



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

**AKUT EKSTREMİTE İSKEMİSİNE MARUZ BIRAKILAN SIÇANLARDA**  
**NİKARDİPİNİN İSKEMİ/REPERFÜZYON HASARINI ENGELLEMEDEKİ ROLÜ**

**UZMANLIK TEZİ**  
**DR. CEMİLE SEDA PAMUK**

**TEZ DANIŞMANI**  
**PROF. DR. TÜRKAN TANSEL**

**İSTANBUL-2021**

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

**AKUT EKSTREMİTE İSKEMİSİNE MARUZ BIRAKILAN SIÇANLARDA**  
**NİKARDİPİNİN İSKEMİ/REPERFÜZYON HASARINI ENGELLEMEDEKİ ROLÜ**

**UZMANLIK TEZİ**  
**DR. CEMİLE SEDA PAMUK**

**TEZ DANIŞMANI**  
**PROF. DR. TÜRKAN TANSEL**

**İSTANBUL-2021**

*Bu çalışma, İstanbul Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinasyon Birimi tarafından desteklenmiştir.*

*(BAP Proje ID: 37679)*

## I. TEŞEKKÜR

*Uzmanlık eğitimim boyunca engin bilgi ve tecrübelerinden faydalandığım Prof. Dr. İbrahim Ufuk Alpagut, Prof. Dr. Nilgün Bozbuğa, Prof. Dr. İhsan Bakır, Prof. Dr. Murat Başaran, Prof. Dr. Onur Selçuk Göksel ve Doç. Dr. Ömer Ali Sayın'a*

*Eğitimim süresince bilgi ve tecrübeleri ile her zaman bana yol gösteren ve cerrahi eğitimimde tartışmasız büyük katkısı olan tez danışmanım değerli hocam Prof. Dr. Türkan Tansel'e,*

*Tezimin laboratuvar çalışma aşamalarında; materyallerin temininde, preparatların değerlendirilmesinde, biyokimyasal ve histolojik analiz işlemlerinin gerçekleştirilmesinde sonsuz yardımlarından dolayı Biyokimya Anabilim Dalı öğretim görevlileri Doç. Dr. Canan Küçükgergin ve Doç. Dr. Fatih Aydın ve immunhistolojik çalışmalarında yardımlarını esirgemeyen Onkoloji Enstitüsü Patoloji Anabilim Dalı öğretim üyesi Prof. Dr. Vakur Olgaç'a,*

*Asistanlık sürem boyunca birlikte çalışmaktan zevk aldığım tüm asistan arkadaşlarıma,*

*Beraber çalışırken yardımlarını esirgemeyen, huzur ve mutluluk içerisinde çalışmamı sağlayan Kalp ve Damar Cerrahisi kliniği tüm hemşire, personel ve çalışanlarına,*

*Yaşamımın her aşamasında örnek aldığım canım annem Dr. Sebahat Ural Yıldırım'a, cerrahi sevgisini bize aşılayan, bu alanda gelişmem için bana rehber olan canım babam Op. Dr. İbrahim Savaş Yıldırım'a, her zaman yanımda ve bana destek olan canım kardeşlerim Op. Dr. Sezgi Güllü Erciystepe ve Dr. Merve Sezer Yıldırım Inkaya'ya, beni sevgiyle büyüten hakkını asla ödeyemeyeceğim canım anneanneme ve beni bir yerlerden izlediğini hep bildiğim canım dedeme, üzerimde inanılmaz emeği olan en değerlim canım ablam Cemile Albayrak'a*

*Tanıdığım günden beri hep iyi ki dediğim, her zaman anlayışı ile beni büyüleyen değerli eşim Oben Pamuk'a ve hayatımıza ışık katan canım kızım Zeynep Pamuk'a sonsuz teşekkürlerimle...*

*Dr. Cemile Seda Pamuk*

*İstanbul, 2021*

## II. İÇİNDEKİLER

### Sayfa No:

|                                                                 |             |
|-----------------------------------------------------------------|-------------|
| <b>I. TEŞEKKÜR .....</b>                                        | <b>I</b>    |
| <b>II. İÇİNDEKİLER .....</b>                                    | <b>II</b>   |
| <b>III. TABLOLAR LİSTESİ .....</b>                              | <b>IV</b>   |
| <b>IV. ŞEKİLLER LİSTESİ .....</b>                               | <b>V</b>    |
| <b>V. SEMBOLLER / KISALTMALAR LİSTESİ.....</b>                  | <b>VIII</b> |
| <b>1. ÖZET .....</b>                                            | <b>1</b>    |
| <b>2. ABSTRACT .....</b>                                        | <b>3</b>    |
| <b>3. GİRİŞ.....</b>                                            | <b>5</b>    |
| <b>4. GENEL BİLGİLER .....</b>                                  | <b>6</b>    |
| 4.1. Hücre Zedelenmesi .....                                    | 6           |
| 4.1.1. Hücre Hasarı .....                                       | 6           |
| 4.1.2. İskemi Patofizyolojisi .....                             | 7           |
| 4.1.3. Reperfüzyon .....                                        | 9           |
| 4.1.4. İskemi/Reperfüzyon Hasarı Mekanizması .....              | 10          |
| 4.1.5. Mitokondriyal hasar .....                                | 12          |
| 4.1.6. Nitrik Oksit .....                                       | 13          |
| 4.1.7. Antioksidan Sistem .....                                 | 14          |
| 4.1.8. Kalsiyum Kanal Blokerleri .....                          | 15          |
| <b>5. GEREÇ VE YÖNTEM .....</b>                                 | <b>23</b>   |
| 5.1. Deney Hayvanları .....                                     | 23          |
| 5.2. Deney Modeli .....                                         | 23          |
| 5.3. Anestezi ve Cerrahi prosedür .....                         | 24          |
| 5.4. Biyokimyasal İncelemeler .....                             | 30          |
| 5.4.1. Gereçler.....                                            | 30          |
| 5.4.2. Kullanılan Kimyasal Malzemeler .....                     | 30          |
| 5.4.3. Serumda yapılan incelemeler .....                        | 31          |
| Katalaz aktivitesinin ölçülmesi (21): .....                     | 36          |
| 5.4.4 Elisa çalışmasında kullanılan malzemeler .....            | 36          |
| 5.5. Histolojik Analiz.....                                     | 37          |
| 5.5.1. Doku takibi ve Hematoksilen-Eozin Boyama Prosedürü ..... | 37          |
| 5.5.2. İmmunohistokimyasal Analizler .....                      | 39          |
| 5.6. İstatiksel İncelemeler .....                               | 41          |

|                                          |           |
|------------------------------------------|-----------|
| <b>6. BULGULAR .....</b>                 | <b>42</b> |
| 6.1. Serumdan Elde edilen Bulgular ..... | 42        |
| 6.2. Histopatolojik Bulgular .....       | 50        |
| <b>7. TARTIşMA .....</b>                 | <b>58</b> |
| <b>8. SONUÇ .....</b>                    | <b>65</b> |
| <b>9. KAYNAKLAR.....</b>                 | <b>66</b> |
| <b>10. ÖZGEÇMİř .....</b>                | <b>70</b> |
| <b>11. EKLER.....</b>                    | <b>71</b> |
| EK-1.....                                | 71        |



### III. TABLolar LİSTESİ

#### Sayfa No:

|                                                                                                                                                                                                                                                            |    |
|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| <b>Tablo 1:</b> Pro/Anti inflamatuvar Sinyaller .....                                                                                                                                                                                                      | 11 |
| <b>Tablo 2:</b> Serbest Oksijen Radikalleri.....                                                                                                                                                                                                           | 12 |
| <b>Tablo 3:</b> Kalsiyum Kanal Blokerleri .....                                                                                                                                                                                                            | 17 |
| <b>Tablo 4:</b> Total SH düzeyleri tayini .....                                                                                                                                                                                                            | 33 |
| <b>Tablo 5:</b> SOD aktivitesinin ölçümü .....                                                                                                                                                                                                             | 35 |
| <b>Tablo 6:</b> Katalaz aktivitesinin ölçümü.....                                                                                                                                                                                                          | 36 |
| <b>Tablo 7:</b> İskemi oluşturulan sıçanlarda Nikardipin uygulamasının serumda reaktif oksijen türleri (ROS), malondialdehit (MDA), proteinlerin ileri oksidasyon ürünleri (AOPP)ve antioksidan aktivite (FRAP) ve Total SH düzeyleri üzerine etkisi ..... | 42 |
| <b>Tablo 8:</b> İskemi oluşturulan sıçanlarda Nikardipin uygulamasının serumda MAPK, STAT1 düzeyleri üzerine etkisi.....                                                                                                                                   | 45 |
| <b>Tablo 9:</b> İskemi oluşturulan sıçanlarda Nikardipin uygulamasının serumda SOD, GSH-Px ve Katalaz ve MPO aktiviteleri üzerine etkisi.....                                                                                                              | 47 |

#### IV. ŞEKİLLER LİSTESİ

##### Sayfa No:

|                                                                                                                                                                             |    |
|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| <b>Şekil 1:</b> Hücre Hasarı Mekanizmaları.....                                                                                                                             | 6  |
| <b>Şekil 2:</b> İskemi hasarı.....                                                                                                                                          | 8  |
| <b>Şekil 3:</b> Serbest radikal oluşumu .....                                                                                                                               | 9  |
| <b>Şekil 4:</b> Kalsiyum Kanal Blokerlerinin Etki Mekanizması ve Düz Kas Kontraksiyonunun Kontrolü(13).....                                                                 | 15 |
| <b>Şekil 5:</b> Nikardipin preparatı.....                                                                                                                                   | 21 |
| <b>Şekil 6:</b> Nikardipin klorür kimyasal formülü.....                                                                                                                     | 21 |
| <b>Şekil 7:</b> hassas terazide sıçanların tartılması.....                                                                                                                  | 24 |
| <b>Şekil 8:</b> Nikardipinin intraperitoneal Olarak Uygulanması .....                                                                                                       | 25 |
| <b>Şekil 9:</b> İşlem Öncesi Cerrahi Alanın Tıraşlanması.....                                                                                                               | 25 |
| <b>Şekil 10:</b> Sıçanların Supin Pozisyonunda Ameliyat Masasına Alınması.....                                                                                              | 26 |
| <b>Şekil 11:</b> Cerrahi alanın hazırlanması.....                                                                                                                           | 27 |
| <b>Şekil 12:</b> İnfrarenal Abdominal Aortun Bulunması.....                                                                                                                 | 28 |
| <b>Şekil 13:</b> Aortun İpek Suture ile Dönülmesi .....                                                                                                                     | 28 |
| <b>Şekil 14:</b> İpek Suture ile Dönülmüş Aortun Atravmatik Klemplenmesi.....                                                                                               | 29 |
| <b>Şekil 15:</b> Cerrahin Alanın Kapatılıp 60 dak İskemi Süresinin Beklenmesi.....                                                                                          | 29 |
| <b>Şekil 16:</b> İskemi ve Nikardipin tedavisi uygulanan sıçanlarda serum örneklerinde reaktif oksijen türleri (ROS) düzeyleri üzerine etkisi (Ortalama±SD) .....           | 43 |
| <b>Şekil 17:</b> İskemi ve Nikardipin tedavisi uygulanan sıçanlarda serum örneklerinde Malondialdehit (MDA) düzeyleri üzerine etkisi (Ortalama±SD) .....                    | 43 |
| <b>Şekil 18:</b> İskemi ve ozon tedavisi uygulanan sıçanlarda serum örneklerinde Proteinlerin ileri oksidasyon ürünleri (AOPP) düzeyleri üzerine etkisi (Ortalama±SD) ..... | 44 |
| <b>Şekil 19:</b> İskemi ve Nikardipin tedavisi uygulanan sıçanlarda serum örneklerinde antioksidan aktivite (FRAP) düzeyleri üzerine etkisi (Ortalama±SD) .....             | 44 |

|                                                                                                                                                                                                              |    |
|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| <b>Şekil 20:</b> İskemi ve Nikardipin tedavisi uygulanan sıçanlarda serumda (Total SH) düzeyleri üzerine etkisi (Ortalama±SD).....                                                                           | 45 |
| <b>Şekil 21:</b> İskemi ve Nikardipin tedavileri uygulanan sıçanlarda serumda Mitojen activated kinaz (MAPK) düzeyleri üzerine etkisi (Ortalama±SD).....                                                     | 46 |
| <b>Şekil 22:</b> İskemi ve Nikardipin tedavileri uygulanan sıçanlarda serumda STAT-1 düzeyleri üzerine etkisi (Ortalama±SD).....                                                                             | 47 |
| <b>Şekil 23:</b> İskemi ve Nikardipin tedavileri uygulanan sıçanlarda serumda SOD düzeyleri üzerine etkisi (Ortalama±SD).....                                                                                | 48 |
| <b>Şekil 24:</b> İskemi ve Nikardipin tedavileri uygulanan sıçanlarda serumda GSH-Px düzeyleri üzerine etkisi (Ortalama±SD).....                                                                             | 48 |
| <b>Şekil 25:</b> İskemi ve Nikardipin tedavileri uygulanan sıçanlarda serumda Katalaz düzeyleri üzerine etkisi (Ortalama±SD).....                                                                            | 49 |
| <b>Şekil 26:</b> İskemi ve Nikardipin tedavileri uygulanan sıçanlarda serumda MPO düzeyleri üzerine etkisi (Ortalama±SD).....                                                                                | 49 |
| <b>Şekil 27:</b> Kontrol grubundan alınan aort. Doğal yapıda aort kesiti(H&Ex200) .....                                                                                                                      | 50 |
| <b>Şekil 28:</b> I/R grubunda aort- düz kas hücrelerinin seyrinde düzensizlik. Elastik lifler seçilmiyor (H&Ex200).....                                                                                      | 50 |
| <b>Şekil 29:</b> Düşük doz Nikardipin tedavisi grubu Aort kesiti. Media tabakasındaki düz kas hücreleri tedavi almayan gruba göre daha düzenli. Elastik lifler doğala yakın seyir gösteriyor. (H&Ex200)..... | 51 |
| <b>Şekil 30:</b> Yüksek doz Nikardipin tedavisi alan grupta media hücreleri düzgün seyirli, elastik lamina doğal görünümlü, mediada yer yer miksomatöz görünüm. (H&Ex200).....                               | 51 |
| <b>Şekil 31:</b> Tedavi uygulanmayan I/R grubunda MMP-9 pozitif boyanan düz kas hücreleri (MMP9x400).....                                                                                                    | 52 |
| <b>Şekil 32:</b> Tedavi uygulanmayan I/R grubunda diffuz zayıf boyanma gösteren aort kesiti (ICAMX400).....                                                                                                  | 52 |
| <b>Şekil 33:</b> Tedavi uygulanmayan I/R grubunda diffuz zayıf boyanma gösteren aort kesiti (MMP-3X400).....                                                                                                 | 53 |
| <b>Şekil 34:</b> Tedavi uygulanmayan I/R grubunda HIF-1 $\alpha$ ile zayıf diffuz boyanma (HIF-1 $\alpha$ x400) .....                                                                                        | 53 |

|                                                                                                                                          |    |
|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| <b>Şekil 35:</b> Tedavi uygulanmayan I/R grubunda zayıf diffuz boyanma (VCAMx400) .....                                                  | 54 |
| <b>Şekil 36:</b> Doğal yapıda çizgili kas dokusu (H&Ex400).....                                                                          | 54 |
| <b>Şekil 37:</b> Tedavi olmayan I/R grubunda ödemli, çizgilenme kaybı gösteren kas lifleri (H&Ex200).....                                | 55 |
| <b>Şekil 38:</b> Tedavi olmayan I/R grubunda kas lifleri çevresinde az sayıda lenfosit ve nötrofil polimorf infiltrasyon (H&Ex400) ..... | 55 |
| <b>Şekil 39:</b> Düşük doz Nikardipin tedavi grubunda hafifçe ödemli çizgili kas dokusu (H&Ex200).....                                   | 56 |
| <b>Şekil 40:</b> Yüksek doz Nikardipin tedavi grubunda doğala yakın görünümde çizgili kas dokusu (H&Ex200).....                          | 56 |
| <b>Şekil 41:</b> Tedavi uygulanmayan I/R grubunda a) HIF 1 $\alpha$ b) ICAM c) MMP3 pozitifliği gösteren çizgili kas dokusu .....        | 57 |

**V. SEMBOLLER / KISALTMALAR LİSTESİ**

|                                   |                                          |
|-----------------------------------|------------------------------------------|
| <b>ACE</b>                        | : Anjiotensin dönüştürücü enzim          |
| <b>AOPP</b>                       | : Proteinlerin İleri Oksidasyon Ürünleri |
| <b>ARE</b>                        | : Antioksidan tepki elemanı              |
| <b>ATP</b>                        | : Adenozin trifosfat                     |
| <b>DNA</b>                        | : Deoksiribonükleik asit                 |
| <b>ET-1</b>                       | : Endotelin-1                            |
| <b>FRAP</b>                       | : Antioksidan kapasite                   |
| <b>G6PDH</b>                      | : Glukoz 6-fosfat dehidrogenaz           |
| <b>GSH</b>                        | : Glutasyon                              |
| <b>GSH-R</b>                      | : Glutasyon redüktaz                     |
| <b>GSH-Px</b>                     | : Glutasyon peroksidaz                   |
| <b>H<sub>2</sub>O<sub>2</sub></b> | : Hidrojen Peroksit Radikali             |
| <b>HOCL</b>                       | : Hipoklorik Asit                        |
| <b>HIF-1</b>                      | : Hipoksi ile İndüklenen Faktor-1        |
| <b>ICAM-1</b>                     | : İntersellüler adezyon molekülü-1       |
| <b>IL</b>                         | : İnterlökin                             |
| <b>I/R</b>                        | : İskemi – Reperfüzyon                   |
| <b>İRH</b>                        | : İskemi Reperfüzyon Hasarı              |
| <b>KAT</b>                        | : Katalaz                                |
| <b>LDH</b>                        | : Laktat dehidrogenaz                    |
| <b>LOO-</b>                       | : Lipid peroksit radikali                |
| <b>LOOH</b>                       | : Lipid hidroperoksit                    |
| <b>LOP</b>                        | : Lipid oksidasyon ürünleri              |
| <b>MI</b>                         | : Miyokardiyal Infarktüs                 |
| <b>MDA</b>                        | : Malondialdehit                         |

|                       |                                               |
|-----------------------|-----------------------------------------------|
| <b>MCP</b>            | : Monosit kemoatraktan protein                |
| <b>MMP</b>            | : Matrix Metalloproteinaz                     |
| <b>NRF2</b>           | : Nükleer faktör eritroid 2 ilişkili faktör 2 |
| <b>NAD+</b>           | : Nikotinamid Dinükleotidi                    |
| <b>NADPH</b>          | : Nikotinamid Adenin dinükleotid fosfat       |
| <b>OH-</b>            | : Hidroksil Radikali                          |
| <b>O<sub>2</sub></b>  | : Oksijen molekülü                            |
| <b>O<sub>2</sub>-</b> | : Süperoksit Radikali                         |
| <b>PAF</b>            | : Trombosit Aktive Edici Faktör               |
| <b>PECAM</b>          | : Trombosit ve Endotel Adhezyon Molekülü      |
| <b>PMNL</b>           | : Polimorfonükleer Lökosit                    |
| <b>PG</b>             | : Prostaglandin                               |
| <b>ROT</b>            | : Reaktif oksijen türevleri                   |
| <b>SR</b>             | : Serbest radikal                             |
| <b>VCAM</b>           | : Vasküler hücre adezyon molekülü             |

## 1. ÖZET

### **Pamuk C.S. Akut Ekstremitte İskemisine Maruz Bırakılan Sıçanlarda Nikardipinin İskemi/Reperfüzyon Hasarını Engellemedeki Rolü.**

**Tıpta Uzmanlık Tezi. İstanbul, 2021.**

**Amaç:** Tüm dünyada olduğu gibi ülkemizde de sık görülen ekstremitte iskemisi önemli mortalite ve morbidite sebeplerinden biridir. İskemi ve reperfüzyon sürecinde hasarın büyük bölümünün reperfüzyon sürecinde oluştuğu ve reaktif oksijen radikallerinin dokuların hasarlanmasında büyük rol oynadığı bilinmektedir.

Bu çalışmada bir kalsiyum kanal blokörü olan Nikardipinin vazodilatasyon ve kalsiyum blokaj etkisinin akut ekstremitte iskemisine maruz bırakılan sıçanlarda iskemi ve reperfüzyon hasarını engellemedeki rolü araştırılmıştır.

**Gereç ve Yöntem:** Bu çalışmada ortalama ağırlıkları 200-400 gr olan 24 adet erkek Wistar Albino cinsi sıçan rastgele 4 gruba ayrıldı. Kontrol grubu(n=6) sıçanlara sadece deri altı kesi yapıldı. İskemi-reperfüzyon (İR) grubu(n=6) sıçanlarda infrarenal abdominal aort 60 dk süreyle klemplenerek iskemi oluşturuldu, sonra klempler kaldırılarak 120 dk reperfüzyon yapıldı. İskemi-reperfüzyon (İR)+düşük doz nikardipin(n=6) (10 mg/ml) grubu sıçanlara cerrahi işleminden 4 gün önce başlanılarak her gün tek doz intraperitoneal yolla nikardipin uygulandı. İskemi-reperfüzyon (İR)+yüksek doz nikardipin(n=6) (20 mg/ml) grubu sıçanlara cerrahi işleminden 4 gün önce başlanılarak her gün tek doz intraperitoneal yolla nikardipin uygulandı. Nikardipin tedavisi tamamlandıktan sonra sıçanlarda infrarenal abdominal aort 60 dk süreyle klemplenerek iskemi oluşturuldu, sonra klempler kaldırılarak 120 dk reperfüzyon yapıldı. Reperfüzyon süresi bitince kontrol grubu dâhil olmak üzere tüm sıçanlar sakrifiye edilerek uygun kan örnekleri alındı, kas ve aort dokusu patolojik değerlendirme için çıkarılarak uygun koşullarda saklandı.

İncelemeler serum ve doku materyalleri üzerinde yapıldı ve özellikle prooksidan-antioksidan sistem ve inflamasyon ile ilgili monoklonal antikorlardaki değişimler araştırıldı. Bu çerçevede HIF-1 alfa antikor, ICAM-1 Antikor, VCAM-1 Antikor, MMP 3 ve MMP9 antikor, Rat myeloperoksidaz (MPO), Rat signal transducer and activator of Transcription 1 (STAT1), Rat mitogen activated protein kinase (MAPK), Glutathione Peroksidaz (GSH-PX), reaktif oksijen türleri (ROS), malondialdehit (MDA), proteinlerin ileri oksidasyon ürünleri

(AOPP) antioksidan aktivite (FRAP), Total-SH, Süperoksit dismutaz (SOD) ve Katalaz çalışıldı.

**Bulgular:** Biyokimyasal incelemelerde iskemi/ reperfüzyon modeli oluşturulan sıçanların serumlarında SODs, GSH-Px ve katalaz enzimlerinde kontrol grubuna bir farklılık göstermediği, MPO aktivite düzeylerinin ise iskemi de anlamlı artıp, tedavi gruplarında anlamlı olarak azaldığı görüldü. MAPK ve STAT1 düzeylerinde ise iskemi uygulamasıyla anlamlı artış, tedavi ile anlamlı azalma tespit edildi. Serum ROS, MDA, Total SH ve AOPP düzeyleri iskemi uygulaması ile anlamlı artış, FRAP düzeylerinde de düşüş görüldü. Tedavi gruplarında ise MDA ve FRAP anlamlı olarak azalırken, ROS, Total SH ve AOPP de değişiklik görülmedi. HIF-1 alfa antikoru, ICAM-1 Antikoru, VCAM-1 Antikoru, MMP-3 ve MMP-9 antikoru iskemik grupta pozitif boyanma gösterirken, tedavi grubunda daha zayıf boyandığı görüldü.

**Sonuç:** Sonuç olarak, İR grubunda alt ekstremitede iskemi- reperfüzyon hasarı oluştuğunu ve nikardipin tedavisinin bu hasara karşı koruyucu etkisinin olduğunu söyleyebiliriz.

**Anahtar Kelimeler:** iskemi-reperfüzyon, nikardipin

## 2. ABSTRACT

### **Pamuk C.S., The role of nicardipine in preventing ischemia/reperfusion damage in rats exposed to acute extremity ischemia, Istanbul 2021**

**Objective:** Limb ischemia, which is as common in our country as in the whole world, is one of the important causes of mortality and morbidity. It is known that most of the damage during ischemia and reperfusion process occurs during the reperfusion process and reactive oxygen radicals play a major role in tissue damage.

In this study, the role of the vasodilation effect of Nikardipine, a calcium channel blocker, in preventing ischemia and reperfusion injury in rats exposed to acute limb ischemia was investigated.

**Materials and Methods:** In this study, 24 Wistar Albino rats with an average weight of 200-400 g were randomly divided into 4 groups. Only subcutaneous incisions were made in the control group (n = 6) rats. Ischemia was induced by clamping the infrarenal abdominal aorta for 60 minutes in ischemia-reperfusion (IR) group (n = 6) rats, then reperfusion was performed for 120 minutes by removing the clamps. Ischemia-reperfusion (IR) + low dose nicardipine (n = 6) group rats were initiated 4 days before the surgical procedure and administered a single dose of nicardipine daily intraperitoneally. Ischemia-reperfusion (IR) + high-dose nicardipine (n = 6) group rats were started 4 days before the surgical procedure and administered a single dose of nicardipine daily intraperitoneally. After the nicardipine treatment was completed, ischemia was created by clamping the infrarenal abdominal aorta for 60 minutes in rats, then reperfusion was performed for 120 minutes by removing the clamps. When the reperfusion period was over, all rats, including the control group, were sacrificed and appropriate blood samples were taken, quadriceps muscle tissue was removed for evaluation and stored under appropriate conditions.

Investigations were made in serum, muscle tissue and aorta; changes in monoclonal antibodies related to prooxidant-antioxidant system and inflammation are investigated in particular. In this context, HIF-1 alpha antibody, ICAM-1 Antibody, VCAM-1 Antibody, MMP-3 and MMP-9 antibody, Rat myeloperoxidase (MPO), Rat signal transducer and activator of Transcription 1 (STAT1), Rat mitogen activated protein kinase (MAPK) , Glutathione Peroxidase (GSH-PX), reactive oxygen species (ROS), malondialdehyde (MDA),

advanced oxidation products of proteins (AOPP) and antioxidant activity (FRAP), Total-SH, Superoxide dismutase (SOD) and Catalase were studied.

