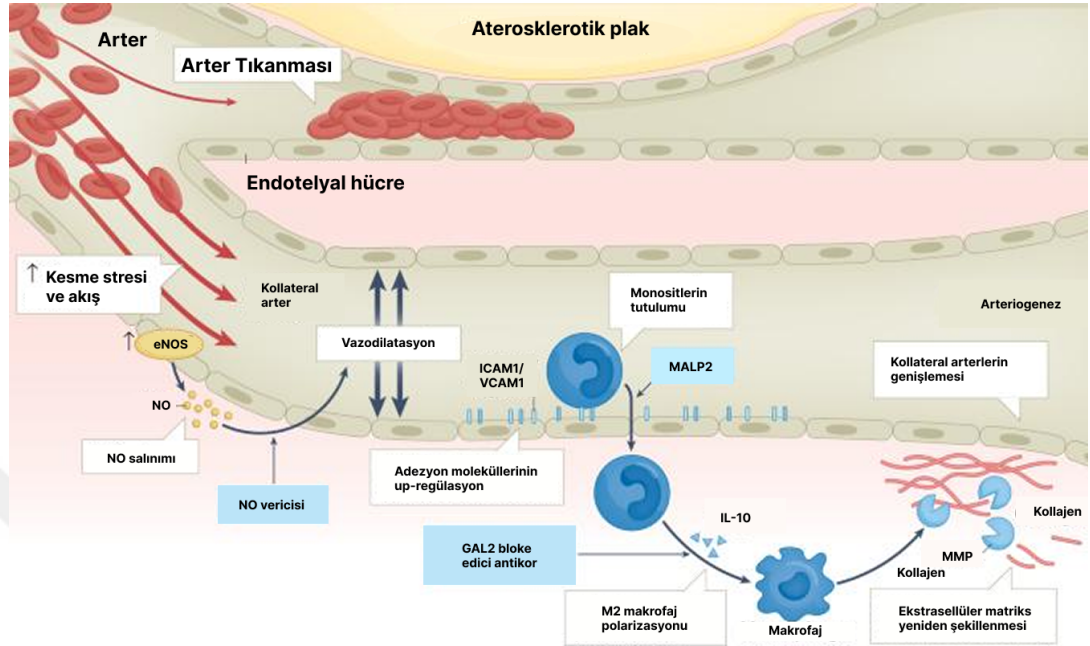
Nötrofiller, İ/R hasarının erken döneminde hasarlı bölgeye ilk ulaşan bağışıklık hücreleridir. Hipoksi ile indüklenen faktör-1 alfa (HIF-1 α), hücreler arası yapışma molekülü-1 (ICAM-1) ve P-selektin gibi adezyon moleküllerinin üretimini artırarak nötrofillerin damar endotel hücrelerine yapışmasını kolaylaştırır. Reperfüzyon sonrası, interlökin-8 (IL-8) ve monosit kemotaktik proteini-1 (MCP-1) gibi kemokinlerin yönlendirmesiyle nötrofiller dokuya göç eder. Hasarlı dokuda bulunan nötrofiller, NADPH oksidaz sistemi aracılığıyla ROS üretir ve oksidatif stresin artmasına, dolayısıyla doku hasarının daha da şiddetlenmesine neden olur (Şekil 9) (77).



Şekil 9. İskemi-reperfüzyon hasarında nötrofillerin göçü

2.2.6.1.b Monositler ve Makrofajlar

Nötrofillerin infiltrasyonunu takiben monositler, hasarlı bölgeye göç eder ve makrofajlara farklılaşır. Makrofajlar, hem pro-inflamatuar hem de doku onarımına yardımcı fonksiyonlara sahiptir. M1 makrofajları, TNF- α , interlökin-6 (IL-6) ve ROS salgılayarak oksidatif hasarı artırır ve endotel disfonksiyonunda rol oynar. Buna karşılık, M2 makrofajları, interlökin-10 (IL-10) ve transformasyon büyüme faktörü-beta (TGF- β) üreterek inflamasyonu baskılar, ekstrasellüler matriksin yeniden şekillenmesini sağlar ve anjiyogenezi destekleyerek iyileşme sürecini başlatır (Şekil 10) (77).



Şekil 10. İskemi-reperfüzyon hasarında vasküler remodelling

2.2.6.1.c T Lenfositleri

T hücreleri, İ/R hasarında inflamasyonun ilerleyen aşamalarında önemli bir rol oynar. CD4⁺ T yardımcı hücreleri, pro-inflamatuar Th1 hücrelerine dönüşerek IFN- γ salgılar ve makrofaj aktivasyonunu artırır. Alternatif olarak, Th2 hücreleri daha çok onarıcı süreçleri destekleyen bir rol üstlenir. Regülatör T hücreleri (Tregler), aşırı inflamasyonu baskılayarak doku onarımını kolaylaştırırken, CD8⁺ sitotoksik T hücreleri perforin ve granzimler salgılayarak doğrudan doku hasarına neden olabilir (77).

2.2.6.1.d Mast Hücreleri

Mast hücreleri, İ/R hasarının erken evrelerinde histamin, serotonin ve proteazlar salgılayarak vasküler geçirgenliği artırır ve bağışıklık hücrelerinin

hasarlı bölgeye ulaşmasını kolaylaştırır. Endotel hücreleri de adezyon moleküllerini artırarak inflamatuvar hücrelerin damar duvarına yapışmasını sağlar. Bunun yanı sıra, trombosit aktive edici faktör (PAF) ve endotelin-1 gibi pro-inflamatuvar mediyatörler salgılayarak vasküler inflamasyonu şiddetlendirirler (78).

2.2.6.1.e Doğal katil hücreleri

Doğal katil (NK) hücreleri, hücresel stres veya hasara maruz kalan, iskemiye uğramış hücreler dahil olmak üzere, çeşitli tehditlere hızla yanıt verebilen sitotoksik bağışıklık hücreleridir. İ/R hasarı sürecinde, bu hücreler iskemik dokuya yönlendirilerek dokuya zarar verici mekanizmaları devreye sokar. NK hücrelerinin İ/R hasarına etkisi iki temel mekanizma üzerinden gerçekleşir (78).

İlk olarak, bu hücreler yüzeylerindeki aktivasyon reseptörleri aracılığıyla stres altındaki hücreleri tanır ve hedef hücreleri ortadan kaldırmak için perforin ve granzim salgılar. Perforin, hücre zarında gözenekler oluşturarak geçirgenliği artırırken, granzimler hücre içine girerek apoptotik süreçleri başlatır ve hücrenin programlı bir şekilde ölmesini sağlar. Bu sitotoksik etki, hasarlı hücrelerin temizlenmesini sağlarken, aynı zamanda İ/R hasarının şiddetlenmesine de neden olabilir.

İkinci olarak, NK hücreleri, inflamatuvar yanıtı güçlendiren çeşitli sitokinler salgılar. Örneğin, IFN- γ salınımı, makrofajların aktivasyonunu artırarak bağışıklık yanıtını kuvvetlendirir. Karaciğerin İ/R modellerinde yapılan çalışmalar, NK hücrelerinin IL-17 üretimiyle inflamasyonu teşvik ederek doku hasarına katkıda bulunduğunu göstermiştir.

2.2.6.1.f Endotel hücreleri

Endotelial hücreler, damar sisteminde homeostazın sağlanmasında kilit bir rol oynar ve dört temel işlevi yerine getirir. Ancak, İ/R hasarı sırasında bu işlevler ciddi şekilde bozulur ve doku hasarına zemin hazırlar. İ/R sürecinde endotelial hücrelerin bariyer fonksiyonu zayıflar, inflamatuvar hücrelerin tutunmasını kolaylaştıran adezyon molekülleri artar, damar tonusu bozulur ve hemostaz dengesi değişerek trombus oluşumuna neden olur (79).

- Endotel Bariyerinin Bozulması: Normal şartlarda, endotelial hücreler kan ile doku arasındaki madde geçişini kontrol eden sıkı bağlantılarla birbirine bağlıdır. Zonula occludens ve zonula adherens adı verilen bu bağlantılar, damar geçirgenliğini düzenleyerek sıvı ve proteinlerin kontrolsüz şekilde sızmasını önler. Ancak İ/R hasarı sırasında, lökositlerden salınan ROS, histamin, PAF ve lökotrien B₄ (LTB₄) gibi inflamatuvar mediyatörler bu bağlantıların bozulmasına yol açar. Ayrıca, kalsiyuma bağımlı miyozin hafif zincir kinazın (MLCK) fosforilasyonu endotelial hücrelerin kasılmasına neden olarak hücreler arası boşlukları artırır. Bunun sonucunda, damar geçirgenliği artar ve sıvı ile proteinlerin dokuya sızması ödemi tetiklerken inflamatuvar hücrelerin bölgeye göçünü hızlandırır (79).
- İnflamatuvar Yanıtın Güçlenmesi: İ/R hasarı sırasında inflamatuvar süreçleri yönlendiren en önemli hücrelerden biri nötrofillerdir. Endotel hücreleri, bu hücrelerin dokuya ulaşmasını kolaylaştırmak için VCAM-1, ICAM-1 ve E-selektin gibi adezyon moleküllerinin üretimini artırır. Bu moleküller, nötrofillerin damar duvarına sıkıca tutunmasını ve iskemik bölgeye göç

etmesini kolaylaştırır. Sonuç olarak, inflamasyon daha da şiddetlenir ve doku hasarı ilerler (79).

- Vasküler Tonusun Düzenlenmesindeki Bozulmalar: Damar genişliği ve kan akışının düzenlenmesinde temel rol oynayan moleküllerden biri nitrik oksittir (NO). Normal koşullarda, endotel hücreleri tarafından üretilen NO, damarların genişlemesini sağlayarak kan akışını düzenler. Ancak İ/R hasarı sırasında, eNOS aktivitesi azalır ve üretilen NO molekülleri ROS tarafından hızla tüketilir. Bu durum, damarların daralmasına ve kan akışının kısıtlanmasına neden olarak dokuya oksijen ulaşımını daha da zorlaştırır (79).
- Hemostazın Bozulması ve Pıhtılaşma Mekanizmalarının Aktifleşmesi: Sağlıklı endotelial hücreler, normalde plateletlerin ve koagülasyon faktörlerinin damar duvarına tutunmasını önleyerek antitrombotik bir ortam oluşturur. Aynı zamanda fibrinolitik sistemin aktivasyonunu destekleyerek pıhtılaşma süreçlerini dengede tutar. Ancak, İ/R hasarı sırasında NO seviyelerinin düşmesi ve inflamasyonun artmasıyla birlikte, endotelial hücreler trombojenik bir hale gelir. Doku faktörü (TF) ekspresyonunun artması, plateletlerin birbirine yapışmasını ve koagülasyon faktörlerinin aktive olmasını tetikler. Bu süreç, mikrodamarlarda trombüs oluşumuna yol açarak dolaşımı daha da bozar ve dokuya oksijen ulaşmasını engelleyerek İ/R hasarının etkilerini ağırlaştırır (79).

2.2.6.2 Humoral Yanıt

İ/R hasarında ortaya çıkan humoral yanıt; kompleman sistemi aktivasyonu, sitokin ve kemokinlerin salınımı ile pıhtılaşma mekanizmalarının aktive edilmesi gibi karmaşık süreçleri içerir. Bu yanıtlar inflamasyonun başlaması, ilerlemesi ve doku hasarında kritik bir role sahiptir (78) .

2.2.6.2.a Kompleman Sistemi

Kompleman sistemi, İ/R hasarının reperfüzyon fazında hızlıca aktive olarak inflamatuvar cevabı kuvvetlendirir. Kompleman aktivasyonu üç farklı yol üzerinden gerçekleşebilir: klasik, alternatif ve lektin yolları. Bu yolların aktivasyonu, hedef hücrelerin zarında porlar oluşturarak hücre lizisine neden olan membran atak kompleksinin (MAC) oluşumu ile sonuçlanır. Ayrıca komplemanın aktivasyonu sonucu oluşan C3a ve C5a, inflamasyonu tetikleyen güçlü kemotaktik ve anafilatoksin etkilere sahiptir. Bu proteinler nötrofiller, monositler ve mast hücreleri gibi inflamatuvar hücrelerin etkilenen bölgeye göçünü sağlar ve hücrel infiltrasyonu artırarak inflamatuvar cevabın şiddetlenmesine yol açar (78).

2.2.6.2.b Sitokinler ve Kemokinler

Sitokinler ve kemokinler, İ/R hasarında inflamasyonun oluşması ve düzenlenmesinde temel aracı moleküllerdir. Özellikle TNF- α , IL-1 β ve IL-6 inflamatuvar süreçlerin tetiklenmesinde ve sürdürülmesinde merkezi rol oynayan pro-inflamatuvar sitokinlerdir. TNF- α , inflamatuvar sinyalizasyon yolu olan nükleer faktör kappa B (NF- κ B)'yi aktive ederek çeşitli inflamatuvar mediatörlerin sentezini

artırır. IL-1 β ise inflamasyon bölgesindeki endotel hücrelerini aktive ederek vasküler geçirgenliği artırır ve lökositlerin transmigrasyonunu kolaylaştırır. IL-6, lokal inflamasyonun yayılmasında rol oynadığı gibi, sistemik inflamasyonun gelişmesinde de etkili olup, SIRS'a yol açarak, çoklu organ yetmezliği riskini artırabilir (79).

2.2.6.2.c Koagülasyon Sistemi ve Trombositlerin Rolü

İ/R hasarında inflamasyon ile koagülasyon sistemleri arasında sıkı bir etkileşim bulunur. İskemi nedeniyle ortaya çıkan endotel hasarı, von Willebrand faktörü (vWF) ve tromboksan A2 gibi prokoagülan faktörlerin salınımını tetikler. Bu durum trombositlerin hasarlı endotel bölgesine yapışmasını ve agregasyonunu kolaylaştırarak trombotik olayların oluşumunu hızlandırır. Aktivasyona uğrayan trombositler, çeşitli kemokin ve pro-inflamatuar sitokinlerin salınımını artırarak inflamatuvar hücrelerin bölgeye yönelmesini sağlar. Bu durum ROS üretimini artırır ve inflamasyon sürecini daha da şiddetlendirir. Ayrıca ağır vakalarda, endotelin TF ekspresyonundaki artış, yaygın damar içi pıhtılaşma (dissemine intravasküler koagülasyon - DIC) gibi ciddi komplikasyonlara neden olabilir (79).

2.2.7 No-reflow fenomeni

No-reflow fenomeni, iskemiye uğrayan dokularda reperfüzyonun sağlanmasına rağmen mikrovasküler düzeyde yeterli kan akımının yeniden sağlanamaması durumunu ifade etmektedir. Endotelyal disfonksiyon, inflamasyon, koagülasyon sistemi aktivasyonu ve immün hücre infiltrasyonu gibi kompleks

süreçlerin etkileşimi sonucu ortaya çıkar. Bu fenomenin altında yatan patofizyolojik mekanizması henüz tam olarak aydınlatılamamış olup, multifaktöriyel bir süreç olduğu kabul edilmektedir (80).

İ/R sırasında meydana gelen endotelial disfonksiyon, no-reflow fenomeninin temel mekanizmalarından biridir. Endotelial hücrelerin fonksiyonel bozulması, mikrovasküler permeabiliteyi artırarak vasküler bariyerin bütünlüğünü bozar. Sonuç olarak, vasküler yataktan çevre dokulara sıvı ve protein geçişi olur ve interstisyel basınç artarken intravasküler basınç azalır. Artan interstisyel ödem, kapiller damarlarda mekanik kompresyona yol açarak mikro dolaşımı daha da kötüleştirir (81).

Sitokinlerin ve aktive nötrofillerin oluşturduğu inflamatuvar yanıt, no-reflow fenomeninin oluşumunda kritik rol oynamaktadır. Özellikle TNF- α , IL-1 β ve IL-6 gibi pro-inflamatuvar sitokinler, inflamatuvar cevabı aktive ederek mikrovasküler bariyer disfonksiyonunu şiddetlendirir. Ayrıca aktive nötrofillerin CD18 aracılı adezyonu ve post-kapiller venüllerde birikimi, damarların kısmi olarak tıkanmasına ve mikrodamar perfüzyonunun azalmasına neden olur. Bu durum, nötrofillerin no-reflow patogenezindeki önemini vurgulamaktadır (81).

Pıhtılaşma sistemi ve trombosit aktivasyonu, no-reflow fenomeninde önemli rol oynar. Endotel hasarı sonrası trombositlerin damar duvarına yapışmasıyla mikrovasküler trombüs oluşur ve damar tıkanıklığı artar. Ayrıca aktive trombositler, inflamasyonu güçlendirerek oksidatif hasarı da şiddetlendirir (81).

2.2.8 İskemi-reperfüzyon hasarında uzak organ hasarı

İ/R hasarı, yalnızca lokal olarak hasarlanmış dokuyu değil, aynı zamanda uzak organları da etkileyebilen sistemik süreçtir. Uzak organ hasarı, özellikle ekstremiteler veya bağırsak gibi bölgelerdeki İ/R olaylarından sonra akciğer, karaciğer, böbrek ve kalp gibi farklı organlarda da fonksiyon bozukluklarına yol açabilmektedir (82).

Uzak organ hasarının temelinde, reperfüzyon sırasında ortaya çıkan ROS, inflammatuar sitokinler ve aktive olmuş lökositlerin sistemik dolaşıma katılması yatar. Başlangıçta lokal bir inflamasyon olarak başlayan süreç, reperfüzyon sonrasında hızla sistemik inflammatuar bir yanıtla dönüşebilir. Bu süreçte, özellikle IL-6, TNF- α ve IL-1 β gibi proinflammatuar sitokinlerin sistemik dolaşıma salınımı gerçekleşir. Bu sitokinler, uzak dokularda inflammatuar hücrelerin aktivasyonunu ve migrasyonunu teşvik ederek ikincil hasar odaklarının oluşumuna zemin hazırlar (83).

Akciğerler, uzak organ hasarının en sık görüldüğü organların başında gelir. Reperfüzyon sırasında oluşan proinflammatuar sitokinlerin pulmoner dolaşıma ulaşması sonucu, akciğerlerde endotel disfonksiyonu ve mikrovasküler geçirgenlik artışı meydana gelir. Bu durum pulmoner ödem, gaz değişiminde bozulma ve ARDS'ye kadar ilerleyebilen ciddi komplikasyonlara neden olabilir (84).

