

**TC
FIRAT ÜNİVERSİTESİ
TIP FAKÜLTESİ
KALP ve DAMAR CERRAHİSİ ANABİLİM DALI**

**DENEYSEL ALT EKSTREMİTE İSKEMİ REPERFÜZYON
MODELİNDE APOSİNİN'İN İSKELET KASI ÜZERİNE
KORUYUCU ETKİLERİNİN ARAŞTIRILMASI**

**UZMANLIK TEZİ
Dr. Mehmet ÖZER**

**TEZ DANIŞMANI
Yrd. Doç. Dr. Ayhan UYSAL**

**ELAZIĞ
2015**

DEKANLIK ONAYI

Prof. Dr. Murat ATMACA

DEKAN

Bu tez uzmanlık tezi standartlarına uygun bulunmuştur.

Prof. Dr. Oktay BURMA

Kalp ve Damar Cerrahisi Anabilim Dalı Başkanı

Tez tarafımdan okunmuş, kapsam ve kalite yönünden Uzmanlık Tezi olarak kabul edilmiştir.

Yrd. Doç. Dr. Ayhan UYSAL _____

Danışman

Uzmanlık Tezi Değerlendirme Jüri Üyeleri

.....	_____
.....	_____
.....	_____
.....	_____
.....	_____

TEŞEKKÜR

İhtisasım boyunca her aşamada sürekli desteklerini gördüğüm Kalp ve Damar Cerrahisi Anabilim Dalı Başkanımız değerli hocam Prof. Dr. Oktay BURMA'ya ve bilgi, öneri ve tecrübelerinden yararlandığım tez danışmanım değerli hocam Yrd. Doç. Dr. Ayhan UYSAL'a, bilgi, öneri ve tecrübelerinden yararlandığım değerli hocam Yrd. Doç. Dr. İ.Murat ÖZGÜLER'e sonsuz saygı ve teşekkürlerimi sunarım.

Tezimin Histolojik çalışmalarında katkılarından dolayı Tıbbi Embriyoloji ve Histoloji Anabilim Dalı öğretim üyesi sayın Yrd. Doç. Dr. Tuncay KULOĞLU'na, tezin patolojik incelemelerini yapan ve yol gösteren Tıbbi Patoloji Anabilim Dalı öğretim üyesi Uzm. Dr. Gökhan ARTAŞ'a bilgi, tecrübe ve önerilerinden yararlandığım Anestezi Anabilim Dalı öğretim üyesi sayın Prof. Dr. Azize Beştaş'a ve Anestezi Anabilim Dalı araştırma görevlisi arkadaşlarıma teşekkürlerimi sunarım.

İhtisas eğitimim boyunca birlikte çalıştığım Kalp ve Damar Cerrahisi Anabilim Dalı araştırma görevlisi arkadaşlarıma, ameliyathane, yoğun bakım ve klinikteki tüm hemşire ve personel arkadaşlara teşekkürlerimi sunarım.

Beni tüm zorluk ve sıkıntılara rağmen, okutup bugünlere getiren ve hiçbir fedakarlıktan sakınmayan canım Annem ve Babama sonsuz teşekkürlerimi sunarım. Beş yılı aşan bir zaman zarfında ihtisas eğitimim boyunca bir an olsun desteğini benden esirgemeyen eşim Yeliz ÖZER'e sevgi ve teşekkürlerimi sunarım.

ÖZET

Deneyisel çalışmalarda iskemi/reperfüzyon (I/R) hasarının önlenmesi amacıyla birçok ajan ile başarılı sonuçlar alınsa da bunların çok az kısmı klinik olarak kullanılmıştır.

Bu çalışmada deneyisel alt extremitte I/R hasarında, aposininin doku malondialdehit (MDA), apoptozis ve Transient Reseptör Potansiyel Melastatin 2 (TRPM2) üzerine etkileri incelenmiştir.

Çalışmada, 30 adet 8-10 haftalık dişi Sprague Dawley rat kullanıldı. Deney hayvanları her grupta 6 hayvan olacak biçimde 5 gruba ayrıldı. Kontrol grubuna deney süresince herhangi bir uygulama yapılmadı. Sham grubuna sadece laparotomi yapıldı. I/R grubuna infrarenal abdominal aorta klempleyilerek 2 saat iskemi, 2 saat reperfüzyon uygulandı. Aposinin-iskemi-reperfüzyon grubuna (A-I/R) I/R öncesi 20 mg/kg dozunda aposinin intravenöz (iv) uygulandı. İskemi-aposinin-reperfüzyon (IAR) grubuna iskemi yapıldı reperfüzyondan yarım saat önce 20 mg/kg dozunda aposinin iv olarak uygulandı.

Deney sonunda anestezi altında ratların soleus kasları çıkartılıp dekapite edildi. Bloklardan alınan kesitlere apoptotik hücrelerin belirlenmesi için TUNEL (TdT-Mediated Nick and Labeling Technique), TRPM2 immünreaktivitesi için avidin-biotin-peroksidaz yöntemi ve histopatolojik inceleme için ise masson trikrom boyama tekniği uygulandı.

Çalışmamızda kontrol ve sham grupları bulguları benzerdi. Kontrol grubu ile karşılaştırıldığında I/R grubunda belirgin histopatolojik değişiklikler ile birlikte apoptozis artmış iken TRPM2 ve MDA seviyesi azalmıştı. I/R grubu ile karşılaştırıldığında A-I/R grubunda histopatolojik değişiklikler ve apoptozisde belirgin iyileşme izlenmekle beraber, MDA seviyesi artmış, TRPM2 immünreaktivitesi ise azalmıştı. IAR grubu ise I/R grubuna benzerdi.

Sonuç olarak, I/R öncesi uygulanan aposininin I/R hasarında TRPM2 immünreaktivitesi ve histopatolojik değişiklikleri belirgin olarak azalttığı ve klinik kullanımı için daha kapsamlı deneyisel çalışmalara gereksinim olduğu kanaatine varılmıştır.

Anahtar Kelimeler: İskemi/Reperfüzyon Hasarı, MDA, TRPM2, Apoptozis, Aposinin

ABSTRACT

THE INVESTIGATION OF APOCYNIN'S PROTECTIVE EFFECTS ON SKELETAL MUSCLE OF EXPERIMENTAL LOWER EXTREMITY ISCHEMIA-REPERFUSION MODEL

Although successful results were obtained with many agents for prevention of ischemia-reperfusion (I/R) injury in experimental studies, only a small part of them were used clinically.

In this study, it was aimed to investigate the influences of apocynin on tissue malondialdehyde (MDA), apoptosis and Transient Receptor Potential Melastatin 2 (TRPM2) in experimental lower extremity I/R injury.

Thirty female Sprague Dawley rats aged 8-10 weeks were used in the study. Test animals were allocated to 5 groups with 6 animals in each. Infrarenal abdominal aorta clamping was done in I/R group and 2 hours ischemia and 2 hours reperfusion was applied. In apocynin-ischemia-reperfusion group (A-I/R), ischemia was created and 20 mg/kg of apocynin was administered via intravenous (iv) route 30 min before reperfusion.

At the end of the test, soleus muscles were removed and the rats were decapitated. TUNEL (TdT-Mediated Nick and Labeling Technique) was applied for determining apoptotic cells, avidin-biotin-peroxidase method was applied for TRPM2 immunoreactivity and mason trichrome stain was applied for histopathologic examination.

Results of control and sham groups were similar. When compared with control group, while apoptosis increased together with significant histopathologic changes, TRPM2 and MDA levels decreased in I/R group. When compared with I/R group, although significant improvement was observed in histopathologic changes and apoptosis, MDA level increased, TRPM2 immunoreactivity decreased in A-I/R group. IAR group was similar with I/R group.

In conclusion, it was considered that apocynin applied before I/R significantly reduced TRPM2 immunoreactivity and histopathologic changes in I/R injury and more comprehensive studies are required for its clinical use.

Key words: ischemia-reperfusion injury, MDA, TRPM2, apoptosis, apocynin

İÇİNDEKİLER

BAŞLIK SAYFASI	i
ONAY SAYFASI	ii
TEŞEKKÜR	iii
ÖZET	iv
ABSTRACT	v
İÇİNDEKİLER	vi
TABLO LİSTESİ	ix
ŞEKİL LİSTESİ	x
KISALTMALAR LİSTESİ	xii
1. GİRİŞ	1
1.1. Genel Bilgiler	2
1.1.1. İskemi	2
1.1.2. İskeminin Tarihçesi	2
1.1.3. İskemi Reperfüzyon Hasarı	3
1.1.4. İskelet Kasında İskemi/Reperfüzyon Hasarı	4
1.1.5. İskemi/Reperfüzyona Karşı Lokal Mikrovasküler Yanıtlar	4
1.1.6. İskemi/Reperfüzyon Sonrası Uzak Organ Hasarı	5
1.1.7. İskemik ve Hipoksik Zedelenme	6
1.1.8. İskemi/Reperfüzyon Hasarı Mekanizması	8
1.1.8.1. Serbest Radikaller	8
1.1.8.2. İskemi Reperfüzyon Hasarında Polimorf Nüveli Lökositler	12
1.1.8.3. İskemi Reperfüzyon Hasarında Komplemanın Rolü	12
1.1.8.4. İskemi Reperfüzyon Hasarında Endotel Hücresinin Rolü	13
1.1.9. Damar Cerrahisinde İskemi Reperfüzyon	13
1.1.10. Serbest Radikallere Karşı Savunma Sistemleri (Antioksidanlar)	14
1.1.10.1. Antioksidan Mekanizmalar	14
1.1.10.2. Antioksidanların Sınıflandırılması	14
1.1.10.2.1. Enzimatik Antioksidanlar	15
1.1.10.2.2. Enzimatik Olmayan Antioksidanlar	16
1.1.10.2.3. Süpürücü Antioksidanlar	16
1.1.11. Malondialdehit (MDA)	16

1.2. Hücre Zarının Yapısı ve Biyofiziksel Özellikleri	17
1.2.1. Hücre Zarı Kanalları	17
1.2.2. Transient Reseptör Potansiyel (TRP) Kanalı ve Ailesi	18
1.2.3. Transient Reseptör Potansiyel Melastatin (TRPM)	20
1.2.3.1. Transient Reseptör Potansiyel Melastatin2 (TRPM2)	21
1.3. Apoptozis	24
1.3.1. Apoptozun genetik düzenlenmesi	27
1.3.2. Apoptozun Sitotoksik Düzenlenmesi	29
1.3.2.1. Fas - Fas Ligandı veya CD95 Yolu	29
1.3.2.2. Granzim veya Perforin Sistemi	29
1.3.2.3. Apoptozisin Saptanmasında Kullanılan Yöntemler	31
1.3.4. İmmünohistokimyasal Yöntem	32
1.3.4.1. TUNEL Yöntemi	32
1.4. Aposinin	33
1.4.1. Aposinin'in etki mekanizması	34
1.4.2. Toksisite	34
1.4.3. Aposinin kinetiği	35
1.4.4. Uyarılmış insan nötrofillerinde NADPH oksidazına bağlı bir ROS üretimi inhibitörü olarak Aposinin	35
2. GEREÇ VE YÖNTEM	36
2.1. Deneysel Grupların Sınıflandırılması	36
2.2. Anestezi-Cerrahi Teknik ve Örneklerin Alınması	36
2.3. Histopatolojik Değerlendirme ve Ölçüm Yöntemleri	37
2.3.1. Malondialdehit (MDA) Çalışması	37
2.3.2. TUNEL Metodu	38
2.3.3. İmmünohistokimyasal İnceleme	39
2.3.4. Histolojik Çalışma	41
2.4. İstatistiksel Analiz	42
3. BULGULAR	43
3.1. MDA Bulgular	43
3.2. TUNEL Bulgular	43
3.3. İmmünohistokimyasal Bulgular	46