**Results:** In the biochemical examinations, it was observed that there was no difference in SODs, GSH-Px and catalase enzymes in the sera of rats for which ischemia/reperfusion model was created. While the MPO activity levels increased significantly in ischemia and it also decreased significantly in the treatment groups. A significant increase in MAPK and STAT1 levels with ischemia and a significant decrease with treatment were detected. Serum ROS, MDA, Total SH and AOPP levels increased significantly with ischemia, and FRAP levels decreased. In the treatment groups, while MDA and FRAP decreased significantly, ROS, TotalSH and AOPP did not change.

**Conclusion:** In conclusion, we were able to create ischemia-reperfusion injury in the lower extremity in the IR group and we can say that nicardipine treatment has a protective effect against this damage.

### 3. GİRİŞ

İskemi, doku ve organların arteriyel kanlanmadan faydalanamamaları sonucu ortaya çıkan ve artık metabolik ürünlerin uzaklaştırılamaması ile hücrel hasar meydana gelmesine neden olan durumlardan biridir. İskemi sonucunda oluşan hasarın şiddeti, yetersiz perfüzyonun süresi ve miktarı ile orantılı olup, hücrenin tipi, yaralanmaya karşı hassasiyeti, kan ihtiyacı ve metabolizmasına göre farklılık göstermektedir. (1)

Dokunun yeniden kanlanması anlamına da gelen reperfüzyon, hücre hasarını engellemede önemli bir rol oynasa da iskemik hasarın sitokin salınımı ve hidroksil radikal ( $\text{OH}^-$ ), süperoksit radikali ( $\text{O}_2^-$ ) ve hidrojen peroksit ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ) gibi reaktif oksijen türleri (ROS) ve kompleman sisteminin aktivasyonu ile tehlikeli etkilerini de artırmaktadır. (2)

Hücrel şişme, hücre iskeleti değişiklikleri ve seçici mikrovasküler geçirgenlik kaybı reperfüzyona bağlı hasarın karakteristik özelliklerindendir.

İskemi reperfüzyon (İR) hasarı; koroner anjioplasti, transplantasyon, kardiyopulmoner bypass, anevrizma cerrahisi, periferik arter cerrahisi gibi girişimlerin sonucunda gelişebildiği gibi aterosklerotik tıkaçıcı hastalık, arteriyel tromboz veya emboli gibi hastalıklarla da prezente olabilen bir klinik tablodur. (3,4)

Bir dihidropiridin kalsiyum kanal blokeri olan Nikardipin arteriyolar vazodilatördür. Kardiyak miyositlerine oranla vasküler düz kasta L-tipi kalsiyum kanalları için seçicidir. Nikardipin kullanım olarak, malign arteriyel hipertansiyon ve hipertansif ensefalopatinin tedavisinde tek başına, aort diseksiyonu vakalarında kısa etkili beta bloker tedavisi uygun olmadığında veya tek başına beta blokajın etkili olmadığı durumlarda beta blokerle kombinasyon halinde, şiddetli preeklampside diğer intravenöz antihipertansif ajanlar önerilmediğinde veya kontrendike olduğunda ve sıklıkla ameliyat sonrası hipertansiyon tedavisinde kullanılmaktadır.

Yapılan yeni çalışmalarda Nikardipinin antiaterosklerotik etkisinin olabileceği ortaya çıkarılmış, çalışmamıza da ilham kaynağı olmuştur. (5)

Çalışmamızda nikardipinin akut iskemiye maruz bırakılan sıçanlarda iskemi/reperfüzyon hasarı üzerindeki rolünün aydınlatılması planlanmıştır. Sıçanlardan alınan kan örnekleri ile serumda oksidatif stres markerları araştırılarak, I/R hasarı azaltmasının mümkün olup olmadığı tespit edilmeye çalışılmıştır. Monoklonal antikorlarla aort dokusu ve cizgili kas dokusu üzerinde çalışmalar yapılmıştır.

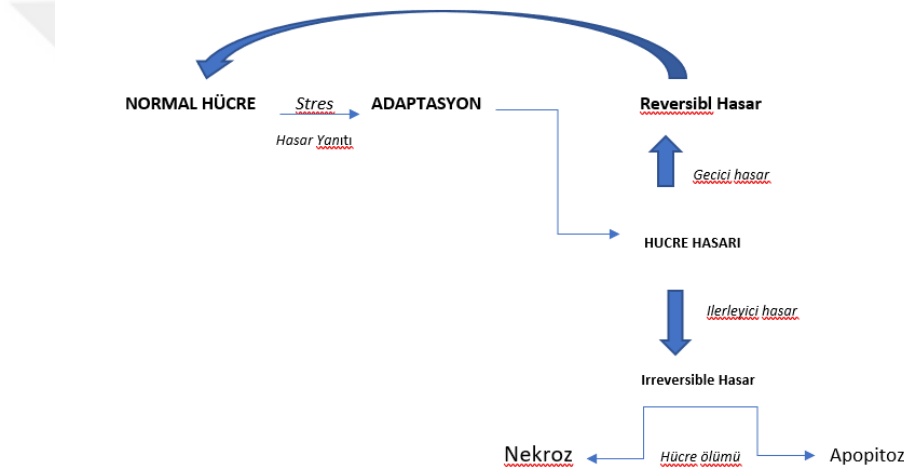
## 4. GENEL BİLGİLER

### 4.1. Hücre Zedelenmesi

Hücre; fiziksel, kimyasal ya da mikrobiyolojik ajanlar gibi dış uyaranlara karşı adaptasyon yanıtı gösterir. Hücrenin adaptasyon mekanizmasının kapasitesinin aşılması durumunda hücre zedelenmesi gelişir.

#### 4.1.1. Hücre Hasarı

a) **Reversible Hasar:** Hücre adaptasyon mekanizmaları ile hasarın geri dönüşümlü olarak düzenlenmesi durumudur.



**Şekil 1:** Hücre Hasarı Mekanizmaları

Geri dönüşlü hücre hasarında, hasara yol açan uyaran ortadan kalktığında meydana gelen morfolojik ya da fonksiyonel değişiklikler geri dönüşlüdür. Ağır membran hasarı ya da çekirdek hasarı gerçekleştirmemiştir.

b) **Irreversibl hasar:** Meydana gelen hasarın süresinin uzaması durumunda hücredeki hasar geri dönüşsüz duruma gelir ve hücre ölümü gerçekleşir. Hücre ölümü nekroz ve apopitoz mekanizmaları ile gerçekleşir.

Hücre hasarı nedenleri oksijen eksikliği, kimyasal etkenler, enfeksiyon etkenleri, genetik faktörler, fiziksel etkenler, beslenme dengesizlikleri ve yaşlanma olarak belirlenmiştir. (1.) Hücre hasarının ana hedefi; mitokondriler ve patolojik koşullarda bu organellerin ATP ve ROT (reaktif oksijen türevleri oluşturabilme kabiliyeti, kalsiyum

homeostazında bozukluk, membranların hasar görmesi ve DNA hasarı sonucu proteinlerin yanlış katlanmasıdır. (1)

Aerobik oksidatif solunumunu etkileyerek hücre ölümüne sebep olan etkenler arasında en önemlisi hipoksidir. Hipoksinin en sık sebebi dokuya gelen arteriyel kan akımının kesintiye uğraması sonucu gelişen iskemidir.

#### **4.1.2. İskemi Patofizyolojisi**

İskemi, dokuların fonksiyone olmaları için gerekli olan oksijen ve diğer metabolitlerin dolaşım sistemi tarafından sağlanamaması sonucunda ortaya çıkan durum olarak tanımlanabilir.

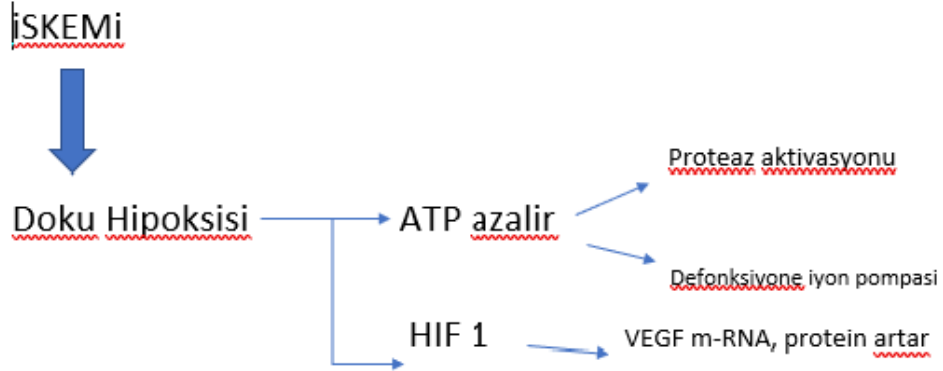
Dokuya azalmış oksijen sunumu, mitokondriyal enerji üretiminin (adenozin trifosfat sentezi, oksidatif fosforilazasyon) azalmasına ve bunun beraberinde glikoliz üretiminin artmasına karşın hücre enerji stokunun azalmasına neden olmaktadır. Yetersiz enerji deposu hücresel iyon hemostazının (intraseküler ve ekstraselüler  $\text{Na}^+$ ,  $\text{Ca}^{++}$  ve  $\text{K}^+$  dengesi) sağlanamamasına neden olarak, hidrolazın aktivasyonuna ve hücre membran geçirgenliğinin artmasına neden olmaktadır. Enerji üretiminin anaerob glikoliz üzerinden devam edebildiği hipoksinin aksine iskemide, gelen kan miktarının azalmış olması nedeniyle, glikoliz için gerekli maddelerin sağlanmasında da sorun vardır. Buna bağlı olarak, dokuya ulaşabilen potansiyel substratlar tükendiğinde ya da glikoliz olayı, normalde venöz kanla dokudan uzaklaştırılan metabolitlerin birikmesi nedeniyle inhibisyona uğradığında, iskemik dokulardaki anaerob enerji üretimi de engellenir. İskemiye bağlı doku hasarı bu nedenle hipoksi nedenli doku hasarından daha çabuk gelişir ve genellikle daha şiddetlidir. (2)

İskeminin süresine ve derecesine bağlı olarak hidrolaz aktivasyonu ve iyon hemostazının düzensizliği logaritmik olarak artar. ATP üretiminin düşmesi ile hücresek lizozomlar hidrojen iyonları sızdırmaya, hücreler glikolitik yolağın kullanımını artırmaya başlarlar. Asidozun artması  $\text{Na-K-ATPaz}$  iyon pompasının ve hücresek lizozomların sağlanmasında görevli enzimlerin fonksiyonunu bozar. Bu beraberinde hücre içindeki  $\text{Na}^+$  ve  $\text{Ca}^{++}$  konsantrasyonlarında artmaya neden olur.  $\text{Ca}^{++}$  düzeyinin artması fosfolipazları (özellikle fosfolipaz A2) ve hücre hasarından sorumlu proteazları aktive eder. (Şekil 2)

Doku iskemisi, vasküler endotelyal faktör (VEGF) sentezini tetikler. Hipoksi sonucunda mRNA kendi stabilizasyonunu sağlama amacıyla yıkımı azaltıp, mRNA üretimini artırır. Hipoksiye bir cevap olarak protein sentezi genel olarak dursa da VEGF mRNA etkili

bir biçimde proteine dönüştürülür. VEGF protein sentezinin başlangıç basamakları VEGF geninin 5'transkripsiyonel başlangıcındaki hipoksiye cevap alanına hipoksi-inducible factor (HIF) bağlanmasına bağlıdır. HIF-1 basit bir protein olup 2 subuniteden oluşur: HIF 1 alfa ve HIF-1 beta. HIF-1 alfa proteini normal koşullarda ubiquitin ve proteosom tarafından down regüle edilir. Hipoksik durum geliştiğinde HIF-1 alfa protein seviyesi dramatik bir şekilde artmaya başlar. HIF 1 alfanın nükleer akümüasyonu HIF 1 beta ile dimerizasyonunu tetikler. Bu iki dimerin birleşmesi ile DNA sekansı VEGF üretimini ve diğer hedef gen üretimini transkripsiyonel olarak başlatır. (3)

Doku hipoksisi nötrofillerin interstisyuma mobilize olması ile sonuçlanır ve bu durum doku reperfüzyonu üzerinde hem yararlı hem de yıkıcı bazı durumları da beraberinde getirir. Hipoksi adaptif yoluna bağlı olarak nötrofil ve makrofajlar inflamasyon alanına migre eder. Aktive olan nötrofiller çözülebilen mediyatörlerden olan glutamat ve adenin nükleotidlerini ortama bırakır. Bu mediyatörler iskemi anında vasküler endotelial yüzeyinde adenezine dönüştürler. Adenozin, nötrofil transmigrasyonundan sonra endotelial hücre, hücre iletişimini tekrar kurarak mikrovasküler endotelial bariyeri korur. Polimorf çekirdekli nötrofiller aynı zamanda endotelial bariyere zarar veren bazı faktörler üreterek yıkıcı özellik de gösterirler. (2,3)

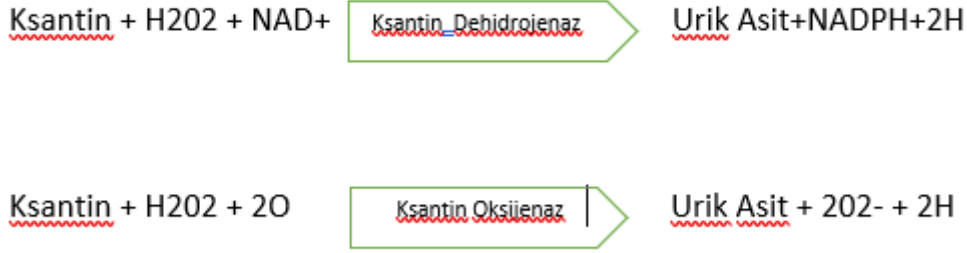


**Şekil 2:** Iskemi hasarı

İskemi esnasında gerçekleşen bu anahtar olaylar, reperfüzyonda durumun daha da kötüleşmesine neden olabilmektedir. Örnek verilmesi gerekirse; ksantin dehidrojenazın ksantin oksidaza dönüşümü.

Ksantin dehidrojenaz oksidize nikotinamid dinükleotidi (NAD<sup>+</sup>) ksantin ve hipoksiksaninin oksidasyonunda kullanır. Isı, proteoliz, sülfidril birleşimlerinin sayıca azalması ksantin dehidrojenazi oksidaz formuna dönüştürür ve bu form NAD<sup>+</sup>'in bir elektron alıcısı olarak kullanımının önüne geçer. (Şekil 3)

Bu süreçle birlikte süperoksit radikali ve hidrojen peroksit oluşumu artar. Süperoksit anyonların hidrojen peroksit ile etkileşime girmesi süperoksit anyondan daha reaktif bir form olan hidroksil radikaline dönüşmesine neden olur. Bu reaksiyon Weiss reaksiyonu olarak da bilinmekte ve normoksik koşullarda yavaş ilerlemesine karşın, hipoksik koşullarda çok hızlı seyretmektedir. Oluşan radikaller anstabil ve oldukça reaktiftirler. Proteinler, lipidler, nükleik asitler ve polisakkaritlerle etkileşime girmekte ve hücre membranında da bir parçası olan bu moleküllerle olan reaksiyonu sonucunda membran bütünlüğü sağlanamayıp hücresel bütünlük ve fonksiyon kaybı ile sonuçlanmaktadır. (3)



**Şekil 3:** Serbest radikal oluşumu

#### 4.1.3. Reperfüzyon

İskemik dokuda, hücrenin rejenerasyonu ve toksik metabolitlerin temizlenmesi için, kan akımının yeniden sağlanması gereklidir. Reperfüzyon hasarı iskemiden sonra yeniden kanlandırılan dokunun buna verdiği kompleks cevap olarak tanımlanabilir. Reperfüzyon hasarının metabolik, trombotik, enflamatuvar komponentleri bulunmaktadır. Reperfüzyon sonrası doku bütünlüğünün sağlanması ya da iskemik hasarın daha da şiddetlenmiş olması primer olarak iskemi süresine bağlıdır. Yeniden kanlandırma sonrası oluşan hasarın iskemik hasara nazaran daha fulminant oluşu paradoksaldır. Bununla beraber, reperfüzyon yapılmadığı takdirde hayati organlarımızda (beyin, bağırsak, kalp ya da ekstremiteler) geri dönüşümsüz hasarlar oluşabilmektedir. Dokunun reperfüzyona verdiği cevapta en majör rolü vasküler endotel tabakası oynamaktadır. Azalan endotelial ATP seviyeleri damar duvarındaki

endotelial tabakanın permeabilitesinin daha geçirgen olmasına yol açmaktadır. Reperfüzyon sırasında dokuda nötrofil infiltrasyonu, kompleman sisteminin aktivasyonu, kalsiyum aracılı proteazların aktivasyonu, araşidonik asit (AA) metabolizması gibi pek çok sistem, serbest radikal (SR) oluşumunu artırarak, hasara neden olmaktadır. (1,4)

Reperfüze olan dokuya bir takım inflamatuvar mediyatörler (makrofajlar, lenfositler, nötrofiller, mast hücreleri, plateletler) yollanır. Kompleman sistemi, reaktif oksijen radikalleri, NO, inflamatuvar ve non inflamatuvar sitokinler gibi hücre dışı elementlerin de reperfüzyon hasarındaki kompleks yapıyı oluşturduğu düşünülmektedir.

#### **4.1.4. İskemi/Reperfüzyon Hasarı Mekanizması**

İskemi reperfüzyon hasarında fizyopatolojik değişikliklere yol açan faktörler (4)

- a) Serbest oksijen radikalleri,
- b) Polimorf nüveli lökositler
- c) Kompleman sistemi,
- d) Endotel hücreleridir.

##### **a) Lökositler:**

Reperfüzyon esnasında nötrofil kemotaksisinde artar ve nötrofil-endotelial hücre adezyonunda logaritmik artma gözlemlenir. İskemi esnasındaki statik durumdaki yavaş transendotelial nötrofil migrasyonunun aksine reperfüzyon esnasında akımla birlikte nötrofil-endotel ilişkisi artar. Reperfüzyondaki transendotelial migrasyon; Rolling (yuvarlanma), adherans ve transendotelial migrasyon basamaklarıyla gerçekleşmektedir. İlk basamak yüzeydeki endotelial P-selektin (CD62P) üretiminin artması ile başlamaktadır. CD62P lökosit ligandı P-selektin glikoprotein ligand 1 (PSGL-1) ile bağlanır ve lökosit yuvarlanması (rolling) baslar. Nötrofilin adheransı  $\beta 2$  integrinler Cd11a/CD18 ve CD11b/CD18 in endotelial interselluler adezyon molekulu-1 (ICAM-1) ile bağlanması sonucu gerçekleşmektedir. Lökositlerin transmigrasyonu ise platelet- endotelial cell adezyon molekulu-1 (PECAM-1) ile sağlanmaktadır. Interstisyuma girer girmez lökositler toksik reaktif oksijen moleküllerini, proteazları ve elastazları ortama bırakırlar. Salınan bu maddeler artmış mikrovasküler permeabilite, ödem, tromboz ve parenkimal hücre ölümü ile ilişkilidir. (3,9)

### b) Sitokinler:

Enflamasyon alanında bulunan multipl büyüme faktörleri ve sitokinler inflamatuvar yanıtın nasıl olacağını belirlemekte en önemli role sahiptirler. Damar duvarında proinflamatuvar ve anti-inflamatuvar sinyal alışverişi sürekli olmaktadır. (Tablo 1)

**Tablo 1:** Pro/Anti inflamatuvar Sinyaller

| PROINFLAMATUAR SINYALLER                | ANTI-INFLAMATUAR SINYALLER              |
|-----------------------------------------|-----------------------------------------|
| Interferon $\gamma$                     | Transforming Growth Faktor- $\beta$     |
| Tumor Nekrosis Faktor (TNF)             | IL-10                                   |
| Interlokin-1 (IL-1)                     | Interlokin Reseptor Antagonisti (IL-RA) |
| IL-4                                    | IL-13                                   |
| IL-13                                   | I- $\kappa$ B                           |
| Makrofaj inflamatuvar protein-2 (MIP-2) |                                         |
| NF- $\kappa$ B                          |                                         |

Nukleer Faktor Kappa B (NF-  $\kappa$ B) iskemi/reperfüzyon da dâhil olmak üzere uyarının çeşidine göre inflamatuvar ve apoptotik genleri aktive eden çok önemli bir transkripsiyon faktörüdür. NF-  $\kappa$ B normalde inhibitör preoteinlere (I-  $\kappa$ B) bağlı olarak inaktif formda sitoplazmada bulunmaktadır. NF-  $\kappa$ B nin aktivasyonunda I-  $\kappa$ B dan dissosiasyonu en önemli basamaktır. NF-  $\kappa$ B nin klasik yoldaki aktivasyonu I-  $\kappa$ B kinaza bağlıdır. I-  $\kappa$ B kinaz I-  $\kappa$ B a bağlanarak inflamatuvar ve antiapoptotik genlerin transkripsiyonunu tetiklemektedir. Alternatif yolda ise farklı bir kinaza (IKK $\alpha$ ) bağlı olarak aktive olmaktadır. IKK $\alpha$  B hücre maturasyonunda ve lenfoid organ gelişiminde önemli bir rol oynadığı düşünülmektedir. Klasik yolağın I/R hasarına neden olan çeşitli sitokinlerin (IL-8) ve Toll-like reseptörlerin aktivasyonundan sorumlu olduğuna inanılmaktadır. İskelet kasları ve intestinal I/R üzerine yapılan çalışmalarda NF-  $\kappa$ B nin aktivasyonu bloke edildiğinde hasarın azaldığı gözlenmiştir. (1,6)

Karaciğer ve iskelete kasında gelişen iskemi/reperfüzyon hasarının lokal ve sistemik sitokinlerin seviyesinin artması ile oluşan lokal ve sistemik hasara bağlı olarak oluştuğu düşünülmektedir. TNF ve Makrofaj Inflamatuvar Protein-2 (MIP-2) seviyeleri iskemi/reperfüzyona maruz bırakılan alt ekstremelerde belirgin şekilde arttığı not edilmiştir. (7) Direk sitokin antagonistlerinin (reseptör antagonistleri ve antisitokin antikorları), metabolik kurtarıcı ajanların ve antiinflamatuvar moleküllerin; hayvanlara ekstremitte I/R

uygulandığında iskemik kas hasarını ve dokudaki proinflamatuvar sitokin seviyelerini düşürdüğü çalışmalarda gösterilmiştir.

### c) Serbest Oksijen radikalleri:

Serbest radikaller, dış yörüngelerinde eşleşmemiş bir elektron yer alan ve bu yapıları nedeniyle aşırı kararsız olduklarından, diğer kimyasallarla kolayca tepkimeye girmektedirler. (Tablo 2) Hücre içerisinde oluşma durumunda hücredeki çeşitli lipid ve proteinlere saldırarak yapılarını kararlı hale getirmeye çalışırlar. Bunu yaparak reaksiyona girdikleri moleküllerin de serbest radikallere dönüşmesine yol açarak hücredeki hasarın büyümesine neden olurlar. (1,3)

**Tablo 2:** Serbest Oksijen Radikalleri

| Serbest Oksijen Radikalleri: |                     |
|------------------------------|---------------------|
| Süperoksit Radikal           | ( O <sub>2</sub> -) |
| Hidroksil radikal            | ( OH-)              |
| Alkoksil radikal             | ( LO-)              |
| Peroksil radikal             | ( LOO-)             |

#### 4.1.5. Mitokondriyal hasar

Mitokondri hücredeki en büyük organeldir ve iç ve dış membranları ile iki büyük kompartmana sahiptir. Oksidatif fosforilizasyonla ilişkili proteinler elektron transport zincirinin dört multipl-subunit enzim kompleksini (Kompleks I; IV) ATP sentazı (KompleksV) ve adenin nükleotid translokatorunu içerir. Mitokondriyal membrandaki elektron akışı sayesinde adenosin difosfat (ADP) enerji üretiminde önemli bir rol oynayan adenosin trifosfata (ATP) dönüşür.

İskemiye maruz kalındığında mitokondriyal enzim kompleksleri bu durumdan etkilenir ve bütün elektron transportu durur. İskemik hasardan en çok etkilenenler ise Kompleks I ve III dur. Myokardiyal reperfüzyonda Kompleks I tamamen iyileşmez ve bu durum elektron kaçağına ve inefektif oksidatif fosforilizasyona neden olur. Elektron transport sisteminin ayrışması, iskemik oksidasyona ve sepsistekine benzer reaktif oksidan ürünlerin oluşmasına neden olur.

#### 4.1.6. Nitrik Oksit

Nitrik oksit sentetaz (NOS) enzimi ile endotelde sentezlenen serbest radikalden biridir. Üç farklı NOS enzimi vardır. Endotelial, nöronal ve enflamasyon veya enfeksiyon durumlarında sitokinler veya endotoksinler tarafından indüklenebilen NOS (iNOS)'dur. NO, süperoksit anyon radikali ile hızla reaksiyona girebildiğinden hücre koruyucusu olarak düşünülebilir. (6) Nitrik oksit vasküler tonusun fizyolojik düzenlemesi ve normal vasküler geçirgenliğin devamı, lökosit adezyonunun engellenmesi, trombosit agregasyonunun inhibisyonu, oksijen kaynaklı serbest radikallerin temizlenmesi, düz kas proliferasyonunun engellenmesi, immun savunmanın güçlendirilmesi, endotel hücrelerinin rejenerasyonu gibi birçok olayda etkili olmaktadır. (9) Ayrıca iskemik dokularda süperoksit dismutaz aktivitesini etkileyerek hidrojen peroksit birikimini azaltır (10) Fizyolojik derişimde üretilen NO, oksihemoglobin tarafından nitrata ( $\text{NO}_3^-$ ) oksitlenerek aktivitesi sonlandırılır.