Benzer şekilde, böbreklerdeki uzak organ hasarı da önemlidir. Renal mikrosirkülasyonun bozulması ve tübüler epitelyumun hasarlanması sonucunda akut böbrek yetmezliği gelişebilir. Bu durum, özellikle ekstremiteler ve intestinal İ/R

sonrası sistemik dolaşıma karışan inflamatuvar mediyatörlerin ve oksidatif stresin renal dokuda hasar oluşturmaya ilişkinidir (85).

Karaciğer, inflamatuvar sitokinler ve oksidatif stres ürünlerine yüksek duyarlılığı nedeniyle İ/R sonrası sıkça etkilenen organlardan biridir. Karaciğerdeki Kupffer hücrelerinin aktivasyonu ve hepatositlerde oksidatif hasar sonucu karaciğer fonksiyon testlerinde bozulma, nekroz alanları ve hatta akut karaciğer yetmezliğine kadar varabilen klinik tablolar görülebilmektedir (86).

Kalp ise, uzak organ hasarı miyokardiyal depresyon ve aritmiler şeklinde ortaya çıkabilir. Bu hasarın altında yatan temel mekanizma, sistemik inflamatuvar cevabın tetiklediği miyokard hücrelerinde fonksiyon kaybı ve apoptozun artmasıdır (87).

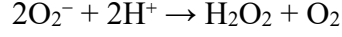
2.2.9 İskemi-reperfüzyon hasarında biyokimyasal belirteçler

İ/R hasarının kompleks sürecinde artan ROS, hücrelerin lipid, protein ve DNA yapılarında hasara yol açar. Lipid peroksidasyonu sonucu oluşan MDA, hücresel membran hasarının biyokimyasal bir göstergesi olarak kabul edilir ve oksidatif hasarın değerlendirilmesinde sıkça kullanılan bir parametredir (88).

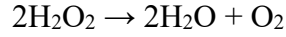
Hücreler, oksidatif strese karşı korunmak için çeşitli antioksidan savunma sistemlerine sahiptir. Bunlar enzimatik ve non-enzimatik olarak iki gruba ayrılır.

Enzimatik antioksidan sistemler arasında süperoksit dismutaz (SOD), katalaz (CAT), glutatyon peroksidaz (GSH-Px), glutatyon S-transferaz (GST), mitokondriyal sitokrom oksidaz sistemi ve hidroperoksidaz bulunur (Tablo 8) (88).

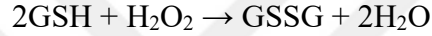
- Süperoksit dismutaz (SOD): Süperoksit radikalini hidrojen peroksit (H₂O₂) dönüştürür.



- Katalaz (CAT): Hidrojen peroksiti su ve oksijene dönüştürür.



- Glutasyon peroksidaz (GSH-Px): Hidrojen peroksiti indirgerken redükte glutasyonu (GSH) kullanarak okside glutasyon (GSSG) oluşturur.



Tablo 8. Enzimatik antioksidanlar ve fonksiyonları

Enzim/Sistem	Fonksiyon
SOD	Süperoksit radikalini hidrojen peroksit dönüştürür
CAT	Hidrojen peroksiti oksijen ve suya dönüştürür
GSH-Px	Hidrojen peroksiti ve organik hidroperoksitleri indirger
GST	Toksik maddelerin (karsinojenler, ilaçlar) glutasyon ile konjugasyonunu sağlayarak detoksifikasyonu yapar.
Mitokondriyal Sitokrom Oksidaz Sistemi	Elektron taşıma zincirinde görev alarak, oksijeni kullanıp ATP sentezini sağlar ve oksidatif fosforilasyonu gerçekleştirir.
Hidroperoksidaz	Hidrojen peroksitleri (özellikle organik hidroperoksitleri) zararsız hale getirir.

Non-enzimatik antioksidanlar, kaynaklarına göre endojen ve eksojen olmak üzere iki grupta sınıflandırılır.

Non-enzimatik endojen antioksidanlar arasında glutatyon (GSH), albumin, bilirubin, seruloplazmin, transferrin, miyoglobin, hemoglobin, ferritin, sistein, metiyonin, ürik asit ve melatonin gibi moleküller yer alır (Tablo 9) (89).

Tablo 9. Non-enzimatik endojen antioksidanlar ve fonksiyonları

Antioksidan	Fonksiyonları
Albumin	Serbest radikalleri bağlayarak oksidatif stresi azaltır, metal iyonlarını bağlar.
Bilirubin	Lipit peroksidasyonunu önleyerek antioksidan koruma sağlar.
Melatonin	Güçlü serbest radikal temizleyici; uyku-uyanıklık döngüsünü düzenler.
Seruloplazmin	Bakır içeren enzimatik aktivitesiyle demir metabolizmasını düzenler ve serbest radikalleri etkisiz hale getirir.
Transferrin	Demir bağlayıcıdır, demirin katalize ettiği serbest radikal üretimini azaltır.
Miyoglobin	Kas dokusunda oksijen depolayıcıdır, oksidatif hasara karşı koruyucu rol oynar.
Hemoglobin	Eritrositlerde oksijen taşıma; kontrollü biçimde oksijenin toksik etkisini önler.
Ferritin	Hücrel demiri depolar ve demirin toksik radikaller oluşturmasını engeller.
Glutatyon(GSH)	Serbest radikallerle doğrudan reaksiyona girerek oksidatif stresi azaltır.
Sistein	Glutatyon sentezinde öncü amino asit, serbest radikallerle savaşı.
Metiyonin	Sülfür içeren amino asit olup oksidatif hasarın tamirine yardım eder.
Ürik Asit	Serbest radikalleri (özellikle hidroksil radikallerini) temizler.
Laktoferrin	Demiri bağlar, bakteriyel enfeksiyonlara karşı koruma sağlar ve oksidatif stresi azaltır.
Metiyonin	Güçlü serbest radikal temizleyici, hücre hasarını önler.

Non-enzimatik eksojen antioksidanlar arasında ise vitamin A (β -karoten, retinol), vitamin E (α -tokoferol), vitamin C (askorbik asit), folat (folik asit) ve demir şelatörleri yer alır (Tablo 10). Bu moleküller serbest radikalleri doğrudan etkisiz hale getirir ve hücrel hasara karşı koruma sağlarlar. Özellikle glutatyon, hücre içi en yaygın antioksidanlardan biri olup, doğrudan serbest radikallerle reaksiyona girer ve GSH-Px enziminin kofaktörü olarak işlev görür (89).

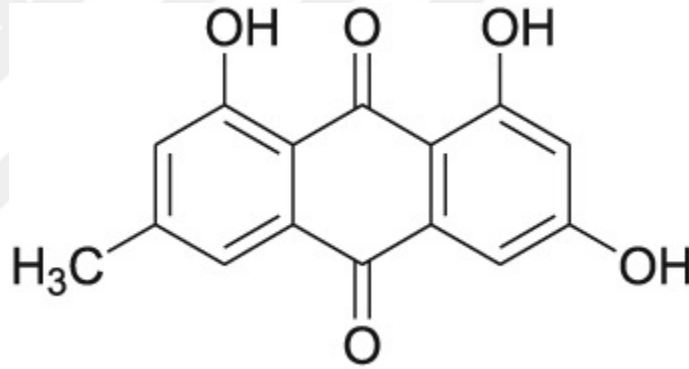
Tablo 10. Non-enzimatik eksojen antioksidanlar ve fonksiyonları

Antioksidan	Fonksiyonları
Vitamin E (α -tokoferol)	Hücre zarlarını lipid peroksidasyonundan korur; lipitte çözünen antioksidandır.
Vitamin A (β -karoten)	Serbest radikallerin zararlı etkilerini azaltır, immün sistemi destekler.
Vitamin C (askorbik asit)	Suda çözünen güçlü antioksidan; serbest radikallerle reaksiyona girer, E vitaminini yeniler.
Folik Asit	DNA hasarını önleyici ve hücrel antioksidan kapasiteyi destekleyicidir.
Demir Şelatörleri	Serbest demiri bağlayarak demirin radikal oluşturmalarını engeller.

İ/R hasarında oksidatif stres ve antioksidan savunma sistemlerinin değerlendirilmesi, hasarın kapsamını ve şiddetini belirlemek açısından önemlidir. Antioksidan sistemlerin biyokimyasal ölçümleri ve bu sistemlerin işleyiş mekanizmalarının anlaşılması, İ/R hasarını azaltmaya yönelik yeni tedavi yaklaşımlarının geliştirilmesine katkıda bulunacaktır.

2.3 Emodin

Emodin, 1,3,8-trihidroksi-6-metilantrakinon yapısına sahip, doğal kaynaklı bir antrakinon türevidir (Şekil 11). *Rheum palmatum* (90), *Polygonum cuspidatum* (91) ve *Aloe vera* (92) gibi çeşitli bitkilerde bulunur. Geleneksel Çin tıbbında uzun yıllar laksatif olarak kullanılmasına rağmen, son yıllarda antikanser, antiviral, antioksidan, antiinflamatuvar, antimikrobiyal ve metabolik hastalıklar üzerinde etkileriyle dikkat çekmektedir (93, 94).



Şekil 11. Emodin'in kimyasal yapısı

Emodin'in kanser tedavisinde umut vadeden bir ajan olduğu yapılan son çalışmalarda gösterilmiştir. Yapılan çalışmalar bu bileşiğin protein tirozin kinaz inhibitörü olarak hareket ettiğini ve akciğer, meme, karaciğer, prostat, over, pankreas kanseri hücrelerinde HER2/neu ile CKII kinaz inhibisyonu yoluyla tümör büyümesini baskıladığı göstermiştir (95, 96). Ayrıca, Emodin'in kemoterapötik ajanlarla kombinasyon halinde kullanıldığında, ilaç toksisitesini azaltarak tedavi etkinliğini artırabileceği öne sürülmektedir (97).

Son yıllarda emodinın antiviral özellikleri de dikkat çekmiştir. Özellikle SARS-CoV ve SARS-CoV-2 üzerine yapılan çalışmalar, emodinın virüsün hücreye giriş mekanizmasını inhibe ettiğini göstermiştir. Bu bileşiğin, ACE2 reseptörü ile SARS-CoV spike proteini arasındaki etkileşimi bloke ederek virüsün hücre içine alınmasını engellediği belirlenmiştir (98). Ayrıca, 3a iyon kanalını inhibe etme kapasitesi sayesinde SARS-CoV'un replikasyon sürecini yavaşlattığı tespit edilmiştir (99).

Antibakteriyel ve antifungal aktiviteleri bakımından değerlendirildiğinde, emodinın *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa* ve *Candida* türleri gibi patojenlere karşı etkili olduğu belirlenmiştir (100). Bakteriyel hücre zarlarını zayıflatarak veya DNA sentezini baskılayarak mikroorganizmaların büyümesini engelleyebildiği ifade edilmektedir. Özellikle antibiyotik dirençli MRSA gibi suşlara karşı etkili olması, emodinın gelecekte antibiyotik geliştirme süreçlerinde kullanılabilecek doğal bileşiklerden biri olabileceğini düşündürmektedir (101).

Metabolik hastalıklar açısından incelendiğinde, emodinın tip 2 diyabet ve insülin direnci modellerinde kan glukoz seviyelerini düşürme ve insülin duyarlılığını artırma yeteneği gösterdiği saptanmıştır. Aynı zamanda, yağ metabolizmasını düzenleyerek obeziteye karşı etkili olabileceği belirlenmiştir. AMPK aktivasyonu yoluyla glikoz alımını artırdığı ve insülin sinyal yollarını iyileştirdiği gözlemlenmiştir (102). Kardiyovasküler sistem üzerindeki etkileri ise endotel fonksiyonlarını düzenleyerek kan damarlarının genişlemesine yardımcı olması ve aterosklerozun ilerlemesini yavaşlatması ile ilişkilidir. Ayrıca, kan

basıncını düzenleyerek hipertansiyona karşı koruyucu bir rol oynayabileceği ifade edilmektedir (103).

Emodin antioksidan özellikleri de geniş kapsamlı araştırmalara konu olmuştur. Serbest radikalleri temizleme ve oksidatif stresi azaltma yeteneği, özellikle nörodejeneratif hastalıklarda potansiyel bir tedavi ajanı olarak değerlendirilmesine neden olmuştur. Alzheimer hastalığı üzerine yapılan deneylerde, emodin amiloid-beta birikimini azalttığı, nöroinflamasyonu baskıladığı ve mitokondriyal fonksiyonları düzenleyerek hücrel enerji üretimini koruduğu gözlemlenmiştir (104). Bu özellikler, bilişsel fonksiyonların korunmasına katkı sağlayabileceğini düşündürmektedir.

Bileşiğin antiinflatuar etkileri, TNF- α , IL-6 ve COX-2 gibi proinflatuar faktörlerin baskılanmasıyla ilişkilidir. İ/R hasarı modellerinde yapılan çalışmalarda, emodin NLRP3 inflammasom aktivasyonunu inhibe ederek ve Toll-like reseptör 4 (TLR4)/MyD88/NF- κ B/NLRP3 yollarını baskılayarak doku koruyucu bir etki gösterdiği belirlenmiştir (105). Bu etki, bağırsak, miyokard, testis ve akciğer I/R hasarında oksidatif stres seviyelerini azaltarak hücrel homeostazı desteklediğini göstermektedir. Reperfüzyon sürecinde özellikle özellikle ROS azaltıcı, inflamatuvar sitokinleri baskılayıcı ve hücre ölüm mekanizmalarını düzenleyici etkiler gösterdiği çeşitli çalışmalarda ortaya konmuştur (106).

İ/R hasarına bağlı testiküler ve pulmoner inflamasyon modellerinde yapılan deneysel çalışmalarda, emodin farklı dozlarda uygulanmasının doku koruyucu etkiler sağladığı gösterilmiştir. Testis İ/R modeli kullanılan bir çalışmada, 20 mg/kg

emodin dozu ile inflamatuvar yanıtın baskılandığı, oksidatif stresin azaldığı ve spermatogenezin korunduğu belirlenmiştir (107). Akciğer İ/R modelinde ise 40 mg/kg dozunda emodin uygulaması, reperfüzyon sonrası oluşan GSDMD aracılı piroptozisi inhibe etmiş ve böylece inflamasyon ve ödemi azaltmıştır (107). Bu bulgular, emodinin organ koruyucu potansiyelinin doz bağımlı olarak değişebileceğini göstermektedir.

Farmakokinetik veriler, emodinin oral biyoyararlanımının düşük olduğunu ve glukuronidasyon nedeniyle hızlı bir metabolizmaya uğradığını göstermektedir (108). Bu nedenle, sistemik etkiler açısından dozun dikkatle belirlenmesi gerekmektedir. Yüksek doz kullanımına bağlı olarak hepatotoksisite, nefrotoksisite ve üreme sistemi üzerinde olumsuz etkiler bildirilmiştir (109). Bu durum, emodinin uzun vadeli kullanımının güvenlik açısından daha fazla araştırılmasını gerekli kılmaktadır.

Elde edilen veriler, emodinin iskemi-reperfüzyon hasarına karşı koruyucu etkileri olan güçlü bir antiinflamatuvar ajan olabileceğini göstermektedir (110). Ancak, klinik kullanımı için optimal doz aralığının belirlenmesi, uzun dönem güvenilirlik çalışmalarının tamamlanması ve farklı organ sistemlerindeki etkilerinin detaylandırılması gerekmektedir. Bu doğrultuda, emodin temelli tedavi yaklaşımlarının geliştirilmesi, İ/R hasarına bağlı klinik tabloların yönetiminde yeni stratejiler sunabilir. Bu çalışma, İ/R patofizyolojisine dahil olan spesifik belirteçleri inceleyerek emodinin alt ekstremitte periferik İ/R hasarındaki koruyucu etkilerini araştırmayı amaçlamaktadır.

3. GEREÇ VE YÖNTEM

3.1 Gereç

3.1.1 Deney hayvanları

Erişkin, erkek Wistar albino cinsi, 250-350 gr 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 Kurulu tarafından onaylanmıştır (G.Ü.ET-23.117, onay tarihi: 28.12.2023). Deneyler sırasında kullanılan hayvan sayısının en aza indirilmesi ve hayvanların herhangi bir acı ya da rahatsızlık yaşamalarının önlenmesi için azami özen gösterilmiştir.

3.1.3 Deneyin tasarımı

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

Grup 1: Sadece laparotomi uygulanan (SHAM)

Grup 2: 45 dk iskemi ve 2 saat reperfüzyon uygulanarak alt ekstremité İ/R modeli oluşturulan (IR)

Grup 3: İntraperitoneal (20 mg/kg) emodin uygulanan ve laparotomi yapılan (E)

Grup 4: 45 dk iskemi ardından intraperitoneal (20 µg/kg) BPC 157 uygulanıp, 2 saat reperfüzyon gerçekleştirilen (IR+E)

3.1.4 İlaç pozolojisi

Emodin (1,3,8-trihidroksi-6-metil-antrakinon; moleküler ağırlık 270.24 g/mol; Katalog No.: HY-14393; MedChemExpress, ABD), %98'in üzerinde yüksek saflıkta bir antrakinon türevi olarak temin edilmiştir. Çalışmamızda, emodin %0.5'lik sodyum karboksimetil selüloz (CMC-Na; Viskozite: 800-1200 mPa.s; Katalog No.: HY-Y0703; MedChemExpress, ABD) içinde süspanse edilerek hazırlanmıştır. Çözünürlük oranı 3.33 mg/mL (12.32 mM) olup, süspansiyon oluşturulmuş ve çözünme işlemi ultrasonik işlem uygulanarak tamamlanmıştır. Sodyum karboksimetil selüloz, ilaçların çözünürlüğünü artırmak ve stabil süspansiyonlar elde etmek için yaygın olarak kullanılan bir taşıyıcıdır.