3.3.1. TRPM2 İmmünreaktivitesi	46
3.4. Histolojik Bulgular	50
4. TARTIŞMA	55
5. KAYNAKLAR	61
6. ÖZGEÇMİŞ	78

TABLO LİSTESİ

Tablo 1. Serbest radikal türleri	9
Tablo 2. Yapısal olarak antioksidanların sınıflandırılması	14
Tablo 3. Farklı kardiyovasküler hücrelerde TRPM kanallarının varlığı	21
Tablo 4. Koagulasyon Nekrozu Ve Apoptozisin Basitleştirilmiş Özellikleri	26
Tablo 5. Apoptozisin belirlenmesinde kullanılan yöntemler	32
Tablo 6. TUNEL Boyama Prosedürü.	39
Tablo 7. İmmünohistokimyasal boyama prosedürü	41
Tablo 8. Histolojik takip serileri	42
Tablo 9. Doku MDA değerleri	43
Tablo 10. Apoptotik İndeks (%)	43
Tablo 11. TRPM2 immünreaktivitesi.	46
Tablo 12. Histoskor	50

ŞEKİL LİSTESİ

Şekil 1.	İskemide pürin metabolizmasının gelişimi ve ksantin dehidrogenazın ksantin oksidaza çevrilmesi, reperfüzyonda oksijen radikalının oluşumu.	7
Şekil 2.	TRP reseptör alt-ünitesinin moleküler modeli.	19
Şekil 3.	TRP ailesi	20
Şekil 4.	TRPM kanalları alt grup ve üyeleri	21
Şekil 5.	TRPM2 kanalının moleküler yapısı.	22
Şekil 6.	TRPM2 kanal aktivasyonu	24
Şekil 7.	Koagülasyon nekrozunda (solda) ve apoptoziste (sağda) görülen ultrastrüktürel değişiklikler dizisi.	26
Şekil 8.	Apoptozisteki olayların şematik görünümü.	30
Şekil 9.	CD95 reseptörü ile indüklenmiş ve DNA hasan ile uyarılmış apoptozis yolları ve tümör hücrelerinin ölümden kaçış mekanizması	31
Şekil 10.	Aposinin	33
Şekil 11.	Kontrol grubuna ait iskelet kası dokusu. TUNEL boyama	44
Şekil 12.	Sham grubuna ait iskelet kası dokusu. TUNEL boyama	44
Şekil 13.	I/R grubuna ait iskelet kası dokusunda TUNEL pozitif hücreler	45
Şekil 14.	A-I/R grubuna ait iskelet kası dokusu. TUNEL boyama	45
Şekil 15.	IAR grubuna ait iskelet kası dokusunda TUNEL pozitif hücreler	46
Şekil 16.	Kontrol grubuna ait iskelet kası dokusunda TRPM2 immunreaktivitesi	47
Şekil 17.	Sham grubuna ait iskelet kası dokusunda TRPM2 immunreaktivitesi	47
Şekil 18.	I/R grubuna ait iskelet kası dokusunda TRPM2 immunreaktivitesi	48
Şekil 19.	A-I/R grubuna ait iskelet kası dokusunda TRPM2 immunreaktivitesi	48
Şekil 20.	IAR grubuna ait iskelet kası dokusunda TRPM2 immunreaktivitesi	49
Şekil 21.	Normal görünümlü kontrol grubuna ait iskelet kası dokusu. Masson trikrom.	51
Şekil 22.	Normal görünümlü sham grubuna ait iskelet kası dokusu. Masson trikrom.	51
Şekil 23.	I/R grubuna ait histolojik değişikliklere sahip iskelet kası dokusu. Masson trikrom.	52

Şekil 24. I/R grubuna ait histolojik değışiklere sahip iskelet kası dokusu. Masson trikrom.	52
Şekil 25. A-I/R grubuna ait histolojik değışiklere sahip iskelet kası dokusu. Masson trikrom.	53
Şekil 26. A-I/R grubuna ait histolojik değışiklere sahip iskelet kası dokusu. Masson trikrom.	53
Şekil 27. IAR grubuna ait histolojik değışiklere sahip iskelet kası dokusu. Masson trikrom.	54
Şekil 28. IAR grubuna ait histolojik değışiklere sahip iskelet kası dokusu. Masson trikrom.	54

KISALTMALAR LİSTESİ

ADP	: Adenozin difosfat
ADPR	: Adenozin Difosforiboz
AIF	: Apoptoz uyarıcı faktör
A-I/R	: Aposinin-İskemi-reperfüzyon
AKK	: Aortik kros-klemp
ALI	: Akut Akciğer Hasarı
AMP	: Adenozin monofosfat
APAF-1	: Apoptotik Proteaz Aktive Faktör-1
ARDS	: Akut solunumsal distres sendromu
ATP	: Adenozin trifosfat
CAD	: Kaspaz uyarıcı Dnase
CAT	: Katalaz
CAM	: Kalmodulin
CT	: Custom Tailored
CTL	: Sitotoksik T lenfositler
DNA	: Deoksiribonükleik Asit
ET	: Endotelin
FADD	: Fas Bağımlı Ölüm Domain Proteinini
Fas	: 45kd ağırlığında tip 1 glikolize transmembran reseptörü
Fas L	: Apoptozisi uyaran 40kd'luk tip 2 transmembran proteini
FFA	: Flufenamik asit
GSH-P	: Glutasyon peroksidaz
GSSG-R	: Glutasyon redüktaz
GST	: Glutasyon S-transferaz
H2O2	: Hidrojen peroksit
HPLC	: Yüksek performanslı sıvı kromatografisi
ICE	: Interleukin converting enzim
IAP	: Apoptozun inhibitörleri
I/R	: İskemi/reperfüzyon
IL1	: İnterlökin-1
IL6	: İnterlökin-6

İAA	: İnfrarenal abdominal aorta
iv	: İntravenöz
KAT	: Katalaz
LTRPC2	: Long transient receptor potential channel 2
MDA	: Malondialdehit
MCP	: Monosit kemoatraktan protein
MIP	: Makrofaj İnflamatuvar Protein
MODS	: Çoklu organ yetmezliği sendromu
NAD	: Nikotinamid Adenin Dinükleotit
NADP	: Nikotinamid Adenin Dinükleotit Fosfat
NO-	: Nitrikoksit
NK	: Doğal öldürücüler
NUDT9-H	: TRPM üzerinde bulunan enzimatik bölge
O2	: Singlet Oksijen
O2-	: Süperoksit
OH-	: Hidroksil radikali
PARP	: Poli ADPR polimeraz
PARG	: Poli-ADPR glikohidrolaz
PMN	: Polimorfonükleer nötrofil
PZR	: Polimeraz Zincir Reaksiyonu
RIP	: Reseptör etkileşimli protein
RNA	: Ribonükleik Asit
ROS	: Reaktif oksijen türleri
SIRS	: Sistemik inflamatuvar yanıt sendromu
SOD	: Süperoksit dismutaz
SOR	: Serbest oksijen radikalleri
TBA	: Tiyobarbitürik asit
TCA	: Trichloroanisole
TdT	: Terminal deoksinükleotitil transferaz
TNF	: Tümör nekroz faktörü
TNFR1	: Tümör nekroz faktör reseptörü-1
TNF-α	: Tümör nekroz faktör-alfa

TRAIL	: Tümör nekroz faktör ilgili apoptoz uyarıcı ligand
TRADD	: Tümör nekroz faktör reseptör Bağımlı lm Domain Proteini
TRP	: Transient Reseptör Potansiyel
TRPA	: Transient Reseptör Potansiyel Ankirin
TRPC	: Transient Reseptör Potansiyel Kanonik
TRPM	: Transient Reseptör Potansiyel Melastatin
TRPML	: Transient Reseptör Potansiyel Mucolipin
TRPN (NOMPC)	: Non Mekano Reseptör Potansiyel-C
TRPP	: Transient Reseptör Potansiyel Polisistin
TRPV	: Transient Reseptör Potansiyel Vanilloid
TUNEL	: TdT-mediated dUTP-biotin nick end-labeling technique
TXA2	: Tromboksan A2

1. GİRİŞ

İskemi, dokunun oksijen ve diğer metabolitlere olan ihtiyacının dolaşım tarafından sağlanamaması ve oluşan artık ürünlerin uzaklaştırılamaması olarak tanımlanır (1).

Doku yada organa yetersiz miktarda oksijen sunumu ise hipoksi olarak tarif edilebilir. Her iki durumda da reperfüzyonla birlikte hasarının başlaması ve metabolizmanın anaerobik yöne doğru kayması sonucu bu süreçte oluşan doku hasarı İskemi/Reperfüzyon Sendromu olarak tarif edilir (2).

Reperfüzyon, iskemi sonucu doku veya organda oluşan enerji ihtiyacının giderilmesi ve zararlı metabolitlerin uzaklaştırılması için doku ya da organa yeniden kan akımının sağlanması olayına denir. Ancak, iskemik dokunun reperfüzyonu dokuda paradoksal olarak sadece iskemi ile oluşan hasara göre çok daha ciddi zarara yol açar (3, 4).

Her dokuya ait bir kritik iskemi süresi bulunmaktadır. İskemiye bağlı hasarın şiddeti ise hipoperfüzyon zamanı ve miktarı ile orantılı olup, hücre tipine, travmaya karşı duyarlılığına, diferansiasyonuna, kan ihtiyacı ve metabolizmasına göre değişiklik göstermektedir. İskemik hasara karşı kas dokusundaki değişiklikler için 4 saat, sinir dokusundaki değişiklikler için 8 saat, yağ dokusundaki değişiklikler için 13 saat, deridekiler için 24 saat ve kemik dokusundaki değişiklikler için 4 güne kadar geri dönüşümlü olabilir (5). Bunun sonucunda; iskelet kasının ekstremitelerde iskemiye en duyarlı doku olduğu görülmektedir.

Alt ekstremitelerde iskemi/reperfüzyon hasarı (I/R), özellikle aort cerrahisinde abdominal aortaya geçici bir süre ile kros-klemp uygulamalarında, tek veya çift taraflı akut arter tıkanıklıklarında, travmatik veya iyatrojenik arteriyel yaralanmalarda görülmektedir. Ayrıca diğer reperfüzyon hasarı sebepleri miyokard infarktüsü, serebrovasküler olaylar, mezenter ve periferik arter embolilerinde yapılan trombolitik tedaviler, sepsis, şok, organ transplantasyonu, yanık, pankreatit gibi cerrahi ve travmatik durumlarda ortaya çıkan iskemi ve hipovoleminin düzeltilmesi ile ayrıca ekstremitelere cerrahi girişim sırasında kullanılan turnikeler olarak sayılabilirler (6).

Abdominal aortaya geçici süre kros-klemp uygulaması sırasında iskemik kalan alt ekstremitelere dokusuna oksijen ve diğer metabolitler sağlanamaz. İskemiye

bağlı olarak lokal ve uzak organ hasarından sorumlu olan nötrofil aktivasyonu, proinflatuar sitokinlerin salınımı, komplemanın aktivasyonu, serbest oksijen radikalleri (SOR) ve proteazların oluşumu, endotelin, anjiyotensin ve katekolaminler gibi vazokonstriktör ajanlar salınımı görülür.

Reperfüzyonda uzak organ hasarı etyolojisinde yer aldığı iddia edilen faktörlerden birisi ‘washout’ fenomenidir. Reperfüzyonda, ‘washout’ yani yıkanma etkisiyle sistemik dolaşıma birçok kimyasal mediyatör dağılır ve olası mikroembolilerle diğer organ kapiller damar yatakları tıkanarak uzak organlarda hasara katkıda bulunmaktadır (7, 8).