Oksijen radikallerindeki durumun aksine, normal vasküler fizyolojide NO; vasküler düz kas hücrelerinin gevşemesine ve trombosit adezyon ve agregasyonunda inhibisyona neden olur. Diğer yandan lipid peroksit radikalleri ile reaksiyona girerek antioksidan ve antiaterosklerotik etki oluşturur. Süperoksit radikalleri ile etkileşimi, damar düz kas hücrelerinin proliferasyonunu inhibe etmesi, santral sinir sisteminde nörotransmitter görevi taşıması, vazodilatator tonusun devamlılığının sağlanması diğer önemli özelliklerindendir. Patolojik olaylarda ise; ödem oluşumunda, makrofajların antimikrobial ve tümorosidal aktivitelerinin düzenlenmesinde pro- ve anti-inflamatuvar ürünler gibi davranmaktadır. En sık olarak lipid yapılarla olmak üzere organizmada pek çok türde serbest radikal oluşabilir. Doymamış yağ asitlerinin açıl grubundan bir hidrojen çıkarsa lipid radikali meydana gelir. Oluşan lipid radikali oksijen ile reaksiyona girer ve lipid peroksit ( $\text{LOO}^-$ ) radikalini oluşturur. İskelet kası lipid radikallerinin en önemli kaynağıdır (11). Lipid peroksit radikali, diğer lipidlerle zincir reaksiyonu başlatır ve lipid hidroperoksitler ( $\text{LOOH}$ ) oluşur. Ortamda bulunan demir ve bakır iyonları lipid peroksidasyonunu hızlandırır. Lipid radikaller yüksek derecede sitotoksik ürünlere dönüşebilir. Bunlar arasında en çok bilinen ürün aldehid grubundan malondialdehittir (MDA). (12)

Neredeyse bütün cerrahi işlemler sırasında dokuların iskemisi ve sıklıkla bunu takip eden bir reperfüzyon periyodu bulunmaktadır. Daha önce de belirtildiği gibi iskemik dokuların reperfüzyonu, toksik serbest oksijen radikali (SOR) oluşumuna neden olmaktadır. Bunlar süperoksit anyonlar ( $\text{O}_2^-$ ), hidroksil radikalleri ( $\text{OH}^-$ ), hipoklorik asit ( $\text{HOCl}$ ),

hidrojen peroksit ( $H_2O_2$ ) ve nitrik oksitten derivate peroksinitrittir. Şiddetli iskemiye uğramış bir iskelet kasının reperfüzyonu  $K$ ,  $H$  iyonları ile lipid peroksidasyonu ürünlerinin serbestleşmesi sonucunda miyokardiyal, pulmoner ve renal fonksiyonlarında bozulmaya yol açabilir. Bu fonksiyon azalmaları reperfüzyon sendromu olarak bilinmektedir ve iskeminin tedavi edilmiş olmasına rağmen yüksek oranda mortalite ve morbiditeye katkıda bulunmaktadır. (6)

#### 4.1.7. Antioksidan Sistem

Serbest radikallerin zararlı etkilerine karşı organizmada koruyucu mekanizmalar vardır. Bu mekanizmaların bir kısmı serbest radikal oluşumunu engellemekteyken, bir kısmı ise oluşmuş serbest radikallerin zararlı etkilerini önlemektedir. Bu işlevi yapan maddelere “antioksidanlar” denilmektedir.

##### a) Endojen Antioksidanlar:

Endojen antioksidanlar, enzim yapısındakiler ve enzim yapısında olmayanlar olmak üzere iki sınıfa ayrılırlar.

##### i) Enzim yapısında olan endojen antioksidanlar;

- Katalaz
- Süperoksit dismutaz (SOD),
- Glutasyon peroksidaz (GSH-Px),
- Glutasyon S-Transferazlar (GST),
- Mitokondriyal sitokrom oksidaz sistemi,
- Hidroperoksidaz.

##### ii) Enzim olmayan endojen antioksidanlar;

- Albümin
- Bilirubin
- Melatonin
- Seruloplazmin,
- Transferin
- Miyogloblin
- Hemogloblin
- Ferritin

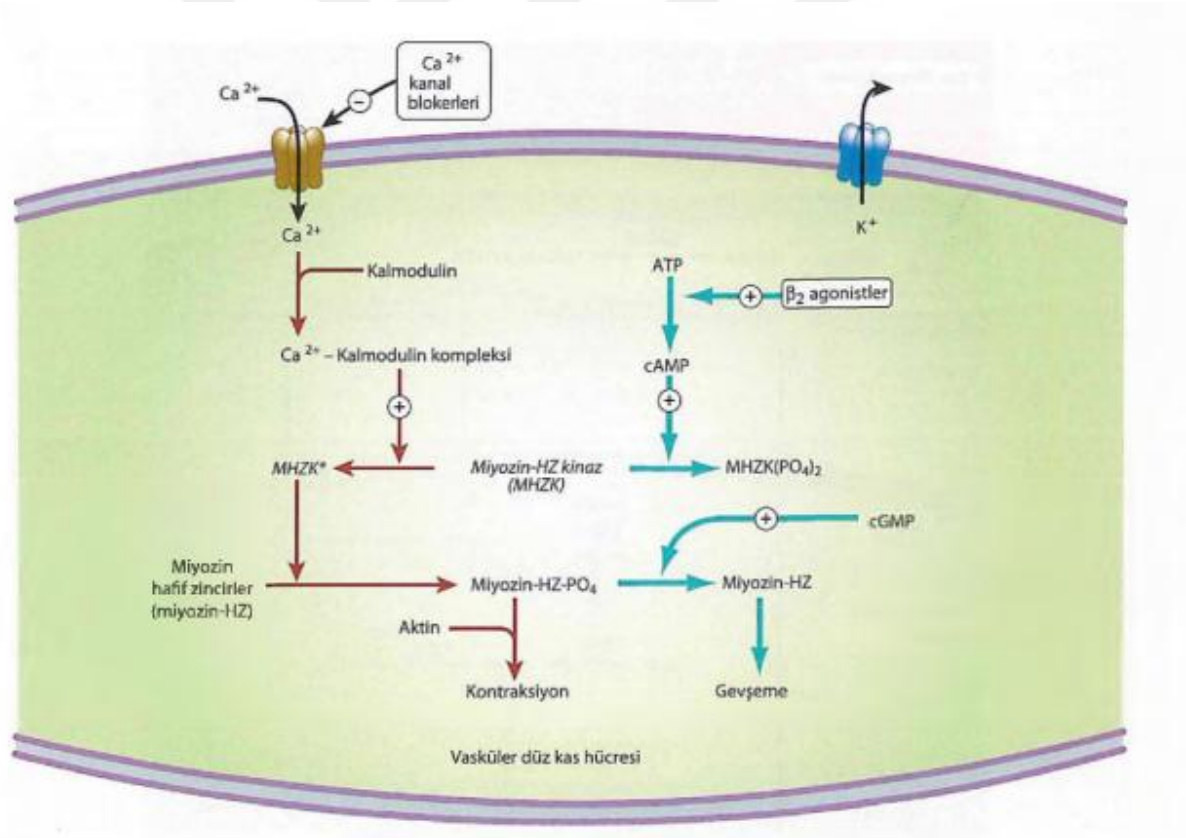
- Glutasyon
- Sistein,
- Metiyonin
- Ürat
- Laktoferrin
- Albümin

**b) Eksojen Antioksidanlar;**

Vitamin E,A,C, Folat ve demir şelatörleri örnek olarak verilebilir.

**4.1.8. Kalsiyum Kanal Blokerleri**

Kalsiyum kanal blokerleri, hücre içine kalsiyum girişini bloke ederler. Etkilerini genellikle düz kas ve miyokard hücreleri üzerinde gösterirler.



**Şekil 4:** Kalsiyum Kanal Blokerlerinin Etki Mekanizması ve Düz Kas Kontraksiyonunun Kontrolü(13)

**Kimyasal yapı bakımından üç ayrı grupta toplanırlar:**

1. Papaverin Grubu: Verapamil, Gallopamil, tiapamil
2. Benzotiazepin grubu: Diltiazem
3. Dihidropiridin grubu: Nifedipin, Nikardipin, nitrendipin, isradipin, amlodipin, felodipin, nimodipin, nisoldipin, niludipin

**Endikasyonları:**

- Hipertansiyon
- Angina pectoris
- Akut koroner sendrom
- Supraventriküler taşikardiler
- İdiopatik ventriküler taşikardi

**i) Farmakodinamik**

Düz kas ve kalp kası kasılması için membrandan kalsiyum girişinin gerekli olduğunun bilinmesi; kalp kası ve çeşitli dokulardaki kalsiyum kanalının keşfini beraberinde getirmiştir. Bu kanalların keşfi kalsiyum bloke edici ilaçların geliştirilmesini mümkün kılmıştır. (Tablo3) Kardiyovasküler hastalıklar için klinik kullanımda olan blokerler L-tipi kalsiyum kanalı blokerlerdir.

Voltaj kapılı L-tipi kalsiyum kanalı, kalp kasında ve düz kasta baskın olan tip olduğu ve çeşitli ilaç reseptörlerini içerdiği bilinmektedir.  $\alpha$ -1 (en büyük olanı, delik biçiminde alt ünite),  $\alpha$ -2,  $\beta$ ,  $\gamma$  ve 6 alt ünitelerinden oluşmaktadır. Nifedipin ve diğer dihidropiridinlerin  $\alpha$ -1 alt ünitesinin bir bölgesine bağladığı gösterilmişken, verapamil ve diltiazem, aynı alt ünitenin bir başka bölgesindeki, eş olmayan ama yakın ilişkili olan reseptörlerine bağlanmaktadır.

Bu ilaçlar membranın iç tarafında etki göstermekte ve inaktive kanallara daha etkin bağlanmaktadır. İlacın bağlanması, depolarizasyon yanıtı oluşturarak kanalın açılma sıklığını azaltır. Sonuç olarak, transmembran kalsiyum akışında belirgin azalma oluşur. Bu da düz kasta uzun süreli gevşeme (Şekil 4), kalp kasında ise kasılmada azalma, sinüs düğümü pacemaker hızında düşme ve atriyoventriküler düğümde ileti hızında azalma ile sonuçlanır. (13)

**Tablo 3:** Kalsiyum Kanal Blokerleri

| ILAC        | ORAL<br>BIYOYARARLANIM (%) | YARI OMUR<br>(saat) | ENDİKASYON                                  |
|-------------|----------------------------|---------------------|---------------------------------------------|
| Amlodipin   | 65-90                      | 30-50               | Angina, Hipertansiyon                       |
| Felodipin   | 15-20                      | 11-16               | Hipertansiyon,<br>Reynaud Fenomeni          |
| Isradipin   | 15-25                      | 8                   | Hipertansiyon                               |
| Nikardipin  | 35                         | 2-4                 | Angina, Hipertansiyon                       |
| Nifedipin   | 45-70                      | 4                   | Angina, Hipertansiyon<<br>Reynaud fenomeni  |
| Nisoldipin  | <10                        | 6-12                | Hipertansiyon                               |
| Nitrendipin | 10-30                      | 5-12                | Arastirmada                                 |
| Diltizem    | 40-65                      | 3-4                 | Angina, Hipertansiyon,<br>Reynaud fenomeni  |
| Verapamil   | 20-35                      | 6                   | Angina, Hipertansiyon,<br>Aritmiler, Migren |

## ii) Kalsiyum Kanal Blokerlerinin Organlar Üzerindeki Etkileri

### 1. Düz kas:

Düz kasın birçok tipi dinlenme tonusu ve kasılma yanıtı için transmembran kalsiyum girişine bağımlıdır. Bu hücreler kalsiyum kanal blokerleri ile gevşer (Şekil 4). Vasküler düz kas bu yanıtı en hassas olmakla birlikte benzer gevşeme bronşiyoller, gastrointestinal ve uterus düz kasında görülebilmektedir. Vasküler sistemde, arteriyoller venlerden daha hassastır, bu bağlamda ortostatik hipotansiyon sık görülen bir istenmeyen etki değildir. Kan basıncı tüm kalsiyum kanal blokerleri ile düşürülebilir. Kadınlar erkeklere göre diltiazemin hipotansif etkisine daha duyarlı olabilirler (13). Periferik vasküler dirençteki azalma, efor anginası olan hastalarda, bu ilaçların yarar sağlayacağı mekanizmalardan biridir. Varyant angina hastalarında, koroner arter spazmın azaldığı bilinmektedir. Kalsiyum kanal blokerleri arasında vasküler seçicilikte önemli farklılıklar bulunmaktadır. Kalsiyum kanal blokerlerinin bir grubu olan dihidropiridinlerin, diltiazem ve verapamile göre, kardiyak etkileri ile ilişkili olarak daha yüksek oranda vasküler düz kas etkileri vardır. Verapamilin vazodilatasyon üzerine görece daha az etkisinin olması, vasküler düz kastaki potasyum kanallarının blokajı sonucu olabilir. Öte yandan dihidropiridinler farklı vasküler yataklarda potenslerine göre değişiklik gösterebilirler. Örnek olarak, nimodipinin özellikle serebral kan damarlarına selektif olduğu iddia edilmektedir, a l kanal alt ünitelerinin yapındaki ek varyantları bu değişiklikler için sorumlu olduğu düşünülmektedir. (13)

## 2. Kalp kası:

Kalp kası, normal fonksiyonunu gerçekleştirebilmesi için her aksiyon potansiyelinde kalsiyum girişine bağımlıdır. Sinoatriyal nodda uyarı üretimi ve atriyoventriküler nodda iletimi tüm kalsiyum kanal blokerleri tarafından azaltılabilir veya bloke edilebilir. Tüm kalp hücrelerinde eksitasyon-kontraksiyon eşleşmesi kalsiyum girişi gerektirmektedir, böylece bu ilaçlar doz bağımlı şekilde kardiyak kontraktiletiyi düşürürler. (13) Bazı vakalarda kardiyak output da azalabilir. Kalbin mekanik fonksiyonlarındaki bu azalma, kalsiyum kanal blokerlerinin, anginası olan hastalarda oksijen gereksinimini azaltarak ağrıyı azaltmasını açıklayan bir mekanizmasıdır. Piyasada bulunan kalsiyum kanal blokerlerinin aralarındaki önemli değişiklikler onların kardiyak iyon kanalları ile etkileşim detaylarından, düz kas ve kalp kası etkileri arasındaki farklarından kaynaklanmaktadır. Verapamil ile sodyum kanal blokajı orta derecede, diltiazem ile daha az belirgindir. Nifedipin ve diğer dihidropiridinlerde ise önemsenecek derecededir.

## 3. İskelet kası

İskelet kası kalsiyum kanal blokerleri ile deprese olmaz bunun en önemli sebebi iskelet kası eksitasyon-kontraksiyon eşleşmesi için hücre içi kalsiyum havuzunu kullanması ve transmembran kalsiyum girişine gereksinim duymamasıdır.

## 4. Subaraknoid kanamayı takiben serebral vazospazm ve enfarkt

Dihidropiridin grubu kalsiyum kanal blokerlerinden nimodipin, serebral kan damarlarına yüksek afiniteye sahiptir ve subaraknoid kanamadan sonra morbiditeyi düşürdüğü düşünülmektedir. (13) Nikardipinin benzer etkileri vardır ve inme ile ilişkili serebral vazospazmı önlemek için intravenöz ve intraserebral arteriyel infüzyon ile kullanılır. Verapamil de vazoselektivite eksikliği dışında, inmede intaarteriyel yol ile kullanılır. Bazı kanıtlar kalsiyum kanal blokerlerinin ayrıca tromboembolik inmeden sonraki serebral hasarı ve enfarkt alanını da azaltabileceğini öne sürmektedir. (13)

## 5. Diğer etkiler:

Kalsiyum kanal blokerleri, değişik dokulardaki kalsiyum kanal tiplerindeki farkları nedeniyle, salgı bezlerindeki ve sinir uçlarındaki uyarı-sekresyon eşleşmesi ile minimal düzeyde etkileşir. Verapamilin insanlarda insülin salınımını inhibe ettiği gösterilmiştir, ancak angina ve diğer kardiyovasküler durumların tedavisinde kullanılandan daha yüksek dozlar gereklidir. (13) Önemli bir kısım kanıt öne sürmektedir ki, kalsiyum kanal blokerleri in vitro

olarak trombosit agregasyonu ile etkileşebilir ve hayvanlardaki ateromatöz lezyonların gelişimini engeller veya azaltır. Ancak, klinik çalışmalar insandaki kan pıhtılaşması ve aterosklerozdaki rolünü henüz saptamamıştır. Verapamilin kanser hücrelerinden (ve diğer hücrelerden) birçok yabancı ilacın taşınması ile sorumlu olan P-glikoproteini bloke ettiği gösterilmiştir (13) diğer kalsiyum kanal blokerleri benzer etki gösteriyor gibi görünmektedir. Verapamilin in vitro olarak kanser hücrelerinin birçok kemoterapötik ilaca karşı direncini kısmen geri çevirdiği gösterilmiştir. Hayvan çalışmaları, kalsiyum kanal blokerlerinin; osteoporoz, üreme bozuklukları, immün modülasyon ve hatta şistozomiyazis tedavisinde gelecekteki olası rollerini öne sürmektedir. (13)

### iii) Toksisite

Kalsiyum kanal blokerlerinin bilinen en önemli toksik etkileri, onların terapötik etkisi ile bağlantılıdır. Kalsiyum girişinin uzamış inhibisyonu; bradikardi, atriyoventriküler blok, kardiyak arrest ve kalp yetersizliği gibi ciddi kardiyak depresyona neden olabilir. Bu etkiler klinik kullanımda nadir görülmektedir. Yavaş salınlı ve uzun etkili dihidropiridin grubu kalsiyum kanal blokerleri genellikle iyi tolere edildiği bilinmektedir. Öte yandan dihidropiridinlerin, anjiyotensin dönüştürücü enzim (ACE) inhibitörleri ile kıyaslandığında, diyabeti olan veya olmayan hipertansiyon hastalarında, istenmeyen kardiyak olay riskini artırdığı saptanmıştır. Bu sonuçlar, çabuk salınlı nifedipin gibi görece kısa etkili kalsiyum kanal blokerlerinin, istenmeyen kardiyak olay riskini artırma potansiyeli olduğunu ve bunlardan kaçınılması gerektiğini ortaya koymaktadır. Minör yan etkileri ise flushing, baş dönmesi, bulantı, konstipasyon ve periferik ödemdir. Konstipasyon özellikle verapamil kullanımında sık rastlanmaktadır.

Kalsiyum kanal blokerleri miyokardiyal kontraktıl gücü düşürürler, bu da miyokardiyal oksijen gereksinimini azaltır. Arteriyel düz kastaki kalsiyum kanal blokajı, arteriyel ve intraventriküler basıncı azaltır. Bu özellikle periferik vazodilatasyona katkıda bulunabilen bir nonspesifik etkiye de sahiptir. Bu etkilerine bağlı olarak, sol ventrikül duvar gerimi azalır ve bu miyokardiyal oksijen gereksinimini düşürür. Verapamil veya diltiazem kullanımı ile azalan kalp hızı da miyokardiyal oksijen isteğinde daha fazla azalmaya yol açar. Kalsiyum kanal bloke edici ajanlar ayrıca, varyant angina fokal koroner arter spazmlarını rahatlatır ve önler. (13) Bu ajanların kullanımının, angina pectorisin en etkili profilaktik tedavisi olduğu anlaşılmaktadır. Temelde kalsiyum bağımlı yavaş yanıtı hücrelerden oluşan sinoatriyal ve atriyoventriküler nod dokuları; belirgin olarak verapamilden, orta derecede diltiazemden ve çok daha az olarak dihidropiridinlerden etkilenir. Bu nedenle, verapamil ve

diltiazem atriyoventriküler iletiyi azaltır ve supraventriküler reentry taşikardi tedavisinde ve atriyal fibrilasyon veya flutterda ventrikül yanıtlarını azaltmada çoğu kez etkilidir. (13) Nifedipin atriyoventriküler iletiyi etkilemez. Hipotansiyona yanıt olarak önemli refleks taşikardi çoğunlukla nifedipin ile daha az sıklıkla diltiazem ve verapamil ile oluşur. Farmakolojik etkilerdeki bu farklar, angina tedavisi için kalsiyum kanalı bloke edici ajanlar seçilirken değerlendirilmektedir.

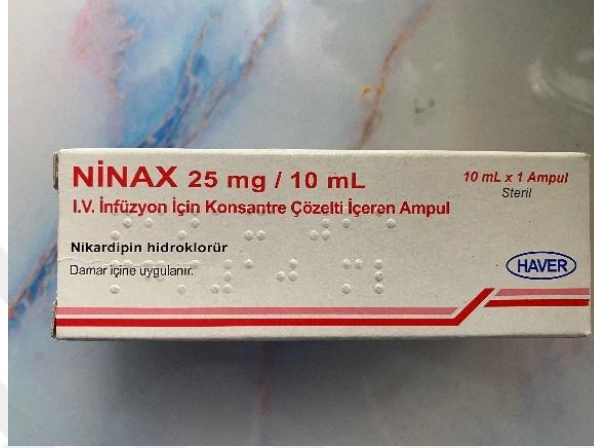
#### **iv) Klinik Kullanım**

Angina tedavisi ile beraber kalsiyum kanal blokerlerinin hipertansiyonda ve supraventriküler taşiaritmilerde kanıtlanmış etkinlikleri vardır. (13) Bunlar ayrıca, hipertrofik kardiyomiyopati, migren ve Raynoud fenomeni gibi türlü başka durumlarda da orta derecede etki gösterir. Kalsiyum kanal blokerlerinin spesifik etkileri bilinerek buna uygun olarak klinik kullanımı yapılmalıdır. Nifedipin atriyoventriküler iletiyi düşürmez ve bu nedenle atriyoventriküler iletim anormalliklerinde verapamil ve diltiazeme oranla daha güvenli olarak kullanılabilir. Verapamil veya diltiazemin  $\beta$  blokerler ile kombinasyonu, atriyoventriküler blok ve ventrikül fonksiyonunun depresyonuna neden olabilir. Kalp yetersizliği varlığında, tüm kalsiyum kanal blokerleri, negatif inotropik etkilerinin sonucunda, yetersizlikte daha da kötüleşmeye neden olabilir. Düşük kan basıncı olan hastalarda, dihidropiridinler basınçta daha fazla istenmeyen düşüşe neden olabilirler. Verapamil ve diltiazem daha az hipotansiyon yapmaları nedeniyle bu durumlarda daha iyi tolere edilebilirler. Atriyal taşikardi, flutter ve fibrilasyon hikâyesi olan hastalarda; verapamil ve diltiazem, antiaritmik etkileri nedeniyle klinik kullanımları daha sıktır. Dijital alan hastalarda verapamil yine dikkatli kullanılmalıdır, farmakokinetik etkileşim yoluyla digoksinin kan seviyelerini yükseltebilir. Stabil olmayan angina hastalarında, orta salınımlı kısa etkili kalsiyum kanal blokerleri istenmeyen kardiyak olay riskini artırabilirler ve bu nedenle kontraendikedirler. Ancak Q dalgasız miyokard enfarktüsünde, diltiazem MI sonrası angina sıklığını azalttığından kullanılmaktadır.

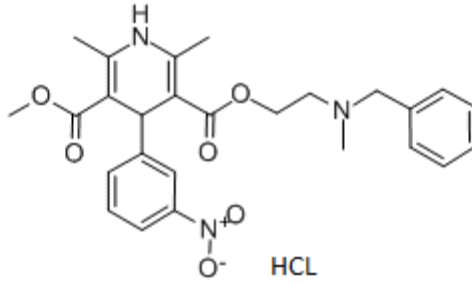
Sonuç olarak özetlemek gerekirse; kalsiyum kanal blokerleri hipertansiyon ve angina pectoris tedavisinde başlıca kullanılmaktadır. Verapamil ve diltiazem supraventriküler taşikardilerin ve bir grup idiyopatik ventriküler taşikardilerin kullanımında da yer almaktadırlar. Nifedipin plazma eliminasyon yarı ömrü kısa bir dihidropiridin türevi bir kalsiyum antagonistidir. Vasküler spesifitesinin daha fazla negatif inotropik etkisinin daha az olduğu iddia edilmektedir.

**v) Nikardipin:**

Bir dihidropiridin kalsiyum kanal blokeri olan Nikardipin, bir arteriyolar vazodilatördür. Kardiyak miyositlerine oranla vasküler düz kasta L-tipi kalsiyum kanalları için seçicidir. Nifedipine göre daha vazoselektif olması nedeniyle bu özelliği ile ondan ayrılır. Nikardipin koroner ve serebral vazodilatör aktiviteye sahiptir. (Sekil 5,6)



**Şekil 5:** Nikardipin preparatı



**Şekil 6:** Nikardipin klorür kimyasal formülü

**a) Farmakokinetik özelliği:**

İntravenöz uygulanan nikardipin, başlangıç süresinin 5-15 dakika arasında değiştiğini gösteren çalışmalarla hızla emilir ve geniş bir konsantrasyon aralığında insan plazmasında yüksek oranda proteine bağlanır. Sitokrom P450 3A4 tarafından metabolize edilir.

Klinik öncesi güvenlik verilerinde nikardipinin emziren hayvanların sütüne geçtiği gösterilmiştir. Bu ilacın hamileliğin son trimesterında yüksek dozda uygulandığı hayvan deneylerinde fetal ölümlerde artış, anomaliler, düşük doğum ağırlığı bildirilmiştir.

**b) Terapötik endikasyonları:**

- Malign arteriyel hipertansiyon / Hipertansif ensefalopati
- Aort diseksiyonu vakalarında kısa etkili beta bloker tedavisi uygun olmadığında veya tek başına beta blokajın etkili olmadığı durumlarda beta blokerle kombinasyon halinde
- Şiddetli preeklampside diğer intravenöz antihipertansif ajanlar önerilmediğinde veya kontrendike olduğunda
- Ameliyat sonrası hipertansiyon tedavisinde

**c) Kontrendikasyonları**

- Etkin maddeye veya yardımcı maddelerden herhangi birine aşırı duyarlılık
- Şiddetli aort darlığı
- Arteriyovenöz şant veya aort koarktasyonu durumunda
- Unstabil anjina
- Miyokard enfarktüsünden sonraki 8 gün içinde
- Nadir kalıtsal fruktoz intoleransı problemi olan hastalar

**d) Doz ayarlaması:**

Başlangıç dozu olarak tedaviye 15 dakika süreyle 3-5 mg / saat hızında sürekli nikardipin uygulamasıyla başlanmalıdır. Gereklik halinde her 15 dakikada bir 0,5 veya 1 mg'lık artışlarla artırılabilir. İnfüzyon hızı 15 mg / saati geçmemelidir. İdame dozu olarak ise hedef kan basıncına ulaşıldığı takdirde terapötik etkinliği sürdürmek için doz aşamalı olarak, genellikle 2 ila 4 mg / saate düşürülmelidir. Günde 3 dozda 60 mg / gün dozunda oral nikardipin 20 mg kapsüllere veya 2 günlük dozda 100 mg / gün dozda nikardipin 50 mg uzatılmış salımlı tabletlere geçiş yapılabilir. (13)

## 5. GEREÇ VE YÖNTEM

Bu çalışma, İstanbul Üniversitesi İstanbul Tıp Fakültesi Kalp ve Damar Cerrahisi, Tıbbi Biyokimya ve İstanbul Üniversitesi Onkoloji Enstitüsü Patoloji Anabilim Dalları tarafından Şubat-Haziran 2021 tarihleri arasında Bezmialem Vakıf Üniversitesi Deneysel Deney Hayvanları Laboratuvarı'nda yapıldı. Çalışma öncesinde, Bezmialem Vakıf Üniversitesi Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulunun (B.V.Ü. HADYEK), 22.02.2021 tarihli oturumunda onay alındı (Ek-1). Çalışma için İstanbul Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinasyon Birimi kapsamında destek sağlanmıştır (BAP Proje ID:37679).