Emodin kullanıldığı önceki çalışmalarda, intraperitoneal, oral ve intravenöz uygulama yöntemleriyle çeşitli doz aralıklarında deney hayvanlarına uygulandığı bildirilmiştir. Çalışmamızda, uygulama yöntemi olarak intraperitoneal yol tercih edilmiş ve doz olarak 20 mg/kg belirlenmiştir. Bu doz, emodin farmakolojik özelliklerinin incelendiği literatürdeki çalışmalardan elde edilmiştir (111).

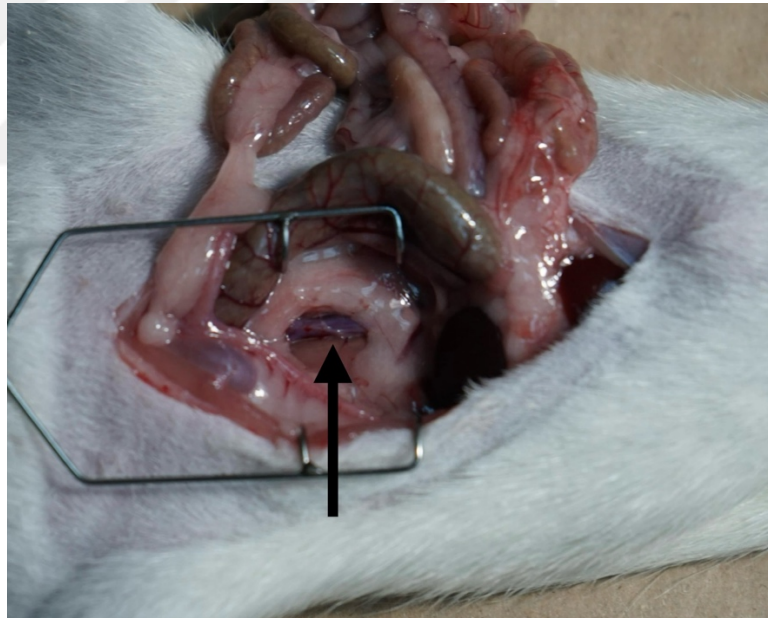
3.2 Yöntem

3.2.1 İskemi-reperfüzyon modeli, cerrahi prosedür ve ilaç uygulanması

Ratlar, prosedürden 12 saat önce aç bırakılmış ancak suya erişimleri serbest bırakılmıştı. 45 mg/kg ketamin (Ketalar® flakon, Parke Davis, USA) + 5mg/kg ksilazin (IPM Ksilazin %2, IPM ilaç San. ve Tic. A.Ş., Türkiye) kokteylinin kas içi yolla enjeksiyonu ile anestezi uygulanıp, 90 dk'da bir yarı doz şeklinde idamesi

gerçekleştirildi. Cerrahi bölgeye kolay erişim sağlamak amacıyla tüm abdomen ve kasık bölgesi tıraş edilmiştir. Ratlar, vücut sıcaklıklarını koruyabilmek ve $37\pm0,5^{\circ}\text{C}$ 'de sabit tutabilmek için ısıtıcı ped bulunan bir masaya supin pozisyonda yerleştirilmiştir. Cerrahi alanın sterilizasyonu %10 povidon iyot ile gerçekleştirilmiş olup, deney farklı gruplar halinde uygulanmıştır.

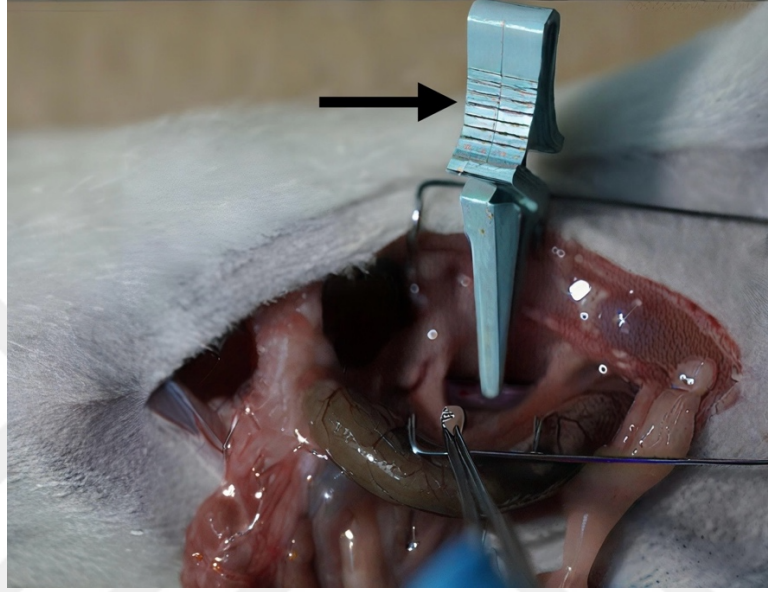
Grup SHAM: Medyan laparotomi ile batın açılarak abdominal aorta ve inferior vena cava bulundu, abdominal aortanın çevresi serbestleştirildi (Resim 1). 45 dk sonra 0,3 cc %0,9 NaCl intraperitoneal olarak uygulandı.



Resim 1. Laparotomi sonrası serbestleştirilen abdominal aorta ve inferior vena cava (ok işareti)

Grup IR: Medyan laparotomi ile batın açılarak abdominal aorta ve inferior vena cava bulundu. Abdominal aortanın çevresi serbestleştirildi. Aortaya atravmatik bulldog klemp yerleştirilerek 45 dk sürecek iskemi periyodu başlatıldı

(Resim 2). 45. dk'da 0,3 cc %0,9 NaCl intraperitoneal uygulandı ve sonrasında bulldog klemp kaldırılarak 2 saat reperfüzyon sağlandı.



Resim 2. Abdominal aortaya atravmatik bulldog klemp (ok işareti) yerleştirilmesi

Grup E: Medyan laparotomi ile batın a.ılarak abdominal aorta ve inferior vena cava bulundu, abdominal aortanın .evresi serbestleştirildi. 45. dk'da 20 mg/kg emodin intraperitoneal olarak uygulandı.

Grup IR+E: Medyan laparotomi ile batın açılarak abdominal aorta ve inferior vena cava bulundu. Abdominal aortanın çevresi serbestleştirildi. Aortaya atravmatik bulldog klemp yerleştirilerek 45 dk sürecek iskemi periyodu başlatıldı. 45. dk'da 20 mg/kg emodin intraperitoneal yolla verildi. 45 dk iskemi periyodu tamamlandıktan sonra bulldog klemp kaldırılarak 2 saat reperfüzyon sağlandı.

Her 4 grupta deneyin 2 saat 45. dk'sında rat yüksek doz anestezi ve vena cava inferiordan alınan kan ile sakrifiye edilerek bilateral olarak gastrokinemus

kasları çıkartıldı. Sol gastrokinemus kası %10 formaldehit ile muamele edilip, histopatolojik inceleme için hazırlandı. Hematoksilen eozin ve masson trikrom ile boyandıktan sonra doku ödemi, nötrofil infiltrasyonu, hemoraji ve miyosit hasarı açısından mikroskop ile incelenerek skorlandı (0: normal, 1: zayıf, 2: orta, 3: şiddetli). Sağ gastrokinemus kası, doku homojenatında malondialdehit (MDA) değeri ile katalaz (CAT), glutatyon (GSH) ve süperoksit dismutaz (SOD) enzim aktivitesi değerlendirilmesi için %0,9 NaCl ile yıkandıktan sonra -80°C 'de dondurularak laboratuvara gönderildi.

3.2.2 Oksidatif stres belirteçlerinin ölçülmesi için doku örnekleme

Sağ gastrokinemus alüminyum folyoya sarılıp sıvı azotta donduruldu ve analizlerin yapılacağı güne kadar -80 °C'de muhafaza edildi.

3.2.2.1 Malondialdehit (MDA) tayini

MDA analizi, TBARS yöntemi kullanılarak gerçekleştirilmiştir (112). İ/R hasarı prosedürü uygulanan iskelet kası dokusu MDA seviyelerini değerlendirmek için kullanılmıştır.

Doku MDA analizi için, 50 mg iskelet kası dokusu tartılmıştır. Dokulara 9 kat soğuk trikloroasetik asit (TCA) solüsyonu eklenmiş ve buz üzerinde homojenize edilmiştir. Ardından, homojenatlar 4500 rpm'de 15 dakika santrifüj edilmiştir. Elde edilen süpernatantlar temiz eppendorf tüplerine alınmış ve 10 dakikalık ikinci bir santrifüj işlemine tabi tutulduktan sonra örnekler, cam tüplere alınmıştır. Butilhidroksi tolüen (BHT) ve tiyobarbitürik asit (TBA) cam tüplerdeki örneklerle

eklenmiştir. Karışım 20 saniye boyunca vortekslendikten sonra tüpler kapatılmış ve 100°C’de, 15 dakika boyunca kaynar su banyosunda bekletilmiştir. İşlemin ardından, 4500 rpm’de son bir santrifüj uygulanmış ve örnekler 96 kuyulu bir plakaya yüklenmiştir. Son aşamada, 535 nm dalga boyunda absorbans ölçümleri yapılmış, distile su blank olarak kullanılmış ve gerekli örnek muameleleri gerçekleştirilmiştir (112).

3.2.2.2 Glutasyon (GSH) tayini

GSH analizi, Modifiye Ellman prosedürü kullanılarak gerçekleştirilmiştir (113). İ/R hasarı prosedürü uygulanan iskelet kası dokusunda GSH’ı değerlendirmek için kullanılmıştır.

Doku GSH tayini için, 50 mg iskelet kası dokusu tartılmıştır. Dokulara 9 kat TCA solüsyonu eklenmiş ve buz üzerinde homojenize edilmiştir. Ardından, homojenatlar 4500 rpm’de 15 dakika santrifüj edilmiştir. Santrifüjden sonra, 0,3 M disodyum hidrojen ortofosfat dihidrat ($\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$) çözeltisi ve ditiobisnitrobenzoat (DTNB) çözeltisi supernatana eklenmiştir. Örnekler 96 kuyulu plakaya yüklenmiş ve oda sıcaklığında 10 dakika inkübe edilmiştir. Örneklerin absorbansı, 412 nm’de spektrofotometre aracılığıyla ölçülmüştür. Distile su blank olarak kullanılmış ve gerekli örnek muameleleri gerçekleştirilmiştir (113).

3.2.2.3 Superoksit dismutaz (SOD) aktivitesi tayini

Doku SOD aktivitesi, Yi-Sun’un tanımladığı, ksantin ksantin oksidaz ile O_2^- - oluşturması ve bunun da nitroblue tatrazolium (NBT) ile renkli bir bileşik

oluşturarak bu renk şiddetinin spektrofotometrik olarak ölçülmesi esasına dayanır (114). Ortamdaki SOD aktivitesi ne kadar fazla ise $O_2^{\cdot-}$ 'i ortadan kaldıracığı için oluşan rengin şiddeti o kadar az olacaktır.

50 mg iskelet kası dokusu buz üzerinde tartılmış ve 0.05 M pH 7.4 Tris HCl çözeltisi ile homojenize edilmiştir. Homojenatlar 4500 rpm'de 15 dakika santrifüj edilmiştir. Sonrasında supernatanlar temiz eppendorf tüplerine alınmıştır. SOD tayini için bu supernatana 1/1 v/v kloroform/etanol (3v/5v) karışımı eklenmiştir. Tekrar santrifüj (+4°C'de 4500 rpm'de 30 dakika) edildikten sonra elde edilen supernatan ile SOD tayini yapılmıştır.

Ksantin çözeltisi, etilendiamintetraasetik asit (EDTA), NBT, Na_2CO_3 ve bovin serum albümini (BSA)'dan elde edilen reaktif karışımı hazırlanmıştır. Örnekler reaktif karışımı eklendikten sonra ksantin oksidaz çözeltisi de eklenmiş, vortekslendikten sonra oda ısısında 20 dakika inkübe edilmiştir. Son olarak $CuCl_2$ eklenerek reaksiyon durdurulmuş ve absorbanslar 560 nm'de spektrofotometre aracılığıyla okutulmuştur. Blank olarak örnek yerine distile su kullanılmış ve aynı muamelelere tabi tutulmuştur. Doku SOD aktivitesi BCA kit ile ölçülen total protein miktarına oranlanarak ünite/mg protein olarak verilmiştir (114).

3.2.2.4 Katalaz (CAT) aktivitesi tayini

CAT aktivite tayini Aebi tarafından tanımlanan metoda göre gerçekleştirilmiştir. Metod, 240 nm dalga boyunda hidrojen peroksidin (H_2O_2) katalaz tarafından parçalanmasına bağlı olarak değişen absorbans miktarının spektrofotometrik yöntem ile tespiti esasına dayanmaktadır (115).

50 mg iskelet kası dokusu buz üzerinde tartılmış ve 0.05 M pH 7.4 Tris HCl çözeltisi ile homojenize edilmiştir. Homojenatlar 4500 rpm'de 15 dakika santrifüj edilmiştir. Sonrasında supernatanlar temiz eppendorf tüplerine alınmıştır. KH_2PO_4 / Na_2HPO_4 'ten fosfat tamponu hazırlanmıştır (pH: 7,4). Tamponlanmış H_2O_2 çözeltisi, H_2O_2 'in fosfat tamponunda çözülmesiyle hazırlanmıştır. Blank olarak, içinde H_2O_2 olmayan fosfat tamponu kullanılmıştır. Örnekler üzerine tamponlanmış H_2O_2 çözeltisi üzerine eklenmiş ve 30 sn aralıkla 2 ölçüm alınarak değişen absorbans miktarı spektrofotometrik yöntem ile tespit edilmiştir. Doku CAT aktivitesi BCA kit ile ölçülen total protein miktarına oranlanarak Ünite/mg protein olarak verilmiştir (115).

3.2.2.5 Total protein tayini

Dokuda total protein tayini BCA kit (Pierce™ BCA Protein Assay Kit) metodu ile gerçekleştirilmiştir. Metodda kitin kullanım prosedürü baz alınmış olup 25 μL 10 kat dilüe edilmiş örnekler ve standartlar, 96 kuyulu plakaya yüklenmiştir. Üzerine 200 μL , solüsyon A ve B'nin oransal karışımı (50:1 Solüsyon A: Solüsyon B) eklenmiştir. Platedeki sıvıların karışması sağlandıktan sonra 37°C'de 30 dakikalık inkübasyon yapılmış ve 562 nm'de spektrofotometrede okutulmuştur.

3.2.3 Histopatolojik inceleme için doku örnekleme

Histolojik değişikliklerin değerlendirilmesi için kas örnekleri %10'luk tamponlu formalin içerisine alınarak 48 saat fikse edildi. Fiksasyonun ardından rutin parafin doku takibine alınan örnekler sırasıyla %60, %70, %80, %90 ve %100

artan dereceli etil alkol serisinden geçirilerek dehidrate edildi. Dehidratasyonun ardından ksilende şeffaflaştırılan doku örnekleri 58°C'ye ayarlanmış etüvde sıvı parafin infiltrasyonuna bırakıldı. Ardından kas örneklerinin, parafine gömülerek elden edilen parafin doku bloklarından HistoCore MULTICUT (Leica, Almanya) marka döner mikrotom kullanılarak 4 µm kalınlığında kas doku kesitleri alındı. Histopatolojik değerlendirme için kas doku kesitleri hematoksilen-eozin (HE) ile boyandı. HE boyalı örnekler bilgisayar destekli ışık mikroskobunda (Leica DM 4000B, Almanya) 200× ve 400× büyültmelerde incelendi ve Leica LAS V4.12 programı kullanılarak kesitlere ait görüntüler alındı. HE boyalı kas kesitlerinde doku hasarı, hemoraji, nötrofil infiltrasyonu, kas liflerinin disorganizasyonu ve dejenerasyonu ve interstisyel ödem bulgularının 0 ile 3 arasında skorlandığı yarı kantitatif bir yöntemle değerlendirildi (0=normal, 1=hafif, 2=orta ve 3=şiddetli). Toplam kas hasarı skoru ise her bir bulgunun ayrı ayrı değerlendirilmesi sonrasında, bu bulguların skorları toplamı olan, 0 ile 12 arasında değişen bir değer olarak belirlendi (116, 117). Elde edilen tüm değerler gruplar arasında karşılaştırıldı.

3.2.4 İstatistiksel analiz

İstatistiksel analizler, SPSS (Statistical Package for the Social Sciences) sürüm 22.0 (IBM Corp., Armonk, NY, ABD) istatistik programı kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Verilerin normal dağılıma uygunluğu görsel yöntemler (histogramlar ve olasılık grafikleri) ile birlikte analitik yöntemler olan Kolmogorov-Smirnov ve Shapiro-Wilk testleri ile değerlendirilmiştir.

Değişkenlerin dağılım özelliklerine göre veriler ortalama $\pm$ standart hata (SH) biçiminde ifade edilmiştir.

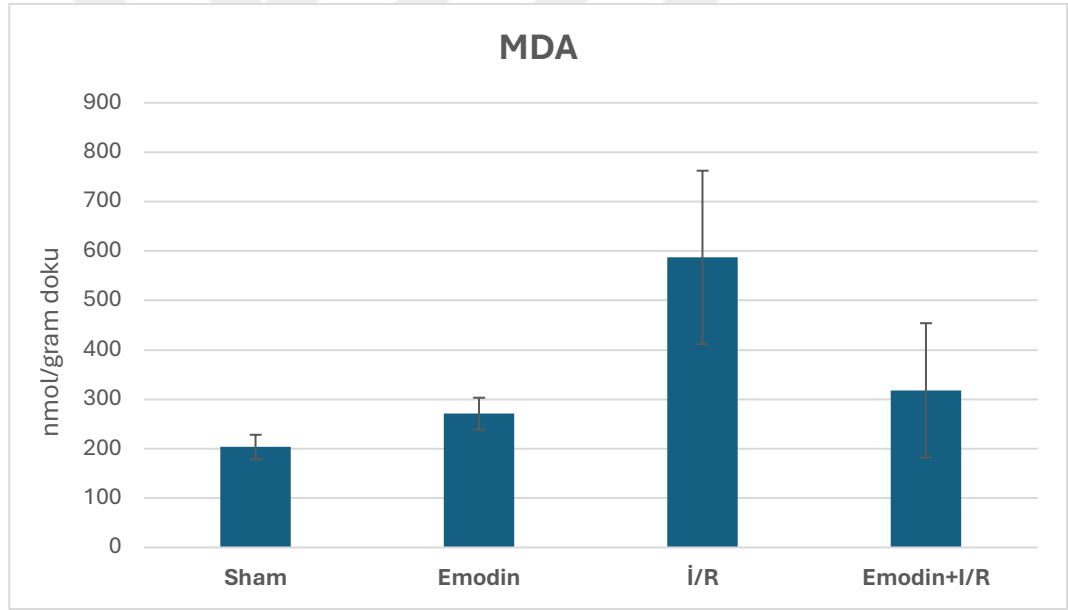
Biyokimyasal parametrelerin karşılaştırılmasında, verilerin dağılımına uygun olarak tek yönlü varyans analizi (ANOVA) veya Kruskal-Wallis varyans analizi kullanılmıştır. ANOVA sonrasında anlamlı fark saptanan değişkenler için gruplar arası karşılaştırmalarda Bonferroni düzeltmeli post-hoc analiz uygulanmıştır. Kruskal-Wallis analiziyle anlamlı farklılık gösteren değişkenlerde ise grup karşılaştırmaları Bonferroni düzeltmeli Mann-Whitney U testi ile yapılmıştır.