1.1. Genel Bilgiler

1.1.1. İskemi

İskemi, dokunun oksijen ve diğer metabolitlere olan ihtiyacının dolaşım tarafından sağlanamaması ve oluşan fazla ürünlerin uzaklaştırılamaması olarak tanımlanır (1).

Hipoksinin en sık görülen sebebi iskemidir. İskemi, kardiyak infarktüsde ve inmede olduğu gibi akut veya tromboanjitis obliterans hastalığındaki gibi kronik olarak seyredebilir. İskemik hasarın derecesi hipoksinin derinliğine ve şiddetine bağlıdır. Her iki durumda da I/R hasarının ilk basamağı oluşmakta ve sonuç olarak metabolizma anaerobik yöne doğru kaymaktadır (9). Ancak iskemide, hem metabolit yetersizliği hem de atık ürün birikimi nedeniyle, glikoliz metabolizması hipoksiye oranla daha erken sonlanır ve hasar çok daha erken ortaya çıkmaktadır (10).

1.1.2. İskeminin Tarihçesi

Volkman 1881 yılında iskekiye bağlı iskemik kontraktürü tariflemesiyle periferik arter hastalıklarının tarihçesi başlamıştır (11). Cannon tarafından 1920’li yıllarda şok ile ilgili toksik faktörleri araştıran ve 1923 yılında ‘Traumatic Shock’ isimli yayını ile iskemik dokunun tekrar kanlandırılmasına bağlı sistemik etkilerin ortaya çıktığı fikrini ortaya atılmıştır (12). Jepson 1926 yılında köpeklerde ekstremiteye turnike uygulanmasının deneysel olarak ödeme yol açtığını bildirmiştir (13). Husveldt ve Bjering 1937 yılında otomobil kazaları ile meydana gelen travmatik şok ardından renal lezyonlar oluştuğunu bildirmişlerdir (14). Bywaters,

İkinci Dünya Savaşı'nda Londra'nın bombalanması sırasında meydana gelen ciddi ekstremiteler yaralanmalarında, renal yetmezlik konusunda geniş hasta sayılı klinik izlemlerini yayınlayarak, tüm dünyanın dikkatini reperfüzyon problemine çekmeyi başarmıştır. Bywaters, böbrek yetmezliğinden ölen hastaların idrarındaki koyu renkli pigmentin myoglobinin olduğunu rapor etmiştir (15). İlk kez 1960 yılında iskemik ekstremiteler revaskülarizasyonu ile oluşabilecek risk, Haimovici tarafından "myonefropatik-metabolik sendrom" olarak tariflenmiştir (16).

1.1.3. İskemi Reperfüzyon Hasarı

İskemi/reperfüzyon hasarı; miyokard infarktüsü, serebrovasküler olay, travma, sepsis, şok, yanık gibi birçok hastalık ile trombolitik tedavi, koroner anjiyoplasti, kardiyopulmoner bypass, transplantasyon, anevrizma cerrahisi, periferik arter cerrahisi gibi medikal/cerrahi girişimlerde görülebilen ortak bir klinik tablodur (17, 18). Alt ekstremitelerde I/R hasarı, özellikle aort cerrahisi sırasında abdominal aortaya geçici bir süre klempe konulmasında, travmatik veya iatrojenik arteriyel yaralanmalarda, akut femoral arter tıkanıklıklarında ortaya çıkmaktadır (19).

Alt ekstremiteler I/R hasarında lokal etkiler iskelet kası ve damar endotelinde gözlenirken, sistemik etkiler ilk olarak akciğer, kalp, beyin ve böbrekler olmak üzere tüm organlarda gözlenebilir (20). İskelet kası, iskemik hasara en hassas doku olması sebebiyle alt ekstremiteler I/R hasarında önemli rol oynar. Alt ekstremiteler I/R hasarında prognoz kas dokudaki hasar miktarına bağlıdır. Reperfüzyonla oluşmuş inflamatuvar yanıt, geri dönüşümlü zedelenme miktarı ile doğru, nekrotik kas miktarı ile ters orantılıdır (21, 22). I/R hasarına bağlı mikrovasküler disfonksiyonda; endotel hücre değişiklikleri, endotel bariyer fonksiyon bozukluğu, vasküler tonusda değişim ve sitokin adezyon moleküllerinde artış görülür.

Reperfüzyon ile sistemik dolaşıma çıkan inflamatuvar maddeler, endotel hücre uyarılmasına ve mikrovasküler fonksiyon bozukluğuna yol açar, olası mikroembolilerle diğer organ kapillerini tıkayarak uzak organlarda hasara katkıda bulunurlar. Yaygın uzak organ hasarı durumunda yüksek mortalite ile seyreden çoklu organ yetmezlik sendromu (MODS) veya sistemik inflamatuvar yanıt sendromu (SIRS) gelişebilir (17, 22).

1.1.4. İskelet Kasında İskemi/Reperfüzyon Hasarı

Kasta değişiklikler: İskelet kası, iskemik hasara en hassas doku olup ekstremitayı oluşturan esas kütledir. Bu nedenle ekstremita I/R hasarının en önemli kısmını iskelet kası hasarı oluşturur (2, 23). İskemiye takiben yaklaşık üçüncü saatte ciddi kas hasarı ve altıncı saatte yaklaşık % 97 fonksiyonel doku kaybı olduğu (geri dönüşümsüz zedelenme) spektrofotometrik (triphenyltetrazolium chloride) yöntemlerle gösterilmiştir (24). Kas lifleri, sahip oldukları myoglobin içeriğine göre, kırmızı (tip 1) ve beyaz (tip 2) olarak sınıflandırılır. Kasların çoğu her iki türü içerse de bacağın ön kompartmanında tip 1 yada yavaş kasılan lifler daha çok baskın olup, enerji üretiminde aerobik metabolizmayı kullanmaları bu kas grubunu iskemiye daha hassas kılar. Bacağın arka kompartmanında; gastrocnemius kasında tip 2 veya hızlı kasılan lifler baskın olup, enerji üretiminde anaerobik metabolizma ön plandadır. İskeminin süresi ve etkilenen kas lifi tipi iskemik hasarda önemli olmakla birlikte dokunun vücuttaki konumu da önemlidir. Örnek olarak, çabuk soğuma sebebiyle, distal ekstremita kas dokusu proksimal kas dokusuna göre iskemiye daha dirençlidir (2, 23).

Mikrodolaşımda değişiklikler: İskemi, ilk olarak kapiller endotel hücreleri etkileyerek, hem lümen hem de sitoplazmaya doğru uzanan parmaklı çıkıntılar oluşturur. İskeminin devamıyla birlikte endotel veziküllerinde artış oluşur. Bu arada, hücreler arası bağlar gevşer ve geçit genişler. Heterojen dağılımlı endotel hücre ödemi oluşturarak kırmızı hücre sıkışmasını artırır. İskeminin dördüncü saatinden sonra mikrodolaşımda hücresel etkileşimler (eritrositik, trombositik ve lökositik) başlar. Venöz ve arteriyel kılcallar, reperfüzyon öncesinde, sıkışmış eritrositlerle kapanmış görünümündedirler. Reperfüzyonun erken döneminde, silindirik biçimindeki eritrosit kümeleri endotelial yüzeyde hasarlanma oluştururlar. Endotel hücre sitoplazmasındaki yıkım sonucu hücreler arası büyük geçitler oluşur. Reperfüzyonla birlikte, özellikle venöz kılcallarda, damar içi platelet ve fibrin kümeleri ile karakterize trombotik komplikasyonlar oluşur (23).

1.1.5. İskemi/Reperfüzyona Karşı Lokal Mikrovasküler Yanıtlar

Abdominal aorta ve alt ekstremita arterlerinin cerrahi girişimler sırasında klemplenmesi distalde iskemiye neden olmaktadır. Klempin açılarak distal kan

akımının tekrar sağlanması lokal, uzak doku ve organlarda reperfüzyon hasarıyla sonuçlanmaktadır (25).

Reperfüzyon hasarı üzerine 1973 yılında yapılmış bir çalışmada iskemik rat kalplerinde oksijene bağımlı enzim salınımının önemli rolü olduğunu göstermiştir. Dokulara yeniden oksijen sunulmasıyla miyokard veya diğer hücrelerde iskemi sırasında oluşan toksik hasar daha da şiddetlenmektedir. Bu nedenle dokuya oksijen sunulması sonucu toksik hasarın şiddetlenmesi hadisesine “oksijen paradoksu” adı verilmiştir (25).

Reperfüzyonun asıl amacı; iskemik kalan doku veya organın korunması ve tekrar fonksiyonlarını kazanmasının sağlanmasıdır. Reperfüzyon hasarı iskemi sonrası kanlanmanın yeniden sağlanmasıyla başlamakta, iskemi süresine bağlı olarak hedef ve uzak organlarda asemptomatik subklinik hasardan hedef dokuda ödem, nekroz, çap artışı, uzak organlarda fonksiyon kaybı, multiorgan yetmezliği ve sonrasında mortaliteye kadar ilerleyen semptomların olduğu geniş bir yelpazede karşımıza çıkmaktadır (25).

1.1.6. İskemi/Reperfüzyon Sonrası Uzak Organ Hasarı

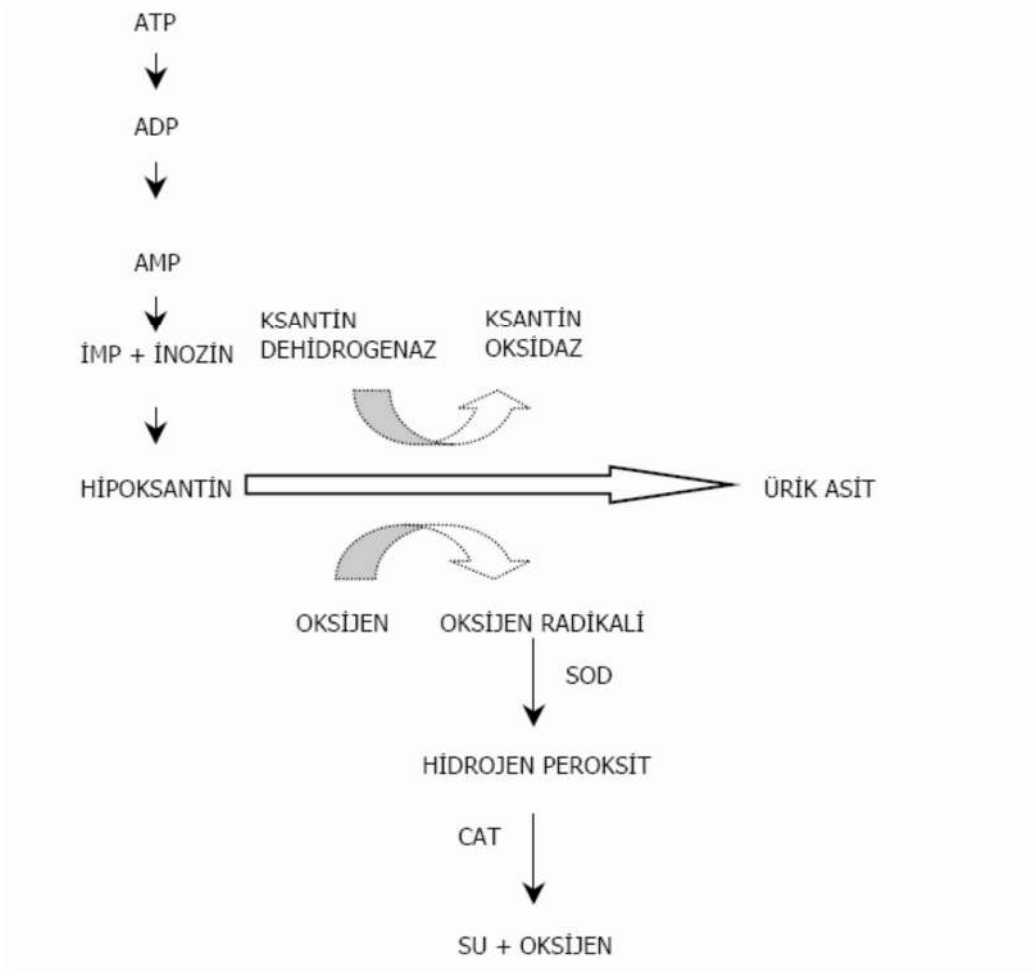
Doku veya organ reperfüzyonunun yıkıcı bir sonucu, ilk olarak iskemik hasara uğramayan organlarda da hasarın oluşmasıdır. MODS, iskelet kası (38), karaciğer, barsak reperfüzyonu yanı sıra aortik oklüzyon-reperfüzyon (30, 31) ve hipovolemik şoka bağlı olarak gelişmektedir (26-31). Ayrıca MODS, yoğun bakım hastalarında başlıca ölüm nedenidir (32). Çeşitli organlarda I/R sonrası splanknik vazokonstriksiyon ve göreceli mezenterik iskemi görülmektedir. Bu yoğun splanknik vazokonstriksiyon, MODS’un patogeneze katkıda bulunmaktadır. Enterik makrofajların bakteriyel ürünlerce uyarılması veya reperfüzyon sırasında dolaşıma salınan diğer mediyatörler, hemen hemen her organda makrofaj aktivasyonuna ve vasküler endoteli aktive edebilen inflamatuvar sitokinlerin (TNF α gibi) üretimine sebep olabilmektedir (33-35). Reperfüzyon sonrası salınan inflamatuvar mediyatörler, dolaşan lökositleri ve vasküler endotel hücrelerini aktive edebilmekte ve adezyon moleküllerinin üretimini arttırmaktadır (36, 37). Bunun neticesinde, vasküler dolaşımda nötrofil-endotel hücre etkileşimleri meydana gelmektedir. MODS ile ilişkili akciğer hasarı, akut akciğer hasarı (ALI) olarak