### 5.1. Deney Hayvanları

Bu proje için ortalama ağırlıkları 200-350 gr olan toplam 24 adet erkek Wistar Albino cinsi sıçan kullanıldı. Sıçanlar rastgele ve kontrol grubu 6, hastalık 6 ve tedavi grubu 12 olmak üzere toplam 24 adet olacak şekilde dört gruba ayrıldı. Sıçanlar deney öncesi 7 gün süre ile tel kafeslerde 12 saat gündüz 12 saat gece sirkadyen ritimde, ortam sıcaklığı 24-26 santigrat derece ve nem oranı %50-60 olacak şekilde tutuldu. Sıçanların beslenmesinde standart ticari pellet yemi ve şehir içme suyu kullanıldı. Tüm sıçanların bakımları, Tıbbi Araştırmalar Ulusal Derneği tarafından biçimlendirilen 'Deney Hayvanlarının Bakım Prensipleri'ne ve Laboratuvar Hayvanı Kaynakları Enstitüsü tarafından yeniden düzenlenen 'Laboratuvar Hayvanlarının Bakım ve Kullanımı için Kılavuzu'na uygun olarak yapıldı.

### 5.2. Deney Modeli

Toplam 24 adet Wistar Albino sıçan 4 gruba ayrıldı.

*A Grubu:* Kontrol Grubu, 6 adet

*B Grubu:* Alt ekstremité iskemisine maruz bırakılıp, reperfüze edilen sıçan grubu, 6 adet

*C Grubu:* İşlemden 4 gün önce düşük doz Nikardipin (10 mg/ml) tedavisi başlandıktan sonra alt ekstremité iskemisine maruz bırakılan sıçan grubu, 6 adet

*D grubu:* İşlemden 4 gün önce yüksek doz Nikardipin (20 mg/ml) tedavisi başlandıktan sonra alt ekstremité iskemisine maruz bırakılan sıçan grubu, 6 adet



**Şekil 7:** hassas terazide sıçanların tartılması

### 5.3. Anestezi ve Cerrahi prosedür

Tüm sıçanlar deney öncesi hassas terazide tartılıp, ağırlıkları kayıt altına alındı. (Sekil7) İntraperitoneal 50-60 mg/kg ketamin hidroklorür (Ketalar®, Parke-Dawis, Pfizer İstanbul, Türkiye) ve 5 mg/kg ksilazin hidroklorür (Rompun®, Bayer AG, Leverkusen, Almanya) uygulaması sonrası anestezi derinliği her 15 dakikada bir, ekstremiteden ağrı verilerek değerlendirildi. Bu dozun 1/3'ü gerektiğinde intramuskuler olarak tekrarlandı. Cerrahi girişim, enjeksiyonlar ve kan alınması anestezi altında yapıldı. Anestezi süresince denekler, solunum desteğine ihtiyaç duymadan, oda havasında izlenip, cerrahi girişim deney sırasında gelişebilecek hipotermi'nin gelişmesini önlemek amacıyla, ısıtıcı lamba altında yapılmış ve vücut sıcaklığı rektal termometre ile ölçülerek 37°C civarında tutulmuştur.

Sıçanlar supin pozisyonda ameliyat masasına yatırıldı, (Sekil 10) Sonra karın orta hattı tıraş edildi (Sekil 9) ve operasyon bölgesi dezenfekte edildikten sonra median laparotomi insizyonu yapıldı. (Sekil 11)



**Şekil 8:** Nikardipinin intraperitoneal Olarak Uygulanması



**Şekil 9:** İşlem Öncesi Cerrahi Alanın Tıraşlanması



**Şekil 10:** Sıçanların Supin Pozisyonunda Ameliyat Masasına Alınması

Grup A'daki sıçanlara A grubunda bulunan sıçanlar (kontrol grubu) anestezi verilerek sadece deri altı kesi + laparotomi insizyonu yapıldı. Hayvanlar cerrahi stres altında bırakıldıktan sonra laparotomi, cilt ve ciltaltı insizyonları kapatıldı ve cerrahi stres sonrası sakrifiye edildi.

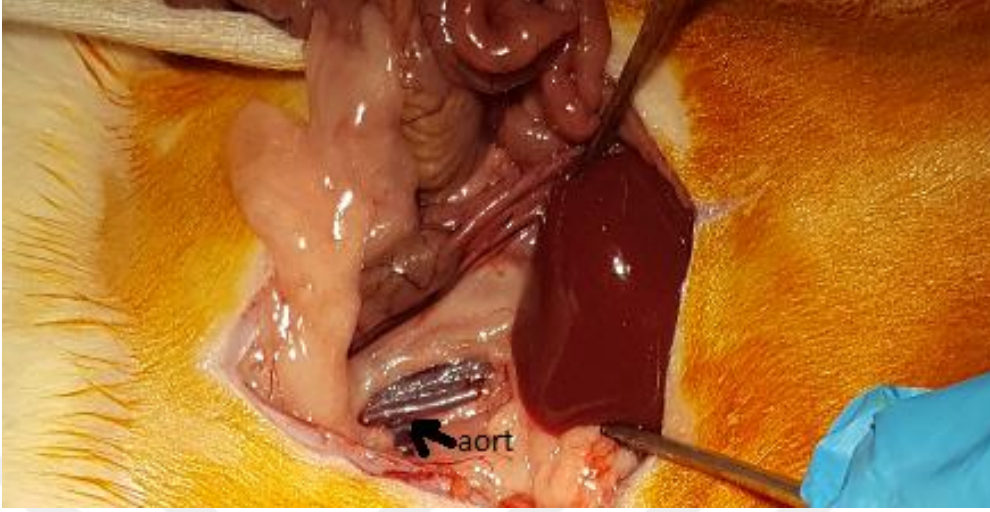
B grubunda bulunan sıçanlara yüzeysel mikrodiseksiyon yapıldıktan sonra derin mikrodiseksiyon ile retroperitoneal bölgede infrarenal abdominal aorta bulundu, serbestleştirildi ve ipek sütür ile döndü. (Şekil 13) (iskemi-reperfüzyon grubu) İnfrarenal abdominal aortaları 60 dk süreyle klempe edilerek alt ekstremitelerde iskemi oluşturuldu. (Şekil 14) Sonra klempler kaldırılarak 120 dakika süre ile reperfüzyon gerçekleştirildi. Aortik iskemi; klempleme işlemi sırasında distal aortada pulsasyonun kaybolmasıyla, aortik reperfüzyon ise; klempin kaldırılması sonrası distal aortada pulsasyonun yeniden görülmesiyle onaylandı. Klemp konulması ve kaldırılması sonrası dönemlerinde, peritoneal boşluğa serum fizyolojik uygulanıp, batın insizyonu geçici olarak kapatıldı. (Şekil 15) Sıçanlar reperfüzyon sonrası sakrifiye edildi.

C grubunda bulunan sıçanlara (düşük doz nikardipin+iskemi-reperfüzyon grubu) işlem öncesi intraperitoneal yolla 10 mg/ml dozda nikardipin (Ninax®,Haver Pharma İlaç, Eczacıbaşı, İstanbul, Türkiye) 4 gün boyunca her gün tek doz olarak uygulandı. Son dozu işlem öncesi verildi. Sıçanların anestezi sonrası infrarenal abdominal aortaları 60 dk süreyle klempe edilerek alt ekstremitelerde iskemi oluşturulup klempler kaldırılarak 120 dakika süre ile reperfüzyon gerçekleştirildi.

D grubunda bulunan sıçanlara (yüksek doz nikardipin+iskemi-reperfüzyon grubu) işlem öncesi intraperitoneal yolla 20 mg/ml dozda nikardipin (Ninax®,Haver Pharma İlaç, Eczacıbaşı, İstanbul, Türkiye) 4 gün boyunca her gün tek doz olarak uygulandı. Son dozu işlem öncesi verildi. Sıçanların anestezi sonrası infrarenal abdominal aortaları 60 dk süreyle klempe edilerek alt ekstremitelerde iskemi oluşturulup klempler kaldırılarak 120 dakika süre ile reperfüzyon gerçekleştirildi. Sıçanlar reperfüzyon sonrası sakrifiye edildi. Tüm gruplarda bulunan sıçanların sakrifiye edilmesinden sonra uygun kan örnekleri alındı. Quadriceps kas dokusu ve aort dokusu patolojik değerlendirme için çıkarıldı, formol solüsyonunda bekletildi. Serum eldesi için kan örnekleri 4000 rpm’de 10 dakika santrifüj edildi.



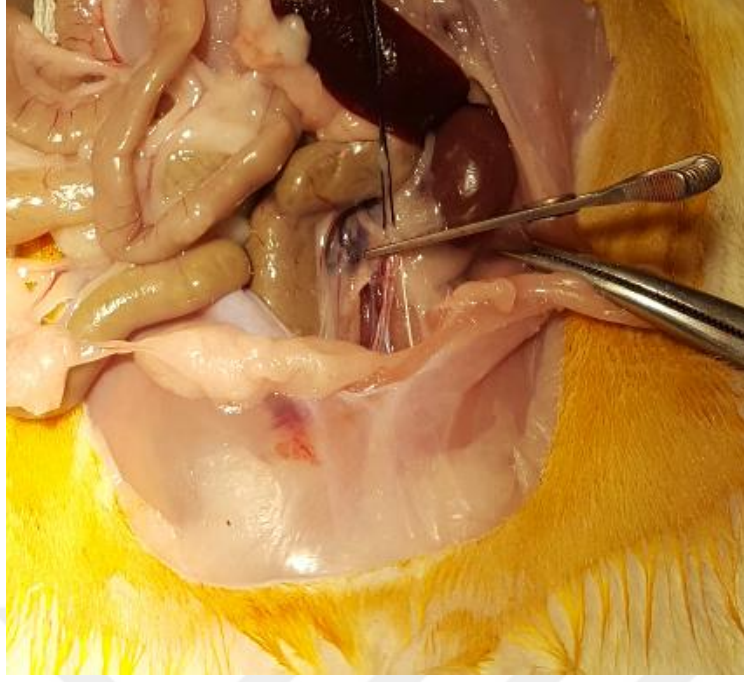
**Şekil 11:** Cerrahi alanın hazırlanması



**Şekil 12: Infrarenal Abdominal Aortun Bulunması**



**Şekil 13: Aortun İpek Suture ile Dönülmesi**



**Şekil 14:** İpek Suture ile Dönülmüş Aortun Atravmatik Klemplenmesi



**Şekil 15:** Cerrahin Alanın Kapatılıp 60 dak İskemi Süresinin Beklenmesi

## 5.4. Biyokimyasal İncelemeler

### 5.4.1. Gereçler

- a. Spektrofotometre (Ultrospec 2000 / Pharmacia Biotech)
- b. Mikrosantrifüj (Biofuge / Heraeus Instruments)
- c. Masaüstü soğutmalı santrifüj (Megafuge 1.0 R / Heraeus Instruments)
- d. Thermo Electron Corporation Fluoroskan Ascent FL
- e. pH metre (HI 9321 microprocessor pH meter)
- f. Su banyosu (Electromag)
- g. Vorteks (Ika MS2 Minishaker)
- h. Manyetik karıştırıcı ve ısıtıcı (Ika Labortechnik)
- i. Hassas terazi (AND HR-120)
- j. ELISA mikropłaka okuyucusu (Bio-tek Elx-800 ve  $\mu$ Quant)
- k. Pipet takımı (Eppendorf)

### 5.4.2. Kullanılan Kimyasal Malzemeler

1. Sodyumdodesil sülfat (SDS)
2. Sodyum hidroksit
3. Sodyum klorür
4. 5,5'-Dithio-bis 2-nitrobenzoikasid (DTNB)
5. Triklorasetik asit
6. Tiyoobarbitürik asit
7. Hidroklorik asit
8. 1,1,3,3-tetraetoksipropan (TEP) standardı
9. Potasyum fosfat
10. Riboflavin
11. o-dianisidin
12. SOD standardı (100 IU/ml)
13. Sodyum azid
14. NADPH
15. Glutasyon
16. Glutasyon redüktaz
17. .Kumen hidroperoksit
18. Hidrojen peroksit

19. Glasiyal metafosforik asit
20. Absolü metanol
21. 100 mM Tea-Dea Tamponu Trietanolamin-dietanolamin (pH 7.4)
22. 7.5 mM NADH
23. 100mM/50mM EDTA/MnCl<sub>2</sub>
24. Amonyum Molibdat

#### 5.4.3. Serumda yapılan incelemeler

**ROS ölçümü (14)** Bu metod 2,7-diklorodihidrofloresein diasetat (DCFH-DA)'ın esterazlar ile 2,7-diklorodihidrofloresein (DCFH)'e dönüşmesi ve oluşan bu ürünün ortamdaki ROS tarafından floresans veren 2,7-diklorofloresein (DCF)'e oksitlenmesi prensibine dayanır.

##### Ayırıcılar:

- Tamponlanmış tuzlu su (PBS) (pH: 7.4): 17.6 mL 0.5 M KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> ve 60.8 mL K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> karıştırıldı, pH'sı 7.4'e ayarlanarak distile su ile 1000 mL'ye tamamlandı (0.05 M fosfat tamponu). Bundan 100 mL alındı ve üzerine 1000 mL % 0.9 NaCl eklenerek PBS hazırlandı.
- DCFH-DA: 5 mM'lık ana çözelti % 99 DMSO ile hazırlandı ve -20°C'de saklandı. Çalışma öncesi 1 mM olacak şekilde PBS ile sulandırıldı.

##### İşlem:

0.2 mL 10 kez sulandırılmış serum örneği alındı. Üzerine 0.02 mL 1mM DCFH-DA çözeltisi eklendi. Çalkalayıcı su banyosunda 37°C'de 30 dakika inkübe edildi. Ayrıca deney körü hazırlamak için, aynı miktar sulandırılmış serum üzerine 0.02 mL PBS eklendi ve aynı koşullarda inkübe edildi. Süre bitiminde deney körü ile deney tüplerinden alınan 0.2 mL'lik örnekler koyu renkli mikropilaka kuyucuklarına pipetlendi ve hızla florometrik mikropilaka okuyucuda ( $\lambda_{\text{eksitasyon}}$ :485 nm,  $\lambda_{\text{emisyon}}$ :538 nm) okundu (Thermo Electron Corporation Fluoroskan Ascent FL). Sonuçlar rölatif floresan ünite (RFU) olarak verildi.

**MDA düzeyleri tayini (15):** Tiyobarbitürik (TBA) asit kullanılarak asit ortamda TBA ile MDA'nın oluşturduğu kompleks spektrofotometrik olarak ölçüldü.

##### Ayırıcılar:

- Buege-Aust ayırıcı: 375 mg TBA bir miktar distile suda eritildi. Üzerine 15 mL %100'lük triklorasetik asit ve 2.1 mL derişik hidroklorik asit (HCl) eklendi, karıştırıldı ve hafifçe ısıtılarak çözüldükten sonra distile su ile 100 mL'ye tamamlandı.

- 1,1,3,3-tetraetoksipropan (TEP) standardı: 22 mg TEP 10 mL distile suda çözünerek 10 mM'lık ana standart hazırlandı. Daha sonra bu ana standart 1000 kez sulandırılarak 10  $\mu$ M'lık çalışma standardı hazırlandı.

#### **İşlem:**

0.5 mL serum üzerine 0.50 mL PBS ve 2 mL Buege-Aust ayırıcı eklendi. Kaynar su banyosunda 15 dakika tutuldu. Soğuduktan sonra 3000 rpm'de 10 dakika santrifüj edilerek elde edilen süpernatantın absorbansı köre karşı okundu. Ayrıca kör ve standart tüpler hazırlandı. Sonuçlar ekstinksiyon katsayısı ( $\epsilon=1,56 \times 10^{-5} \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ ) ve standardın absorbansı değerlendirilerek hesaplandı.

**AOPP düzeyleri tayini (16):** Başlıca ditirozin içeren çapraz bağlı protein ürünleri olan AOPP tayini için serum örneklerinin sitrik asit içeren asit ortamda verdiği absorbanslar 340 nm.'de okundu. Sonuçlar kloramin-T ile potasyum iyodürün (KI) oksidasyonu ile oluşan triiyodid ile standardize edilerek karşılaştırıldı.

#### **Ayırıcılar:**

- 0.2 M sitrik asit
- 1.16 M KI
- Kloramin-T stok standardı (100 mM): 227.6 mg kloramin-T 10 mL'de çözüldü ve sulandırılarak 25, 50 ve 100  $\mu$ M'lık çalışma standartları hazırlandı.

#### **İşlem:**

Mikroplaka kuyucuklarına 0.04 mL serum ve 0.16 mL 0.2 M sitrik asit konuldu (deney). Ayrıca 0.190 mL 0.2 M sitrik asit ve 0.01 mL 1.16 M potasyum iyodür içeren (kör) ve 0.190  $\mu$ L kloramin-T (25, 50 ve 100  $\mu$ M; 0.2 M sitrik asitte hazırlandı) ve 0.01 mL 1.16 M KI içeren (standart) kuyucuklar hazırlandı ve 2 dakika sonra kör tüpe karşı deney ve standardın absorbansları 340 nm'de  $\mu$ Quant mikroplaka okuyucuda belirlendi. Sonuçlar  $\mu$ mol/L kloramin-T eşdeğeri olarak verildi.

#### **Total SH düzeyleri tayini (17):**

Plazma total tiyol seviyesi glutatyon, sistein, albümin ve diğer protein yapılarıdaki SH grupları tarafından oluşturulmaktadır. Bu tiyol grupları vücudu oksidatif strese korumaya çalışan doğal antioksidanlardır ve oksidatif stresin değerlendirilmesinde kullanılmaktadır. -SH grupları DTNB reaktifi ile alkali ortamda kromojen bileşik meydana getirmektedir. Bu

bileşiğın 412 nm’de verdiğı absorbandsın örnek körüne karşı okunmasıyla total–SH düzeyi belirlenmektedir.

**İşlem:** İşlem aşağıda Tablo 3.4.3’te gösterildiğı gibi gerçekleştirildi. Her bir örnek için ayrı kör yapıldı. Tüm tüpler karıştırıldıktan sonra ağızları kapatıldı ve 15-20 dk oda sıcaklığında bekletildi. 3000 g’de 10 dk santrifüj edildi ve süpernatant 412 nm’de köre karşı okundu.

**Tablo 4:** Total SH düzeyleri tayini

| Tablo 4.İşlem  |        |         |
|----------------|--------|---------|
| Kör            | Deney  |         |
| Plazma         | 0,1 ml | 0,1 ml  |
| Tampon         | 0,3 ml | 0,3 ml  |
| DTNB           | -      | 0,02 ml |
| Absolü metanol | 1,6 ml | 1,58 ml |

**Ayıracılar:**

- 10 mM DTNB (5,5'-Dithio-bis 2-nitrobenzoikasıd): 4 mg DTNB 1 ml absolü metanolde çözöldü.
- 0,25 M Tris-HCl, 3mM EDTA tamponu (pH:8.2): 30,275 g Tris 7,445 g EDTA 800 ml distile suda çözölür HCl ile pH 8,2’ye ayarlanır ve 1 litreye tamamlanır.
- Absolü metanol

**Hesap:** Sonuçların hesaplanmasında ekstinksiyon katsayısı ( $\epsilon = 13,6 \times 10^3 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ ) kullanıldı. Sonuçlar  $\mu\text{mol/ml}$  serum olarak verildi.

**Antioksidan kapasite (Ferric Reducing Antioxidant Power; FRAP) (18):** Bu yöntemin prensibi  $\text{Fe}^{+3}$ ’ü  $\text{Fe}^{+2}$ ’ye indirgeyen antioksidan gücün ölçölmesine dayanır. Sonuçlar askorbik asidin indirgeme potansiyeli ile karşılaştırarak hesaplandı.

**Ayıracılar:**

- 40 mM HCl
- 300 mM Asetat tamponu (pH 3.6): 3.1 g Na-asetat ( $3\text{H}_2\text{O}$ ) 100 mL kadar distile suda eritildi, 16 mL asetik asit eklendi ve ayıracın pH’ı 3.6’ya ayarlandı ve distile su ile litreye tamamlandı.

- 10 mM 2,4,6-tripridil-s-triazin (TPTZ): 31.2 mg TPTZ tartıldı ve 10 mL 40 mM HCl'de eritildi.
- 20 mM FeCl<sub>3</sub> (6H<sub>2</sub>O): 54 mg FeCl<sub>3</sub> (6H<sub>2</sub>O) 10 mL distile suda çözündü.
- Askorbik asit standartları: 500 ve 1000 µM (sudaki çözelti)
- FRAP ayırıcı: Asetat tamponu, TPTZ ve FeCl<sub>3</sub> ayıraçları sırası ile 10:1:1 olacak şekilde karıştırılarak hazırlandı.

#### **İşlem:**

Mikroplaka kuyucuklarına 0.01 mL serum ve 0.3 mL FRAP çalışma ayırıcı konuldu, 37°C'de 4 dakika inkübe edildikten sonra mikroplaka okuyucuda 593 nm'de absorbanlar okundu. Ayrıca 0.01 mL askorbik asit (500 ve 1000 µM) ve 0.2 mL FRAP çalışma ayırıcı içeren standartlar hazırlandı. 1 mM askorbik asidin FRAP değeri 2000 olarak kabul edilerek sonuçlar µM olarak verildi.

**SOD aktivitesinin ölçümü (19)** Bu reaksiyonun prensibi süperoksit radikali aracılığı ile NDH in oksidasyonuna dayanır. EDTA, Mn, merkapttoetanolün uygun konsantrasyonlarında koenzim oksidasyonu meydana gelir.

#### **Ayıraçlar:**

- 100 mM Tea-Dea Tamponu Trietanolamin-dietanolamin (pH 7.4)
- 7.5 mM NADH
- 100mM/50mM EDTA/MnCl<sub>2</sub>
- SOD (100 IU/mL) standardı: Sigma firmasından sağlanan SOD standardı 100 IU/mL olacak şekilde soğuk distile su ile sulandırıldı. Daha sonra bu ana standarttan deney ortamında 1 ve 0,5 IU SOD standardının bulunması sağlandı.
- 10mM Merkapttoetanol

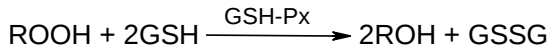
#### **İşlem:**

**Tablo 5:** SOD aktivitesinin ölçümü

| <b>Tablo 5. İşlem</b> |            |                 |              |
|-----------------------|------------|-----------------|--------------|
|                       | <b>Kör</b> | <b>Standart</b> | <b>Deney</b> |
| <b>Havuz</b>          | 0,865 mL   | 0,865 mL        | 0,865 mL     |
| <b>Standart</b>       |            | 0,100 mL        |              |
| <b>Serum örneği</b>   |            |                 | 0,100 mL     |
| <b>Merkaptoetanol</b> | 0,100 mL   | 0,100 mL        | 0,100 mL     |

340 nm de absorbans değişimi takip edildi. Sonuçlar IU/ml olarak verildi.

**GSH-Px aktivitesinin ölçülmesi (20)** GSH-Px aktivite tayini birbirini izleyen iki reaksiyona dayanır. Birinci reaksiyonda  $H_2O_2$  veya organik hidroperoksitler (ROOH), GSH-Px etkisi ile indirgenirken, ortamdaki GSH oksitlenmiş GSH'a (GSSG) dönüşür. İkinci reaksiyonda GSSG, GSH- redüktaz (GSH-R) etkisi ile tekrar GSH'a, NADPH ise  $NADP^+$ ye oksitlenmektedir. Bu dönüşüm 340 nm'de absorbandsda azalma olarak izlenir, NADPH 340 nm'de bir absorbans verdiği halde,  $NADP^+$  bu dalga boyunda absorbans vermemektedir.



#### **İşlem:**

GSH-Px aktivitesi, 1 mL'lik hacimde son konsantrasyonlar 50 mM potasyum fosfat tamponu (pH 7.0), 1 mM EDTA, 1 mM sodyum azid, 0.2 mM NADPH, 1 mM GSH, 0.5 IU/mL glutatyon redüktaz (GSH-R), 1.2 mM kumen hidroperoksit ve enzim kaynağı içerecek şekilde hazırlanmış ortamda 37°C'de tayin edilmektedir.

Bu amaçla 20 mL potasyum fosfattamponu (125 mM, pH 7.0), 2.5 mL sodyum azid (130 mg/dl), 2.5 mL  $Na_2$ -EDTA (744 mg/dL), 5 mL NADPH (8.3 mg/5 mL), GSH (15.3 mg/5 mL) içeren bir havuz hazırlandı ve bu havuzdan 0.14 mL alınarak üzerine 0.02 mL GSH-Re (0.5 IU) ve 0.02 mL 10 kez sulu serum örneği eklendi. Daha sonra 0.02 mL 12 mM kumen hidroperoksit ilavesi ile reaksiyon başlatıldı ve absorbans azalması 340 nm'de izlendi.

Sonuçlar NADPH'in ekstinksiyon katsayısı olan  $6.22 \times 10^3 \text{ M}^{-1} \times \text{cm}^{-1}$ 'den yararlanılarak hesaplandı ve nmol NADPH /dakika/ml olarak belirtildi.

#### **Katalaz aktivitesinin ölçülmesi (21):**

$\text{H}_2 \text{O}_2$  in amonyum molibdatla stabil bir kompleks oluşturması esasına dayanır. Önce serum  $\text{H}_2 \text{O}_2$  ile inkübe edilir. Katalaz  $\text{H}_2 \text{O}_2$  in dekompozisyonuna neden olur. Reaksiyon amonyum molibdat ile durdurulur ve residüel  $\text{H}_2 \text{O}_2$  amonyum molibdat ile sarı renkli bir kompleks oluşturur. Bu kompleks 405 nm de okunur.

#### **Ayırıcılar:**

60 mM Sodyum-potasyum fosfat tamponu pH:7.4

65 mM Hidrojen peroksit

32.4 mM Amonyum Molibdat

**Tablo 6:** Katalaz aktivitesinin ölçümü

|          | Blank 2 | Blank3   | Deney   |          | Blank1  |
|----------|---------|----------|---------|----------|---------|
| Serum    |         |          | 0,01 mL | Substrat | 0,1 mL  |
| Substrat | 0,1 mL  |          | 0,1 mL  | Molibdat | 0,1 mL  |
| Tampon   | 0,02 mL | 0,120 mL | 0,01 mL | Serum    | 0,01 mL |
| Molibdat | 0,1 mL  | 0,1 mL   | 0,1 mL  |          |         |
|          |         |          |         |          |         |

405 nm de okunur. Sonuçlar kUL olarak verildi.