Tüm analizlerde istatistiksel anlamlılık sınırı %5 olarak kabul edilmiş olup, $p < 0.05$ değeri istatistiksel olarak anlamlı kabul edilmiştir.

4. BULGULAR

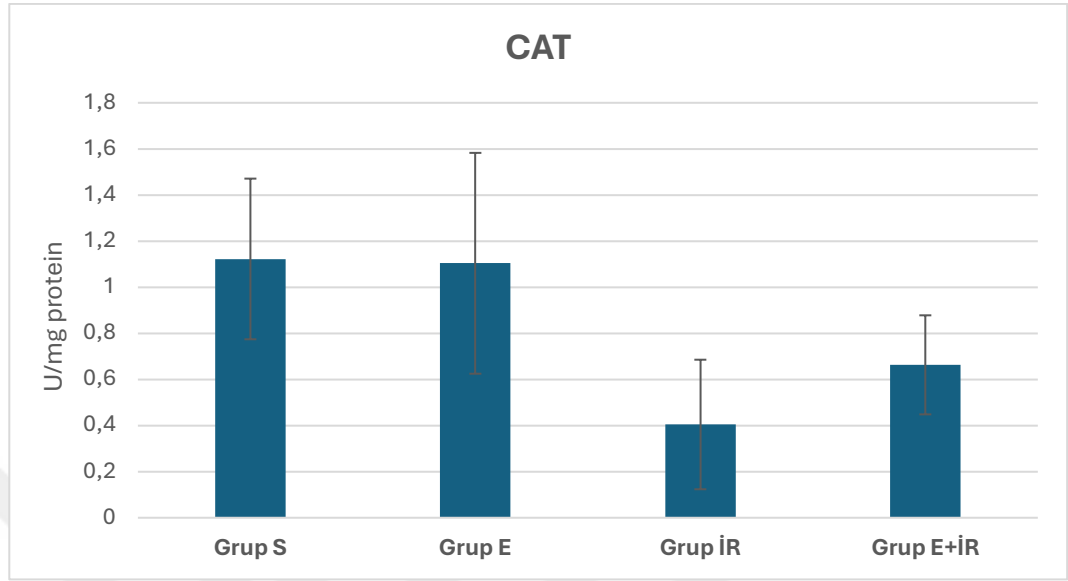
4.1 Biyokimyasal Bulgular

Gruplar kas dokusu MDA düzeyi açısından kendi aralarında kıyaslandığında, gruplar arasında anlamlı fark vardı ($p<0.001$). İR grubunda S ve E gruplarına göre MDA düzeyi anlamlı yüksek bulundu ($p<0.001$, tümü). MDA düzeyi İR+E grubunda İR grubuna göre anlamlı düşük bulundu ($p=0.003$), (Tablo-11, Grafik 1).



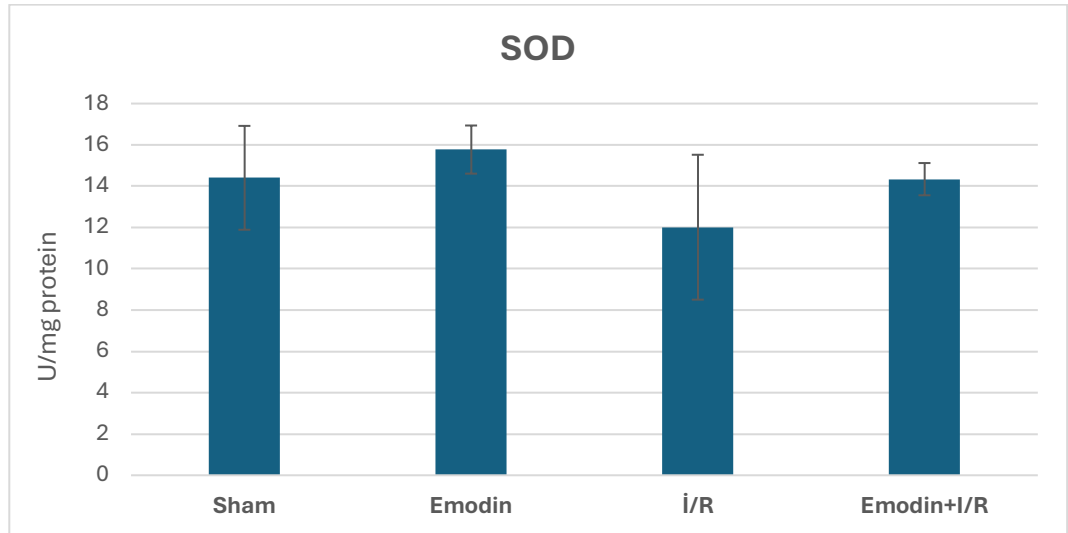
Grafik 1: Kas dokusu MDA düzeyi verileri

Gruplar kas dokusu CAT enzim aktivitesi açısından kendi aralarında kıyaslandığında, gruplar arasında anlamlı fark vardı ($p=0.004$). İR grubunda S ve E gruplarına göre CAT enzim aktivitesi anlamlı düşük bulundu ($p=0.011$, $p=0.013$, sırasıyla) (Tablo-11) (Grafik 2).

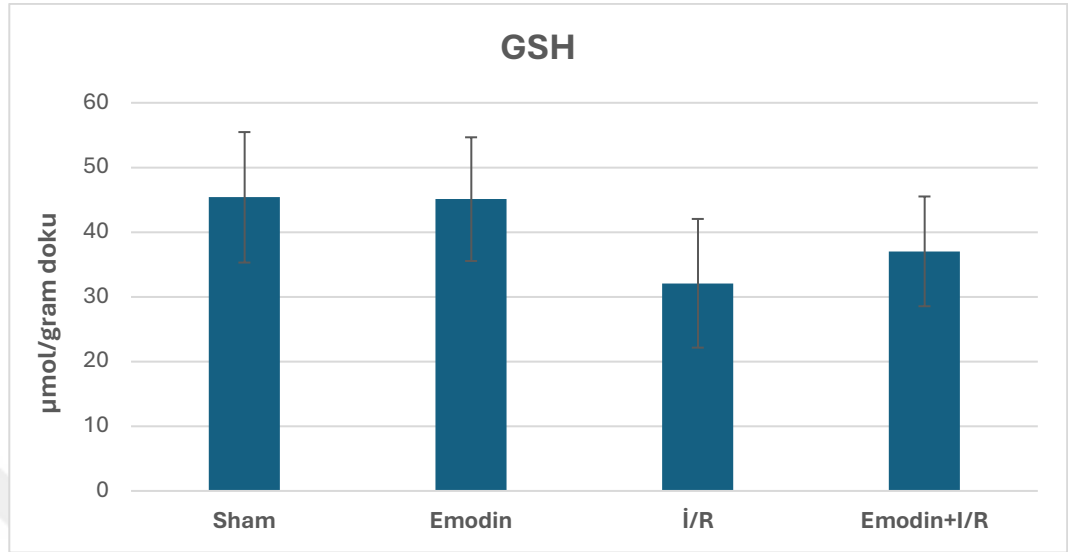


Grafik 2: Kas dokusu CAT aktivitesi verileri

Gruplar kas dokusu SOD ve GSH enzim aktiviteleri açısından kendi aralarında kıyaslandığında, gruplar arasında benzer bulundu ($p=0.064$, $p=0.068$, sırasıyla) (Tablo-11) (Grafik 3-4).



Grafik 3: Kas dokusu SOD aktivitesi verileri



Grafik 4: Kas dokusu GSH aktivitesi verileri

Tablo 11. Kas dokusu oksidan durum parametreleri [Ort±SS]

	Grup S (n=6)	Grup E (n=6)	Grup İR (n=6)	Grup E+İR (n=6)	P değeri
MDA (nmol/gr doku)	203.31±24.80	270.93±32.19	587.05±175.54*,**	317.91±136.01***	<0.001
CAT (U/mg.protein)	1.12±0.35	1.10±0.48	0.41±0.28*,**	0.66±0.21	0.004
SOD (U/mg.protein)	14.40±2.52	15.77±1.17	12.01±3.51	14.34±0.78	0.064
GSH (nmol/gr doku)	45.39±10.09	45.11±9.56	32.10±9.95	37.04±8.48	0.068

Verilerin analizinde ANOVA testi kullanılmıştır.

Anlamlılık düzeyi $p < 0.05$ olarak belirlenmiştir.

* $p < 0.05$: Grup S ile karşılaştırıldığında anlamlı fark.

** $p < 0.05$: Grup E ile karşılaştırıldığında anlamlı fark.

*** $p < 0.05$: Grup İR ile karşılaştırıldığında anlamlı fark.

4.2 Histopatolojik Bulgular

S grubuna ait kesitlerde enine çizgilenmeleriyle belirgin normal morfolojide kas lifleri ve olağan kas doku yapısı izlenirken (Resim 3), E grubuna ait hayvanlardan bir kısmına ait kesitlerde belirgin olmayan çok hafif düzeyde bir nötrofil infiltrasyonu gözlemlendi (Resim 4). İR grubuna ait örnekler incelendiğinde eozinofili artışı, vakuolizasyon ya da sarkoplazmik fragmentasyon ile belirgin şiddetli kas lifi hasarına, hücreler arası mesafenin belirgin bir biçimde açıldığı interstisyel ödemin ve dikkati çeken lökosit infiltrasyonunun eşlik ettiği görüldü (Resim 5 ve 6). Emodin uygulaması yapılan IR+E grubunda ise iskemi reperfüzyonun neden olduğu kas lifi hasarı, nötrofil infiltrasyonu ve interstisyel ödem gibi bulguların daha hafif olduğu gözlemlendi (Resim 7).

Histopatolojik incelemeler sırasında değerlendirilen değişikliklerin skorları istatistiksel olarak karşılaştırıldığında, kas liflerinin disorganizasyonu ve dejenerasyonu, nötrofil infiltrasyonu ve interstisyel ödem düzeyleri gruplar arasında anlamlı olarak farklı bulundu (sırasıyla, $p<0.001$, $p=0.019$ ve $p<0.001$). Buna göre, İR grubunda kas liflerinin disorganizasyonu ve dejenerasyonu düzeyi, S ve E gruplarına göre belirgin olarak daha yüksekti (tümü $p<0.001$). İR+E grubunda ise kas liflerinin disorganizasyonu ve dejenerasyonu düzeyi S ve E gruplarına göre daha fazla olmakla birlikte (sırasıyla $p=0.003$ ve $p<0.001$); İR grubuyla karşılaştırıldığında ise kas liflerinin disorganizasyonu ve dejenerasyonu skoru anlamlı olarak düşük bulundu ($p=0.024$) (Tablo 12).

İR grubunda nötrofil infiltrasyonu skoru S ve E gruplarına göre anlamlı olarak daha yüksek bulundu (sırasıyla $p=0.003$ ve $p=0.026$). İR+E grubunda ise

nötrofil infiltrasyonu skoru İR grubuna göre anlamlı olarak düşük bulundu ($p=0.026$) (Tablo 12).

İR grubunda S ve E gruplarına göre interstisyel ödem skoru daha yüksek bulundu (tümü $p<0.001$). Ayrıca İR+E grubunda S ve E gruplarına göre interstisyel ödem daha belirgin iken (sırasıyla $p=0.006$ ve $p=0.018$); İR grubuyla karşılaştırıldığında interstisyel ödem skoru anlamlı olarak düşük bulundu ($p=0.002$) (Tablo 12).

Örneklerde belirgin bir hemoraji gözlenmedi ve hemoraji skoru bakımından gruplar karşılaştırıldığında da istatistiksel bir farklılık görülmedi ($p=0.540$) (Tablo 12).

Toplam kas hasarı skoru bakımından karşılaştırıldığında gruplar arasında anlamlı fark bulundu ($p<0.001$). İR grubunda S ve E gruplarına göre toplam kas hasarı skoru daha yüksek bulundu (tümü $p<0.001$). Ayrıca İR+E grubunda S ve E gruplarına göre toplam kas hasarı skoru daha fazla bulundu (sırasıyla $p=0.008$ ve $p=0.013$). İR grubuyla karşılaştırıldığında ise İR+E grubunda toplam kas hasarı skoru anlamlı olarak düşük bulundu ($p=0.002$) (Tablo 12).

Tablo 12. Kas dokusu histopatolojik bulguları [Ortanca (%25-%75)]

	Grup S (n=6)	Grup E (n=6)	Grup İR (n=6)	Grup E+İR (n=6)	P değeri
Hemoraji	0.00 (0-0.25)	0.00 (0-0)	0.00 (0-1)	0.00 (0-0.25)	0.540
Nötrofil İnfiltrasyonu	0.00 (0-0.25)	0.50 (0-1)	1.00 (1-1.50)*,**	0.50 (0-1)***	0.019
Kas liflerinin disorganizasyonu ve dejenerasyonu	0.00 (0-1)	0.00 (0-0.25)	2.50 (1.75-3)*,**	1.50 (1-2)*,**,***	<0.001
İnterstisyel ödem	0.00 (0-0.25)	0.00 (0-1)	2.50 (1.75-3)*,**	1.00 (1-1.25)*,**,***	<0.001
Toplam kas hasarı skoru	0.00 (0-2.25)	1.00 (0.75-1.25)	6.50 (4.50-8.25)*,**	3.00 (2.75-4.25)*,**, ***	<0.001

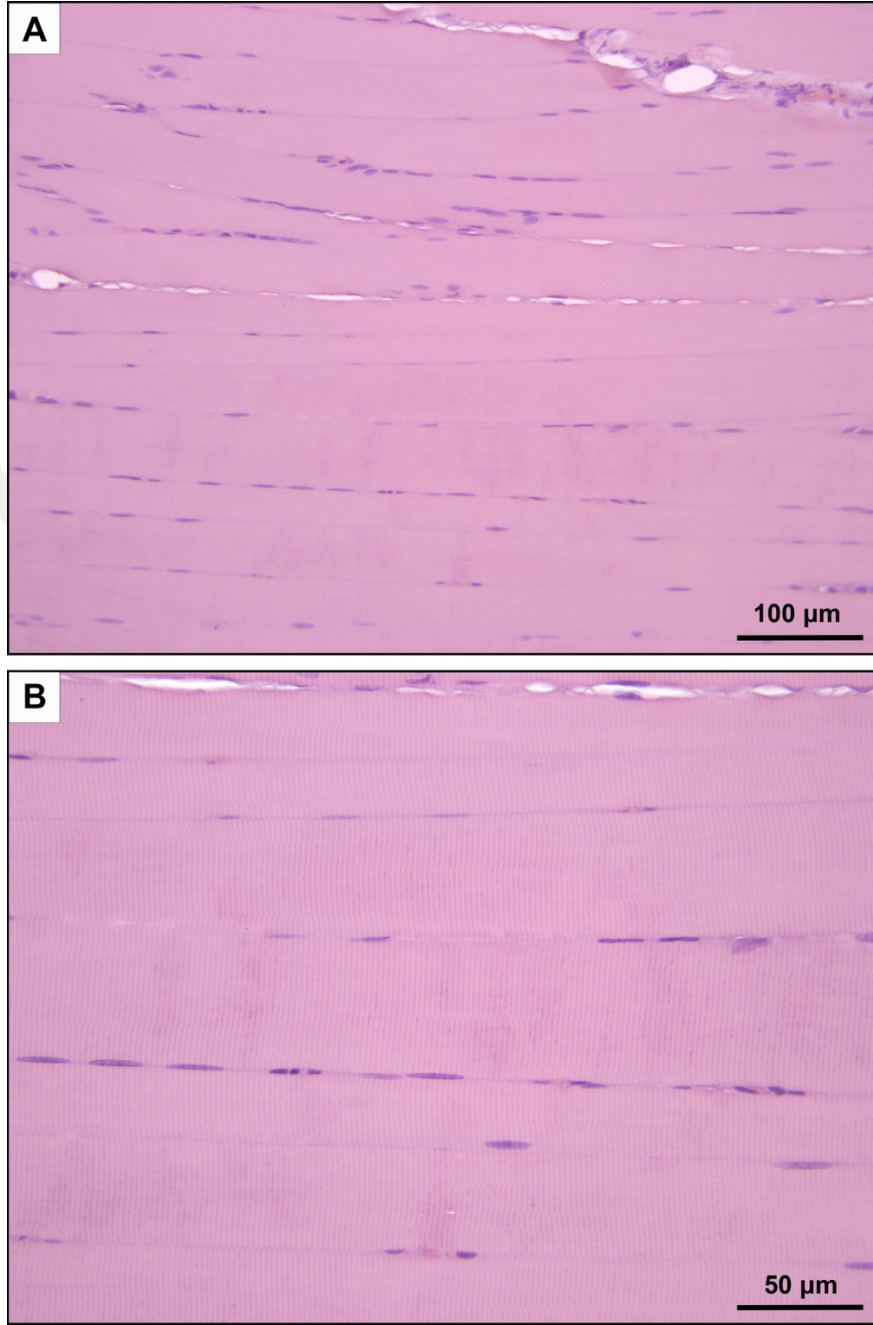
Verilerin analizinde Kruskal-Wallis testi kullanılmıştır.