adlandırılan hafif fonksiyon bozukluğundan, ağır solunum yetmezliği veya akut solunumsal distres sendromuna (ARDS) kadar farklılaşan bir dizi akciğer hasarını temsil etmektedir (38). ARDS ve MODS ile ilişkili akciğer hasarının ayırt edici özelliği pulmoner mikrovasküler permeabilitede ve nötrofilden zengin alveol sıvı birikiminde artıştır (39, 40). Solunum yetmezliğinin ardından hepatik, renal ve gastrointestinal disfonksiyon, ayrıca santral sinir sistemi tutulumu ve myokard yetmezliği gelişir (34). Yaygın organ ve sistem tutulumuna ilaveten MODS, koagülasyon kaskadı ve immun sistemde disfonksiyon ile karakterize olup tromboz, dissemine intravasküler koagülasyon ve immun yetmezlik ile sonuçlanır (41). Oksidanlar ve aktive olmuş lökositler I/R'ye bağlı uzak organ hasarının mediyatörleri olarak gösterilmektedir (42).

1.1.7. İskemik ve Hipoksik Zedelenme

Hücre zedelenmesinin tıpta klinik olarak en sık görülen nedeni iskemidir. İskeminin başlaması ile birlikte normalde var olan aerobik metabolizma hızla anaerobik metabolizmaya dönüşerek doku ve organ işlevlerinde bozulmaya neden olmaktadır. İskemi ve hipokside aerobik metabolizmanın devam edememesi sebebiyle dokuda mevcut adenosin trifosfat (ATP)'lar tükenmeye başlar ve yeni ATP üretimi yetersizliği sebebiyle enerji ihtiyacı için gerekli olan olayların devamlılığı sağlanamaz (43, 44).

Adenosin trifosfat seviyelerinde azalma ve adenosin difosfat (ADP) düzeylerinde artma olur. Artan ADP'ler önce adenosin monofosfata (AMP) daha sonra adenosin, inozin ve sonunda hipoksantine dönüşmektedir. Hipoksantin reperfüzyonun sağlanması halinde oksijen ve ksantin oksidaz enziminin etkisi ile ksantine dönüşür. Ksantin ortamdaki oksijenle reaksiyona girerek ürik asite parçalanır. Bu siklus neticesinde hasardan sorumlu serbest oksijen radikalleri oluşmaktadır. Hipoksinin devam etmesi durumunda ortamda oksijen bulunmadığından ksantin, nikotinamid adenin dinükleotit (NAD) ve hidrojen ile reaksiyona girerek ürik asit, nikotinamid adenin dinükleotit fosfat (NADP), H^+ , hidrojen peroksit (H_2O_2) ve süperoksit radikalleri (O_2^-) oluşur (43).



ATP: Adenozin trifosfat; AMP: Adenozin monofosfat; CAT: Katalaz

Şekil 1. İskemide pürin metabolizmasının gelişimi ve ksantin dehidrogenazın ksantin oksidaza çevrilmesi, reperfüzyonda oksijen radikalinin oluşumu (45).

İskemi, glikoliz için gerekli maddelerin taşınamamasına, oluşan metabolitlerin uzaklaştırılamamasına ve glikolizin inhibe olmasına sebep olur. İskemi süresinin artması durumunda anaerobik enerji üretimi engellenir. Hipokside ise glikolitik enerji üretimi devam edebilmektedir. Bu sebeple iskemi hipoksiden daha hızlı bir şekilde dokulara zarar verir (43).

İskeminin hücrel etkileri aşağıdaki şekilde özetlenebilir (46):

- 1- Membran potansiyelinin değişmesi,
- 2- İyon dağılımının değişmesi (intraseküler Ca^{+2}/Na^{+2}),
- 3- Hücrel şişme,
- 4- Hücre iskeletinin disorganizasyonu,
- 5- Artmış hipoksantin seviyeleri ,

- 6- Azalmış ATP seviyeleri,
- 7- Azalmış glutatyon seviyeleri,
- 8- Azalmış fosfokreatin seviyeleri,
- 9- Hücresel asidoz.

Bütün bu etkiler iskeminin süresine ve şiddetine göre geri dönüşümlü veya geri dönüşümsüz zedelenme şeklinde ortaya çıkabilir.

1.1.8. İskemi/Reperfüzyon Hasarı Mekanizması

İskemi reperfüzyon hasarında fizyopatolojik değişikliklere yol açan faktörler aşağıdakilerdir (47):

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

1.1.8.1. Serbest Radikaller

Serbest radikaller, dış yörüngesinde bir ya da daha fazla eşlenmemiş elektron içeren atom ya da moleküllerdir (48).

Bir serbest radikal üç yolla ortaya çıkabilir (48, 49):

- 1- Molekülün kovalent bağının homolitik yıkımı sonucu,
- 2- Normal bir molekülden tek bir elektronun kaybı ya da bir molekülün heterolitik olarak bölünmesi,
- 3- Normal bir moleküle bir elektronun eklenmesi ile oluşurlar.

Biyolojik sistemlerdeki en önemli serbest radikaller oksijenden oluşmuş radikallerdir (50). Serbest radikaller stabil olmadığından dolayı ömürleri çok kısadır. Elektriksel yükleri pozitif, negatif veya nötr olabilmektedir (2).

Oksijen atomunun dış yörüngesini oluşturan p orbitalinde iki elektronun eksik olması sebebiyle “diradikal” olarak değerlendirilir. Bu özelliği diğer serbest radikallerle kolayca reaksiyona girmesini sağlar. Radikal olmayan maddelerle daha yavaş reaksiyona girer. Oksijen, metabolizmada en son suya indirgenirken, kısmen indirgenmesi ile de çok sayıda reaktif oksijen türleri oluşmaktadır (51). Oksijen bu kararsız yapısını giderebilmek için başka bir oksijen atomunun dış yörüngesindeki iki elektronu ortaklaşa kullanarak Oksijen radikallerini oluşturur (52). Serbest oksijen radikalleri çok kısa ömürlü ve güçlü oksidanlardır. Aerobik canlılar

yaşamları için gerekli olan kimyasal ve ısı enerjilerini, besinlerin oksijen (O₂) ile yakılması sonucu elde ederler (2).

Organizma sürekli olarak serbest radikal ataklarıyla karşı karşıya kalmaktadır. Serbest radikaller fizyolojik şartlarda ve dış etkenlere karşı organizmanın savunmasında belirli oranlarda oluşmaktadır ve iç mekanizmalar yardımı ile bu radikallerin organizmaya olabilecek zararlı etkileri önlenebilmektedir. Biyolojik sistemlerde oluşan serbest radikaller endojen kaynaklı oksijen, nitrik oksit (NO), uyarılmış nötrofil, mitokondriyal elektron transport sistemi, endoplazmik retikulum, peroksizom ve plazma membranı olarak sayılabilir (53).

Aerobik canlılarda moleküler oksijen serbest radikaller için en önemli kaynaktır. Normal metabolizma sırasında O₂'nin %98'i suya (H₂O) indirgenmektedir. Geriye kalan yaklaşık % 2'lik kısım ise süperoksit (O₂⁻) radikali ve hidroksil (OH⁻) radikaline dönüşür. En önemli serbest oksijen radikalleri O₂⁻ ve OH⁻ anyonlarıdır (Tablo 1).

Tablo 1. Serbest radikal türleri.

Oksijen kaynaklı radikaller		Oksijen kaynaklı olmayan radikaller
Potansiyel oksijen radikalleri	Reaktif oksijen türevleri	
Süperoksit radikali (O ₂ ⁻)	Singlet oksijen (¹ O ₂)	Karbon kaynaklı radikaller
Hidroksil radikali (HO ⁻)		Triklor metil (CCL)
	Hidrojen peroksit (H ₂ O ₂)	Sülfür kaynaklı radikaller
Peroksil radikali (ROO ⁻)		Thiyl (RS ⁻)
Nitrik oksit (NO ⁻)	Peroksinitrit (OONO ⁻)	Nitrojen kaynaklı radikaller
Alkoksil radikali (RO ⁻)		Fenildiazin (C ₆ H ₂ N:N)
		Geçiş metal kompleksleri
		Fe ⁺³ /Fe ⁺² , Cu ⁺³ /Cu ⁺²

Serbest oksijen radikallerinin toksik etkileri aşağıdaki gibi sıralanabilir (54):

- Hücre organelleri ve membranındaki lipid ve protein yapısını bozarlar.
- Hücre içi yararlı enzimleri etkisizleştirirler.
- DNA'yı tahrip ederler.
- Mitokondrilerde aerobik solunumu bozarlar.

- Elastaz, proteaz, fosfolipaz, lipoksigenaz, siklooksigenaz, ksantinoksidaz, indolamin dioksigenaz, triptofan dioksigenaz, galaktoz oksidaz gibi litik enzimleri aktive ederler.
- Hücrenin potasyum kaybını arttırmalıdır.
- Trombosit agregasyonunu arttırmalıdır.
- Dokulara fagosit toplanmasını kolaylaştırır.
- Hücre dışındaki kollagen doku komponentlerini, savunma enzimlerini ve transmitterleri yıkarlar.

Vücutta serbest radikal kaynakları aşağıdaki gibi sıralanabilir (2, 54):

- Stres ile artan katekolaminlerin oksidasyonu fagositik inflamasyon hücrelerinden salgılanma (nötrofil, monosit, makrofaj, eozinofil, endotelial hücreler),
- Normal biyolojik işlemler (Oksijenli solunum, katabolik ve anabolik işlemler),
- Uzun süreli metabolik hastalıklar, yaşlanma süreci ve diğer nedenler: (Sıcak şoku, güneş ışını, sigara),
- Oksidatif stres yapıcı durumlar (İskemi, travma, hemoraji, radyoaktivite, intoksikasyon, ksenobiyotik maddeler),
- Oksidan enzimler (Ksantin oksidaz, İndolamin dioksigenaz, Triptofan dioksigenaz, Galaktoz oksidaz, Siklooksigenaz, Lipooksigenaz, Monoamino oksidaz).