#### **5.4.4 Elisa çalışmasında kullanılan malzemeler**

1. MPO ELISA kiti MyBiosource marka
2. MAPK ELISA kiti MyBiosource marka
3. STAT 1 ELISA kiti MyBiosource marka

#### a) Serum MPO Düzeyinin Ölçülmesi

Serum örneklerinin MPO düzeyleri İstanbul Tıp Fakültesi Biyokimya Anabilim Dalında sandviç ELISA prensibine dayanan MyBiosource marka (San Diego, USA, katalog no: MBS265515) ticari kitler ile Eon-Biotek marka (Winooski/USA) mikrolaka spektrofotometre cihazında ölçülmüştür. Sonuçlar ng/ml olarak verilmiştir. Kullanılan ticari kit için üretici firma tarafından sensitivite 0,5 ng/ml, intra assay:CV: <8% ve inter assay CV: < 12% olarak bildirilmektedir.

#### b) MAPK Düzeyinin Ölçülmesi

Serum örneklerinin MAPK düzeyleri İstanbul Tıp Fakültesi Biyokimya Anabilim Dalında sandviç ELISA prensibine dayanan MyBiosource marka (San Diego, USA, katalog no: MBS267271) ticari kitler ile Eon-Biotek marka (Winooski/USA) mikrolaka spektrofotometre cihazında ölçülmüştür. Sonuçlar ng/mL olarak verilmiştir. Kullanılan ticari kit için üretici firma tarafından sensitivite 0,05 ng/ml, intra assay:CV: <8% ve inter assay CV: < 12% olarak bildirilmektedir.

#### c) STAT 1 Düzeyinin Ölçülmesi

Serum örneklerinde STAT1 düzeyi İstanbul Tıp Fakültesi Biyokimya Anabilim Dalında sandviç ELISA prensibine dayanan MyBiosource marka (San Diego, USA, katalog no: MBS2703652) ticari kitler ile Eon-Biotek marka (Winooski/USA) mikrolaka spektrofotometre cihazında ölçülmüştür. Sonuçlar ng/mL olarak verilmiştir. Kullanılan ticari kit için üretici firma tarafından sensitivite 0.117 ng/mL, intra assay:CV: < 10% ve inter assay CV: < 12 % olarak bildirilmektedir.

#### Yöntemin prensibi

Yöntem, ELISA prensibine dayanmaktadır. Bu yöntemde ilgili parametrelere özgü spesifik antikorla kaplanmış kuyucuklar kullanılmaktadır. Hasta örneklerinde bulunan analit, kuyucuklardaki spesifik antikorlara bağlanır. Daha sonra biotinle işaretlenmiş antikor eklenir ve analite bağlanır. Böylece antikor-antijen-antikor sandviç kompleksi oluşur. Streptavidin-HRP işaretli antikorlar ortama eklenir ve biotinle işaretlenmiş olan antikorlara bağlanır. Kuluçka süresinden sonra yıkama yapılarak ortamdaki bağlanmamış Streptavidin-HRP uzaklaştırılır. Ortama HRP substratı eklenir. Gerçekleşen enzimatik reaksiyon sonucu oluşan renkli ürün miktarı örnekteki analit yoğunluğu ile doğru orantılıdır. Asidik durdurma çözeltisi eklenerek reaksiyon durdurulur. 450nm’de absorbans değerleri ölçülür.

### 5.5. Histolojik Analiz

#### 5.5.1. Doku takibi ve Hematoksilen-Eozin Boyama Prosedürü

Tüm gruplardaki sıçanlardan alınan aort ve çizgili kas dokuları %10’luk tamponlu formaldehit içinde 72 saat boyunca fiske edildi. İki saat boyunca akan su altında yıkandıktan

sonra doku örnekleri yarı otomatik Leica TP 1050 cihazında aşağıdaki sıra ile doku takibi gerçekleştirildi:

1. Distile suda 2 saat yıkama.
2. Dehidratasyon
  - a) %50 alkolde 2 saat bekletme.
  - b) %70 alkolde 1 saat bekletme.
  - c) %80 alkolde 1 saat bekletme.
  - d) %96 alkolde 1 saat bekletme
  - e) %100 alkolde 1 saat bekletme
  - f) %100 alkolde 1 saat bekletme.
3. Şeffaflaştırma
  - a) Ksilöl (15 dakika)
  - b) Ksilöl (15 dakika)
  - c) Ksilöl (15 dakika)
4. İnfiltrasyon
  - a) Parafin I (46-48 oC; 1 saat)
  - b) Parafin II (56- 58 oC; 2 saat)

İnfiltrasyon işleminden sonra, dokular manuel olarak eriyik parafin içinde bloklandı ve donmaya bırakıldı. Her bir bloktan 3 mikron kalınlığında kesitler, Leica RM 2145 mikrotom cihazı ile alındı. Histopatolojik değerlendirme yapmak için, Hematoksilen-Eozin boyama işlemi aşağıdaki şekilde gerçekleştirildi:

1. Ksilende 15 dak. bekletme
2. Ksilende 5 dak. bekletme
3. Ksilende 5 dak. bekletme
4. %100'lük Alkolde 5 dak. bekletme
5. %96'lık Alkolde 5 dak. bekletme

6. %80'lik Alkolde 5 dak. bekletme
7. %70'lik Alkolde 5 dak. bekletme
8. Çeşme suyunda 1 dak. yıkama
9. Hemotoksilen boyasında 2 dak. bekletme
10. Asit-Alkol içine daldırıp çıkarma
11. Eozin solüsyonunda 1 dak. bekletme
12. %96'lık Alkolde 5 dak. bekletme
13. %100'lük Alkolde 5 dak. bekletme
14. Üç farklı ksilen serisinde 5 dak. bekletme

Entellan ile kapatma işlemi gerçekleştirilen kesitler kurumaya bırakıldı. Boyanan doku kesitleri, üzerine kamera monte edilmiş Olympus BX60 (Olympus, Tokyo, Japan) marka ışık mikroskobunda incelendi ve fotoğrafları çekildi.

Aort dokularının incelenmesinde media tabakasındaki düz kas hücrelerinde fokal vakuolizasyon, yaygın vakuolizasyon, düz kas hücrelerinin seyirlerinde düzensizlik, dejenerasyon ve lamina elastika düzensizliği ve nekroz kriter olarak alındı. Her bir kritere 1 puan verilerek toplam skor elde edildi.

Çizgili kas incelemesinde ise

- 0- Normal
- 1- Fokal ödemli alanların bulunması
- 2- Yaygın ödem
- 3- Ödem ve iltihap hücresi infiltrasyonu
- 4- Nekroz ve yoğun iltihap

kriter olarak alındı ve değerlendirildi.

### **5.5.2. İmmunohistokimyasal Analizler**

İmmunohistokimyasal boyamalar, HIF-1Alfa, ICAM, VCAM, MMP-3, MMP-9 antikorlarının düzeyini ışık mikroskobik düzeyde incelemek amacıyla Ventana

BENCHMARK GX otomatik immünohistokimya boyama cihazında, aşağıda verilen protokole göre yapıldı.

1. 75 °C'de 4 dakika inkubasyon.
2. EZPRep 4 dakika uygulama.
3. Reaction buffer ile yıkama.
4. EZPRep'de 4 dakika inkubasyon.
5. Reaction buffer ile 1 kez yıkama.
6. EZPRep ile 4 dakika inkubasyon
7. Reaction buffer ile 1 kez yıkama.
8. 75 °C 4 dakika uygulama.
9. Reaction Buffer ile 1 kez yıkama.
10. CC 1, 95 °C , 8 dakika yıkama.
11. EZPrep / CC 1, 100 °C, 30 dakika uygulama.
12. EZPrep / CC 1, 100 °C ,60 dakika uygulama.
13. Reaction buffer ile 1 kez yıkama.
14. °C, 2 dakika inkubasyon.
15. Reaction buffer ile 1 kez yıkama.
16. UltraView inhibitor (3% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) ile 4 dakika inkubasyon.
17. Reaction buffer ile 1 kez yıkama.
18. 32 dakika antikor uygulaması.
19. Reaction Buffer ile 1 kez yıkama.
20. UV HRP, UNIV MULTI ile 8 dakika inkubasyon.
21. Reaction buffer ile 1 kez yıkama.
22. UV DAB ve UV DAB H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> ile 8 dakika muamele
23. Reaction buffer yıkama.

24. UV Copper ile 4 dakika inkubasyon.
25. Reaction buffer ile 1 kez yıkama.
26. Hematoksilen ile 8 dakika uygulama.
27. Reaction buffer ile 1 kez yıkama.
28. Bluing reagent ile 4 dakika inkubasyon.
29. Reaction buffer ile 1 kez yıkama. Bu aşamadan sonra cihazdan çıkarılan preparatlar aşağıdaki işlemlere tabi tutulur:
30. Deterjanlı su ile 2 kez yıkama.
31. Distile su ile 2 kez yıkama.
32. 100 'lük etanolden 2 kez geçirme.
33. Ksilenden 2 kez geçirme.
34. Entellan ile kapatma.

Bu amaçla kullanılacak olan Anti-HIF-1Alfa (Santa Cruz, 1 µg/ul, Kat No: SC-13515), Anti-ICAM-1 (Santa Cruz, 1 µg/ul, Kat No: SC-8439), Anti-VCAM-1 (Santa Cruz, 1 µg/ul, Kat No: SC18864), Anti-MMP-3 (Santa Cruz, 1 µg/ul, Kat No: SC-21732), Anti-MMP-9 (Santa Cruz, 1µg/ul, Kat No: SC393859), primer antikorları üreticinin önerdiği standart protokole uygun olarak dilüe edilerek uygulandı. İmmünohistokimyasal değerlendirmeler; bilgisayar destekli ve kamera ataçmanlı ışık mikroskobu (Olympus Bx60, Tokyo, Japan) altında değerlendirildi ve fotoğrafları çekildi.

## 5.6. İstatiksel İncelemeler

Çalışmada verilerin istatistiksel analizi için SPSS (Statistical Package for the Social Sciences) programının 21.0 versiyonu (IBM, Armonk, NY, USA) kullanıldı.

Çalışma verileri değerlendirilirken tanımlayıcı istatistiksel metotların (Ortalama, Standart Sapma, Medyan, Frekans, Oran, Minimum, Maksimum) yanı sıra verilerin dağılımı Levene's Testi ile değerlendirilmiştir. Niceliksel verilerin normal dağılım göstermeyen üç ve üzeri grubun karşılaştırmasında Kruskal-Wallis testi; normal dağılım göstermeyen iki grup karşılaştırmasında Mann-Whitney U Testi kullanıldı. Anlamlılık  $p < 0.05$  düzeylerinde değerlendirildi.

## 6. BULGULAR

### 6.1. Serumdan Elde edilen Bulgular

Çalışmamızda alt ekstremitede iskemi reperfüzyon modeli oluşturulan sıçanlara uygulanan Nikardipin tedavisinin serumdaki oksidan ve antioksidan göstergeler üzerindeki etkileri araştırıldı. Bu amaçla ROS, MDA, AOPP düzeyleri ile birlikte GSH ve FRAP, Total SH düzeyleri, SOD ve GSH-Px, Katalaz ve MPO aktiviteleri incelendi. Bununla beraber hangi yola ile etki ettiğini göstermek amacı ile MAPK ve STAT1 düzeyleri incelendi.

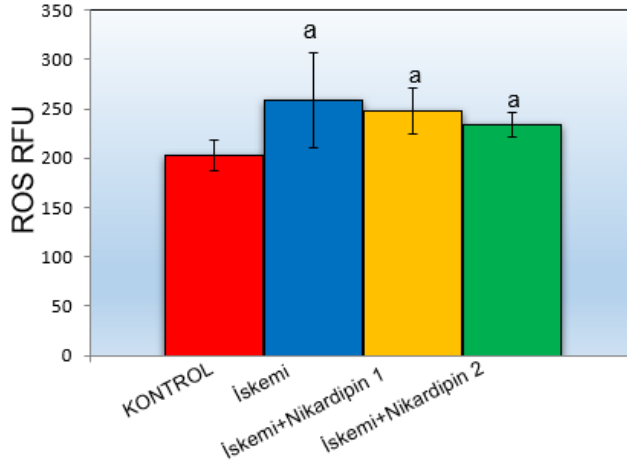
İskemi reperfüzyon modeli oluşturulan sıçanların serum ROS, MDA, Total SH düzeylerinde iskemi uygulamasıyla anlamlı bir artış oysa FRAP düzeylerinde anlamlı olarak azalma görüldü. AOPP düzeylerinde anlamlı bir değişiklik bulunmadı. Nikardipin 1 ve Nikardipin 2 uygulamasıyla MDA, düzeylerinde anlamlı olarak azalma görülürken ROS, Total SH ve AOPP düzeylerinde anlamlı olarak bir değişiklik görülmedi. FRAP düzeyleri ise anlamlı olarak azaldı (Tablo 7, Şekil 16,17,18,19,20).

**Tablo 7:** İskemi oluşturulan sıçanlarda Nikardipin uygulamasının serumda reaktif oksijen türleri (ROS), malondialdehit (MDA), proteinlerin ileri oksidasyon ürünleri (AOPP) ve antioksidan aktivite (FRAP) ve Total SH düzeyleri üzerine etkisi (Ortalama $\pm$ SD)

|                           | n | ROS<br>(RFU)                   | MDA<br>( $\mu$ mol/L)        | AOPP<br>( $\mu$ mol/L) | FRAP<br>( $\mu$ mol/L)        | Total SH<br>( $\mu$ mol/L)   |
|---------------------------|---|--------------------------------|------------------------------|------------------------|-------------------------------|------------------------------|
| <b>Kontrol</b>            | 6 | 203.2 $\pm$ 15.5               | 2.95 $\pm$ 0.67              | 146.0 $\pm$ 18.50      | 304.6 $\pm$ 79.5              | 19.6 $\pm$ 1.72              |
| <b>İskemi</b>             | 6 | 258.7 $\pm$ 48.7 <sup>a</sup>  | 4.41 $\pm$ 0.83 <sup>a</sup> | 137.7 $\pm$ 27.2       | 197.9 $\pm$ 34.0 <sup>a</sup> | 14.7 $\pm$ 1.60 <sup>a</sup> |
| <b>İskemi+Nikardipin1</b> | 6 | 247.9 $\pm$ 23.9 <sup>a</sup>  | 3.26 $\pm$ 0.58 <sup>b</sup> | 134.1 $\pm$ 14.6       | 259.5 $\pm$ 34.2 <sup>b</sup> | 11.4 $\pm$ 1.55 <sup>a</sup> |
| <b>İskemi+Nikardipin2</b> | 6 | 234.4 $\pm$ 12.34 <sup>a</sup> | 2.79 $\pm$ 0.31 <sup>b</sup> | 141.4 $\pm$ 14.8       | 288.6 $\pm$ 46.8 <sup>b</sup> | 12.3 $\pm$ 1.55 <sup>a</sup> |

<sup>a</sup> p<0.05 kontrol grubu ile; <sup>b</sup> p<0.05 iskemi grubu ile karşılaştırıldığında;

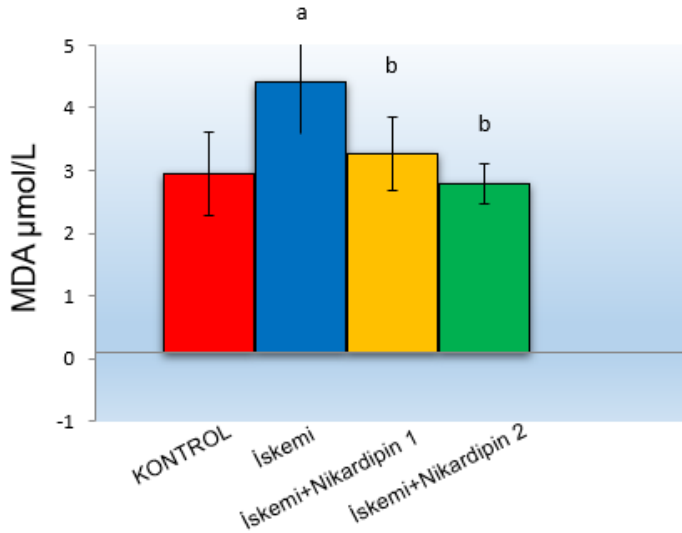
Gruplara göre ROS değerleri istatistiksel olarak anlamlı farklılık göstermektedir (p=0,016; p<0,05) Kontrol grubunun ROS değerinin iskemi+tedavi 1 ve iskemi+tedavi 2 değerlerine göre düşük olması istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur. Bu değer tedavi grubunda azalma göstermekle beraber istatistiksel olarak anlamlı bulunmamıştır.



<sup>a</sup> p<0.05 kontrol grubu ile; <sup>b</sup> p<0.05 iskemi grubu ile karşılaştırıldığında;

**Şekil 16:** İskemi ve Nikardipin tedavisi uygulanan sıçanlarda serum örneklerinde reaktif oksijen türleri (ROS) düzeyleri üzerine etkisi (Ortalama±SD)

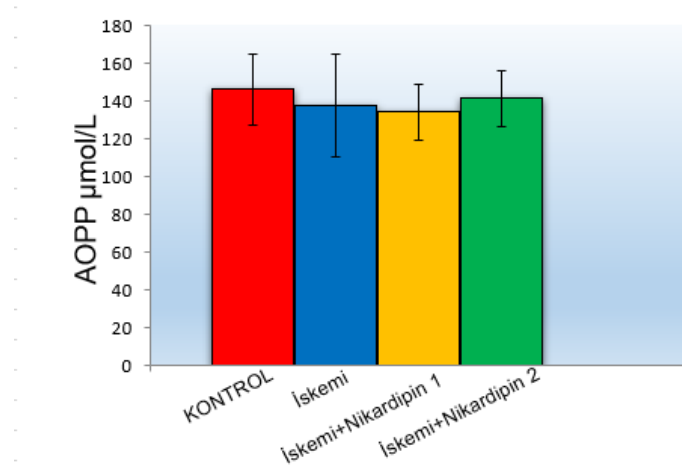
Gruplara göre MDA değerleri istatistiksel olarak anlamlı farklılık göstermektedir ( $p=0,019$ ;  $p<0,05$ ). İskemi grubunun MDA değerinin kontrol, iskemi+tedavi 1 ve iskemi+tedavi 2 değerine göre yüksek olması istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur. Tedaviye yanıt olarak MDA değerleri istatistiksel olarak anlamlı azalma göstermiştir.



<sup>a</sup> p<0.05 kontrol grubu ile; <sup>b</sup> p<0.05 iskemi grubu ile karşılaştırıldığında;

**Şekil 17:** İskemi ve Nikardipin tedavisi uygulanan sıçanlarda serum örneklerinde Malondialdehit (MDA) düzeyleri üzerine etkisi (Ortalama±SD)

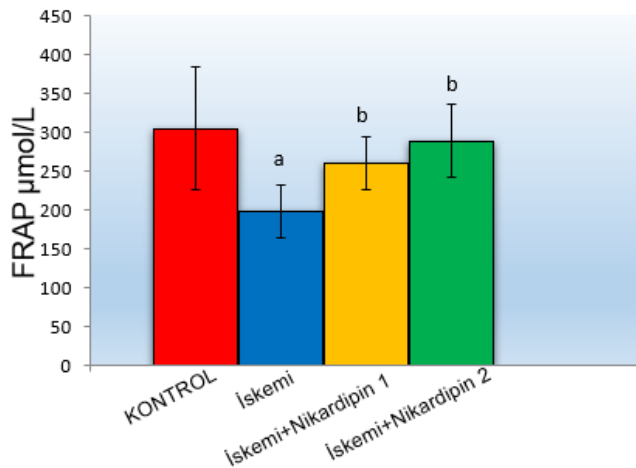
Gruplara göre AOPP değerleri istatistiksel olarak anlamlı farklılık göstermemektedir ( $p>0,05$ ).



<sup>a</sup> $p<0,05$  kontrol grubu ile; <sup>b</sup> $p<0,05$  iskemi grubu ile karşılaştırıldığında;

**Şekil 18:** İskemi ve ozon tedavisi uygulanan sıçanlarda serum örneklerinde Proteinlerin ileri oksidasyon ürünleri (AOPP) düzeyleri üzerine etkisi (Ortalama $\pm$ SD)

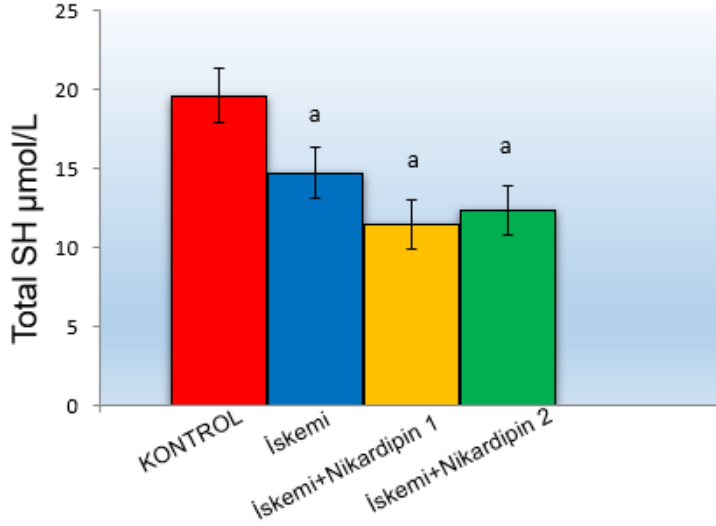
Gruplara göre FRAP değerleri istatistiksel olarak anlamlı farklılık göstermektedir ( $p=0,008$ ;  $p<0,01$ ). İskemi grubunun FRAP değerinin kontrol, iskemi + tedavi 1 ve iskemi + tedavi 2 gruplarına göre düşük olması istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur. Tedaviye yanıt olarak iskemi grubuna kıyasla tedavi gruplarında istatistiksel olarak anlamlı artış gözlenmiştir.



<sup>a</sup> $p<0,05$  kontrol grubu ile; <sup>b</sup> $p<0,05$  iskemi grubu ile karşılaştırıldığında;

**Şekil 19:** İskemi ve Nikardipin tedavisi uygulanan sıçanlarda serum örneklerinde antioksidan aktivite (FRAP) düzeyleri üzerine etkisi (Ortalama $\pm$ SD)

İskemi grubunun total SH değerinin iskemi+tedavi1 ve iskemi+tedavi2 gruplarına göre yüksek olması istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur. Tedavi gruplarında iskemi grubuna kıyasla istatistiksel anlamlı artış gösterilememiştir.



<sup>a</sup>p<0.05 kontrol grubu ile; <sup>b</sup>p<0.05 iskemi grubu ile karşılaştırıldığında;

**Şekil 20:** İskemi ve Nikardipin tedavisi uygulanan sıçanlarda serumda (Total SH) düzeyleri üzerine etkisi (Ortalama±SD)

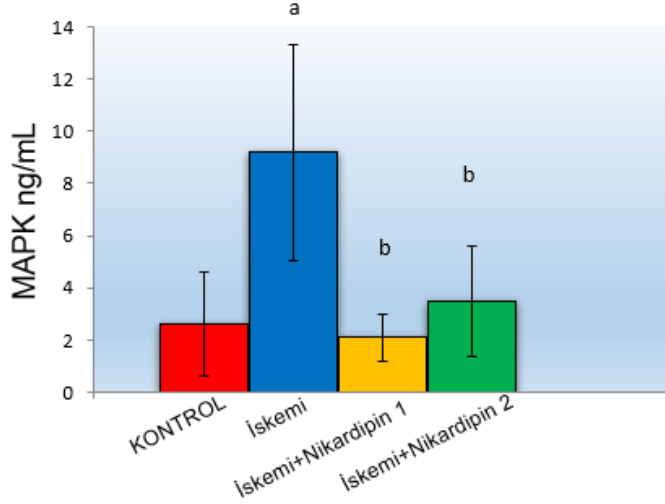
b) İskemi reperfüzyon modeli oluşturulan sıçanların serum MAPK ve STAT1 düzeylerinde iskemi uygulamasıyla anlamlı bir artış, Nikardipin 1 ve Nikardipin 2 uygulamasıyla MAPK ve STAT1 düzeylerinde anlamlı olarak azalma saptandı (Tablo 8, Şekil 3).

**Tablo 8:** İskemi oluşturulan sıçanlarda Nikardipin uygulamasının serumda MAPK, STAT1 düzeyleri üzerine etkisi (Ortalama±SD)

|                            | n | MAPK<br>(ng/ml)        | STAT1<br>(ng/ml)       |
|----------------------------|---|------------------------|------------------------|
| <b>Kontrol</b>             | 6 | 2.61±1.97              | 0.64±0.16              |
| <b>İskemi</b>              | 6 | 9.19±4.13 <sup>a</sup> | 1.62±0.53 <sup>a</sup> |
| <b>İskemi+Nikardipin 1</b> | 6 | 2.12±0.90 <sup>b</sup> | 0.90±0.28 <sup>b</sup> |
| <b>İskemi+Nikardipin 2</b> | 6 | 3.49±2.09 <sup>b</sup> | 0.60±0.47 <sup>b</sup> |

<sup>a</sup>p<0.05 kontrol grubu ile; <sup>b</sup>p<0.05 iskemi grubu ile karşılaştırıldığında;

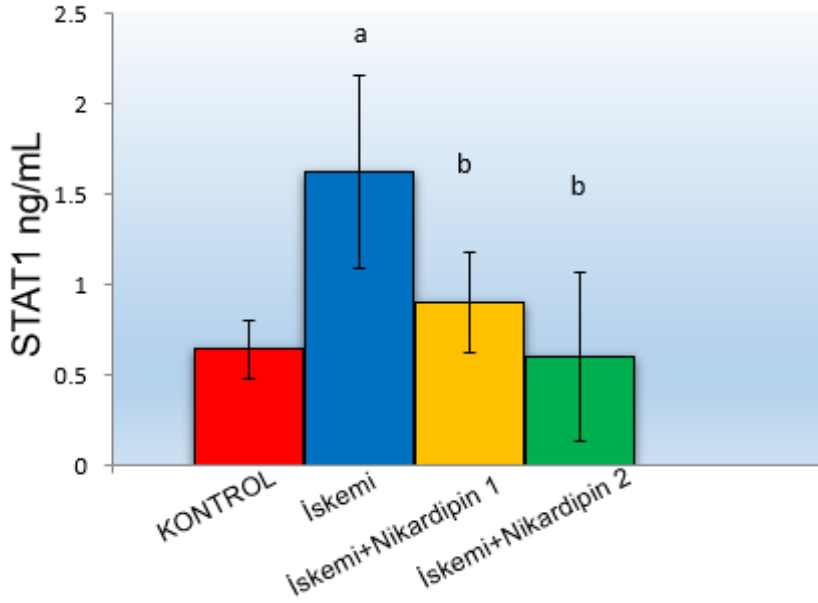
Gruplara göre MAPK değerleri istatistiksel olarak anlamlı farklılık göstermektedir ( $p=0,043$ ;  $p<0,05$ ). İskemi grubunun MAPK değerinin kontrol, iskemi+tedavi1 ve iskemi+tedavi2 gruplarına göre yüksek olması istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur. Tedaviye yanıt olarak iskemi grubuna kıyasla tedavi gruplarında istatistiksel anlamlı azalma gözlenmiştir.