Anlamlılık düzeyi $p < 0.05$ olarak belirlenmiştir.

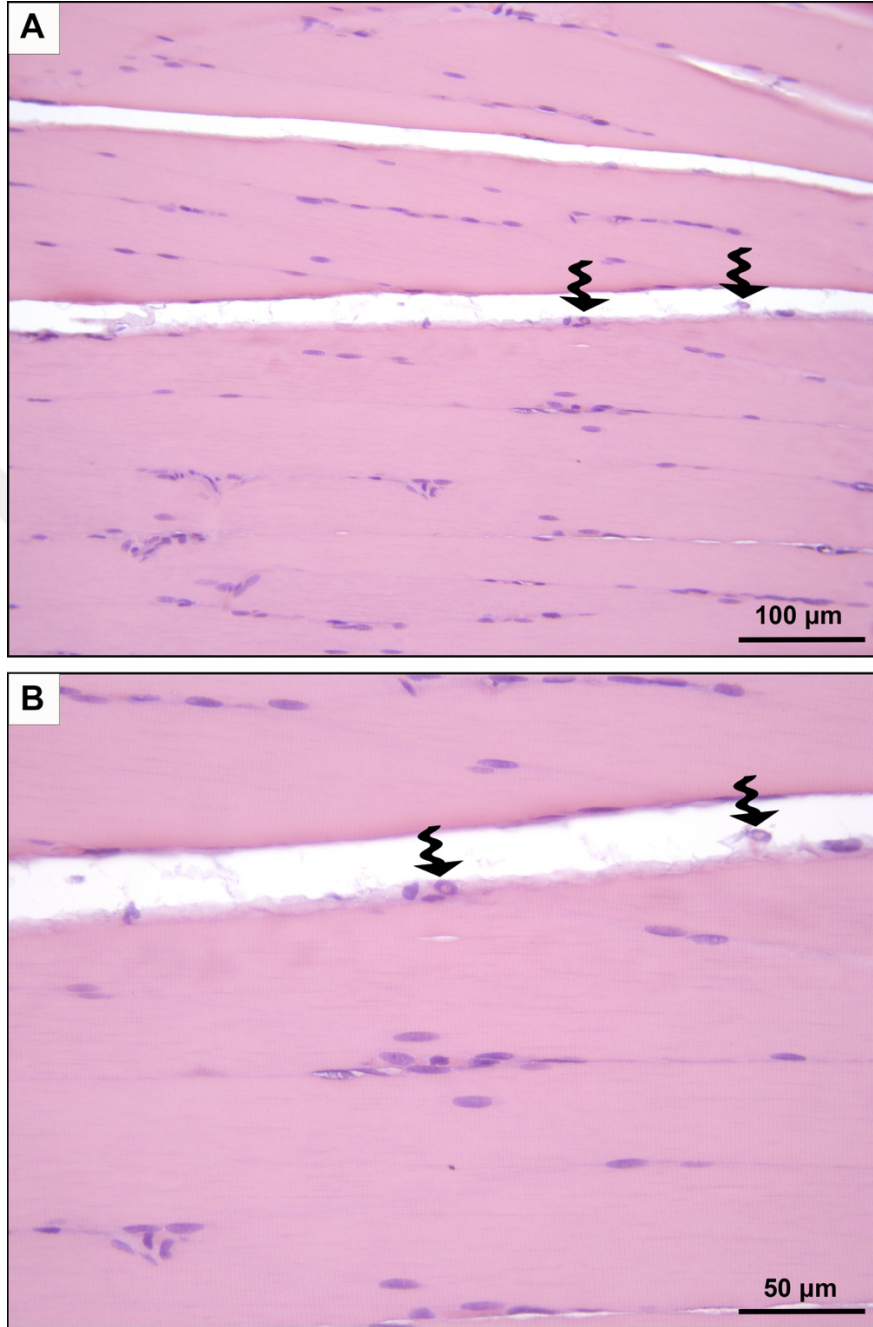
* $p < 0.05$: Grup S ile karşılaştırıldığında anlamlı fark.

** $p < 0.05$: Grup E ile karşılaştırıldığında anlamlı fark.

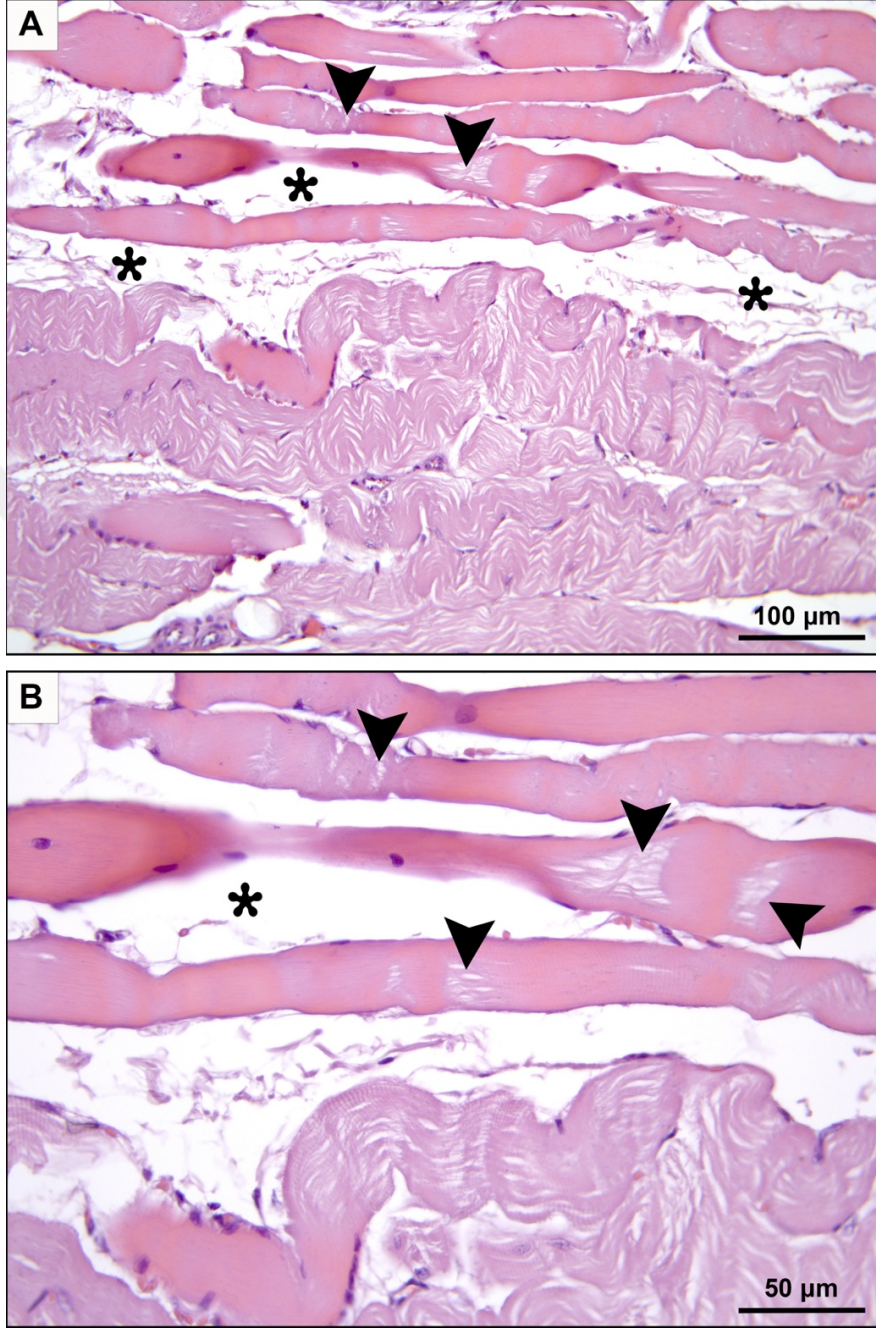
*** $p < 0.05$: Grup İR ile karşılaştırıldığında anlamlı fark.



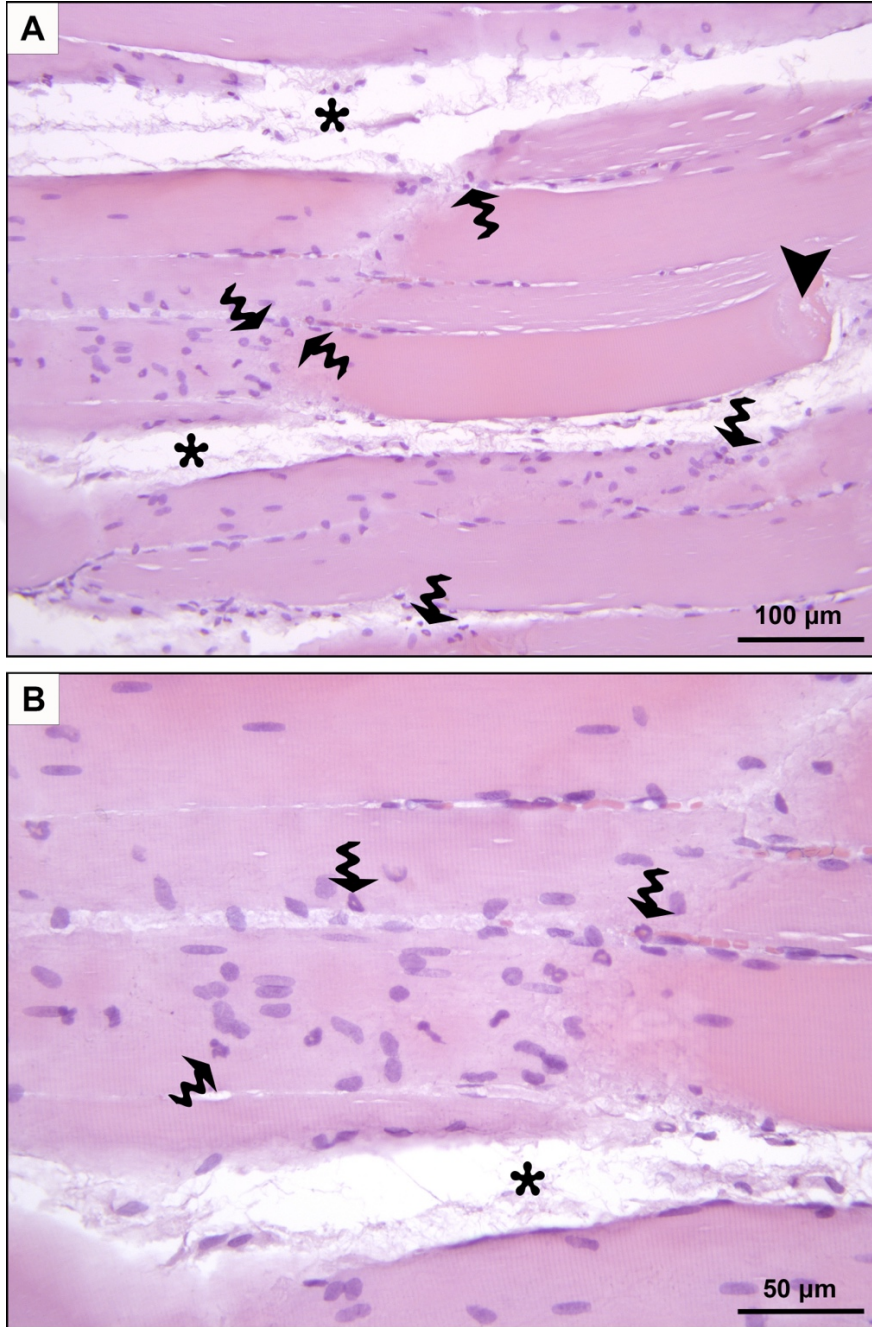
Resim 3. Sham (S) grubuna ait HE boyalı kas kesitlerinin küçük (A) ve büyük büyültme (B) mikrografları. Longitudinal kesit düzleminde enine çizgilenmelerin belirgin olarak izlendiği, periferik yerleşimli nükleuslarıyla karakterize kas liflerinin düzenli fasiküller oluşturduğu görülüyor (A, 200× büyültme; B, 400× büyültme).



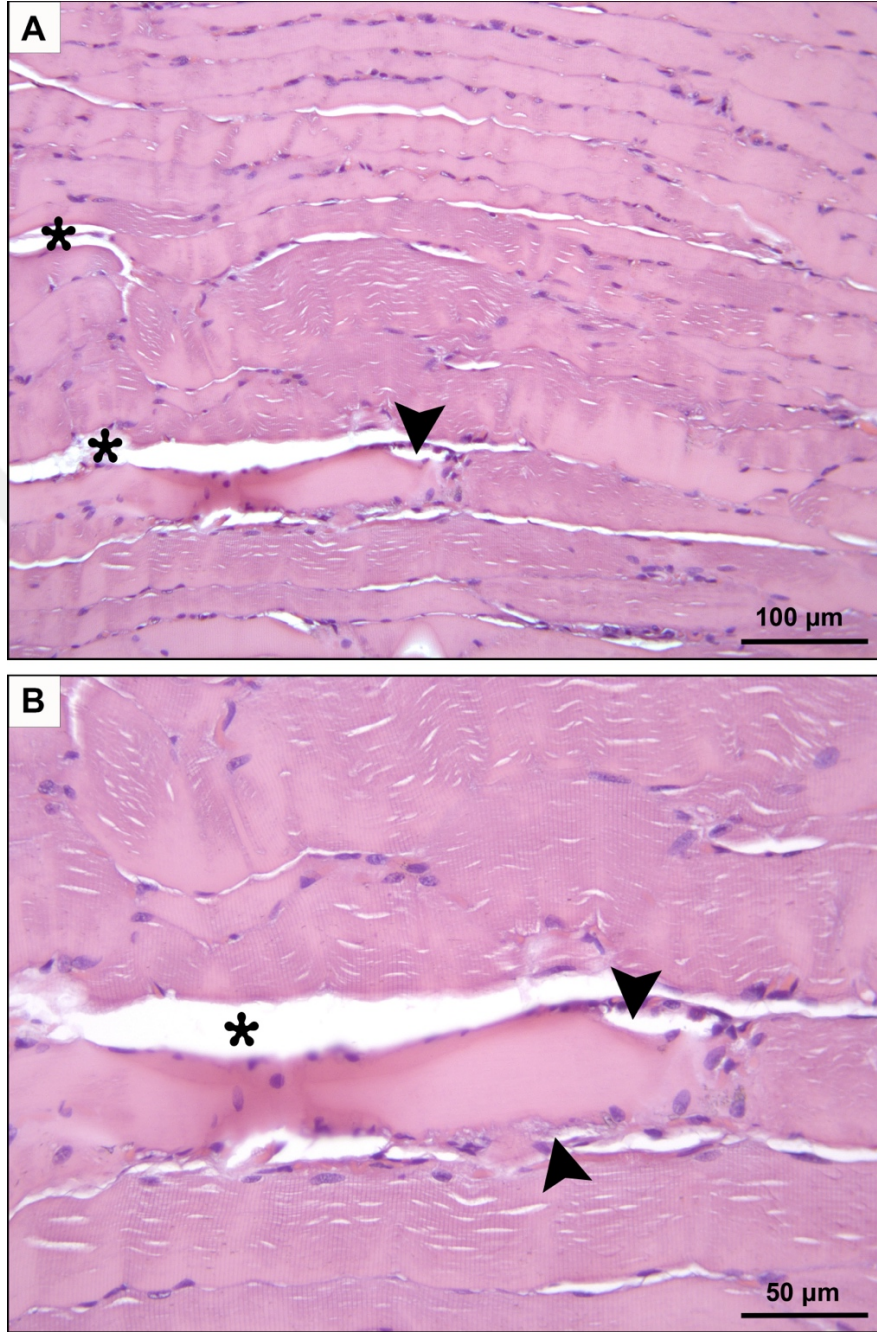
Resim 4. Emodin (E) grubuna ait HE boyalı kas kesitlerinin küçük (A) ve büyük büyültme (B) mikrografları. Enine çizgilenmelerin belirgin olarak izlendiği kas liflerinin, longitudinal düzlemde düzenli fasiküller oluşturduğu görülüyor. İnterstisyel mesafede seyrek nötrofiller (**ondüle oklar**) dikkati çekiyor (A, 200× büyültme; B, 400× büyültme).



Resim 5. İskemi-reperfüzyon (İR) grubuna ait HE boyalı kas kesitlerinin küçük (A) ve büyük büyültme (B) mikrografları. Hücresel ödem nedeniyle genişlemiş ve sarkoplazmik fragmentasyon (**ok başları**) sergileyen kas liflerinde oldukça belirgin olan hasara, şiddetli bir interstisyel ödem (**asteriskler**) de eşlik ediyor (A, 200× büyültme; B, 400× büyültme).



Resim 6. İskemi-reperfüzyon (İR) grubuna ait HE boyalı kas kesitlerinin küçük (A) ve büyük büyültme (B) mikrografları. Şiddetli interstisyel ödem (asteriskler) nedeniyle aralarındaki mesafenin genişlediği kas hücrelerinin hücre ödemi nedeniyle genişlediği ve yer yer vakuolizasyon (ok başı) sergilediği gözleniyor. Ayrıca yoğun bir nötrofil infiltrasyonu (ondüle oklar) dikkati çekiyor(A, 200× büyültme; B, 400× büyültme).



Resim 7. Emodin uygulanan iskemi-reperfüzyon (İR+E) grubuna ait HE boyalı kas kesitlerinin küçük (A) ve büyük büyültme (B) mikrogramları. Sarkoplazmik bütünlüğü bozulan (**ok başları**) ve hücre ödemi nedeniyle genişlemiş, daha hafif düzeyde hasarlı kas hücrelerine daha hafif bir interstisyel ödem (**asteriskler**) eşlik ediyor (A, 200× büyültme; B, 400× büyültme).