Süperoksit (O_2^-): Tüm aerobik hücrelerde moleküler oksijenin (O_2) bir elektron alarak indirgenmesi sonucu oluşur. Çok toksik olmayan bir serbest radikaldir. Süperoksit radikali kendisi direkt olarak zarar vermez. Bu radikal anyonun asıl önemi, hidrojen peroksit (H_2O_2) kaynağı olması ve geçiş metalleri iyonlarının indirgeyicisi olmasıdır. Zayıf oksidan etkisine karşın düşük pH değerlerinde protonlanarak hidroperoksil (HO_2^-) oluşur (2).

Hidrojen peroksit (H_2O_2): Süperoksitin etrafından bir elektron alması veya moleküler oksijenin etrafındaki moleküllerden iki elektron alması sonucu peroksit oluşur. Peroksit molekülü iki hidrojen molekülü ile birleşerek H_2O_2 oluşturur. H_2O_2 tek başına radikal değildir (55).

H₂O₂ uzun ömürlü oksidan olup membranlardan geçebilir. Kendisi bir serbest radikal olmadığı halde, reaktif oksijen türleri içine girer ve serbest radikal biyokimyasında önemli bir görev oynar. Süperoksit anyon radikaliyle geçiş metal iyonları mevcudiyetinde hızla gerçekleşen bir reaksiyonla en reaktif radikal olan hidroksil radikalini oluşturmaktadır (56).

Hidroksil radikali (OH⁻): Hücrede oluştuğu yerden daha uzağa gidemez. Oldukça reaktif ve toksik bir radikaldir, yarılanma ömrü çok kısadır. Oluştugu yerin çevresinde oldukça büyük hasara yol açabilir. Fenton Reaksiyonu ve Haber-Weiss Reaksiyonu sonucu hidrojen peroksitten oluşmaktadır. Ayrıca suyun yüksek enerjili iyonize edici radyasyona maruz kalması sonucunda da oluşur. Elektronegativitesi ve büyük molekül yapısı sebebiyle DNA, protein, karbonhidrat ve lipitler gibi makromoleküllerle reaksiyona girerek oksidatif hasara neden olur (2, 57).

Singlet oksijen (O₂): Radikal değildir. Serbest oksijen radikalleri ile birlikte olan reaktif oksijen türüdür (2).

Nitrik oksit (NO-): L-Arginin'in guanidium grubundan, nitrik oksit sentetaz (NOS) enzimi aracılığı ile endotelde sentezlenen serbest radikaldir. Üç farklı NOS enzimi vardır.

Endoteliyal, nöronal ve indüklenabilir NOS (iNOS)'dur. NO, süperoksit anyon radikali ile hızla reaksiyona girdiğinden hücre koruyucusu olarak düşünülebilir (2, 58).

- Nitrik oksit vasküler tonusun fizyolojik düzenlenmesi,
- Vasküler geçirgenliğin devamı,
- Endotele lökosit adezyonunun engellenmesi,
- Trombosit agregasyonunun inhibisyonu,
- İmmun defansın güçlendirilmesi,
- Oksijen kaynaklı serbest radikallerin temizlenmesi,
- Düz kas proliferasyonunun engellenmesi,
- Endotel hücrelerinin rejenerasyonu gibi birçok olayda etken bir maddedir (59). Ayrıca iskemik dokularda süperoksit dismutaz aktivitesini etkileyerek hidrojen peroksit birikimini azaltır (60).

1.1.8. 2. İskemi Reperfüzyon Hasarında Polimorf Nüveli Lökositler

İskemi/Reperfüzyon hasarı sonrasında aktif hale gelen ilk hücreler polimorf nüveli lökositler olup, mikrovasküler permeabilitede artıştan başlıca sorumlu tutulan ana hücrelerdir (61, 62).

Mikrodolaşım, en uç kan dolaşımı sistemidir. Arteriol, venül, arteryel ve venöz kılcalların boyutu 7-100 µm arasında değişir. İskeminin ardından dokuda reperfüzyon sağlandığında uyarılmış lökositler mikrodolaşımda birikerek kollaps ve tıkanıklığa neden olurlar. Bu nedenle lökosit-trombosit ve lökosit-endotel hücre etkileşimleri ana mekanizma olup, interstisyel sıvı birikimi ve endotel bağımlı vazodilatasyonda azalma bu duruma katkıda bulunur (63). Bu durum ilk kez 1967 yılında Majno tarafından “no reflow” fenomeni olarak tanımlanmıştır (64).

1.1.8.3. İskemi Reperfüzyon Hasarında Komplemanın Rolü

Kompleman sistemi bir dizi plazma proteini ve bu proteinlerin hücre zarı reseptörlerinden oluşur. Kompleman komponentlerinin sentez yerleri makrofajlar, monositler, hepatositler, böbreğin glomerüler ve tübüler hücreleridir. Proinflamatuvar komponentler (C3a, C5a, C3b ve C5b-9) kompleman sisteminin aktivasyonu sonucunda oluşur. C3a ve C5a, lökositleri aktive eden anafilatoksinlerdir. C5a ayrıca, TNF- α , IL-1, IL-6, makrofaj inflamatuvar protein (MIP)-2, MIP-1a, MIP-1b ve monosit kemoatraktan protein (MCP)-1 üretimini uyatarak inflamatuvar yanıtı artırır (65).

Sitokinler, salgılandığı hücrenin embriyolojik kaynağına göre farklılık gösteren ve hücreler arası iletişimi gerçekleştiren polipeptid yapıda aracı maddelerdir. Sitokinler çok geniş bir ailedir. Sitokin terimi ayrıca, immunomodülatör ajanlar olan interlökinler ve interferonları da tanımlamak için kullanılır. Literatürde; interlökin-1 (IL1), interlökin-6 (IL6), tromboksan A2 (TXA2) ve tümör nekroz faktörü (TNF)’nün etkileri, I/R hasarı için iyi tanımlanmıştır. Bu sitokinler, lökositler ve vasküler endotel bariyeri arasında sinyal görevi üstlenerek lökositlerin selektif adezyon ve migrasyonunu sağlamaktadır (66).

1.1.8.4. İskemi Reperfüzyon Hasarında Endotel Hücresinin Rolü

Endotel, kan ile dokuları birbirinden ayıran tek sıra dizilmiş hücrelerden oluşan bir bariyerdir. Damar fonksiyonlarının devam etmesinde rol alır. Kan ve dokular arasında madde alış verişini seçici geçirgen özelliği sayesinde sağlar (67). Endotel hücreleri SOR üretim kaynağı olup aynı zamanda SOR için hedef konumundadır. Endotel, mikrovasküler homeostazdan sorumlu olan endotelin (ET) ve NO'nun ana kaynağıdır (68).

1.1.9. Damar Cerrahisinde İskemi Reperfüzyon

İskemi/reperfüzyon sendromunda iki önemli komponent vardır. Bunlar: lokal doku hasarı ve uzak organ hasarıdır (2).

Alt ekstremité iske mi reperfüzyon hasarının gelişmesinde iskelet kası, iskemik hasara karşı en duyarlı dokulardan biri olması ve büyük kütle ye sahip olması nedeniyle önemli rol oynar. Prognoz, reperfüzyon hasarında kas hasarı miktarıyla ters orantılıdır (27).

İskemiye karşı doku toleransı, dokunun yapısı ve kollateral akımla yakın ilişkili olmakla birlikte, sıcaklık ve doku kütlesi de önemli faktörlerdir. İskemik dokuda reperfüzyon ile birlikte başlayan inflamatuvar cevap neticesinde lokal doku hasarı artmaktadır. Ölü hücrelerden inflamatuvar cevap oluşumunda salınan histamin benzeri maddeler, asit fosfataz, laktat, lizozimler, inorganik fosfatlar, miyoglob in, potasyum, nükleotitler, aminoasitler, aspartat aminotransferaz, laktat dehidrogenaz, proteolitik enzimler, kreatin fosfokinaz, pürin bazları gibi ürünlerin önemli görevleri vardır (2).

Ölü hücrelerden salınan yıkım ürünleri neticesinde pıhtılaşma mekanizmalarının aktifleşmesi ile mikrovasküler hasar ve mikrovasküler trombozis oluşarak kas hasarının daha da artmasıyla sonuçlanır. Böylece kapiller kaçak ve interstisyel basınçta artma gözlenir.

Eğer interstisyel alandaki basınçlar mikrodolaşım basıncına yaklaşır veya aşarsa kan akımının engellenmesine neden olur (2).

Pıhtılaşma neticesinde oluşan inflamatuvar mediatörler doku hasarının artmasında önemli sebeplerden biridir. Bu sebeple yüksek doz heparinin permeabilite

değişikliklerini ve iskemik demarkasyon seviyesini azaltabileceği aynı zamanda kollateral akımı düzeltebileceği yapılan bazı çalışmalarda gösterilmiştir (2, 69).

Yıkım ürünleri ve prokoagülanlar dokunun reperfüzyonu sonucu sistemik dolaşıma geçer ve sistemik koagülasyon oluşturabilirler. Faktör XII'nin uyarılması ve histamin, bradikinin, kompleman, tromboksan gibi inflamatuvar mediatörler ile pıhtılaşma başlatılabilir (2).

1.1.10. Serbest Radikallere Karşı Savunma Sistemleri (Antioksidanlar)

1.1.10.1. Antioksidan Mekanizmalar

Antioksidanlar, serbest radikalleri etkisiz hale getirmek amacıyla geliştirilmiş savunma sistemleridir (43). Etkilerini lokal oksijen konsantrasyonunu azaltarak, hidroksil radikallerini temizleyip lipid peroksidasyonunun başlamasını önleyerek yapabilmektedir. En belirgin özellikleri okside olan substratlara oranla çok daha az konsantrasyonlarda bile, substratın oksidasyonunu geciktirmeleri ve inhibe etmeleridir (44).

1.1.10.2. Antioksidanların Sınıflandırılması (70):

Birçok faktöre göre antioksidanları sınıflandırmak mümkün olup 4 başlık altında toplanmaktadır. Bunlar;

- 1- Yapısal özelliklerine göre (enzimatik, enzimatik olmayan),
- 2- Çözünürlüklerine göre (suda çözünenler, yağda çözünenler),
- 3- Kaynaklarına göre (endojen, ekzojen) ve
- 4- İnsan vücudundaki yerleşimlerine göre (intraselüler, ekstraselüler) sınıflara ayrılırlar.

Tablo 2. Yapısal olarak antioksidanların sınıflandırılması

<i>Enzimatik</i>	<i>Nonenzimatik</i>
Süperoksit dismutaz (SOD)	Glutasyon (GSH)
Katalaz (KAT)	α -Tokoferol (vit E)
Glutasyon peroksidaz (GSH-Px)	Askorbat (vit C)
Fosfolipid hidroperoksit glutasyon peroksidaz (PLGSH-Px)	β -Karoten
Glutasyon S-transferaz (GST)	Flavonoidler
Glutasyon redüktaz (GSSG-R)	Ürat
	Bilirubin
	Albümin
	Seruloplazmin
	Transferrin
	Ferritin
	Laktoferrin
	Melatonin
	Sistein

1.1.10. 2.1. Enzimatik Antioksidanlar

Süperoksit dismutaz (SOD): Süperoksit radikalini dismutasyona uğratarak H_2O_2 ve moleküler oksijene dönüşümünü sağlar. Organizmada serbest radikali substrat olarak kullanan tek enzim SOD'dur. İnsanlarda SOD'un Cu-Zn ve Mn kapsayan iki izoenzimi bulunmaktadır. Mn içeren tipi mitokondride, Cu ve Zn içeren tipi ise sitozolde yerleşim gösterir (71-73).