<sup>a</sup>  $p<0.05$  kontrol grubu ile; <sup>b</sup>  $p<0.05$  iskemi grubu ile karşılaştırıldığında;

**Şekil 21:** İskemi ve Nikardipin tedavileri uygulanan sıçanlarda serumda Mitojen activated kinaz (MAPK) düzeyleri üzerine etkisi (Ortalama±SD)

Gruplara göre STAT-1 değerleri istatistiksel olarak anlamlı farklılık göstermektedir ( $p=0,006$ ;  $p<0,01$ ) İskemi grubunun STAT-1 değerinin kontrol, iskemi+tedavi1 ve iskemi+tedavi2 gruplarına göre yüksek olması istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur. Tedaviye yanıt olarak iskemi grubuna kıyasla tedavi gruplarında istatistiksel anlamlı azalma gözlenmiştir.



<sup>a</sup>p<0.05 kontrol grubu ile; <sup>b</sup>p<0.05 iskemi grubu ile karşılaştırıldığında;

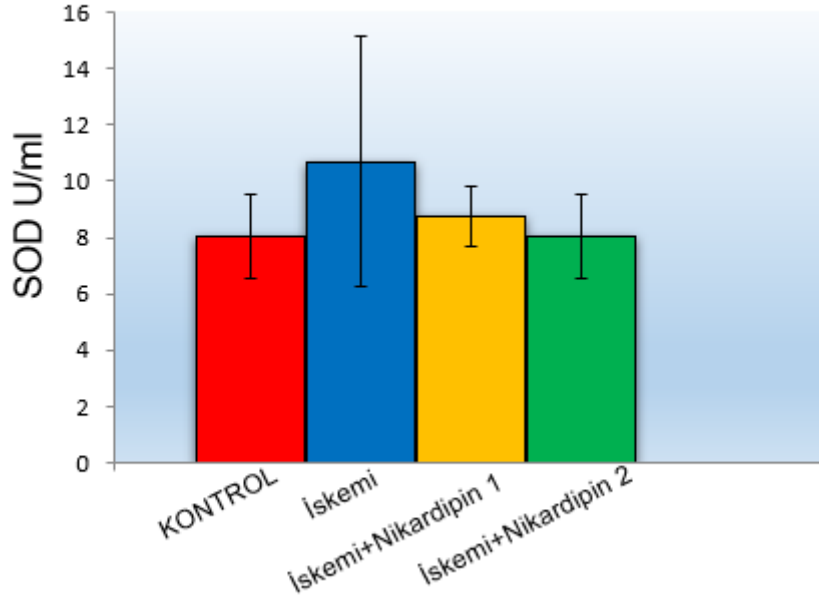
**Şekil 22:** İskemi ve Nikardipin tedavileri uygulanan sıçanlarda serumda STAT-1 düzeyleri üzerine etkisi (Ortalama±SD)

a)İskemi reperfüzyon modeli oluşturulan sıçanların serum SOD, GSH-Px ve katalaz enzim aktivitelerinin iskemi reperfüzyon modelinde kontrol grubuna göre bir farklılık göstermediği, Nikardipin 1 ve Nikardipin 2 grupları arasında da anlamlı bir fark olmadığı saptandı. MPO aktivite düzeylerinde ise iskemi reperfüzyon modelinde anlamlı olarak arttığı, Nikardipin 1 ve Nikardipin 2 uygulaması ile bu düzeylerin iskemi reperfüzyon grubuna göre anlamlı olarak azaldığı görüldü. (Tablo 9, Şekil 23,24,25,26).

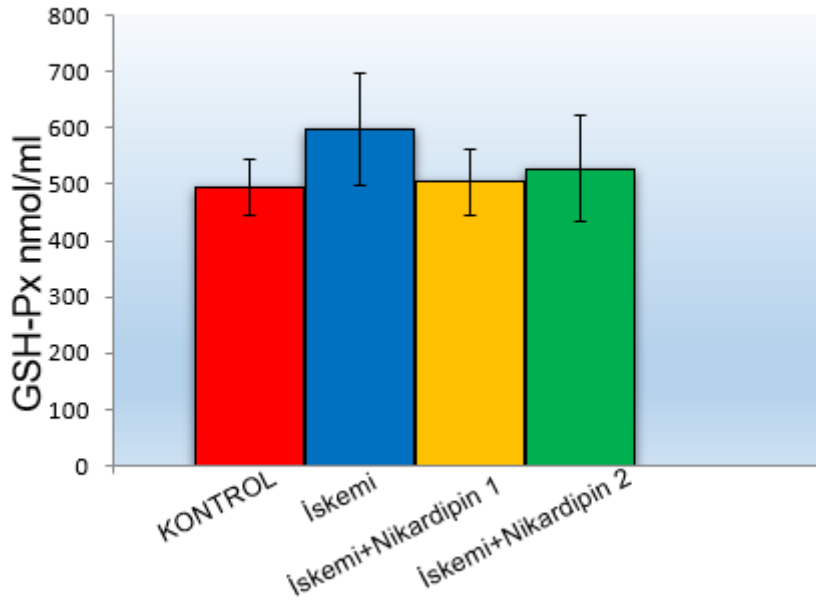
**Tablo 9:** İskemi oluşturulan sıçanlarda Nikardipin uygulamasının serumda SOD, GSH-Px ve Katalaz ve MPO aktiviteleri üzerine etkisi (Ortalama±SD)

|                            | n | SOD<br>(U/ml) | GSH-Px<br>(nmol/ml) | KATALAZ<br>(kU/L) | MPO<br>(ng/mL)         |
|----------------------------|---|---------------|---------------------|-------------------|------------------------|
| <b>Kontrol</b>             | 6 | 8.04±1.51     | 494.4±49.71         | 60.57±19.56       | 4.38±0.94              |
| <b>İskemi</b>              | 6 | 10.7±4.41     | 597.5±99.6          | 65.36±19.67       | 9.74±4.39 <sup>a</sup> |
| <b>İskemi+Nikardipin 1</b> | 6 | 8.76±1.06     | 503.5±58.1          | 54.02±18.24       | 6.90±0.87 <sup>b</sup> |
| <b>İskemi+Nikardipin 2</b> | 6 | 8.04±1.51     | 527.0±94.0          | 62.89±25.0        | 7.99±0.90 <sup>b</sup> |

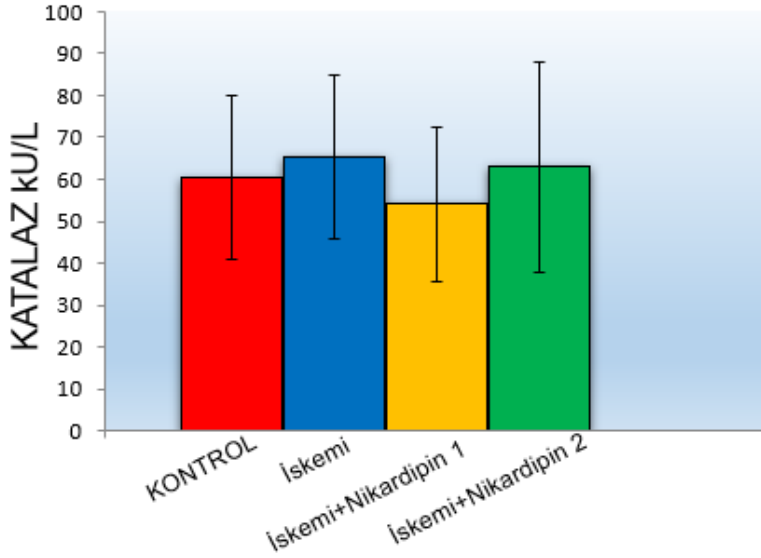
<sup>a</sup>p<0.05 kontrol grubu ile; <sup>b</sup>p<0.05 iskemi grubu ile karşılaştırıldığında;



**Şekil 23:** İskemi ve Nikardipin tedavileri uygulanan sıçanlarda serumda SOD düzeyleri üzerine etkisi (Ortalama±SD)

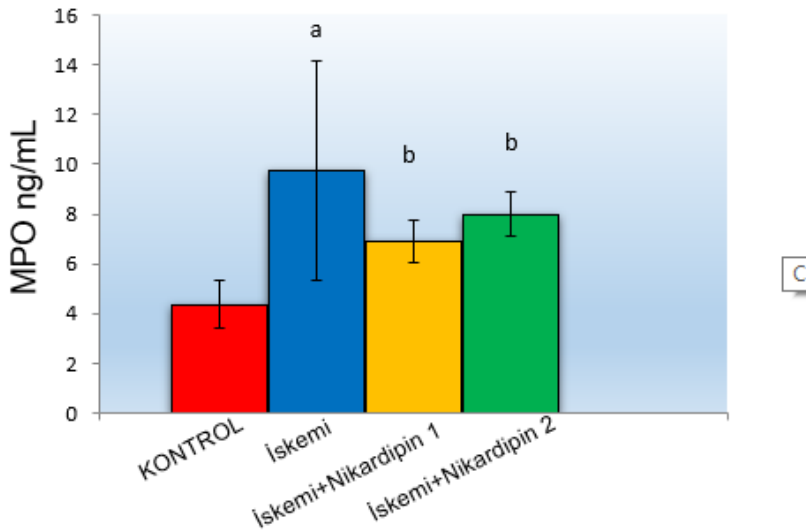


**Şekil 24:** İskemi ve Nikardipin tedavileri uygulanan sıçanlarda serumda GSH-Px düzeyleri üzerine etkisi (Ortalama±SD)



**Şekil 25:** İskemi ve Nikardipin tedavileri uygulanan sıçanlarda serumda Katalaz düzeyleri üzerine etkisi (Ortalama±SD)

Gruplara göre MPO değerleri istatistiksel olarak anlamlı farklılık göstermektedir. Kontrol grubunun MPO değerinin iskemi, iskemi+tedavi1 ve iskemi+tedavi2 gruplarına göre düşük olması istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur. Tedaviye yanıt olarak iskemi grubuna kıyasla tedavi gruplarında istatistiksel anlamlı azalma gözlenmiştir.

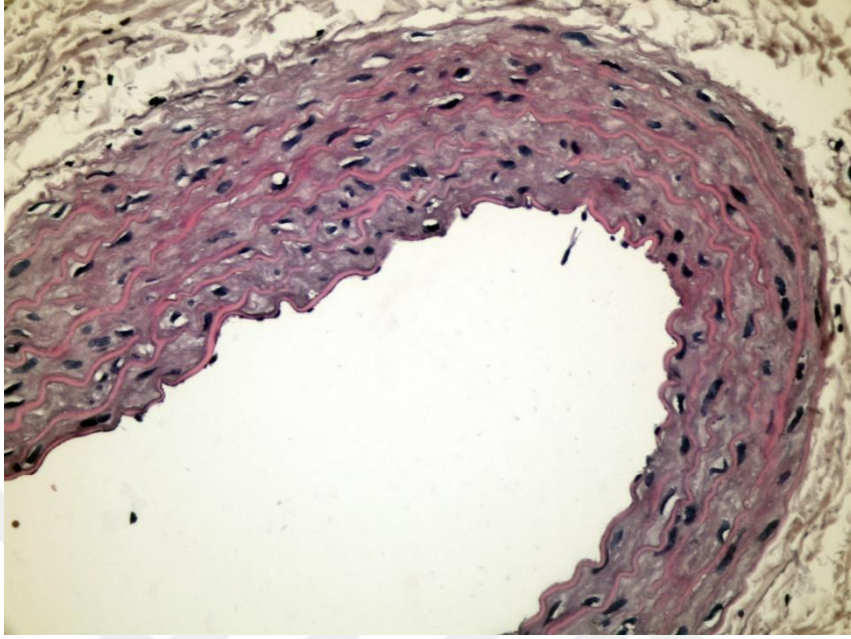


<sup>a</sup>p<0.05 kontrol grubu ile; <sup>b</sup>p<0.05 iskemi grubu ile karşılaştırıldığında;

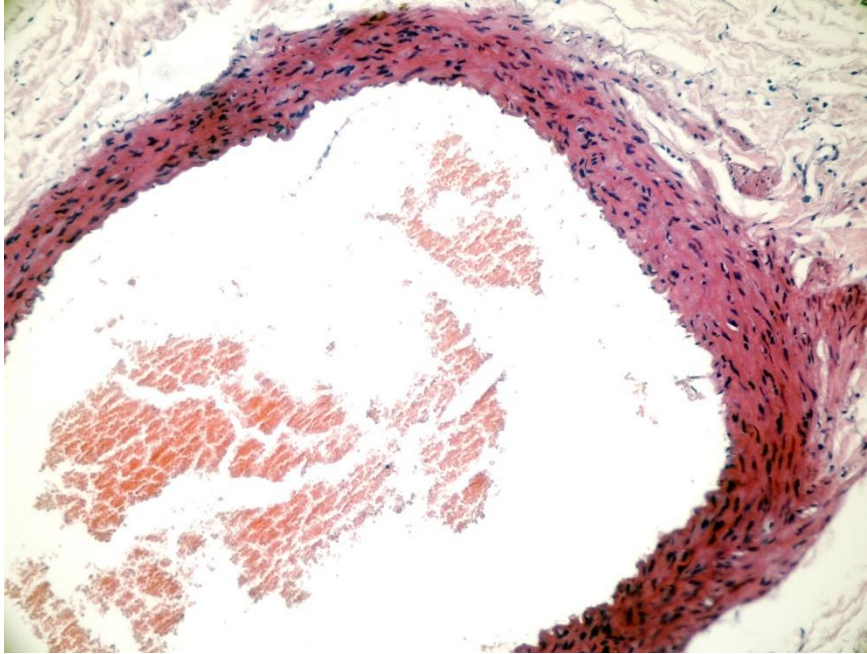
**Şekil 26:** İskemi ve Nikardipin tedavileri uygulanan sıçanlarda serumda MPO düzeyleri üzerine etkisi (Ortalama±SD)

## 6.2. Histopatolojik Bulgular

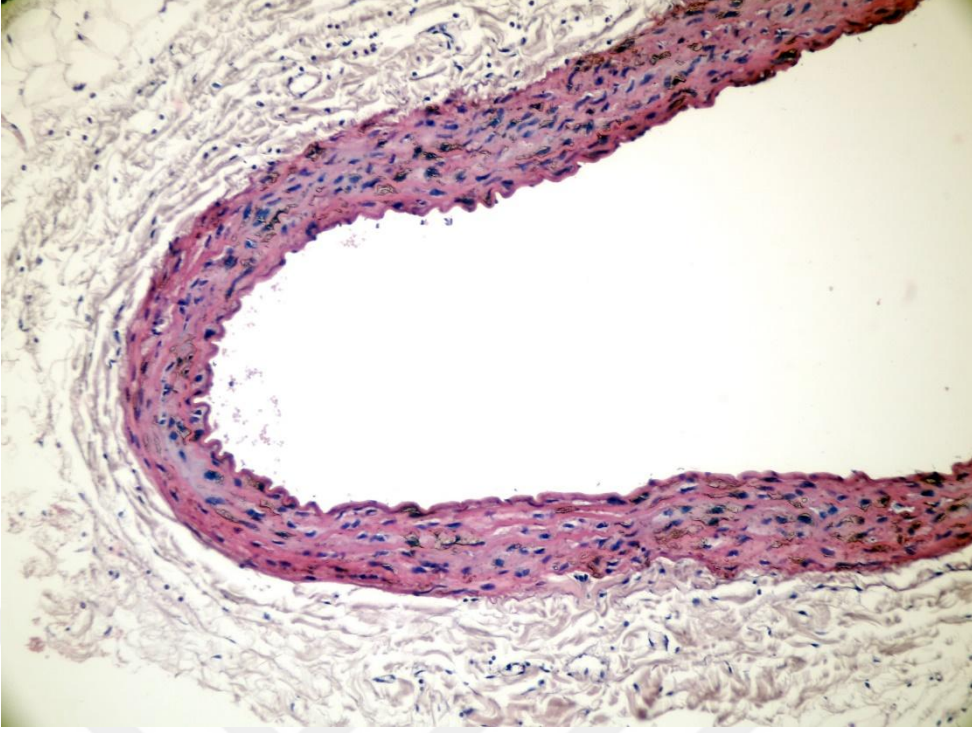
Sıçanlardan alınan aort ve çizgili kas dokuları histopatolojik olarak incelendi.



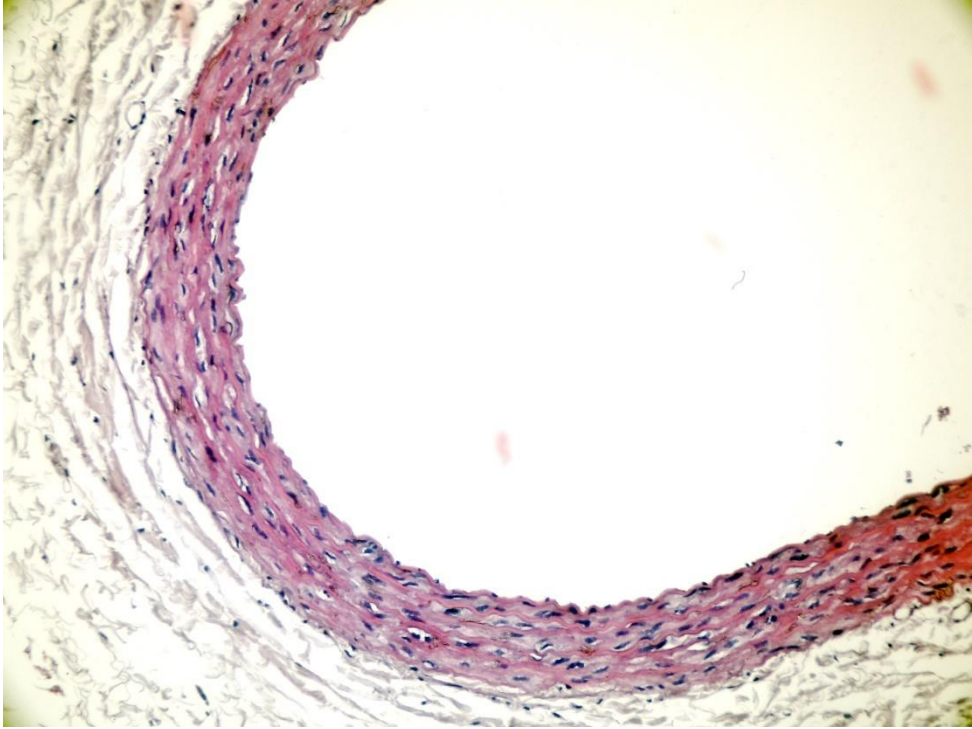
**Şekil 27:** Kontrol grubundan alınan aort. Doğal yapıda aort kesiti(H&Ex200)



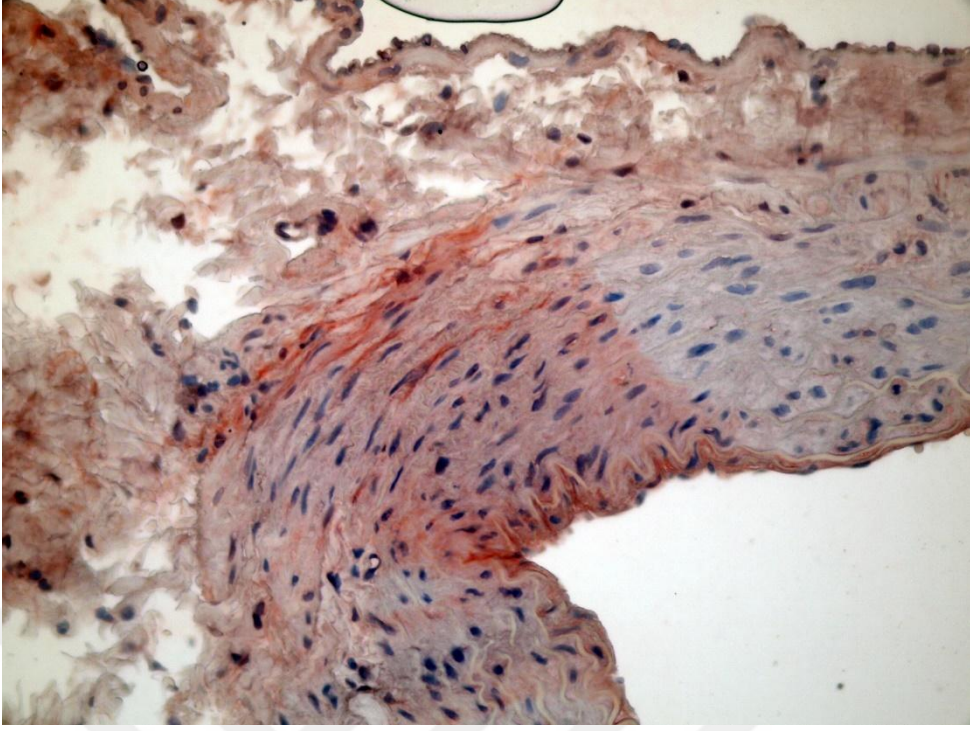
**Şekil 28:** I/R grubunda aort- düz kas hücrelerinin seyrinde düzensizlik. Elastik lifler seçilmiyor (H&Ex200)



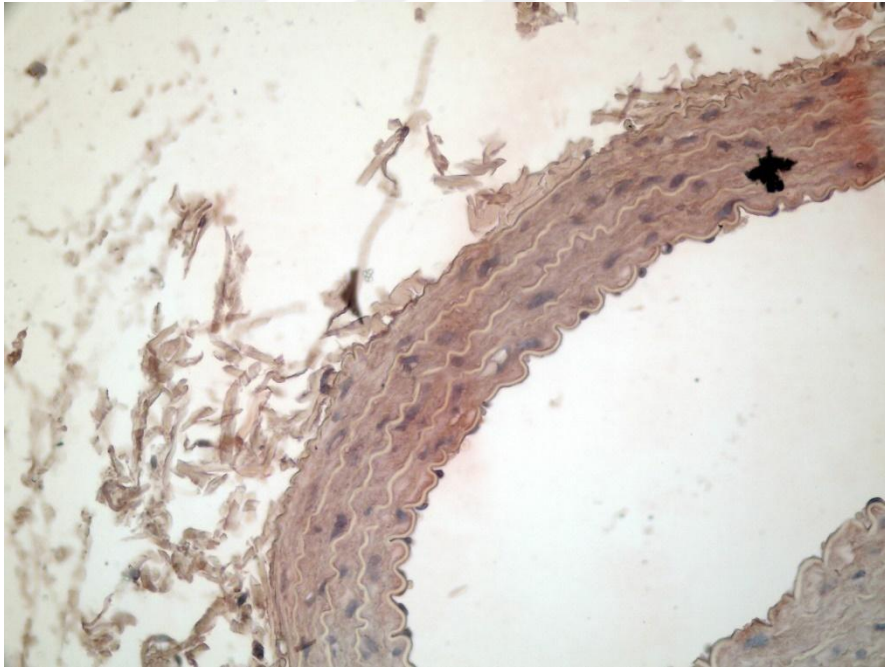
**Şekil 29:** Düşük doz Nikardipin tedavisi grubu Aort kesiti. Media tabakasındaki düz kas hücreleri tedavi almayan gruba göre daha düzenli. Elastik lifler doğala yakın seyir gösteriyor. (H&Ex200)



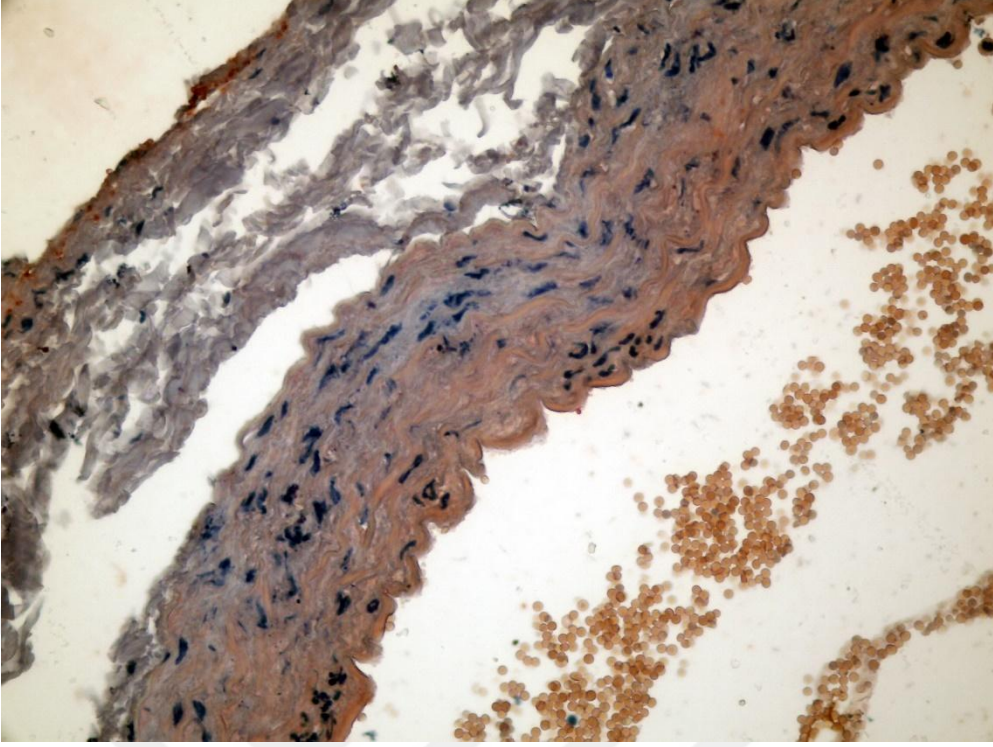
**Şekil 30:** Yüksek doz Nikardipin tedavisi alan grupta media hücreleri düzgün seyirli, elastik lamina doğal görünümlü, mediada yer yer miksomatöz görünüm. (H&Ex200)