5. TARTIŞMA

Periferik arter hastalıklarında iskemi-reperfüzyon hasarı, modern tıbbın önemli klinik ve araştırma alanlarından birini oluşturmaktadır. İskemi, dokuya oksijen ve besin maddelerinin yetersiz ulaşmasıyla ortaya çıkan bir süreçtir ve akut veya kronik nedenlerle gelişebilir. Periferik arter hastalığında uzun süreli hipoperfüzyonun ardından kan akışının yeniden sağlanması, dokuların canlılığını korumak için gerekli olmakla birlikte, paradoksal olarak ciddi biyokimyasal ve hücresel hasar mekanizmalarını tetikler. Reperfüzyon süreci, büyük miktarda ROS'un ani salınımıyla başlar ve inflamatuvar yanıtın hızla aktive olmasıyla birlikte hücresel homeostaz ciddi şekilde bozulur (52). Oksidatif stresin artmasıyla birlikte hücresel membranlar, protein yapıları ve DNA zarar görürken, iyon dengesi de bozulur. Bu süreç, dokuların iskemi sonrası daha fazla hasar görmesine ve hücresel fonksiyonların geri dönüşümsüz şekilde etkilenmesine yol açabilir (58). Oksidatif stres, NO biyoyararlanımını azaltarak vasküler disfonksiyona yol açarken, inflamatuvar hücrelerin dokuya göçü ve proinflamatuvar sitokinlerin aşırı salınımı, bölgesel ve sistemik düzeyde doku hasarını şiddetlendirir. Ayrıca, kalsiyum homeostazındaki bozulmalar ve mitokondriyal disfonksiyon, hücresel enerji krizine neden olarak apoptoz ve nekroz mekanizmalarını tetikler. Bu süreçler, klinik olarak akut ekstremité iskemisi, kompartman sendromu, kas nekrozu ve daha ağır vakalarda SIRS gibi komplikasyonlara yol açabilir (56).

İ/R hasarının hem lokal hem de sistemik etkileri göz önüne alındığında, bu patolojik sürecin önlenmesi ve tedavi edilmesi büyük önem taşımaktadır. Günümüzde, antioksidan tedaviler, inflamasyon düzenleyiciler, mitokondriyi hedef

alan ajanlar ve hücrel koruyucu mekanizmaları modüle eden stratejiler üzerinde yoğunlaşan çeşitli araştırmalar yürütülmektedir. Ancak, İ/R hasarını tamamen önleyebilecek veya tersine çevirebilecek ideal bir tedavi yöntemi henüz geliştirilmemiştir ve bu yönde çalışmalara ihtiyaç vardır.

Emodin, doğal bir antrakınon türevi olup, geniş farmakolojik özellikleri nedeniyle bilim dünyasında ilgi çeken bir bileşiktir. Emodinin çok yönlü farmakolojik özellikleri, onu kanser, inflamatuvar hastalıklar, viral enfeksiyonlar, metabolik sendrom ve nörodejeneratif hastalıklar gibi birçok alanda geniş bir terapötik potansiyele sahip bir bileşik haline getirmektedir (111). Özellikle güçlü antioksidan etkileri nedeniyle, deneysel ve klinik çalışmalarda oksidatif stresin yol açtığı hücrel hasarın önlenmesi amacıyla kullanılmakta olup, vasküler cerrahinin ilerlemesiyle birlikte revaskülarizasyon sonrası gelişen İ/R hasarında potansiyel koruyucu etkileri araştırılmaktadır (110).

Emodin, oksidatif stresle mücadele eden antioksidan savunmayı güçlendirerek, antiinflamatuvar yanıtları düzenleyerek ve hücrel apoptozu inhibe ederek endotel hücrelerini korumakta, Akt aracılı HO-1 upregülasyon yoluyla İ/R hasarının olumsuz etkilerini hafifletmektedir. Ayrıca, RUNX1/miR-142-3p/DRD2 sinyal yolunu baskılayarak NF-κB bağımlı inflamasyonu engellemekte ve inflamatuvar süreçleri azaltarak vasküler bütünlüğü desteklemektedir(111). Bunun yanı sıra, emodin, NLRP3 aracılı piroptoz sürecini baskılayarak doku hasarını sınırlamakta ve reperfüzyon sonrası gelişen hücre ölümünü azaltmaktadır. Akciğer, testis ve miyokard gibi farklı dokularda yapılan çalışmalarda emodinin, inflamatuvar yanıtı düzenleyerek ve oksidatif stresi azaltarak İ/R hasarına karşı etkili bir koruma

sağladığı gösterilmiştir (118). Bu çok yönlü mekanizmalar sayesinde emodin, İ/R hasarının patofizyolojisini hedef alan umut verici bir tedavi seçeneği olarak dikkat çekmektedir. Bu çalışmada, İ/R hasarının kas dokusunda yol açtığı değişiklikler incelenmiş ve emodinin bu sürece olan etkisi araştırılmıştır. Bulgular, iskemi-reperfüzyonun ciddi doku hasarına ve oksidatif stres artışına neden olduğunu gösterirken, emodinin bu etkileri belirli ölçüde hafiflettiğini ortaya koymuştur.

Histopatolojik incelemeler, İ/R grubunda kas liflerinin belirgin şekilde hasarlandığını, disorganizasyon ve dejenerasyon gösterdiğini ortaya koymuştur ($p<0.001$). Bunun yanında, inflamasyon belirteci olarak değerlendirilen nötrofil infiltrasyonu ($p=0.019$) ve interstisyel ödemin de ($p<0.001$) belirgin şekilde arttığı görülmüştür. Buna karşılık, emodin uygulanan İ/R+E grubunda kas liflerindeki yapısal bozuklukların ve inflamasyonun daha hafif olduğu, İ/R grubuna kıyasla istatistiksel olarak anlamlı derecede azaldığı gözlenmiştir. Ancak, emodin tamamen koruyucu bir etki göstermemiş, sadece hasarın şiddetini azaltmıştır.

Biyokimyasal incelemelerde ise lipid peroksidasyonunun göstergesi olan MDA seviyelerinin İ/R grubunda anlamlı şekilde arttığı belirlenmiştir ($p<0.001$). Bu durum, oksidatif stresin yükseldiğini göstermektedir. Emodin uygulamasının MDA seviyelerini düşürdüğü, dolayısıyla lipid peroksidasyonunu azalttığı görülmüştür ($p=0.003$). CAT enzimi aktivitesi de İ/R grubunda düşüş gösterirken ($p=0.004$), emodin uygulamasıyla bir miktar artış gözlenmiştir. Ancak, SOD ve GSH seviyelerinde anlamlı bir değişiklik tespit edilmemiştir.

Emodinin İ/R sürecinde koruyucu etkileri olduğu görülse de, bu etki sınırlıdır. Özellikle histopatolojik bulgular incelendiğinde, emodin uygulanan

grupta kas liflerinin daha düzenli kaldığı, inflamasyonun daha hafif seyrettiği belirlenmiştir. Oksidatif stres açısından ise MDA seviyelerindeki düşüş, emodinin lipid peroksidasyonunu baskıladığını düşündürmektedir. Bununla birlikte, emodin antioksidan savunma mekanizmaları üzerinde doğrudan etkili olmamış, SOD ve GSH seviyelerinde belirgin bir değişim sağlamamıştır.

Literatürde emodinin alt ekstremitte periferik İ/R hasarı üzerine bir çalışma bulunmamasına karşın potansiyel antioksidan etkisine yönelik çeşitli çalışmalar bulunmaktadır. Chen ve arkadaşları tarafından bir çalışmada, emodinin bağırsak İ/R kaynaklı akciğer hasarı üzerindeki etkilerini ve bu etkinin mekanizmalar incelenmiştir. Fareler üzerinde gerçekleştirilen deneylerde, I/R sonrası oksidatif stresin arttığı (MDA yükselmesi, SOD aktivitesinin azalması), inflamasyonun (TNF- α , IL-6, IL-1 β , CXCL1, MPO aktivitesi) ve apoptozun (TUNEL, Bax, Bcl-2, Cleaved Caspase-3) arttığı gözlemlenmiştir. Emodinle ise MDA seviyesinin düştüğü, SOD aktivitesinin arttığı, inflamasyon ve apoptozun azaldığı gösterilmiştir. Bu koruyucu etkinin, PI3K/Akt yolu üzerinden heme oksijenaz-1 (HO-1) ekspresyonunun artırılmasıyla gerçekleştiği belirlenmiştir. Ayrıca, HO-1 veya PI3K/Akt inhibitörleri uygulandığında emodinin iyileştirici etkisinin ortadan kalkması, bu sinyal yolunun kritik rolünü ortaya koymuştur (119). Wang ve arkadaşları, çalışmalarında emodinin böbrek İ/R kaynaklı akut böbrek hasarına (AKI) karşı koruyucu etkilerini ve mekanizmalarını araştırmıştır. Fareler ve insan böbrek tübüler epitel hücreleri üzerinde yapılan deneylerde, emodinin böbrek fonksiyonlarını iyileştirdiği, mitokondri aracılı apoptozu ve oksidatif stresi azalttığı gösterilmiştir. Emodin, mitokondriyal bölünmeyi baskılayarak hücresel enerji

dengeini korumuştur. İ/R sonrası, mitokondriyal füzyon-fisyon dengesinde kritik rol oynayan Dynamin-Related Protein 1 (DRP1) proteininin Ser616 bölgesinde fosforilasyonunun arttığı, ancak emodin tedavisi ile bu fosforilasyonun baskılandığı bulunmuştur. Bu etkinin emodinin, Calcium/Calmodulin-Dependent Protein Kinase II (CAMKII) aktivitesini inhibe etmesiyle gerçekleştiği gösterilmiştir (120). Zhang ve arkadaşları, çalışmalarında emodinin miyokardiyal İ/R hasarı üzerindeki koruyucu etkilerini araştırmıştır. Farelerde yapılan deneylerde, emodinin CK, CK-MB, LDH, TNF- α ve IL-6 seviyelerini düşürerek inflamasyonu baskıladığı ve kardiyomiyosit hasarını azalttığı gösterilmiştir. Moleküler mekanizmanın incelenmesi sonucunda, emodinin RUNX1 transkripsiyon faktörünü baskıladığı ve bunun miR-142-3p ekspresyonunu azalttığı, bu mikroRNA'nın ise, anti-inflamatuar etkileri bilinen dopamin reseptörü D2 (DRD2)'yi negatif regüle ettiği gösterilmiştir. Emodinin, DRD2 ekspresyonunu artırarak NF- κ B aktivasyonunu inhibe ettiği gösterilmiştir (121). He ve arkadaşları, fare testis torsiyon/detorsiyon (TTD) modeli kullanarak emodinin testis İ/R hasarına karşı koruyucu etkilerini ve mekanizmasını incelemiştir. Emodinin, MDA seviyeleri düşürmesi, SOD aktivitesini artırması ve LDH salınımını azaltmasıyla inflamasyonu ve piroptozu baskıladığı, oksidatif stresi azalttığı ve testis dokusunu koruduğu gösterilmiştir. Histolojik analizler, seminifer tübül hasarının hafiflediğini, Western blot ve immünohistokimya analizleri, NLRP3 ve GSDMD seviyelerinin düştüğünü ortaya koymuştur (118). Leung ve arkadaşları, çalışmalarında emodinin İ/R kaynaklı beyin hasarına karşı nöroprotektif etkilerini ve mekanizmalarını araştırmıştır. Rat orta serebral arter oklüzyonu modeli kullanılarak yapılan deneylerde, emodinin GLT-1 seviyelerini artırarak glutamat

toksisitesini azalttığı, ROS üretimini azalttığı, Bcl-2 ekspresyonunu artırdığı ve aktif kaspaz-3 seviyelerini düşürerek oksidatif stresi azalttığı, nöronal apoptozu engellediği ve beyin dokusunu koruduğu gösterilmiştir. Western blot analizlerinde, ERK1/2 sinyal yolunun aktivasyonunun emodinin koruyucu etkisinde kritik rol oynadığı ortaya koyulmuştur (122).

Çalışmamızda, iskelet kası İ/R hasarında emodinin koruyucu etkileri değerlendirildi. Elde edilen bulgular, emodinin oksidatif stres ve inflamasyonu azaltarak kas dokusunda İ/R hasarını hafiflettiğini göstermektedir. Çalışmamız, emodinin lipid peroksidasyonunu baskılayarak MDA seviyelerini azalttığını, ancak SOD ve GSH seviyeleri üzerinde belirgin bir değişiklik oluşturmadığını ortaya koymuştur. Bu durum, emodinin temel etkisini antioksidan savunma sistemlerinin aktivasyonundan ziyade, oksidatif stresin doğrudan inhibisyonu yoluyla gösterdiğini düşündürmektedir.

Mevcut bulgular, emodinin farklı organlardaki İ/R hasarına karşı gösterdiği koruyucu etkilerle tutarlılık göstermektedir. Böbrek ve beyin İ/R hasarı modellerinde yapılan çalışmalarda, emodinin oksidatif stresi azalttığı, inflamatuvar yanıtı baskıladığı ve dokuların yapısal bütünlüğünü koruduğu bildirilmiştir (122, 120). Örneğin, emodinin böbrek İ/R hasarına karşı CAMKII/DRP1 aracılı mitokondriyal bölünmeyi baskılayarak koruyucu etki gösterdiği rapor edilmiştir (120). Benzer şekilde, beyin İ/R modeli üzerinde yapılan bir çalışmada, emodinin ERK-1/2 sinyal yolunu aktive ederek nöronal apoptozu inhibe ettiği ve inflamatuvar yanıtları azalttığı bulunmuştur (122).

Öte yandan, testis torsiyonu modelinde emodinin NLRP3 aracılı piroptozisi baskıladığı gösterilmiştir (118). Çalışmamızda piroptozis veya spesifik sinyal yolları değerlendirilmemiş olsa da, emodinin kas dokusunda da benzer mekanizmalar aracılığıyla koruyucu etki gösterebileceği düşünülmektedir. Nitekim, diğer organlardaki İ/R hasarını önlemede rol oynayan PI3K/Akt, RUNX1/miR-142-3p/DRD2 ve HO-1 sinyal yollarının kas dokusunda da aktif olup olmadığının incelenmesi, emodinin etkisini daha ayrıntılı anlamak açısından önemli bir araştırma alanı olabilir.

Çalışmamızda emodin, tek doz uygulanmış ve kısa süreli etkileri değerlendirilmiştir. Ancak, diğer organ sistemlerinde yapılan çalışmalar, emodinin doz ve süre bağımlı olarak farklı mekanizmalar üzerinden etkili olabileceğini göstermektedir. Örneğin, böbrek İ/R modelinde düşük dozların etkisiz olduğu, ancak daha uzun süreli veya daha yüksek doz uygulamalarının belirgin koruma sağladığı bildirilmiştir (120). Bu nedenle, emodinin iskelet kası İ/R hasarında optimum etkinliği için farklı doz ve uygulama sürelerinin incelenmesi gereklidir.

Sonuç olarak, bu çalışma, emodinin iskelet kası İ/R hasarında oksidatif stres ve inflamasyonu baskılayarak koruyucu bir ajan olarak potansiyel taşıdığını göstermektedir. Ancak, daha kapsamlı analizler yapılarak, emodinin spesifik sinyal yolları üzerindeki etkilerinin belirlenmesi gerekmektedir.

Gelecek çalışmalar için, emodinin farklı dozajlarda ve uzun süreli uygulamalarla etkinliğinin araştırılması büyük önem taşımaktadır. Mevcut bulgular, kısa vadeli etkileri değerlendirmekle sınırlı olup, emodinin zaman içinde doku iyileşmesini ne ölçüde desteklediği ve kas fonksiyonları üzerindeki uzun vadeli

etkileri halen belirsizdir. Bu nedenle, daha uzun süreli takip çalışmaları yapılarak, emodin tedavisinin doku rejenerasyonu, mitokondriyal dinamikler ve hücrel adaptasyon mekanizmaları üzerindeki etkilerinin detaylı olarak incelenmesi gerekmektedir. Bununla birlikte, emodinin iskelet kası dokusunda gösterdiği koruyucu etkilerin hangi hücrel sinyal yolları aracılığıyla gerçekleştiğinin aydınlatılması önemlidir. Ayrıca, emodinin yalnızca kas dokusu üzerindeki etkileri değil, sistemik düzeyde oluşturabileceği yanıtlar ve olası yan etkileri de dikkate alınmalıdır. Farklı organlarda yapılan çalışmalar, emodinin antioksidan ve anti-inflamatuar etkilerinin dokuya özgü mekanizmalarla değişebildiğini göstermektedir. Bu nedenle, emodinin diğer sistemik parametreler üzerindeki olası etkilerini değerlendirmek için daha geniş çaplı deneysel ve klinik araştırmaların yapılması gerekmektedir.

6. SONUÇ

İ/R hasarı, periferik arter hastalığı ve cerrahi revaskülarizasyon işlemleri gibi klinik durumlarda önemli bir komplikasyon olarak ortaya çıkmaktadır. Bu süreç, ROS aşırı üretimi, inflamatuvar yanıtın aktivasyonu ve hücresel hasarın artmasıyla karakterize olmakla birlikte lokal ve sistemik komplikasyonlara yol açarak morbidite ve mortalite oranlarını artırmaktadır. Çalışmamızda, rat iskelet kasında İ/R hasarının patofizyolojisi detaylı şekilde incelenmiş ve emodinin iskelet kası üzerindeki koruyucu etkileri değerlendirilmiştir. Bulgularımız, ROS üretimini azaltarak oksidatif stresi hafıflettiği, inflamatuvar yanıtı düzenleyerek doku bütünlüğünü koruduğu ve apoptotik hücre ölümü süreçlerini inhibe ettiğini ortaya koymaktadır. Deneysel modelimizde elde edilen bulgular, emodinin iskelet kası İ/R hasarında terapötik bir ajan olarak değerlendirilebileceğini düşündürmektedir. Ancak, bu bileşiğin klinik uygulamalarda güvenli ve etkin bir şekilde kullanılabilmesi için daha kapsamlı deneysel ve klinik çalışmalara ihtiyaç duyulmaktadır. Emodinin uzun vadeli etkilerinin, optimal dozajının ve yan etki profilinin daha detaylı şekilde araştırılması, bu bileşiğin klinik kullanım potansiyelini daha iyi anlamamıza katkı sağlayacaktır. Sonuç olarak, emodinin İ/R hasarı üzerine olan etkileri, periferik arter hastalığı ve diğer iskemi ile ilişkili klinik durumlarda yeni tedavi yaklaşımı açısından umut vadedicidir. Bu çalışma, ilerleyen dönemlerde daha geniş kapsamlı çalışmalara rehberlik edebilecek bilimsel bir temel sunmayı amaçlamaktadır.