Katalaz: Hidrojen peroksitten su ve oksijen oluşumunu katalizleyen membrana bağlı bir peroksizom enzimidir (2, 74).

Glutasyon peroksidaz: Sitozol ve mitokondride SOD tarafından oluşturulan H_2O_2 'yi ortadan kaldıran başlıca enzimidir. Yapısında eser element olan selenyum bulunur. İndirgenmiş glutasyonun varlığında H_2O_2 'nin peroksidasyonunu katalizleyerek H_2O ve okside glutasyon oluşumuna yol açar (75).

Katalaz ve glutasyon peroksidaz enzimleri peroksitlerin güvenli bir şekilde ortadan kaldırılmalarını sağlar. Bunlar esas olarak peroksizomlarda lokalizedir ve etkilerini hidrojen peroksit üzerinden yaparlar (2).

Glutasyon (GSH): Glutamat, sistein ve glisinden sentezlenen bir tripeptiddir. Özellikle karaciğerde olmak üzere pek çok dokuda yüksek düzeyde bulunur. Hücre için en önemli antioksidan molekülü GSH olup serbest radikaller ve peroksitlerle reaksiyona girerek hücreleri oksidan hasara karşı korur. Bazı enzimlerin substratı veya kofaktörü olarak da görev yapmaktadır. GSH-Px, GSH-R ve GST gibi

enzimlerin fonksiyonu için gereklidir. Ayrıca pek çok proteinin ve enzimin inaktivasyonunu hücrenin protein yapısındaki sülfhidril (-SH) gruplarını indirgenmiş halde tutarak engeller. GSH amino asitlerin membrandan transportunda da görev alır (71-73).

1.1.10.2. 2. Enzimatik Olmayan Antioksidanlar (2).

- Doğal engelleyici antioksidanlar: Albumin, Laktoferrin (demir iyonlarını bağlayan), Seruloplazmin (bakır iyonlarını bağlayan)
- Desferroksamin (demir şelatörü)
- Metoprolol (beta bloker ve lipid peroksidasyonu azaltıp, indirgenmiş glutatyon konsantrasyonunu arttırıcı)
- Karvedilol (serbest radikal temizleyici özelliği ve oksidatif stresi azaltıcı)
- Amiodaron (antiaritmik ilaç)

1.1.10.2.3. Süpürücü Antioksidanlar

Doğal süpürücü antioksidanlar: Ürik asit, askorbik asit, beta karoten, bilirubin, tiyoller, tokoferol, ubikinol ve flavonoidler bu grupta yer almaktadır.

Farmakolojik süpürücü antioksidanlar: Salisilatlar, mannitol, dimetilsülfoksit ve dimetiltiyöre, ksantin oksidaz enzimini inhibe eden allopürinol ve oksipürinol örnektir (74).

1.1.11. Malondialdehit (MDA)

Non-enzimatik oksidatif lipid peroksitlerinin, membran poliansatüre yağ asitlerinin oksidasyonu sonucunda meydana gelip parçalanması sonucu oluşan toksik etkili son üründür (76). Lipit peroksidasyonun en önemli göstergesi MDA'dır (77, 78). MDA'nın asıl kaynağını ikiden fazla çift bağ içeren yağ asitlerinin otooksidasyonu veya eikozanoid oluşumuyla serbestleşen siklik endoperoksitler oluşturmaktadır. Oksidatif hasarın seviyesini göstermede kullanılır. MDA, Deoksiribonükleik asit (DNA)'nın nitrojen bazları ile tepkimeye girebilir ve mutajenik, genotoksik, karsinojeniktir. MDA miktarının tayini, lipid peroksit düzeylerinin belirlenmesinde sıklıkla kullanılmaktadır (79).

MDA hücresel düzeyde metabolize edilir. Karaciğer aldehid dehidrogenazı tarafından enzimatik yıkıma uğrayan MDA, CO₂'e metabolize olarak veya

mitokondriyal yolla yıkılabilmektedir. İdrarda asit ile hidrolize edilebilen formda küçük miktarlarda atılır. MDA'nın eritrosit membranının aminofosfolipid organizasyonunu bozup hücre hasarında ve yaşlanma pigmenti olan lipofuksinlerin oluşumunda etkili olduğu gösterilmiştir (80).

Malondialdehitin tiyobarbitürik asit (TBA) ile tepkimesi, biyolojik örneklerde serbest radikal aktivitesinin ve lipid peroksidasyonunun belirlenmesinde kullanılan en kolay ve yaygın yöntemdir (81). Lipid peroksidasyonunun belirlenmesi için kullanılan ve spesifik olmayan bir yöntem olmasına rağmen TBA tepkimesi, MDA üretiminin iyi bir göstergedir. Ayrıca, TBA testinin kaynatma aşamasında daha önce oluşmuş olan lipid hidroperoksitlerinin yıkılımı sonucunda artefakt bir MDA üretimi olmaktadır. Okside lipidlerde bulunan 2,4-alkadienler ve 2-alkenaller de TBA ile pozitif sonuç vermektedir. Yüksek performanslı sıvı kromatografisi (HPLC), serbest MDA ölçümünde en güvenilir yöntemdir.

Dokularda lipid peroksidasyon oluşumu ve buna bağlı olarak MDA artışı, hücrede membran bütünlüğünün yok olmasına, permabilitenin artmasına, hücrelere kalsiyum ve sodyum gibi elektrolit geçişlerinin hızlanması sonucu ATP kaybına, DNA hasarına ve hücre ölümleri ile sonuçlanan fizyolojik, metabolik ve işlevsel bozukluklara yol açabilmektedir (79).

1.2. Hücre Zarının Yapısı ve Biyofiziksel Özellikleri

Hücrenin etrafını sararak, onu içinde bulunduğu ortamdan ayıran ve ona şekil kazandıran seçici geçirgenlik özelliği gösteren yapı 'hücre zarı' olarak tanımlanmaktadır. Hücre zarı enzim ve organeller sayesinde canlılıklarını devam ettirmekte olup elastik, ince, kıvrılabilir bir yapıda ve 7.5-10 nanometre kalınlığında olup lipid ve proteinlerden oluşmuştur. Hücre zarının bileşenleri yaklaşık olarak % 55 protein, % 25 fosfolipit, % 13 kolesterol, % 4 diğer lipidler ve % 3 karbonhidratdır (19).

1.2.1. Hücre Zarı Kanalları

Hücre içi ile hücreler arası sıvı madde akışını sağlayan protein yapısındaki yapılara hücre zarı kanalları adı verilmektedir. Bu protein yapılar membranda çeşitli moleküller için transport noktaları oluşturmasından ötürü hücre zarının devamlılığını

bozmaktadır. Hücre zarı kanalları taşıyıcı ve kanal proteinleri olmak üzere ikiye ayrılmaktadır (82).

A)- Taşıyıcı Proteinler: Hücre zarı kanallarının büyük bir bölümünü oluşturmaktadır. Gececek olan molekül, protein yapıyla etkileştikten sonra meydana gelen boşluk veya biçim değişikliği, maddelerin transportunu gerçekleştirmektedir.

B)- Kanal Proteinler: İyon moleküllerinin taşınmasında uygun olan kanal proteinlerinden bir kısmı su moleküllerinin transport için spesifik kanallar içermektedirler. İyon ve moleküllerin türüne göre kanal proteinleri veya taşıyıcı proteinler seçicilik göstermektedirler (83).

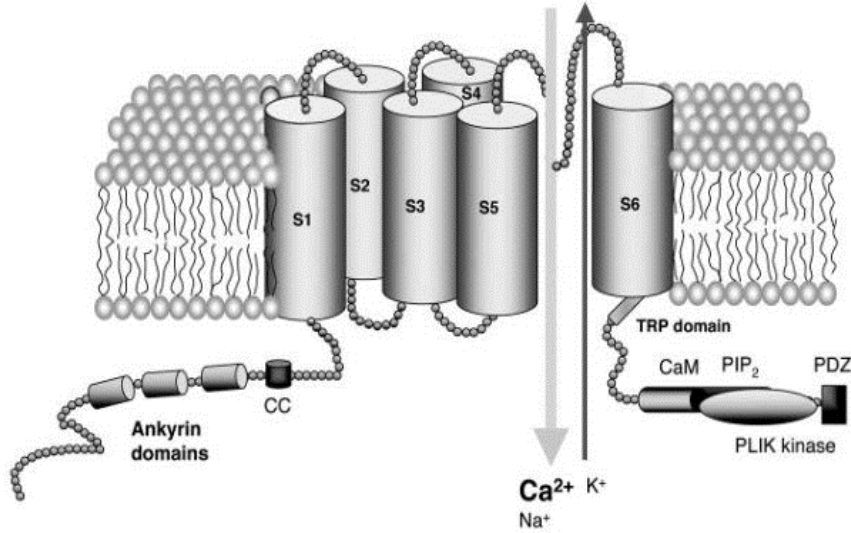
Kanal proteinlerinin aktifleşmesine sebep olan mekanizmalara göre (ligand duyarlı, voltaj duyarlı gibi) ve geçirgen oldukları iyon moleküllerine göre (kalsiyum kanalı, potasyum kanalı gibi) sınıflandırması yapılmaktadır (84).

1.2.2. Transient Reseptör Potansiyel (TRP) Kanalı ve Ailesi

Transient reseptör potansiyel proteini ilk kez uzun süreli aydınlatmaya maruz bırakılan ve dolayısıyla görme bozukluğunun olduğu *Drosophila melanogaster* türü sirke sineklerinin mutant tipinde keşfedilmiştir (85). Transient reseptör potansiyel (TRP) proteinleri katyon kanallarının büyük bir süper ailesini temsil eder. TRP kanalları, sodyum (Na^+), kalsiyum (Ca^{+2}) ve magnezyum (Mg^{+2})'a geçirgen, seçici olmayan katyon kanallarıdır (86). TRP katyon kanallarının diğer iyon kanallarına göre aktivasyon mekanizmaları ve seçiciliği daha fazladır (87).

Transient reseptör potansiyel proteinleri spesifik bağlanmaların meydana gelmesiyle homotetromer ya da heterotetromer şekillerin olduğu fonksiyonel kanallardır (88). Voltaj kapılı potasyum kanalları ile TRP kanalları birbirine benzemekte olup basit yapılarıdır.

Kanal açıklığının 5. ve 6. segmentleri arasında bir iletken iyon çevresinde homotetromik veya heterotetromik düzenlenmeler gerçekleştirirler (89).



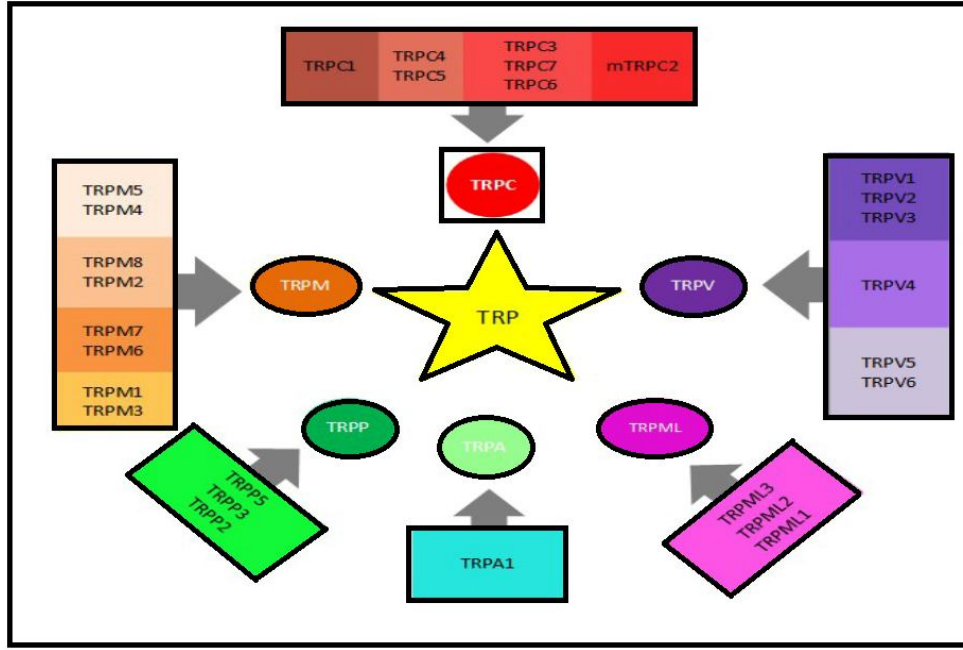
Şekil 2. TRP Reseptör alt-ünitesinin moleküler modeli (90).