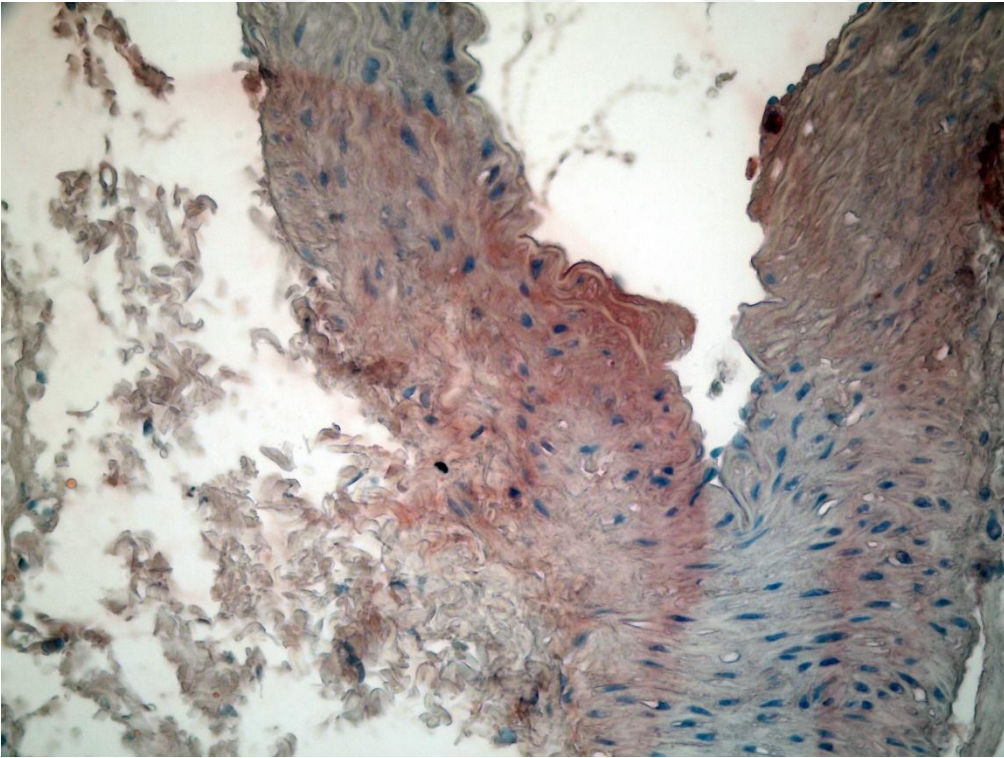
**Şekil 31:** Tedavi uygulanmayan I/R grubunda MMP-9 pozitif boyanan düz kas hücreleri (MMP9x400)



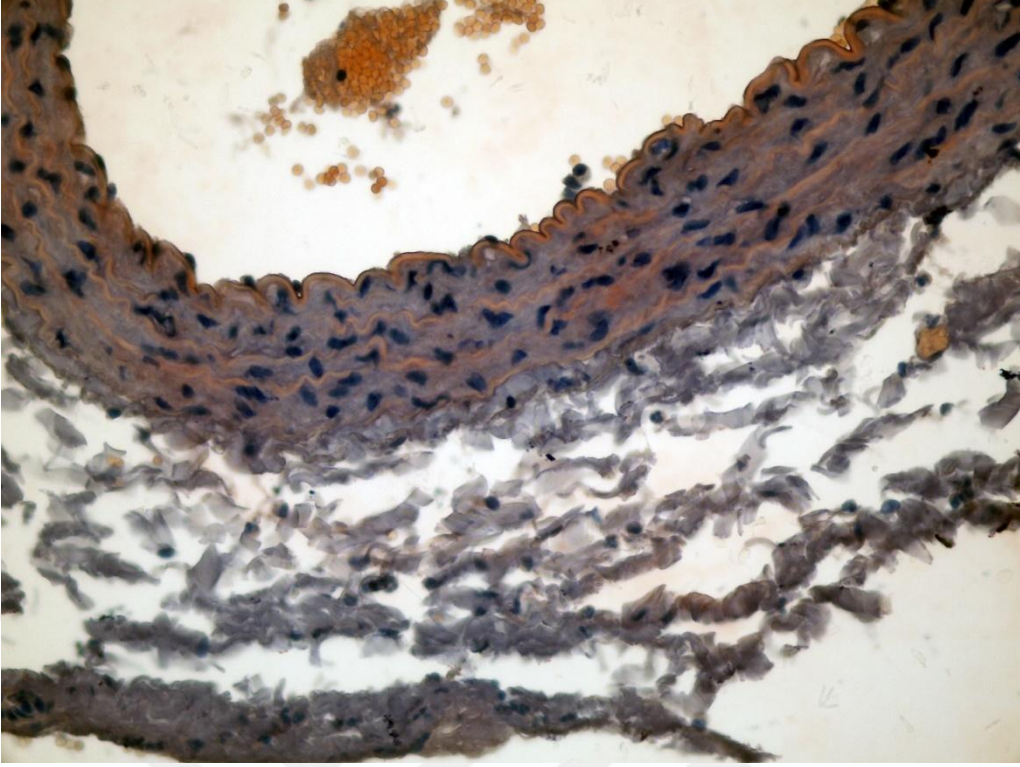
**Şekil 32:** Tedavi uygulanmayan I/R grubunda diffuz zayıf boyanma gösteren aort kesiti (ICAMX400)



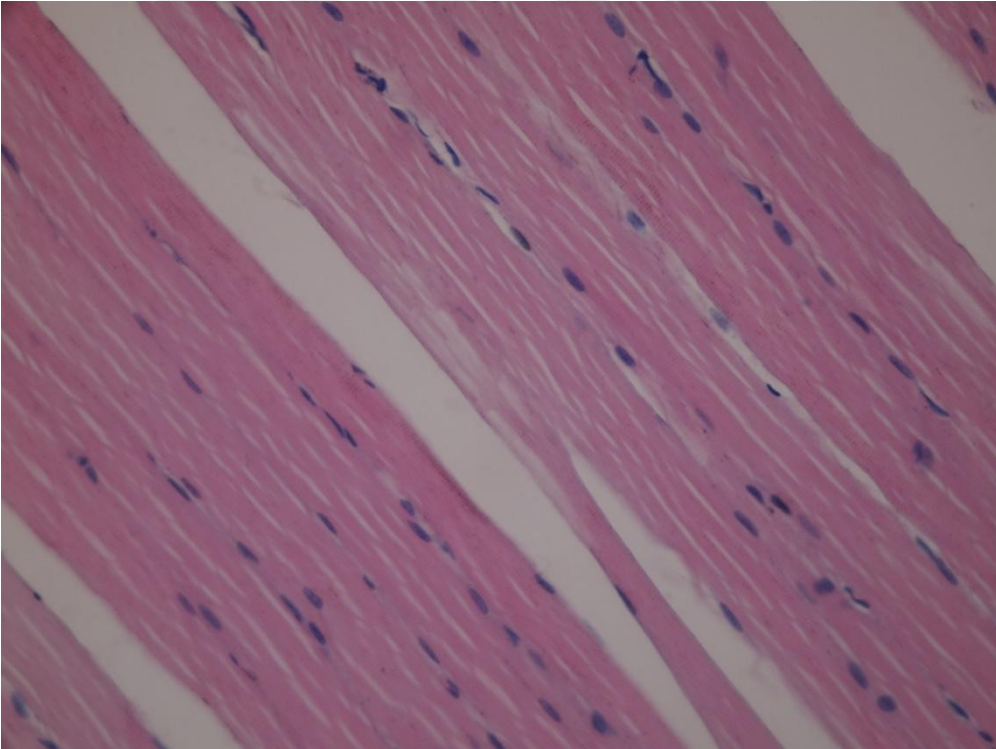
**Şekil 33:** Tedavi uygulanmayan I/R grubunda diffuz zayıf boyanma gösteren aort kesiti (MMP-3X400)



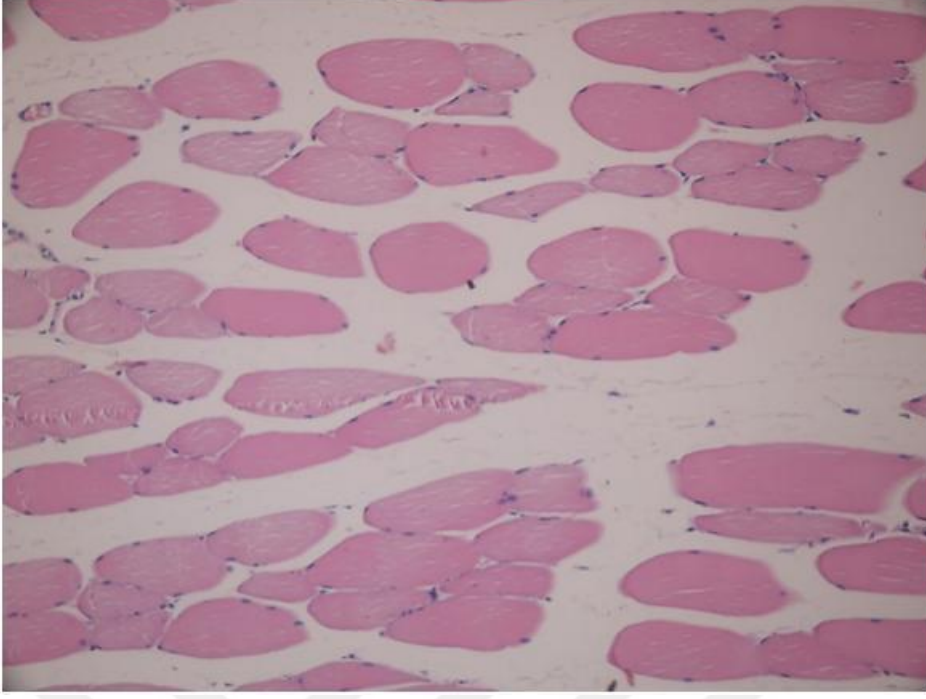
**Şekil 34:** Tedavi uygulanmayan I/R grubunda HIF-1 $\alpha$  ile zayıf diffuz boyanma (HIF-1 $\alpha$ x400)



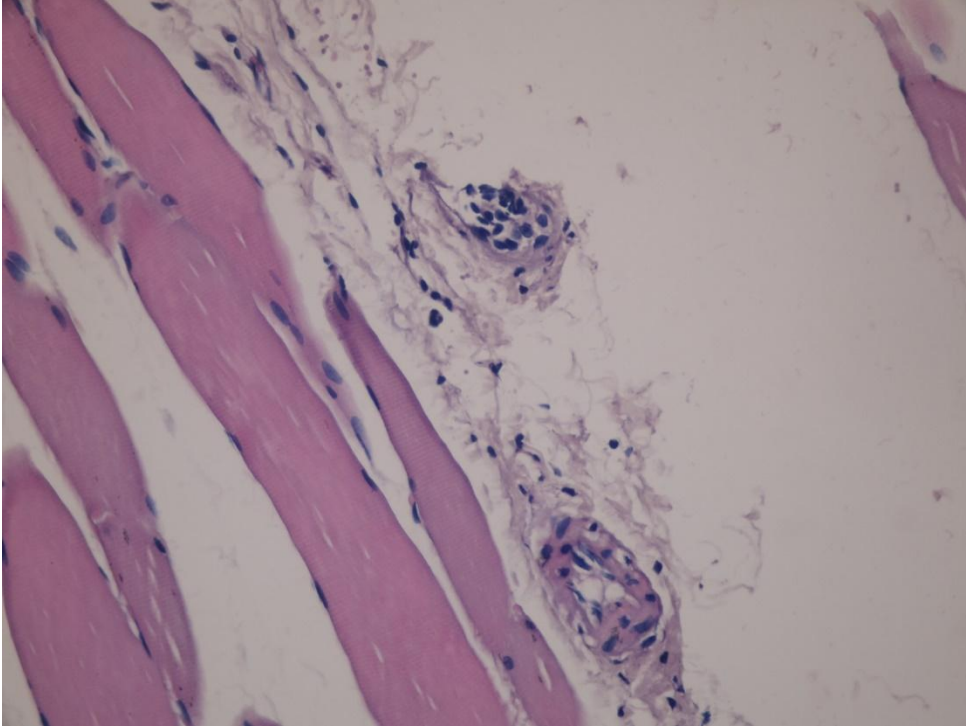
**Şekil 35:** Tedavi uygulanmayan I/R grubunda zayıf diffuz boyanma (VCAMx400)



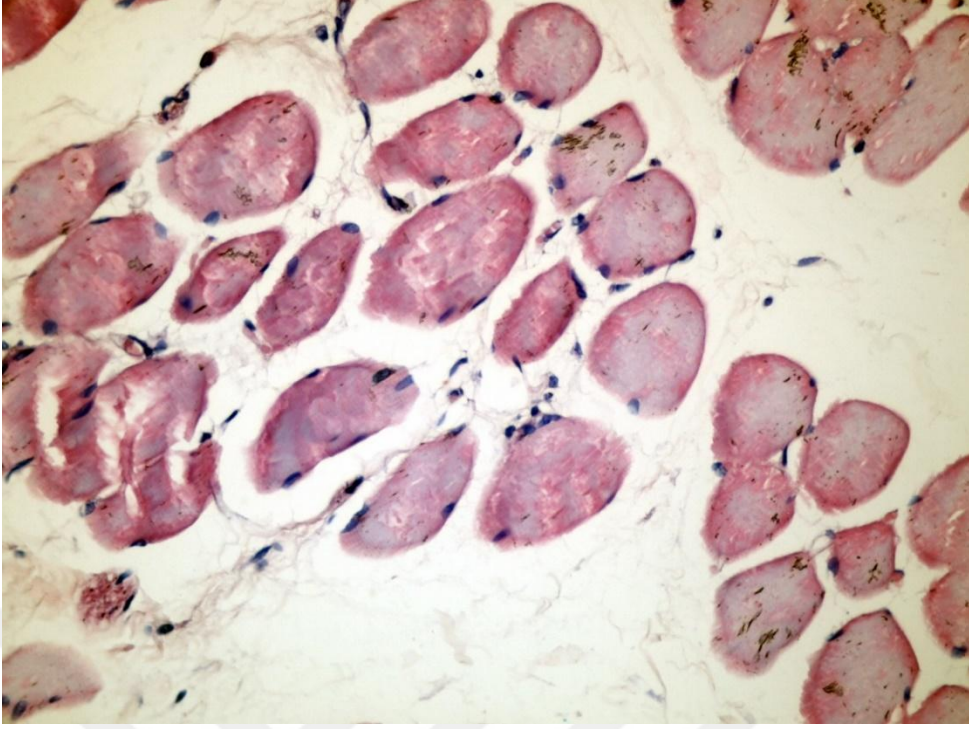
**Şekil 36:** Doğal yapıda çizgili kas dokusu (H&Ex400)



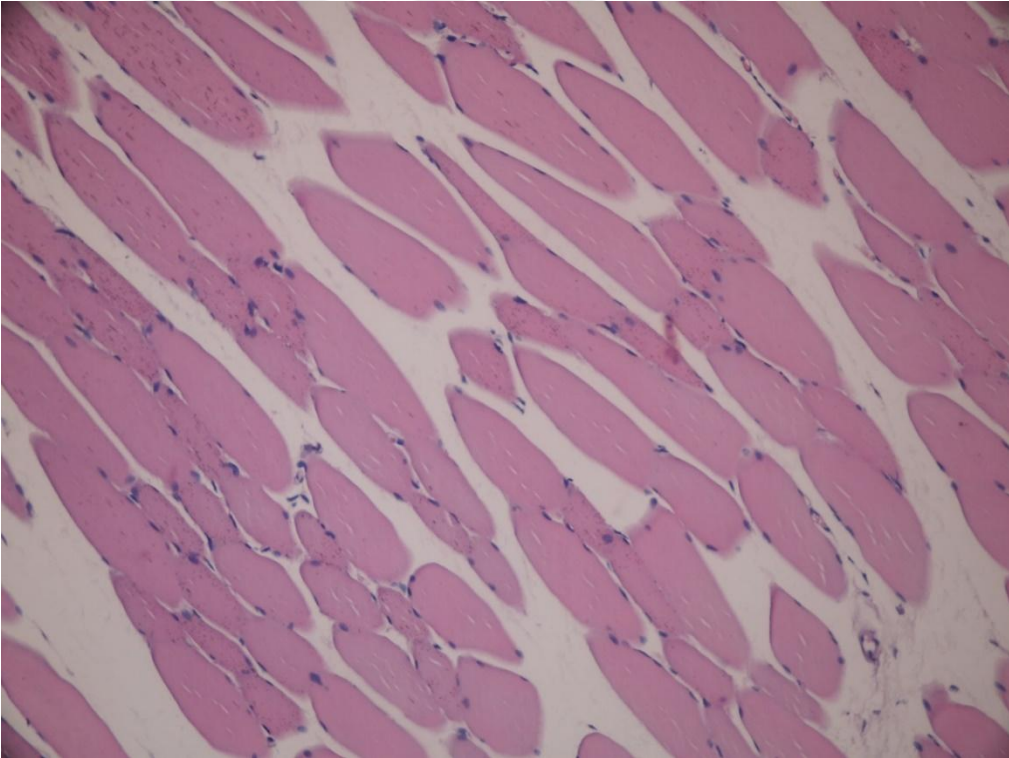
**Şekil 37:** Tedavi olmayan I/R grubunda ödemli, çizgilenme kaybı gösteren kas lifleri (H&Ex200)



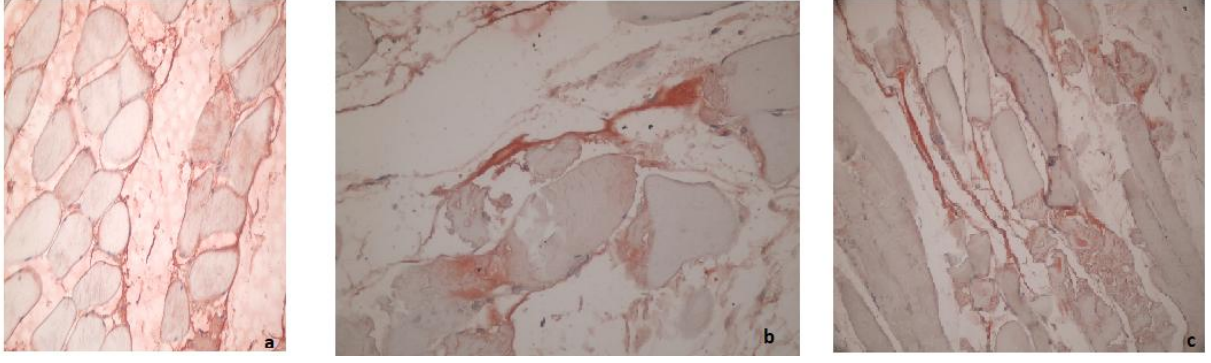
**Şekil 38:** Tedavi olmayan I/R grubunda kas lifleri çevresinde az sayıda lenfosit ve nötrofil polimorf infiltrasyon (H&Ex400)



**Şekil 39:** Düşük doz Nikardipin tedavi grubunda hafifçe ödemli çizgili kas dokusu  
(H&Ex200)



**Şekil 40:** Yüksek doz Nikardipin tedavi grubunda doğala yakın görünümde çizgili kas dokusu  
(H&Ex200)



**Şekil 41:** Tedavi uygulanmayan I/R grubunda a) HIF 1 $\alpha$  b) ICAM c) MMP3 pozitifliği gösteren çizgili kas dokusu

## 7. TARTIŞMA

İskemi; azalan kan akımına bağlı olarak yetersiz gelişen organ perfüzyonu sonucu hücrelerin oksijen ve gerekli metabolitler ile beslenememesi olarak tanımlanabilir. İskeminin gelişmesi sonucunda toksik metabolitler hücre içerisinde birikerek hücre ölümüne neden olmaktadır. Dokunun yeniden kanlanmasına reperfüzyon denilmektedir. Doku düzeyindeki hasara bağlı olarak zedelenmenin geri dönüşümlü olup olmadığı belirlenebilir. Geri dönüşümlü zedelenmede hücre fonksiyonlarını tekrar kazanır ve işleyişine devam eder. Çeşitli hücre tiplerinin hipoksiye olan toleransı, dokunun metabolik hızına ve adaptif mekanizmalarına bağlı olarak farklılık gösterir.

Reperfüzyon hasarı konsepti ilk olarak geç 1970 ve erken 1980'lerde Buckberg ve daha sonraları Braunwald ve Kloner tarafından ortaya atılmıştır. (22)

İskemi/Reperfüzyon hasarının iki büyük komponenti hücresel hipoksi ve reoksijenizasyon olarak görülmektedir. (23)

Reperfüzyon, erken iskemik hasarın sitokin salınımı ve hidroksil radikal ( $\text{OH}^\cdot$ ), süperoksit radikali ( $\text{O}_2^\cdot$ ) ve hidrojen peroksit ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ) gibi reaktif oksijen türleri (ROS) ve kompleman sisteminin aktivasyonu ile tehlikeli etkilerini artırır. Bu radikaller etkilerini sarkolemma fosfolipidlerinin oksidasyonu ve bunun sonucunda membran bütünlüğünün bozulması ile göstermektedirler. SOD, glutatyon peroksidaz ve katalaz gibi antioksidan enzimlerin iskemi sonrasında miktarlarının azalmış olduğu bilinmektedir.

Aktive nötrofiller vasküler reperfüzyon hasarına katkıda bulunur, ancak posthipoksik hücresel hasar, reaktif oksijen (ROS) veya nitrojen türlerini içeren mekanizmalar yoluyla inflamatuvar hücrelerin yokluğunda meydana gelir. Hücresel hipoksi, hipoksi ile indüklenebilir faktör-1 (HIF-1), aktivatör protein 1 (AP-1) ve bazı mitojen aktive edici protein kinaz yolları (MAPK) da dahil olmak üzere transkripsiyonel düzenleyicileri aktive eden önemli bir sinyal gibi görünmektedir. Bu radikaller etkilerini sarkolemma fosfolipidlerinin oksidasyonu ve bunun sonucunda membran bütünlüğünün bozulması ile göstermektedirler. SOD, glutatyon peroksidaz ve katalaz gibi antioksidan enzimlerin iskemi sonrasında miktarlarının azalmış olduğu bilinmektedir.

Reoksijenizasyon sırasında hasara zemin hazırlayan doku hipoksisinin belirgin örnekleri arasında dolaşım şoku, miyokardiyal iskemi, felç ve organ transplantasyonu yer alır. İskemi/reperfüzyon hasarı kaynaklı doku hasarı; akut iskemi sonrası ya da periferik arter

hastalıklarında alt ekstremitte revaskülarizasyonu, abdominal aort cerrahi gibi prosedürlerden sonra karşılaşılan önemli bir problemdir.

İskeminin gelişmesini takiben hücre içerisinde ATP üretimi oksidatif fosforilasyonun azalmasını takiben azalacak, bu durumda  $\text{Na}^+$  pompası azalacak ve hücre içerisinde  $\text{Ca}^{++}$ ,  $\text{H}_2\text{O}$  ve  $\text{Na}^+$  girişinin artmasına neden olacaktır. Artmış hücre içi kalsiyum çeşitli mekanizmalarla hücre hasarına neden olmaktadır; mitokondri permeabilitesini artırarak ATP üretimini bozar, kaspazları direk aktive ederek ve mitokondri permeabilitesini artırarak apoptozu uyarır. Membran hasarına yol açan fosfolipazlar, hücre içi protein iskeletinin yıkımına neden olan proteazlar, DNA ve kromatin parçalanmasına neden olan endonükleazlar ve ATP azalmasına neden olan ATPaz enzimleri hücre içi kalsiyum artışı ile aktive olmakta ve hücre hasarına neden olmaktadır.

Kalsiyum kanal blokerleri hücre içine kalsiyum girişini bloke ederler. Etkilerini genellikle düz kas ve miyokard hücreleri üzerinde gösterirler. Hipertansiyon, anjina, periferik vasküler bozukluklar ve bazı aritmiler gibi kardiyovasküler hastalıkların tedavisinde yaygın olarak kullanılırlar. Damar düz kas hücresine  $\text{Ca}^{++}$  girişini engelleyerek kalsiyumun düz kas hücresinde oluşturduğu konstrüksiyonu engellerler.

İskemi reperfüzyon hasarı özellikle majör vasküler cerrahilerden sonra gelişen en önemli mortalite ve morbidite sebeplerindendir. Sadece iskemiye maruz bırakılan dokular değil aynı zamanda akciğer, böbrek, kalp, iskelet kası, santral sinir sistemi ve gastrointestinal sistem iskemi reperfüzyon hasarından etkilenmektedirler. (24)

Bu sebeple çalışmamızda sıçanlarda akut ekstremitte iskemisi modelini geliştirerek iskemi/reperfüzyon hasarını engellemede rolü olabilecek bir ajan olarak Nikardipinin etkilerini incelemek istedik. Nikardipinin dihidropiridin türevi bir kalsiyum kanal blokeri olarak gevşetici etkisi güçlüdür. Vazospastik anjinada özellikle kullanılmaktadırlar.

Çalışmamızda alt ekstremitte iskemi/reperfüzyon modeli oluşturmak amacı ile 60 dk süreyle infrarenal abdominal aorta klempe edildi ve 120 dakika sonrasında klemp kaldırılarak reperfüzyon gerçekleştirdik. İşlemden 4 gün önce başlanılarak düşük ve yüksek dozda Nikardipin enjeksiyonu yapıldı. İki farklı doz seçilmesinin sebebi, antioksidan etkisinin doz bağımlı olup olmadığının araştırılmasıydı.

Aort cerrahisinde ya da her iki alt ekstremitte vasküler bypass cerrahisinde işlemin gerçekleştirilebilmesi için damar üzerine geçici klemp konulmakta, deklempaj sonrası

yeniden kanlandırılma beraberinde çoğu zaman iskemi/ reperfüzyon hasarını da getirmektedir. Özellikle majör aort cerrahisi ile böbrekler hedef organ konumundadır ve bu durum mortalite ve morbidite açısından olarak postoperatif süreçte önemlidir. (25.)

Koksal ve ark. (26) Ekstremitte iskemi modeli oluşturarak bir ajanın I/R hasarını engellemedeki rolünü araştırmış, dokudaki lokal ve sistemik hasarı incelemişlerdir.

Biz de çalışmamızda 24 adet Wistar Albino sıçanlarının infrarenal abdominal aortlarını klempe edip ekstremitte iskemi-reperfüzyon modeli oluşturarak, iskemi-reperfüzyon öncesi nikardipin uygulanan sıçanlarda serum örneklerinde oksidan ve antioksidan sistem etkilerini araştırdık. Sıçanlar, fizyolojilerinin ve vaskülarizasyonlarının insana yakın olmasından dolayı alt ekstremitte iskemi modelinin oluşturulmasında tercih edilmektedir. Maliyet, kolay bakım ve ulaşım gibi avantajları nedeniyle sıçan modelini tarafımızca da seçildi.