7. KAYNAKLAR

1. European Stroke Organisation; Tendera M, Aboyans V, Bartelink ML, Baumgartner I, Clément D, Collet JP, et al. ESC Committee for Practice Guidelines. ESC Guidelines on the diagnosis and treatment of peripheral artery diseases: Document covering atherosclerotic disease of extracranial carotid and vertebral, mesenteric, renal, upper and lower extremity arteries: the Task Force on the Diagnosis and Treatment of Peripheral Artery Diseases of the European Society of Cardiology (ESC). Eur Heart J 2011; 32(22): 2851-906.
2. Meijer WT, Grobbee DE, Hunink MG, Hofman A, Hoes AW. Determinants of Peripheral Arterial Disease in the Elderly. Arch Intern Med. 2000 Oct 23;160(19):2934.
3. Joosten MM, Pai JK, Bertoia ML, Rimm EB, Spiegelman D, Mittleman MA, et al. Associations Between Conventional Cardiovascular Risk Factors and Risk of Peripheral Artery Disease in Men. JAMA. 2012 Oct 24;308(16):1660.
4. Aboyans V, Ricco JB, Bartelink MLEL, Björck M, Brodmann M, Cohnert T, et al. 2017 ESC Guidelines on the Diagnosis and Treatment of Peripheral Arterial Diseases, in collaboration with the European Society for Vascular Surgery (ESVS). Eur Heart J. 2018 Mar 1;39(9):763–816.
5. Campia U, Gerhard-Herman M, Piazza G, Goldhaber SZ. Peripheral Artery Disease: Past, Present, and Future. Am J Med. 2019 Oct;132(10):1133–41.

6. Beks PJ, Mackaay AJC, de Neeling JND, de Vries H, Bouter LM, Heine RJ. Peripheral arterial disease in relation to glycaemic level in an elderly Caucasian population: the Hoorn Study. *Diabetologia*. 1995 Jan;38(1):86–96.
7. Tzoulaki I, Murray GD, Lee AJ, Rumley A, Lowe GDO, Fowkes FGR. Inflammatory, haemostatic, and rheological markers for incident peripheral arterial disease: Edinburgh Artery Study. *Eur Heart J*. 2007 Jan 11;28(3):354–62.
8. Ridker P, Stampfer M, Rifai N. Novel Risk Factors for Systemic Atherosclerosis. *JAMA: The Journal of the American Medical Association*. 2001;285:2481–5.
9. Wassel CL, Loomba R, Ix JH, Allison MA, Denenberg JO, Criqui MH. Family History of Peripheral Artery Disease Is Associated With Prevalence and Severity of Peripheral Artery Disease. *J Am Coll Cardiol*. 2011 Sep;58(13):1386–92.
10. Valentine RJ, Guerra R, Stephan P, Scoggins E, Clagett GP, Cohen J. Family history is a major determinant of subclinical peripheral arterial disease in young adults. *J Vasc Surg*. 2004 Feb;39(2):351–6.
11. Vural T, Tan MN, Kartal M, Güldal AD. Detecting Peripheral Arterial Disease in Primary Care: A Population Based Study. *Korean J Fam Med*. 2020 Jan 20;41(1):61–7.
12. Bozkurt AK, Tasci I, Tabak O, Gumus M, Kaplan Y. Peripheral artery disease assessed by ankle-brachial index in patients with established cardiovascular

disease or at least one risk factor for atherothrombosis--CAREFUL study: a national, multi-center, cross-sectional observational study. *BMC Cardiovasc Disord.* 2011 Jan 19;11:4.

13. Simon F, Oberhuber A, Floros N, Düppers P, Schelzig H, Duran M. Pathophysiology of chronic limb ischemia. *Gefäßschirurgie.* 2018 Jun 10;23(S1):13–8.
14. Rafieian-Kopaei M, Setorki M, Douudi M, Baradaran A, Nasri H. Atherosclerosis: process, indicators, risk factors and new hopes. *Int J Prev Med.* 2014 Aug;5(8):927–46.
15. Lusis AJ. Atherosclerosis. *Nature.* 2000 Sep;407(6801):233–41.
16. Olin JW, Sealove BA. Peripheral Artery Disease: Current Insight Into the Disease and Its Diagnosis and Management. *Mayo Clin Proc.* 2010 Jul;85(7):678–92.
17. McGinagle KL. Peripheral Vascular Disease. Primary Care: Clinics in Office Practice. 2024 Mar;51(1):83–93.
18. Köksal C, Türkkolu Ş. Arteriyel ve Venöz Sistemin Muayenesi. In: Polat A, Akay HT, Köksal C, Bozkurt AK, editors. *Damar.* İstanbul: Bayçınar Tıbbi Yayıncılık; 2019. p. 16–32.
19. Sartipy F, Sigvant B, Lundin F, Wahlberg E. Ten Year Mortality in Different Peripheral Arterial Disease Stages: A Population Based Observational Study on Outcome. *European Journal of Vascular and Endovascular Surgery.* 2018 Apr;55(4):529–36.

20. Clark CE, Taylor RS, Shore AC, Ukoumunne OC, Campbell JL. Association of a difference in systolic blood pressure between arms with vascular disease and mortality: a systematic review and meta-analysis. *Lancet*. 2012 Mar 10;379(9819):905–14.
21. Guirguis-Blake JM, Evans C V, Redmond N, Lin JS. Screening for Peripheral Artery Disease Using the Ankle-Brachial Index: Updated Evidence Report and Systematic Review for the US Preventive Services Task Force. *JAMA*. 2018 Jul 10;320(2):184–96.
22. Olin JW, Kaufman JA, Bluemke DA, Bonow RO, Gerhard MD, Jaff MR, et al. Atherosclerotic Vascular Disease Conference. *Circulation*. 2004 Jun;109(21):2626–33.
23. Heijnenbroek-Kal MH, Kock MCJM, Hunink MGM. Lower Extremity Arterial Disease: Multidetector CT Angiography—Meta-Analysis. *Radiology*. 2007 Nov;245(2):433–9.
24. 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.
25. Natarajan B, Patel P, Mukherjee A. Acute Lower Limb Ischemia—Etiology, Pathology, and Management. *International Journal of Angiology*. 2020 Sep 27;29(03):168–74.
26. Hess CN, Huang Z, Patel MR, Baumgartner I, Berger JS, Blomster JI, et al. Acute Limb Ischemia in Peripheral Artery Disease. *Circulation*. 2019 Aug 13;140(7):556–65.

27. Hardman R, Jazaeri O, Yi J, Smith M, Gupta R. Overview of Classification Systems in Peripheral Artery Disease. *Semin Intervent Radiol*. 2014 Nov 14;31(04):378–88.
28. Rudofker EW, Hogan SE, Armstrong EJ. Preventing Major Amputations in Patients with Critical Limb Ischemia. *Curr Cardiol Rep*. 2018 Sep 10;20(9):74.
29. Conte MS, Bradbury AW, Kolh P, White J V., Dick F, Fitridge R, et al. Global Vascular Guidelines on the Management of Chronic Limb-Threatening Ischemia. *European Journal of Vascular and Endovascular Surgery*. 2019 Jul;58(1):S1-S109.e33.
30. Zor MH. Tibio-peroneal (infrapopliteal) Damar Hastalıkları. In: Polat A, Akay HT, Köksal C, Bozkurt AK, editörler. *Damar*. Konu 18. İstanbul: Bayçınar Tıbbi Yayıncılık; 2019. p. 245-60.
31. Mills JL, Conte MS, Armstrong DG, Pomposelli FB, Schanzer A, Sidawy AN, et al. 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):220-234.e2.
32. Gerhard-Herman MD, Gornik HL, Barrett C, Barshes NR, Corriere MA, Drachman DE, 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 Mar 21;135(12).

33. Mohammedi K, Woodward M, Hirakawa Y, Zoungas S, Colagiuri S, Hamet P, et al. Presentations of major peripheral arterial disease and risk of major outcomes in patients with type 2 diabetes: results from the ADVANCE-ON study. *Cardiovasc Diabetol*. 2016 Dec 2;15(1):129.
34. Khan SZ, Montross B, Rivero M, Cherr GS, Harris LM, Dryjski ML, et al. Angiotensin Converting Enzyme Inhibitors and Angiotensin II Receptor Blockers (ACEI/ARB) are Associated with Improved Limb Salvage after Infrapopliteal Interventions for Critical Limb Ischemia. *Ann Vasc Surg*. 2020 Feb;63:275–86.
35. Schanzer A, Hevelone N, Owens CD, Beckman JA, Belkin M, Conte MS. Statins are independently associated with reduced mortality in patients undergoing infrainguinal bypass graft surgery for critical limb ischemia. *J Vasc Surg*. 2008 Apr;47(4):774-781.e1.
36. Kokkinidis DG, Arfaras-Melainis A, Giannopoulos S, Katsaros I, Jawaid O, Jonnalagadda AK, et al. Statin therapy for reduction of cardiovascular and limb-related events in critical limb ischemia: A systematic review and meta-analysis. *Vascular Medicine*. 2020 Apr 22;25(2):106–17.
37. Lane R, Harwood A, Watson L, Leng GC. Exercise for intermittent claudication. *Cochrane Database of Systematic Reviews*. 2017 Dec 26;2017(12).
38. Murphy TP, Cutlip DE, Regensteiner JG, Mohler ER, Cohen DJ, Reynolds MR, et al. Supervised Exercise, Stent Revascularization, or Medical Therapy

- for Claudication Due to Aortoiliac Peripheral Artery Disease. *J Am Coll Cardiol*. 2015 Mar;65(10):999–1009.
39. A randomised, blinded, trial of clopidogrel versus aspirin in patients at risk of ischaemic events (CAPRIE). *The Lancet*. 1996 Nov;348(9038):1329–39.
40. Hiatt WR, Fowkes FGR, Heizer G, Berger JS, Baumgartner I, Held P, et al. Ticagrelor versus Clopidogrel in Symptomatic Peripheral Artery Disease. *New England Journal of Medicine*. 2017 Jan 5;376(1):32–40.
41. Anand SS, Caron F, Eikelboom JW, Bosch J, Dyal L, Aboyans V, et al. Major Adverse Limb Events and Mortality in Patients With Peripheral Artery Disease. *J Am Coll Cardiol*. 2018 May;71(20):2306–15.
42. Bonaca MP, Bauersachs RM, Anand SS, Debus ES, Nehler MR, Patel MR, et al. Rivaroxaban in Peripheral Artery Disease after Revascularization. *New England Journal of Medicine*. 2020 May 21;382(21):1994–2004.
43. Gerhard-Herman MD, Gornik HL, Barrett C, Barshes NR, Corriere MA, Drachman DE, et al. 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. *Circulation*. 2017 Mar 21;135(12).
44. Abaraogu UO, Abaraogu OD, Dall PM, Tew G, Stuart W, Brittenden J, et al. Exercise therapy in routine management of peripheral arterial disease and intermittent claudication: a scoping review. *Ther Adv Cardiovasc Dis*. 2020 Jan 27;14.

45. Bypass versus angioplasty in severe ischaemia of the leg (BASIL): multicentre, randomised controlled trial. *The Lancet*. 2005 Dec;366(9501):1925–34.
46. Siracuse JJ, Menard MT, Eslami MH, Kalish JA, Robinson WP, Eberhardt RT, et al. Comparison of open and endovascular treatment of patients with critical limb ischemia in the Vascular Quality Initiative. *J Vasc Surg*. 2016 Apr;63(4):958-965.e1.
47. Farber A, Menard MT, Conte MS, Kaufman JA, Powell RJ, Choudhry NK, et al. Surgery or Endovascular Therapy for Chronic Limb-Threatening Ischemia. *New England Journal of Medicine*. 2022 Dec 22;387(25):2305–16.
48. Nehler MR, Brass EP, Anthony R, Dormandy J, Jiao J, McNamara TO, et al. Adjunctive parenteral therapy with lipo-ecraprost, a prostaglandin E1 analog, in patients with critical limb ischemia undergoing distal revascularization does not improve 6-month outcomes. *J Vasc Surg*. 2007 May;45(5):953–61.
49. Goodney PP, Beck AW, Nagle J, Welch HG, Zwolak RM. National trends in lower extremity bypass surgery, endovascular interventions, and major amputations. *J Vasc Surg*. 2009 Jul;50(1):54–60.
50. Khan S, Hawkins BM. Acute Limb Ischemia Interventions. *Interv Cardiol Clin*. 2020 Apr;9(2):221–8.

51. Eliason JL, Wakefield TW. Metabolic Consequences of Acute Limb Ischemia and Their Clinical Implications. *Semin Vasc Surg.* 2009 Mar;22(1):29–33.
52. Yu H, Chi D, Wang S, Liu B. Effect of early goal-directed therapy on mortality in patients with severe sepsis or septic shock: a meta-analysis of randomised controlled trials. *BMJ Open.* 2016 Mar 1;6(3):e008330.
53. Wu MY, Li CJ, Hou MF, Chu PY. New Insights into the Role of Inflammation in the Pathogenesis of Atherosclerosis. *Int J Mol Sci.* 2017 Sep 22;18(10):2034.
54. Allen D, Xiao X. Activity Of The Na⁺/H⁺ Exchanger Contributes To Cardiac Damage Following Ischaemia And Reperfusion. *Clin Exp Pharmacol Physiol.* 2000 Sep 14;27(9):727–33.
55. Ornellas FM, Ornellas DS, Martini SV, Castiglione RC, Ventura GM, Rocco PR, et al. Bone Marrow–Derived Mononuclear Cell Therapy Accelerates Renal Ischemia-Reperfusion Injury Recovery by Modulating Inflammatory, Antioxidant and Apoptotic Related Molecules. *Cellular Physiology and Biochemistry.* 2017;41(5):1736–52.
56. Cowled P, Fitridge R. Pathophysiology of Reperfusion Injury. 2011.
57. Wang W, Kang PM. Oxidative Stress and Antioxidant Treatments in Cardiovascular Diseases. *Antioxidants (Basel).* 2020 Dec 17;9(12).
58. Granger DN, Kvietys PR. Reperfusion injury and reactive oxygen species: The evolution of a concept. *Redox Biol.* 2015 Dec;6:524–51.

59. Soares ROS, Losada DM, Jordani MC, Évora P, Castro-e-Silva O. Ischemia/Reperfusion Injury Revisited: An Overview of the Latest Pharmacological Strategies. *Int J Mol Sci*. 2019 Oct 11;20(20):5034.
60. Korsmo HW, Ekperikpe US, Daehn IS. Emerging Roles of Xanthine Oxidoreductase in Chronic Kidney Disease. *Antioxidants (Basel)*. 2024 Jun 12;13(6).
61. Kalogeris T, Baines CP, Krenz M, Korthuis RJ. Cell Biology of Ischemia/Reperfusion Injury. In 2012. p. 229–317.
62. Bedard K, Krause KH. The NOX Family of ROS-Generating NADPH Oxidases: Physiology and Pathophysiology. *Physiol Rev*. 2007 Jan;87(1):245–313.
63. Ma MW, Wang J, Zhang Q, Wang R, Dhandapani KM, Vadlamudi RK, et al. NADPH oxidase in brain injury and neurodegenerative disorders. *Mol Neurodegener*. 2017 Dec 17;12(1):7.
64. Simone S, Rascio F, Castellano G, Divella C, Chieti A, Ditunno P, et al. Complement-dependent NADPH oxidase enzyme activation in renal ischemia/reperfusion injury. *Free Radic Biol Med*. 2014 Sep;74:263–73.
65. Phillips L, Toledo AH, Lopez-Neblina F, Anaya-Prado R, Toledo-Pereyra LH. Nitric Oxide Mechanism of Protection in Ischemia and Reperfusion Injury. *Journal of Investigative Surgery*. 2009 Jan 9;22(1):46–55.
66. 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.
67. Contreras L, Drago I, Zampese E, Pozzan T. Mitochondria: the calcium connection. *Biochim Biophys Acta*. 2010;1797(6-7):607-18.
 68. Gottlieb RA. Cell Death Pathways in Acute Ischemia/Reperfusion Injury. *J Cardiovasc Pharmacol Ther*. 2011 Sep 7;16(3-4):233-8.
 69. Lopez-Neblina F, Toledo AH, Toledo-Pereyra LH. Molecular Biology of Apoptosis in Ischemia and Reperfusion. *Journal of Investigative Surgery*. 2005 Jan 9;18(6):335-50.
 70. Zhu J, Yao K, Wang Q, Guo J, Shi H, Ma L, et al. Ischemic Postconditioning-Regulated miR-499 Protects the Rat Heart Against Ischemia/Reperfusion Injury by Inhibiting Apoptosis through PDCD4. *Cellular Physiology and Biochemistry*. 2016;39(6):2364-80.
 71. Kalogeris T, Baines CP, Krenz M, Korthuis RJ. Ischemia/Reperfusion. In: *Comprehensive Physiology*. Wiley; 2016. p. 113-70.
 72. Liu H, Jing X, Dong A, Bai B, Wang H. Overexpression of TIMP3 Protects Against Cardiac Ischemia/Reperfusion Injury by Inhibiting Myocardial Apoptosis Through ROS/Mapks Pathway. *Cellular Physiology and Biochemistry*. 2017;44(3):1011-23.
 73. Chen X, Zhang X, Xue L, Hao C, Liao W, Wan Q. Treatment with Enriched Environment Reduces Neuronal Apoptosis in the Periinfarct Cortex after Cerebral Ischemia/Reperfusion Injury. *Cellular Physiology and Biochemistry*. 2017;41(4):1445-56.