Transient reseptör potansiyel kanalları az miktarda sekans benzerliği gösteren Na^+ ve Ca^{+2} konsantrasyonları ile voltaj kanallarının düzenlenmesinde önemli rol oynamaktadır (91). TRP kanallarının yapısı voltaj kapılı kanallara benzer (87).

Ayrıca TRP kanalları dokunma, koku, tat ve işitme duyusu dahil olmak üzere pek çok mekanizmada etkili olup stres ve sıcaklık kanalın mekanizmasını etkilemektedir (92).

Transient reseptör potansiyel kanallarının yapısındaki proteinlerin aminoasit dizilimlerine göre 29 üyeye, homolog olmasına göre ise 7 alt aileye sınıflandırılmıştır. TRPA (Transient Reseptör Potansiyel Ankirin), TRPC (Transient Reseptör Potansiyel Kanonik), TRPML (Transient Reseptör Potansiyel Mucolipin), TRPM (Transient Reseptör Potansiyel Melastatin), TRPN veya diğer adıyla NOMPC (Non Mekano Reseptör Potansiyel-C), TRPP (Transient Reseptör Potansiyel Polisistin) ve TRPV (Transient Reseptör Potansiyel Vanilloid) olarak bilinmektedir.

Transient reseptör potansiyel ankirin-1 alt aileden, TRPC 7 alt aileden, TRPML 3 alt aileden, TRPM 8 alt aileden, TRPN 6 alt aileden, TRPP 3 alt aileden ve TRPV 6 alt aileden oluşmaktadır (89).



Şekil 3. TRP ailesi (93).

Memelilerde TRPN haricinde diğer tüm alt aileler bulunabilmektedir. Altı tane transmembran proteini ile karakterize TRP kanallarından geçişler 5 ve 6. segmentler arasında meydana gelen porlarla olur (86).

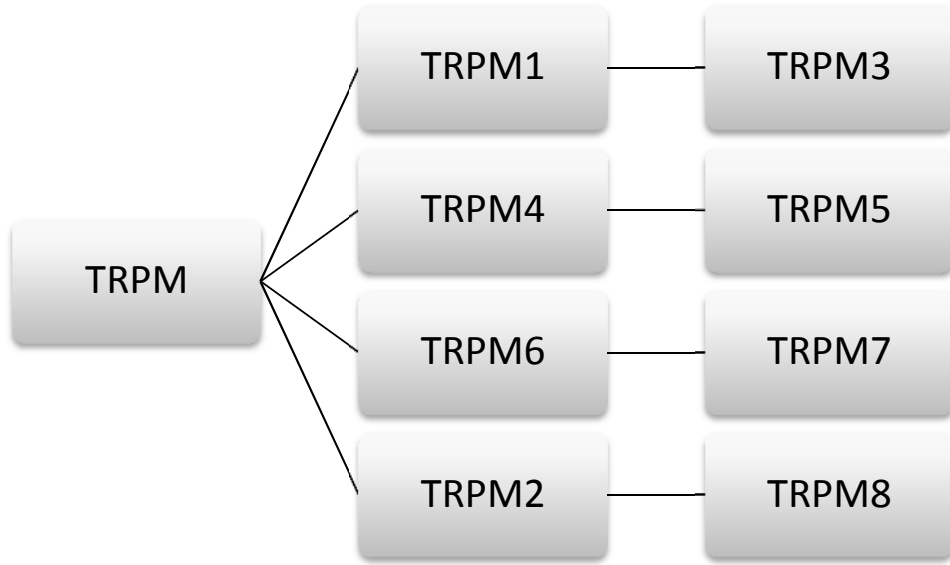
1.2.3. Transient Reseptör Potansiyel Melastatin (TRPM)

Memelilerde TRPM alt ailesinin ilk adlandırılması tümör supressor proteinlerde bulunmasıyla başlamış olup 4 homolog çift halinde ayrılmışlardır. TRPM1/TRPM3, TRPM2/TRPM8, TRPM4/TRPM5 ve TRPM6/TRPM7 (94).

Transient Reseptör Potansiyel Melastatin ailesinin bütün üyeleri transmembran bölgesi, N-terminal bölgesi ve C- terminalinden oluşup, bütün TRPM alt üyelerinde N-terminal bölgesi eş spesifik özellik göstermektedir (89).

Transient Reseptör Potansiyel Melastatin-1 kanalı haricinde diğer kanalların mekanizması ve aktivasyonu tam olarak aydınlatılamamış olmakla birlikte Adenozin difosforiboz (ADPR) pirofosfataz ile uyarılabilen ve fonksiyonel NUDT9-H (TRPM üzerinde bulunan enzimatik bölge) homoloji alanı içeren TRPM2 kanalı Ca^{+2} iyonuna çok geçirgendir. Fakat TRPM4/TRPM5, TRPM6/TRPM7 Ca^{+2} iyonuna geçirgenlikleri değişik olup TRPM4/TRPM5 hem ısıya hemde Ca^{+2} iyonuna duyarlıdır (74). Yarı yarıya benzer homologik yapı özelliğini gösteren TRPM4 ve

TRPM5 daha çok bağırsaklarda, kalpte ve damar endotelinde sık olarak tespit edilmiştir (95).



Şekil 4. TRPM kanalları alt grup ve üyeleri

Tablo 3. Farklı kardiyovasküler hücrelerde TRPM kanallarının varlığı

KANAL	HÜCRELER
TRPM2	Kalp kası, pulmoner arter ve aort düz kası
TRPM4	Kardiyomiyosit, atrial ve ventriküler miyokard, beyin arter hücreleri
TRPM6	Beyin arteri
TRPM7	Damar düz kas hücreleri, kalp hücre membranları, miyokard

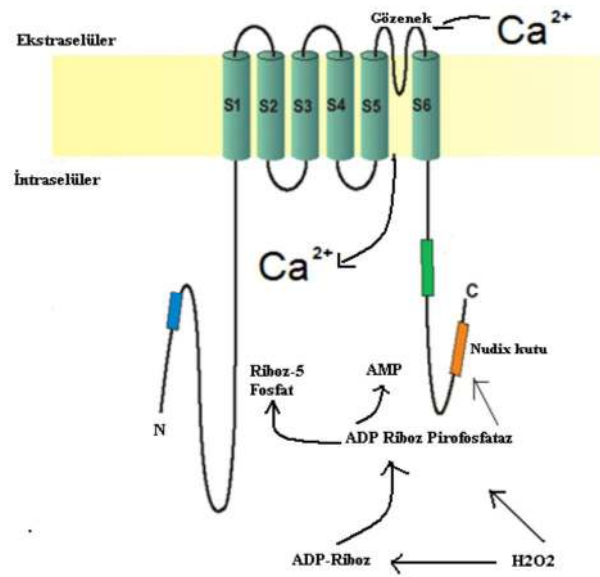
1. 2.3.1. Transient Reseptör Potansiyel Melastatin2 (TRPM2)

Transient reseptör potansiyel melastatin 2, Ca^{+2} iyonuna geçirgen çok işlevli katyon kanalıdır. Önceden Long transient receptor potential channel 2 (LTPC2) veya Transient Reseptör Potansiyel Katyon Kanalı 7 (TRPC7) olarak bilinmektedir. İnsanda TRPM2 kanalının kromozomdaki gen konumu 21g.22.3 olup 90 kilo baz (KB) çiftleri ve 32 eksondan oluşmaktadır.

İnsan TRPM2 kanal proteininin moleküler kütle ağırlığı yaklaşık 170 k Da olup bileşiminde 1503 tane farelerde ise 1507 tane aminoasit bulunmaktadır. TRPM2, 6 tane transmebran segmenti (S1-S6) içerir. Hücre içinde N ve C terminal uçları ile 5. ve 6. segmentler arasında bulunan açıklıktan iyon geçişleri olmaktadır. Kanalin N ve C olmak üzere iki ucu bulunmaktadır. C ucu “nudix domain” olarak da

adlandırılmaktadır. C ucunda ADPR pirofosfataz enzimi bulunmakta olup bu enzim, ADPR (Adenin difosforiboz)'dan AMP (Adenozin monofasfat) ve Riboz 5-fosfat oluşumunu katalizlemektedir. N terminalinde calmodulini (CAM) bağlamak için yaklaşık 700 adet aminoasit vardır (97).

C terminal bölgesinde ise NUDT9 homoloji alanı olduğu bildirilmiştir. C ve N uçları dahil olmak üzere bu uçlar arasında kalan transmembran alan TRPM2 kanalını 3 temel bölgeden oluşturmaktadır. TRPM2 kanalının açılıp kapanma aktivitelerinde kanalın C ucunda bulunan Nudix bölgesi çok önemli rol oynamaktadır (97).



Şekil 5. TRPM2 Kanalının moleküler yapısı (98).

ADPR pirofosfataz hem, ADPR'dan AMP hem de Riboz 5-fosfat oluşumunu katalizlemekte olup Nudix bölgesinde bulunan NUDT9-H aktivasyonunu etkilemektedir. Bu olayın kanal hareketinde önemli bir etken olduğu bildirilmiştir (99).

Oksidatif stresin hidrojen peroksit ya da tümör nekrozis faktör α (TNF α)'nın TRPM2 kanallarında Ca^{+2} akışını uyardığı birçok çalışmada belirtilmiştir. TRPM2'nin farklı aktivasyon özelliklerine sahip üç fizyolojik varyantı tespit edilmiştir; bunlar TRPM2- Δ N, TRPM2- Δ C, TRPM2-S'dir. TRP kanallarının çoğunda olduğu gibi Ca^{+2} affiniteleri oldukça yüksektir. TRPM2 calmodulin veya

direkt olarak Ca^{+2} iyonunun bağlanması ADPR ile TRPM2 arasındaki kombinasyonu güçlü bir şekilde düzenlemektedir (100).

Non-spesifik bazı farmakolojik ajanların TRPM2 kanal aktivasyonunu engelledikleri yapılan çalışmalarda bildirilmektedir. Örneğin flufenomik asit (FFA) gibi fenometler başta olmak üzere anti fungal ajanlar, klotrimazol ve ekonazol, antranilik asit bunlardan bazıları olup, non-steroid anti inflamatuvar ajanlar merkezi sinir sisteminde iyon akışını inhibe edebilmektedir. FFA'nın, TRPM2 aktivasyon bölgesine bağlanması kısa süreli de olsa geri dönüşümsüz bir reaksiyon oluşturmakta ve kanalı inhibe etmektedir (101).