Bir dihidropiridin türevi olan Nikardipin, antihipertansif bir ajan olarak malign hipertansiyon tedavisinde, aort diseksiyonu vakalarında kısa etkili beta bloker tedavisi uygun olmadığı veya tek başına beta blokajın etkili olmadığı durumlarda beta blokerle kombinasyon halinde, şiddetli preeklampside diğer intravenöz antihipertansif ajanlar önerilmediğinde veya kontrendike olduğunda (27) ve ameliyat sonrası hipertansiyon tedavisinde (28) ve (29) kullanılmaktadır.

Son zamanlarda yapılan çalışmalarda nikardipinin akut iskemik inmelere serebral nekrozu engellediği, subaraknoid kanamalardan sonra gelişen cerebral vazospazmı engellediği belirtilmiştir. (30)

Habibzadeh ve ark. No-reflow fenomenine bir çözüm bulmak adına safen ven greftlerinin içine nikardipin vererek araştırmalarında olumlu sonuçlar elde etmiş, safen ven greftlerine yapılacak girişim öncesi bu ilacın kullanımını önermişlerdir. (31)

Kouoh ve ark., nikardipinin insan ve tavşan nötrofilleri üzerindeki antioksidan ve anti-elastaz aktivitesini ölçerek, potansiyel bir antiaterosklerotik ajan olabileceği iddiasını ortaya çıkarmışlardır. (5)

Masso ve ark yaptıkları araştırmada iskemik inme geçiren hastalarda nikardipin kullanımının serebral enfarktı azalttığını ortaya koymuşlardır. (32).

Biz de bu çalışmaların ışığında nikardipinin serebral infarktı azalmadaki başarısı, antiaterosklerotik özelliğinin olabileceği, neo-intima oluşumunu geciktirmedeki gücü sebebiyle çalışmamızda Nikardipin kullandık.

Bir lipid peroksidasyon ürünü olan Malondialdehit (MDA), hasarlanmış hücre membranındaki yağ asit radikalleri ile etkileşerek lipid peroksidasyon reaksiyonunu artırır. Bu sayede MDA düzeyi ölçümü ile membran hasarı derecesi hakkında fikir sahibi olunabilmektedir. Oksidatif stres durumlarında biyomarker olarak MDA kullanılır (33)

Kiriş ve ark. (34) infrarenal aortik iskemi / reperfüzyon modeli oluşturup renal hasarı araştırmışlar, uyguladıkları işlemde 30 dakika iskemi ve 60 dakika reperfüzyon ile uzak organlarda I/R hasarının oluştuğunu, dokuda MDA düzeyi ve antioksidan enzim aktivitelerinin artışının tespiti ile göstermişlerdir.

Çalışmamızda alınan serum örneklerinde incelenen MDA düzeyleri kontrol grubu ile karşılaştırıldığında İR grubunda istatistiksel olarak anlamlı düzeyde yüksek bulunmuştur. Nikardipin tedavi gruplarında MDA düzeyini istatistiksel olarak anlamlı düşürdüğünü söylememiz mümkündür.

Hazaa ve ark, sıçanlarda akut spinal iskemi modelini oluşturup, atorvastatin ve l-karnitininin reperfüzyon hasarını engellemedeki rolünü inceleyip bu çalışmalarında AOPP, GSH-Px,, MDA ve katalaz enzim aktivitelerini incelediklerinde kullandıkları ajanların oksidan ve antioksidan enzim sistemleri üzerinde anlamlı sonuçlar bulmuşlardır. (35) Biz de çalışmamızda bu enzimlerin aktivitelerini ölçmek istedik. Serum örneklerinde Katalaz, SOD ve GSH-Px enzim düzeylerinde de istatistiksel anlamlı bir fark tedavi gruplarında saptanmamıştır. Değerlere bakıldığında ise azalma eğiliminde olduğu net bir şekilde görülmüştür. Bu durum nikardipin uygulamasının süresinin uzatılması durumunda sonuçların değişebileceğini düşündürmektedir.

Plazma total tiyol seviyesi glutatyon, sistein, albümin ve diğer protein yapılarıdaki SH grupları tarafından oluşturulmaktadır. Bu tiyol grupları vücudu oksidatif stresten korumaya çalışan doğal antioksidanlardır ve oksidatif stresin değerlendirilmesinde kullanılmaktadır. Total Sülfidril içeriği (tSH) oksidasyon zincirini kırma özelliğine sahip güçlü antioksidanlardandır. İskemi grubunun total SH değerinin iskemi+tedavi1 ve iskemi+tedavi2 gruplarına göre yüksek olması istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur. Tedavi gruplarında iskemi grubuna kıyasla istatistiksel anlamlı artış gösterilememiştir. Savunma mekanizması

olarak da belirtilebilen tSH in hala aktive olduğu, tedavinin suresinin uzatılması durumunda olumlu sonuç alınabileceği düşünülmektedir.

Antioksidan gücün bir başka göstergesi de FRAP seviyesinin ölçümü ile belirlenebilir. FRAP düzeyini ölçme prensibi  $Fe^{+3}$ 'ü  $Fe^{+2}$ 'ye indirgeyen antioksidan gücün ölçülmesine dayanmaktadır. Çalışmamızda iskemi grubunun FRAP değerinin kontrol ve tedavi gruplarına göre düşük olması istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur. Tedaviye yanıt olarak iskemi grubuna kıyasla tedavi gruplarında istatistiksel olarak anlamlı artış gözlenmiştir. Nikardipin bu antioksidan gücü artmıştır.

Miyeloperoksidaz (MPO) enzimi, oksidatif strese yanıt olarak lökositlerden salgılanan lizozomal bir enzimdir. Lökositlerde bolca bulunan ve reaktif oksidan ürünler oluşturan miyeloperoksidaz enzimi aterosklerotik reaksiyonlarda bulunarak katalitik aktiviteyi göstermektedir.

Sun ve ark (36) yaptıkları çalışmada iskemi/reperfüzyon hasarına bağlı olarak yapılan flap rekonstruktif cerrahi de Sodyum Ferulat molekülünün bu hasarı engellemedeki rolünü incelemiş, MPO ve MDA düzeylerinin anlamlı azalması ile bu tezlerini desteklemişlerdir.

Çalışmamızda ise gruplara göre MPO değerleri istatistiksel olarak anlamlı farklılık göstermektedir. Kontrol grubunun MPO değerinin iskemi, iskemi+tedavi1 ve iskemi+tedavi2 gruplarına göre düşük olması istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur. Tedaviye yanıt olarak iskemi grubuna kıyasla tedavi gruplarında istatistiksel anlamlı azalma gözlenmiştir.

Mitojenle aktive edilmiş protein kinazlar (MAPK) hücre proliferasyonunu, apoptotik aktiviteyi, inflamasyon mekanizmasını regüle etmektedir. Apoptotik aktiviteyi tetikleyen Ras ve Raf proteinleri bu yolağı tetikleyerek apoptotik enzimlerin salınmasına ve sonucunda hücre ölümüne neden olmaktadır. Zhang ve ark nikardipin ile yaptıkları çalışmada kalsiyum antagonistlerinin kardiyomiyosit hücrelerinin hasarındaki protektif gücünü araştırmış, MAPK yolağı ile bunun gerçekleştiğini ortaya koymuşlardır. (37)

Bizim çalışmamızda bu sav güçlendirilmiş olup MAPK aktivitesi tedavi gruplarında I/R grubuna göre anlamlı olarak azalmıştır. Nikardipin MAPK aktivitesini azaltmıştır.

Signal transducer and activator of transcription (STAT-1) proteini, salınan sitokinlerle aktive olmakta ve hücre yaşamasında kilit rol oynamaktadır.

Xu ve ark (38) sıçanlar üzerinde miyokardiyal iskemi/reperfüzyon hasarını engellemede Baicalin in rolünü inceledikleri çalışmada JAK-STAT aktivitelerini incelemiş ve başarılı sonuçlar elde etmişlerdir.

İ/R sonucunda salınan sitokinler ile aktive olduğu çalışmamızda gözlenmiş, nikardipin tedavisine anlamlı olarak yanıt vererek azalmıştır. Temel olarak hipoksi tarafından ekspresyonu kontrol edilen HIF-1 proteinin etki ettiği mekanizmalar, çok sayıda genin transkripsiyonunun düzenlenmesi, hücrelerinde diferansiyasyonu, vaskülarizasyon, otokrin büyüme faktörü üretimi, proliferasyon, invazyon ve metastaz, metabolik yeniden programlanma ve tümör büyümesinin artması olarak sıralanabilir. (39-40-41) Wang ve arkadaşları (42) serebral iskemi modeli çalıştıkları sıçanlarda hiperbarik oksijen tedavisinin HIF-1  $\alpha$  geninin regülasyonu sağladığını çalışmalarında göstermişlerdir. Terada ve arkadaşları (43) sıçanlarda çalıştıkları miyokardiyal iskemi/reperfüzyon modelinde akut hipobarik ve hipoksik şartlanmanın hasarı artırdığını göstermek için HIF-1  $\alpha$  ekspresyonu değerlerine bakmışlardır. Matsushima ve arkadaşları (44), HIF-1  $\alpha$  nın kardiyak fibroblastları apoptozdan koruyabildiğini ve hipoksik hasarı takiben kalbin yeniden şekillenmesi için potansiyel bir terapötik hedefi temsil ettiğini göstermişlerdir. Nataraja ve arkadaşları (45) miyokardiyal iskemi reperfüzyon modelinde HIF-1 alfa'nın rolünü araştırmışlardır.

Biz de kendi deneyimizin immunohistokimyasal çalışmasında HIF-1 alfa nın antikorlarının doku düzeyindeki değerlerini ölçerek nikardipinin hasarı engellemede bu genin aktivasyonu üzerinden rolü olup olmadığını görmek istedik. Çalışmamızın sonunda tedavi gruplarında HIF-1 alfa değerlerinin artış gösterdiğini gözlemledik.

ICAM-1 (CD54); Endotel hücresi, lenfositler, monositler, düz kas hücreleri ve makrofajlarda eksprese edilen Ig süper ailesinin bir üyesidir. (46) Endotel hücrelerinde, ICAM-1 yapısal olarak az miktarlarda eksprese edilmektedir. IL-1 (İnterlökin-1), TNF- $\alpha$  (Tümör Nekroz Faktör), IFN- $\gamma$  (İnterferon), LPS (Lipopolisakkarit) gibi mediyatörlerle endotel hücrelerinin uyarılması sonucu ICAM-1 ekspresyonu artmaktadır (47). Bu artış akut ve kronik inflamasyon alanlarında ve tümoral hücrelerde daha çok belirgindir (48). Zhang ve arkadaşları (49) Fisetinin serebral iskemi reperfüzyon hasarında nöroprotektif etkisini değerlendirmek için ICAM-1 adezyon molekülünü ölçmüşlerdir.

VCAM molekülleri, damar endotelial duvarında lökositlerin göçü ve adezyonunu sağlarlar (50). ICAM-1 ve VCAM-1'in her ikisi de immun yanıt ve iltihap durumlarında hayati rol oynamaktadırlar. Maruyama ve arkadaşları (51) renal iskemi/reperfüzyon da

Tadalafil in nötrofil üzerine etkisini göstermek için VCAM değerlerini ölçüp ve bu maddenin VCAM değerlerini azaltarak pozitif etki sunduğunu ortaya çıkarmışlardır.

Hücre matriks etkileşimleri, ekstrasellüler matriks bileşenlerinin hidrolizinden sorumlu olan enzimler tarafından düzenlenir. Bu proteolitik enzimler ekstrasellüler matriks yapısının bütünlüğünü düzenleyerek matriks molekülleri tarafından oluşturulan sinyallerin denetlenmesi, hücre çoğalması, farklılaşması ve apoptozisinde temel rol oynar. Bu enzim sistemlerinin içinde Matriks Metalloproteinazlar (MMP) önemli bir yer tutar. (52) Liu ve arkadaşları (53) farelerde serebral iskemi molekülü çalışmışlar ve CD147 antagonistik Peptid-9'un nanopartikül iletiminin farelerde akut iskemik beyin hasarına ve TPA'nın indüklediği intraserebral kanamalara karşı koruduğunu ortaya çıkarmak için MMP-3 ve MMP-9 moleküllerini değerlendirmeye almışlardır. Owolabi ve arkadaşları (54) akut aterosklerotik miyokardiyal hasar öncesi ve sonrasında MMP-3 ve MMP-9 seviyelerini ölçüp, MI da artış gösterdiğini belirtmişlerdir.

Giagtzidis ve arkadaşları (55) periferik arter hastalığı nedeniyle alt ekstremitelerde endovasküler girişim yapılan hastalarda dolaşımdaki matriks metalloproteinazların profilini incelemişler ve Matriks metalloproteinazların aterosklerotik vasküler hastalığın gelişiminde ve ilerlemesinde önemli bir rol oynadığını net bir şekilde ifade etmişlerdir.

Biz de çalışmamızda immunohistokimyasal olarak aort dokusu ve çizgili kas dokusunda MMP-3 ve MMP-9 seviyelerini ölçtük. Nikardipin uygulanan sıçanlarda oldukça azalmış olduğunu gözlemledik.

## 8. SONUÇ

Bu çalışma vasküler cerrahi sonrasında gelişebilen reperfüzyon hasarı nedeniyle artış gösteren morbidite ve mortaliteyi azaltma aşamasında başarılı olabilecek bir ajanın ortaya çıkarılması amacıyla yapılmıştır.

Sonuç olarak, elimizdeki bulgular, iskemi-reperfüzyon modeli çalışmamızın sonucunda biyokimyasal ve histopatolojik olarak İR hasarının oluştuğunu; verilen nikardipin tedavisinin bu hasara karşı koruyucu etki gösterdiğini söyleyebiliriz.

Bu yararlı etkinin hangi mekanizmalar aracılığı ile oluştuğunu tam olarak aydınlatabilmek için yeni deneysel çalışmalara gereksinim vardır.



## 9. KAYNAKLAR

1. Kumar V, Abbas A, Aster J (çeviri: Tuzlalı S, Güllüoğlu M, Çevikbaş U). Robbins Temel Patoloji. Dokuzuncu baskı. İstanbul Nobel Tıp Kitabevi 2013;7.
2. Li C, Jackson RM. Reactive species mechanisms of cellular hypoxia-reoxygenation injury. *Am J Physiol Cell Physiol* 2002; 282: 227-41.
3. Cronenwelt J., Johnston K. Rutherford's Vascular Surgery, Seventh Edition, Elsevier 2010;89
4. Woodfin A, Voisin MB, Nourshargh S. PECAM-1: a multi-functional molecule in inflammation and vascular biology. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2007; 27: 2514-2523.
5. Kouoh F, Gressier B, Dine T, Luyckx M, Brunet C, Ballester L, Cazin JC. Antioxidant effects and anti-elastase activity of the calcium antagonist nicardipine on activated human and rabbit neutrophils--a potential antiatherosclerotic property of calcium antagonists? *Cardiovasc Drugs Ther.* 2002 Dec;16(6):515-20.
6. Ege T. Kalp ve damar hastalıklarında iskemi-reperfüzyon hasarı. Duran E (Editör). Kalp ve damar cerrahisi. I.Baskı. İstanbul: Çapa Tıp Kitabevi; 2004: 197-215.
7. Gute DC, Ishida T, Yarimizu K, Korthuis RJ. Inflammatory responses to ischemia and reperfusion in skeletal muscle. *Molec Cell Bioch*1998; 179: 169–187.
8. Blaisdell F W. The pathophysiology of skeletal muscle ischemia and the reperfusion syndrome: A review. *Cardio Surg* 2002; 10: 620–630.
9. Springer TA. Traffic signals for lymphocyte recirculation and leukocyte emigration: the multistep paradigm. *Cell* 1994; 76: 301-314.
10. Yavaş D, Zengin M, Kaklıkaya İ, Uzun Z, Ören A, et al. Serbest oksijen radikal temizleyici olarak aprotininin rolü (deneysel çalışma). *GKD Cer Derg* 1994; 2: 208-215.
11. Russel RC, Roth AC, Kucan JO, Zook EG. Reperfusion injury and oxygen free radicals: A review. *J Reconstr Microsurg* 1989; 5: 79-84
12. Oyokuni S: Reactive oxygen species-induced molecular damage and its application in pathology. *Pathol int* 1999; 49: 91-102.
13. Akkan R, Kalsiyum Kanal blokerleri, Katzung Temel ve Klinik Farmakoloji, 12. Edisyon 2014;195
14. Wang H, Joseph JA. Quantifying cellular oxidative stress by dichlorofluorescein assay using microplate reader. *Free Radic Biol Med* 1999; 27: 612-616.)
15. Buege JA, Aust SD. Microsomal lipid peroxidation. *Methods Enzymol* 1978; 52: 302–310.
16. Hanasand M, Omdal R, Norheim KB, Gøransson LG, Brede C, Jonsson G. Improved detection of advanced oxidation protein products in plasma. *Clin Chim Acta* 2012; 413: 901-906.

17. Hu, M. L. Measurement of protein thiol groups and glutathione in plasma (1994) *Methods Enzymol.* 233:380-382
18. Benzie IF, Strain JJ. The ferric reducing ability of plasma (FRAP) as a measure of "antioxidant power": the FRAP assay. *Anal Biochem* 1996; 239: 70-76.
19. Paoletti f, Aldinucci D, Mocali A, Caparrini A. A sensitive spectrophotometric method for the determination of superoxide dismutase activity in tissue extracts. *Analytical Biochemistry.* 1986; 154; 536-541
20. Lawrence RA, Burk RF. Glutathione peroxidase activity in selenium-deficient rat liver. *Biochem Biophys Res Commun* 1976; 71: 952-958
21. Goth L, A simple method for determination of serum catalase activity and revision of reference range. *Clin Chim Acta* 1991; 196; 143-152
22. Braunwald E, Kloner RA Myocardial reperfusion: a double edged sword? *J Clin Invest* 1985;76:1713-1719.
23. Li C, Jackson RM. Reactive species mechanisms of cellular hypoxia-reoxygenation injury. *Am J Physiol Cell Physiol* 2002; 282: 227-41.
24. Roberts AJ, et al. Cardiac and renal responses to cross-clamping of the descending thoracic aorta. *J Thorac Cardiovasc Surg* 1983; 86: 732- 741.
25. Nath AK, Fischereder M, Hostetter H. The role of oxidants in progressive renal injury. *Kidney Int* 1994; 45: 111-115
26. Köksal C, Bozkurt AK, Cangel U. Attenuation of ischemia/reperfusion injury by Nacetylcysteine in a rat hind limb model. *J Surg Res.* 2003 May 15;111(2): 236-9.
27. Qi H, Qin J, Ren L, Li L, Lan L, Yan Y, Gan S, Zhang Y. Efficacy of low-dose nicardipine for emergent treatment of severe postpartum hypertension in maternal intensive care units: An observational study. *Pregnancy Hypertens.* 2020 Jul;21:43-49.
28. Kaplan JA. The role of nicardipine during anesthesia and surgery. *Clin Ther.* 1989;11(1):84-93.
29. Kaplan JA. Clinical considerations for the use of intravenous nicardipine in the treatment of postoperative hypertension. *Am Heart J.* 1990 Feb;119(2 Pt 2):443-6. doi: 10.1016/s0002-8703(05)80066-3. PMID: 2405614.
30. Stuart D, Christian R, Uschmann H, Palokas M. Effectiveness of intrathecal nicardipine on cerebral vasospasm in non-traumatic subarachnoid hemorrhage: a systematic review. *JB I Database System Rev Implement Rep.* 2018 Oct;16(10):2013-2026
31. Habibzadeh MR, Thai H, Movahed MR. Prophylactic intragraft injection of nicardipine prior to saphenous vein graft percutaneous intervention for the prevention of no-reflow: a review and comparison to protection devices. *J Invasive Cardiol.* 2011 May;23(5):202-6. PMID: 21562350.

32. Martí Massó JF, Lozano R. Nicardipine in the prevention of cerebral infarction. *Clin Ther.* 1990 Jul-Aug;12(4):344-51. PMID: 2224948
33. Hanasand M, Omdal R, Norheim KB, Gøransson LG, Brede C, Jonsson G. Improved detection of advanced oxidation protein products in plasma. *Clin Chim Acta* 2012; 413: 901-906.
34. Kiriş İ, Okutan H, Savaş Ç, Yönden Z, Delibas N. Deneysel aortik iskemi reperfüzyon modelinde renal hasara gadolinyum klorürün etkisi. *Turkish J Vasc Surg* 2005; 14: 13- 18
35. Hazzaa SM, Abdou AG, Ibraheim EO, Salem EA, Hassan MHA, Abdel-Razek HAD. Effect of L-carnitine and atorvastatin on a rat model of ischemia-reperfusion injury of spinal cord. *J Immunoassay Immunochem.* 2021 Apr 26;1-24.
36. Sun YD, Gao YS, Xu LW, Zhang YF, Cheng C, Wei KC, Lin J, Chen G, Liu CY, Li QF. Protective effects of sodium ferulate on flap transplantation via anti-inflammatory modulation and oxidative stress inhibition. *Braz J Med Biol Res.* 2021 May 17;54(7):e10520.
37. Zhang X, Liu HM, Yang YJ, Zhou TF. [Protection of HOE642 against cardiomyocyte injury caused by anoxia and reoxygenation]. *Sichuan Da Xue Xue Bao Yi Xue Ban.* 2005 Sep;36(5):672-5. Chinese. PMID: 16235534
38. Xu M, Li X, Song L. Baicalin regulates macrophages polarization and alleviates myocardial ischaemia/reperfusion injury via inhibiting JAK/STAT pathway. *Pharm Biol.* 2020 Dec;58(1):655-663.
39. Patiar S, Harris AL. Role of hypoxia-inducible factor-1 $\alpha$  as a cancer therapy target. *Endocrine-Related Cancer* 2006;13:61-75.
40. Semenza GL. Evaluation of HIF-1 inhibitors as anticancer agents. *Cancer Lett* 2007;12(19-20):853-59.
41. Semenza GL. Regulation of mammalian O<sub>2</sub> homeostasis by hypoxia-inducible factor 1. *Annu Rev Cell Dev Biol.* 1999;15:551-78.
42. Wang C, Niu F, Ren N, Wang X, Zhong H, Zhu J, Li B. Hyperbaric Oxygen Improves Cerebral Ischemia/Reperfusion Injury in Rats Probably via Inhibition of Autophagy Triggered by the Downregulation of Hypoxia-Inducing Factor-1 Alpha. *Biomed Res Int.* 2021 Mar 15;2021:6615685.
43. Terada H, Hirata N, Sawashita Y, Ohno S, Yoshikawa Y, Yamakage M. Acute Hypobaric and Hypoxic Preconditioning Reduces Myocardial Ischemia-Reperfusion Injury in Rats. *Cardiol Res Pract.* 2021 Mar 16;2021:6617374.
44. Matsushima S, Kuroda J, Ago T, Zhai P, Ikeda Y, Oka S, Fong GH, Tian R, Sadoshima J. Broad suppression of NADPH oxidase activity exacerbates ischemia/reperfusion injury through inadvertent downregulation of hypoxia-inducible factor-1 $\alpha$  and upregulation of peroxisome proliferator-activated receptor- $\alpha$ . *Circ Res.* 2013 Apr 12;112(8):1135-49.

45. Natarajan R, Salloum FN, Fisher BJ, Kukreja RC, Fowler AA 3rd. Hypoxia inducible factor-1 activation by prolyl 4-hydroxylase-2 gene silencing attenuates myocardial ischemia reperfusion injury. *Circ Res*. 2006 Jan 6;98(1):133-40.
46. Patarroyo M. Leukocyte adhesion in host defense and tissue injury. *Clin Immunol Immunopathol* 60: 333-336. 1991
47. Dustin ML, Rothlein R, Bhan AK, Dinarello CA, Springer TA. Induction by IL 1 and interferon-gamma: tissue distribution, biochemistry, and function of a natural adherence molecule (ICAM-1). *J Immunol* 137: 245-54. 1986
48. Feldman M. Intercellular adhesion molecules. In: Roitt I, Brastaff J, Male D, eds. *Immunology*. Barselona: Mosby, 143-5. 1996
49. Zhang P, Cui J. Neuroprotective Effect of Fisetin Against the Cerebral Ischemia-Reperfusion Damage via Suppression of Oxidative Stress and Inflammatory Parameters. *Inflammation*. 2021 Feb 22. 10.1007/s10753
50. Blankenberg S, Rupprecht HJ, Bickel C, Peetz D, Hafner G, Tiret L and Meyer J. Circulating cell adhesion molecules and death in patients with coronary artery disease. *Circulation* 104: 1336-42. 2001
51. Maruyama Y, Araki M, Kidokoro K, Sogawa Y, Yoshinaga K, Mitsui Y, Sadahira T, Wada K, Watanabe M, Watanabe T, Kashihara N, Nasu Y. Evaluation of Neutrophil Dynamics Change by Protective Effect of Tadalafil After Renal Ischemia/Reperfusion Using In Vivo Real-time Imaging. *Transplantation*. 2021 Apr 27. doi: 10.1097
52. Reel B. Matriks Metalloproteinaz Enzimleri Ve Ateroskleroz: Derleme . *Türkiye Klinikleri J Med Sci* 2006;26:527-537
53. Liu S, Jin R, Wang M, Li G. Nanoparticle Delivery of CD147 Antagonistic Peptide-9 Protects against Acute Ischemic Brain Injury and tPA-Induced Intracerebral Hemorrhage in Mice. *ACS Appl Bio Mater*. 2020 Apr 20;3(4):1976-1985. doi: 10.1021
54. Owolabi US, Amraotkar AR, Coulter AR, Singam NSV, Aladili BN, Singh A, Trainor PJ, Mitra R, DeFilippis AP. Change in matrix metalloproteinase 2, 3, and 9 levels at the time of and after acute atherothrombotic myocardial infarction. *J Thromb Thrombolysis*. 2020 Feb;49(2):235-244. doi: 10.1007
55. Giagtzidis IT, Kadoglou NP, Mantas G, Spathis A, Papazoglou KO, Karakitsos P, Liapis CD, Karkos CD. The Profile of Circulating Matrix Metalloproteinases in Patients Undergoing Lower Limb Endovascular Interventions for Peripheral Arterial Disease. *Ann Vasc Surg*. 2017 Aug; 43:188-196. doi: 10.1016