74. DILISA F, BERNARDI P. Mitochondria and ischemia–reperfusion injury of the heart: Fixing a hole. *Cardiovasc Res.* 2006 May 1;70(2):191–9.
75. Karbowski M, Lee YJ, Gaume B, Jeong SY, Frank S, Nechushtan A, et al. Spatial and temporal association of Bax with mitochondrial fission sites, Drp1, and Mfn2 during apoptosis. *J Cell Biol.* 2002 Dec 23;159(6):931–8.
76. Newton K, Dugger DL, Maltzman A, Greve JM, Hedehus M, Martin-McNulty B, et al. RIPK3 deficiency or catalytically inactive RIPK1 provides greater benefit than MLKL deficiency in mouse models of inflammation and tissue injury. *Cell Death Differ.* 2016 Sep 13;23(9):1565–76.
77. Slegtenhorst BR, Dor FJMF, Rodriguez H, Voskuil FJ, Tullius SG. Ischemia/Reperfusion Injury and its Consequences on Immunity and Inflammation. *Curr Transplant Rep.* 2014 Sep 31;1(3):147–54.
78. Zuidema MY, Zhang C. Ischemia/reperfusion injury: The role of immune cells. *World J Cardiol.* 2010 Oct 26;2(10):325–32.
79. 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.
80. Menger MD, Rücker M, Vollmar B. Capillary dysfunction in striated muscle ischemia/reperfusion: on the mechanisms of capillary “no-reflow”. *Shock.* 1997 Jul;8(1):2–7.
81. Niccoli G, Marino M, Spaziani C, Crea F. Prevention and treatment of no-reflow. *Acute Cardiac Care.* 2010 Sep 10;12(3):81–91.
82. Zhao ZQ. Postconditioning in Reperfusion Injury: A Status Report. *Cardiovasc Drugs Ther.* 2010 Jun 9;24(3):265–79.

83. Kaur S, Jaggi AS, Singh N. Molecular aspects of ischaemic postconditioning. *Fundam Clin Pharmacol*. 2009 Oct 4;23(5):521–36.
84. Laubach VE, Sharma AK. Mechanisms of lung ischemia-reperfusion injury. *Curr Opin Organ Transplant*. 2016 Jun;21(3):246–52.
85. Huang R, Zhang C, Xiang Z, Lin T, Ling J, Hu H. Role of mitochondria in renal ischemia–reperfusion injury. *FEBS J*. 2024 Dec 3;291(24):5365–78.
86. Jiménez-Castro MB, Cornide-Petronio ME, Gracia-Sancho J, Peralta C. Inflammasome-Mediated Inflammation in Liver Ischemia-Reperfusion Injury. *Cells*. 2019 Sep 23;8(10):1131.
87. Al-Salam S, Hashmi S. Myocardial Ischemia Reperfusion Injury: Apoptotic, Inflammatory and Oxidative Stress Role of Galectin-3. *Cellular Physiology and Biochemistry*. 2018;50(3):1123–39.
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.
89. Dubois-Deruy E, Peugnet V, Turkieh A, Pinet F. Oxidative Stress in Cardiovascular Diseases. *Antioxidants (Basel)*. 2020 Sep 14;9(9).
90. Wang J bo, Zhao H ping, Zhao Y ling, Jin C, Liu D jian, Kong W jun, et al. Hepatotoxicity or Hepatoprotection? Pattern Recognition for the Paradoxical Effect of the Chinese Herb *Rheum palmatum* L. in Treating Rat Liver Injury. *PLoS One*. 2011 Sep 6;6(9):e24498.

91. Wang M, Zhao R, Wang W, Mao X, Yu J. Lipid regulation effects of *Polygoni Multiflori Radix*, its processed products and its major substances on steatosis human liver cell line L02. *J Ethnopharmacol*. 2012 Jan;139(1):287–93.
92. Naqvi S, Ullah MF, Hadi SM. DNA degradation by aqueous extract of *Aloe vera* in the presence of copper ions. *Indian J Biochem Biophys*. 2010 Jun;47(3):161–5.
93. Shrimali D, Shanmugam MK, Kumar AP, Zhang J, Tan BKH, Ahn KS, et al. Targeted abrogation of diverse signal transduction cascades by emodin for the treatment of inflammatory disorders and cancer. *Cancer Lett*. 2013 Dec;341(2):139–49.
94. Matsuda Y, Yokohira M, Suzuki S, Hosokawa K, Yamakawa K, Zeng Y, et al. One-year chronic toxicity study of *Aloe arborescens* Miller var. *natalensis* Berger in Wistar Hannover rats. A pilot study. *Food and Chemical Toxicology*. 2008 Feb;46(2):733–9.
95. Srinivas G, Babykutty S, Sathiadevan PP, Srinivas P. Molecular mechanism of emodin action: Transition from laxative ingredient to an antitumor agent. *Med Res Rev*. 2007 Sep 3;27(5):591–608.
96. Hsu SC, Chung JG. Anticancer potential of emodin. *Biomedicine (Taipei)*. 2012 Sep;2(3):108–16.
97. Shraibom N. Cardiac glycoside analogs in combination with emodin for cancer therapy. United States patent US 8,541,382. 2013 Sep 24.

98. HO T, WU S, CHEN J, LI C, HSIANG C. Emodin blocks the SARS coronavirus spike protein and angiotensin-converting enzyme 2 interaction. *Antiviral Res.* 2007 May;74(2):92–101.
99. Schwarz S, Wang K, Yu W, Sun B, Schwarz W. Emodin inhibits current through SARS-associated coronavirus 3a protein. *Antiviral Res.* 2011 Apr;90(1):64–9.
100. Lee NH, Lee SM, Song DH, Yang JY, Lee HS. Antimicrobial Effect of Emodin Isolated from *Cassia tora* Linn. Seeds against Food-Borne Bacteria. *J Appl Biol Chem.* 2013 Sep 30;56(3):187–9.
101. HATANO T, UEBAYASHI H, ITO H, SHIOTA S, TSUCHIYA T, YOSHIDA T. Phenolic Constituents of Cassia Seeds and Antibacterial Effect of Some Naphthalenes and Anthraquinones on Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus*. *Chem Pharm Bull (Tokyo).* 1999;47(8):1121–7.
102. Xue J, Ding W, Liu Y. Anti-diabetic effects of emodin involved in the activation of PPAR γ on high-fat diet-fed and low dose of streptozotocin-induced diabetic mice. *Fitoterapia.* 2010 Apr;81(3):173–7.
103. Huei-Chen H, Chai-Rong L, Pei-Dawn Lee Chao, Ching-Chow C, Shu-Hsun C. Vasorelaxant effect of emodin, an anthraquinone from a Chinese herb. *Eur J Pharmacol.* 1991 Dec;205(3):289–94.
104. Sun Y ping, Liu J ping. Blockade of Emodin on Amyloid- β 25–35-Induced Neurotoxicity in A β PP/PS1 Mice and PC12 Cells through Activation of the Class III Phosphatidylinositol 3-Kinase/Beclin-1/B-Cell Lymphoma 2 Pathway. *Planta Med.* 2015 Jan 15;81(02):108–15.

105. Li Z, Xia X, Zhang S, Zhang A, Bo W, Zhou R. Up-regulation of Toll-like receptor 4 was suppressed by emodin and baicalin in the setting of acute pancreatitis. *Biomedicine & Pharmacotherapy*. 2009 Feb 1;63(2):120–8.
106. Hsu SC, Chung JG. Anticancer potential of emodin. *Biomedicine (Taipei)*. 2012 Sep 1;2(3):108–16.
107. He KX, Ning JZ, Li W, Cheng F. Emodin alleviates testicular ischemia-reperfusion injury through the inhibition of NLRP3-mediated pyroptosis. *Tissue Cell*. 2023 Jun;82:102069.
108. Lin SP, Chu PM, Tsai SY, Wu MH, Hou YC. Pharmacokinetics and tissue distribution of resveratrol, emodin and their metabolites after intake of *Polygonum cuspidatum* in rats. *J Ethnopharmacol*. 2012 Dec;144(3):671–6.
109. Cui Y ting, Liu B, Xie J, Xu P, Habte-Tsion HM, Zhang Y yuan. The effect of emodin on cytotoxicity, apoptosis and antioxidant capacity in the hepatic cells of grass carp (*Ctenopharyngodon idellus*). *Fish Shellfish Immunol*. 2014 May;38(1):74–9.
110. Gao J, Wang F, Wang W, Su Z, Guo C, Cao S. Emodin Suppresses Hyperglycemia-Induced Proliferation and Fibronectin Expression in Mesangial Cells via Inhibiting cFLIP. *PLoS One*. 2014 Apr 1;9(4):e93588.
111. Semwal RB, Semwal DK, Combrinck S, Viljoen A. Emodin - A natural anthraquinone derivative with diverse pharmacological activities. *Phytochemistry*. 2021 Oct;190:112854.

112. Casini AF, Ferrali M, Pompella A, Maellaro E, Comporti M. Lipid peroxidation and cellular damage in extrahepatic tissues of bromobenzene-intoxicated mice. *Am J Pathol.* 1986 Jun;123(3):520–31.
113. Aykaç G, Uysal M, Yalçın AS, Koçak-Toker N, Sivas A, Oz H. The effect of chronic ethanol ingestion on hepatic lipid peroxide, glutathione, glutathione peroxidase and glutathione transferase in rats. *Toxicology.* 1985 Jul;36(1):71–6.
114. Sun Y, Oberley LW, Li Y. A simple method for clinical assay of superoxide dismutase. *Clin Chem.* 1988 Mar;34(3):497–500.
115. Aebi H. Catalase in vitro. *Methods Enzymol.* 1984;105:121–6.
116. Zhang S, Shaw-Boden J, Banz Y, Bongoni AK, Taddeo A, Spirig R, et al. Effects of C1 inhibitor on endothelial cell activation in a rat hind limb ischemia-reperfusion injury model. *J Vasc Surg.* 2018 Dec;68(6):209S-221S.e2.
117. Shih Y, Shih J, Pai M, Hou Y, Yeh C, Yeh S. Glutamine Administration After Sublethal Lower Limb Ischemia Reduces Inflammatory Reaction and Offers Organ Protection in Ischemia/Reperfusion Injury. *Journal of Parenteral and Enteral Nutrition.* 2016 Nov 9;40(8):1122–30.
118. He KX, Ning JZ, Li W, Cheng F. Emodin alleviates testicular ischemia-reperfusion injury through the inhibition of NLRP3-mediated pyroptosis. *Tissue Cell.* 2023 Jun;82:102069.

119. Chen M, Ji T, Liu YY, Liu WL, Yan XT, Jiang HX, et al. Emodin alleviates intestinal ischemia/reperfusion-induced lung injury by upregulating HO-1 expression via PI3K/AkT pathway. *Surgery*. 2024 Aug;176(2):499–510.
120. Wang Y, Liu Q, Cai J, Wu P, Wang D, Shi Y, et al. Emodin prevents renal ischemia-reperfusion injury via suppression of CAMKII/DRP1-mediated mitochondrial fission. *Eur J Pharmacol*. 2022 Feb 5;916:174603.
121. Zhang X, Qin Q, Lv X, Wang Y, Luo F, Xue L. Natural emodin reduces myocardial ischemia/reperfusion injury by modulating the RUNX1/miR-142-3p/DRD2 pathway and attenuating inflammation. *Exp Ther Med*. 2022 Nov 7;24(6):745.
122. Leung SW, Lai JH, Wu JCC, Tsai YR, Chen YH, Kang SJ, et al. Neuroprotective Effects of Emodin against Ischemia/Reperfusion Injury through Activating ERK-1/2 Signaling Pathway. *Int J Mol Sci*. 2020 Apr 21;21(8):2899.

8. ÖZET

Arka plan: Emodin adlı antrakinon türevinin antioksidan ve antiinflamatuvar özellikle daha önceki çalışmalarda gösterilmiştir. Bu çalışmada, emodinin iskelet kasında iskemi-reperfüzyon hasarı üzerindeki antioksidan etkileri değerlendirilmiştir.

Gereç ve Yöntem: Deneysel model olarak Wistar albino cinsi erkek ratlar kullanılmış ve hayvanlar dört gruba ayrılmıştır: yalnızca laparotomi uygulanan kontrol grubu (SHAM), alt ekstremite iskemi-reperfüzyon modeli oluşturulan grup (IR), yalnızca emodin uygulanan grup (E) ve hem iskemi-reperfüzyon hasarı oluşturulup hem de emodin uygulanan grup (IR+E). Emodin, 20 mg/kg dozunda intraperitoneal olarak uygulanmıştır. Yöntem açısından, deneysel prosedürde abdominal aorta üzerine klemp yerleştirilerek 45 dakika süreyle iskemi indüklenmiş, ardından 2 saatlik reperfüzyon süreci başlatılmıştır.

Bulgular: Çalışma kapsamında biyokimyasal, histopatolojik ve oksidatif stres belirteçleri incelenmiş, kas dokularında MDA, CAT, SOD ve GSH seviyeleri ölçülmüştür. Ayrıca doku örnekleri histopatolojik olarak hematoksilen-eozin ve Masson trikrom boyama yöntemleriyle incelenmiştir. Sonuçlar, iskemi-reperfüzyon hasarının kas dokusunda belirgin oksidatif stres ve inflamasyona yol açtığını göstermektedir. IR grubunda MDA düzeyi anlamlı şekilde yüksek bulunurken, CAT aktivitesinin belirgin şekilde azaldığı gözlenmiştir. Emodin uygulaması, iskemi-reperfüzyon kaynaklı oksidatif stresin bir miktar azalmasını sağlamış ve MDA seviyelerini anlamlı derecede düşürmüştür. Ancak SOD ve GSH seviyelerinde belirgin bir değişiklik saptanmamıştır. Histopatolojik analizlerde, IR grubunda kas

liflerinin dejenerasyonu, nötrofil infiltrasyonu ve interstisyel ödem gibi belirgin yapısal bozukluklar tespit edilmiştir. Buna karşılık, E grubunda bu patolojik değişikliklerin daha hafif seyrettiği gözlenmiştir.

Sonuç: Çalışmamız, emodinin antioksidan ve antiinflamatuvar özellikleri sayesinde iskemi-reperfüzyon hasarını hafifletebileceğini göstermiştir. Bu bulgular, emodinin iskemi-reperfüzyon hasarında potansiyel bir koruyucu ajan olarak değerlendirilebileceğini ortaya koymaktadır.

Anahtar kelimeler: Emodin, alt ekstremitte, iskemi-reperfüzyon, reaktif oksijen türleri

9. SUMMARY

Background: The antioxidant and anti-inflammatory properties of emodin, an anthraquinone derivative, have been demonstrated in previous studies. This study aimed to evaluate the antioxidant effects of emodin on ischemia-reperfusion injury in skeletal muscle.

Materials and Methods: Male Wistar albino rats were used as the experimental model and were divided into four groups: the control group (SHAM), which underwent only laparotomy; the ischemia-reperfusion group (IR), in which a lower extremity ischemia-reperfusion model was induced; the emodin-only group (E); and the group subjected to both ischemia-reperfusion injury and emodin treatment (IR+E). Emodin was administered intraperitoneally at a dose of 20 mg/kg. In the experimental procedure, ischemia was induced by clamping the abdominal aorta for 45 minutes, followed by a 2-hour reperfusion period.

Results: Biochemical, histopathological, and oxidative stress markers were analyzed. Levels of MDA, CAT, SOD, and GSH were measured in muscle tissues. Additionally, tissue samples were histopathologically examined using hematoxylin-eosin and Masson's trichrome staining techniques. The results indicated that ischemia-reperfusion injury led to significant oxidative stress and inflammation in muscle tissue. In the IR group, MDA levels were significantly elevated, whereas CAT activity was markedly decreased. Emodin administration partially reduced ischemia-reperfusion-induced oxidative stress and significantly decreased MDA levels. However, no significant changes were observed in SOD and GSH levels. Histopathological analyses revealed severe structural damage in the IR group,

including muscle fiber degeneration, neutrophil infiltration, and interstitial edema.

In contrast, these pathological changes were milder in the E group.

Conclusion: Our study suggests that emodin may alleviate ischemia-reperfusion injury due to its antioxidant and anti-inflammatory properties. These findings indicate that emodin could be considered a potential protective agent in ischemia-reperfusion injury.

Keywords: Emodin, lower extremity, ischemia-reperfusion, reactive oxygen species

10. EKLER

10.1 Etik kurul onay

Evrak Tarih ve Sayısı: 28.12.2023-E.83/8/2



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



Sayı : E-66332047-604.01.02-837872
Konu : Değerlendirme ve Onay

28.12.2023

Sayın Prof. Dr. Gürsel Levent OKTAR
Kalp ve Damar Cerrahisi Anabilim Dalı Başkanlığı - Öğretim Üyesi

Araştırmacı grubu Gürsel Levent OKTAR, Abdullah ÖZER, Mustafa ARSLAN, Hüseyin DEMİRTAŞ, Dilara YİĞİT, Ayşegül KÜÇÜK, Zeynep YİĞMAN ve Esra TEKİN'den oluşan, G.Ü.ET-23.117 kod numaralı ve "*Rat İskelet Kasında İskemi-Reperfüzyon Hasarında Emodin'in İn-Vivo Antioksidan Etkisi*" başlıklı araştırma öneriniz incelenmiş ve Gazi Üniversitesi Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurul Yönergesindeki ilkelere uygun olduğu saptanarak onaylanmasına oybirliği ile karar verilmiştir.

Bilgilerinizi rica ederim.

It is unanimously approved that the research project numbered G.Ü.ET-23.117 and entitled "*In-Vivo Antioxidant Effect of Emodin on Ischemia-Reperfusion Injury of Rat's Skeletal Muscle*" is in compliance with Gazi University Animal Experiments Local Ethics Committee regulations.

With my best regards.

Hayvan Türü : Rat Wistar Albino
Hayvan Sayısı : 24

Prof. Dr. Mustafa ARSLAN
Kurul Başkanı

Ek:1 Liste

Belge Doğrulama Kodu :BSRH1CNZYZ

Bu belge, güvenli elektronik imza ile imzalanmıştır.

Belge Takip Adresi : <https://www.turkiye.gov.tr/gazi-universitesi-ebys>



Emniyet Mahallesi Bandırma Caddesi No :6/1 06560 Yenimahalle/ANKARA
Tel:0 (312) 202 20 57 - 0 (312) 2... Faks:0 (312) 202 38 76
e-Posta :hadyek@gazi.edu.tr İnternet Adresi :http://hadyek.gazi.edu.tr/
Kep Adresi :gaziuniversitesi@hs01.kep.tr

Bilgi için :Ayfer Çekmez
Genel Evrak Sorumlusu
Telefon No:202 38 81