Adenozin difosforiboz veya bileşenleri, TRPM2 metabolik bölgesinin uyarılmasına neden olduklarından dolayı TRPM2 hücre ölümünde önemli görev oynamaktadır. Bu nedenle apoptozisde etkili olan kaspazın aktivitesi için kalsiyum sinyali gerekmektedir (102). Birçok hücre içi ve hücre dışı moleküller sinir doku hasarına ve apoptozuna katılabilirken, oksidatif stres ürünlerinin birikimi, ROS'un fazla üretimi, hücre hasarı ve ölümü için potansiyel bir faktör olarak görünmektedir (103). TRPM2 oksidatif stres tarafından aktive edilebildiği için, son zamanlarda miyokardiyal enfarktüs, diyabet, inflamasyon ve nörodejeneratif hastalıklar da dahil olmak üzere, oksidatif strese bağlı hastalıklara karşı potansiyel bir hedef olarak ortaya çıkmıştır (104). Hidrojen peroksidin TRPM2 aktivasyonuna neden olması hücre içinde Ca^{+2} iyonu artışına neden olur. Hidrojen peroksit ile uyarılan ve TRPM2 kanalı üzerinde meydana gelen oksidatif strese bağlı olarak ADPR oluşumunun tetiklendiği görülmüştür (105).

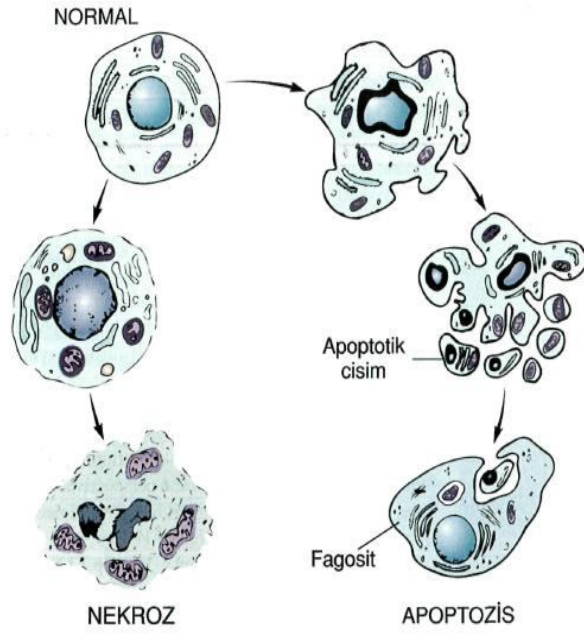
Apoptozis, genetik materyaller ile düzenlenen programlı protein sentezi ve dolayısıyla enerji gerektiren reaksiyonlar zinciridir. Basit yapıda ve tek hücreli *Caenorhabditis elegans* nematodu ile yapılan apoptozis çalışmalarında Brenner ve arkadaşları “programlanmış hücre ölümü ve organ gelişiminin genetik olarak düzenlenmesi” konusuyla 2002 yılında Nobel ödülü kazanmışlardır. Bu nematodlarda 3 gen; ced-3, ced-4 ve ced-9 apoptozu kontrol mekanizmasını oluşturmaktadır. Nematodlarda ced-3 ve ced-4 genlerinin mutasyonla inaktive edilmesi sonucu apoptozun meydana gelmediği ve normalde ölmesi gereken hücrelerin yaşamaya devam ettiği görülmüştür.

Bu nedenle ced-3 ve ced-4’ün apoptozu uyaran ölüm genleri olup, ced-9’un ise apoptozu inhibe edip ölüme karşı koruyan gen olduğu belirlenmiştir. Bu genlerin insan genomundaki karşılıkları ced-3 için kaspazlar, ced-4 için Apoptotik Proteaz Aktive Faktör 1 (APAF-1) ve ced-9 için Bcl-2 olduğu ifade edilmektedir (108).

Nekroz, bir hücrede kimyasal ve fiziksel hasarlarla meydana gelen ve hücrede ölüme sebebiyet veren patolojik bir olaydır (109). Nekroz birçok hücrede veya dokunun bir bölümünde görülürken apoptozis tek bir hücrede gerçekleşir. Apoptozis ve nekroz birbirinden tamamen bağımsız iki olay olup nekrozda hücre membranının yapısı bozularak hücre deplazmolize olur ve lizise uğrar. Apoptoziste ise hücre ölümleri DNA’nın yapısında meydana gelen dejenerasyonlar sonucu gerçekleşir (110, 111). Apoptozis, hücrelerin genetik kodlarında var olan çeşitli sinyal molekülleriyle, oksidatif stresle ve patofizyolojik olaylarla aktive olabilmektedir. Ancak apoptozisle ilgili mekanizma günümüzde halen tam olarak bilinmemektedir (112). Hücre içi elektron dengesinin bozulması, oksidatif stres, mitokondrial defektler ve antioksidan sistemin yetersiz kalması apoptoz oluşumunu tetikleyebilmektedir (113). Ayrıca apoptozisi etkileyen hücre içi uyaranlar genel olarak: büyüme faktörleri, onkojenler, tümör süpresör genler olmak üzere üç ana grupta toplanabilir (114). Apoptotik cisimler apoptozisde çok önemli rol oynamaktadırlar.

Apoptozise giden hücrelerin kromatin ve sitoplazma yoğunlaşmasının ardından hücreler küçülür ve zamanla küçük cisimcikler meydana gelir. Bu yapılar apoptotik cisimcikler olup üzerlerinde oluşan yeni reseptörler çevre hücreleri uyarak fagositozu gerçekleştirirler (115, 116). Apoptotik cisimlerin bazılarında

bazofilik nükleer materyal varken bazılarında yoktur. Kromatin kümeleri hilal şeklindedir. Sitoplazmaları oval ve kitleler halindedir. Histolojik açıdan bu özellikleri apoptotik cisimcikler için karakteristiktir (117).



Şekil 7. Koagülasyon nekrozunda (solda) ve apoptoziste (sağda) görülen ultrast-rüktürel değişiklikler dizisi (118).

Apoptozisde başlangıç değişikliği nükleer kromatin yoğunlaşması ve parçalanmasından ibarettir. Bunu sitoplazmik tomurcuklanma ve apoptotik cisimler olarak ayrılan yapıların fagositozu izler. Koagülasyon nekrozunun belirtileri kromatin kümeleşmesi, organellerin şişmesi ve son olarak membran hasarını kapsar (118).

Tablo 4. Koagülasyon Nekrozu ve Apoptozisin Basitleştirilmiş Özellikleri (119)

	Koagülasyon Nekrozu	Apoptozis
Stimuluslar	Hipoksi, toksinler	Fizyolojik ve patolojik
Histolojik görünüm	Hücrel şişme	Tek hücreler
	Koagülasyon nekrozu	Kromatin yoğunlaşması
	Organellerin parçalanması	Apoptotik cisimler
DNA yıkımı	Rastgele, diffüz	Nükleozomlar arası
Mekanizmalar	ATP azalması	Gen aktivasyonu
	Membran zedelenmesi	Endonükleazlar
	Serbest radikal hasarı	Proteazlar
Doku reaksiyonu	İltihap	İltihap yok, Apoptotik cisimlerin fagositozu

1.3.1. Apoptozun genetik düzenlenmesi

DNA tek veya çift iplik parçaları ve nükleotid azlığı, DNA-bağı transkripsiyon faktör p53 ile başlayan bir dizi olayı aktive eder ve hücre apoptotik yola girer.

1. P53'ün görevi: Bir tümör baskılayıcı gen olarak işlev gören p53'ün mutasyona uğradığı ya da olmadığı durumlarda hücrenin ömrü uzar. İnsanda apoptoz, p53 ile başlayıp, kaspazlara kadar devam eden bir süreçtir. Genotoksik hadiselerle oluşan hücre hasarı, bir transkripsiyon düzenleyici gen olan p53'ü aktive eder. P53 DNA'ya doğrudan bağlanarak hasarı tanıdıktan sonra ya G1 siklusunda hücre siklusunun durmasını uyararak tamir için gerekli zamanı elde eder ya da hasar fazlaysa apoptoza yönlendirir (120).

2. Bcl-2/Bax: Apoptozun düzenlenmesi Bcl-2/Bax gen ailesi ile olmaktadır (107, 120). Bu ailenin 20 üyesi tanımlanmıştır (121); bunlardan Bcl-2, Bcl-xL, Bcl-w, Boo, Mcl-1 apoptoz inhibitörleridir (antiapoptotik). Bazıları ise apoptozu uyararak proapoptotik genler olarak tanımlanır (122). Örneğin; Bcl-2 nin oranının daha yüksek olması hücrenin hayatını sürdürmesini sağlarken, Bax'ın daha fazla olması durumunda hücre ölüme gitmektedir (123).

Bcl-2, bir proto-onkogendir ve ürettiği protein, mitokondrinin sitoplazmaya bakan dış zarı üzerinde ve endoplazmik retikulumun çekirdek zarında yerleşmiştir (124). Bu proteinler, zarın parçalanmasına karşı koruyucu etki yapıp, iyon alış-verişini düzenlerler. Bcl-xL'in mitokondriyal hasarı engelleyerek mitokondriyi koruduğu söylenmektedir. Bu sayede apoptoz önlenmiş olmaktadır (122). Bcl-2 ailesinin bir özelliği de pro-oksidan gibi davranarak reaktif oksijen seviyesinin apoptoz üzerindeki etkilerini kontrol etmesidir (125).

Bax proteinleri sitoplazmada da bulunur. Apoptotik uyarı ile Bax proteinleri, mitokondri zarına doğru yönelerek permeabilite geçiş poruna bağlanırlar. Bu bağlanma, seçici iyon geçirgenliğini azaltabilmektedir. Zardaki bu etkileşimler nedeniyle Apoptozis Inducing Factor (AIF) ve sitokrom c gibi mitokondri zarı içinde yer alan faktörler sitoplazmaya geçerler. AIF, direkt olarak çekirdeğe doğru yönelirken, sitoplazmada bulunan sitokrom c apoptozisin en son evresinde görev alır. Sitoplazma proteini Apoptotik Proteaz Aktive Faktör -1 (APAF-1)'in uyarıcısı Sitokrom-c'dir (120). Sitokrom-c'nin APAF-1'e bağlanması prokaspaz-9'u aktive

eder ve oluşan bu bileşik “apoptosom” olarak adlandırılır (126). Prokaspaz-9’un uyarılmasıyla, bir seri kaspaz uyarılmaya başlar (120). APAF-1 aynı zamanda ATP’ye de bağlanmaktadır. Bu hadise apoptozun niçin enerji gereksinimi duyduğunu izah etmektedir (126).

3. Kaspazlar: Apoptoz mekanizmasında üç temel grup rol alır (125,126). Bunlar:

- 1- Ölüm reseptörleri
- 2- Adaptör proteinler ve
- 3- Proteolitik enzimlerdir (kaspazlar)

Ölüm reseptörleri; Tumour Necrosis Factor (TNF) reseptör gen ailesine aittir. Bu reseptör adaptör proteinlere bağlanırlar (125). Bilinen altı tane ölüm reseptörü, CD95 (APO-1/Fas), TNF Related Apoptosis Inducing Ligand (TRAIL) R1, TRAILR2, TNF-R1, Ölüm reseptörü 3 (DR3) ve Ölüm reseptörü 6 (DR6) vardır (127).

Adaptör proteinler, reseptörle gelen uyarı sonucunda kaspazlara bağlanıp onları uyarırlar. Bu reseptörlerin en çok tanınanları TNF reseptörü 1 (TNFR1) ve tip 1 glikolize transmembran reseptörü (Fas) olup karaciğerde bol miktarda bulunur. Fas’ın etkisiyle kaspaz serisi aktive olur ve kaspazla uyarılan Dnaz caspase activated Dnase (CAD) aracılığı ile DNA’nın yıkımına neden olur (120). Kaspazların aktif merkezinde sistein yer alır ve sitoplazmada inaktif prokürsörler olarak bulunmaktadır. Diğer adı ise interleukine converting enzyme (ICE) proteazlar olup sitoplazmik proteinlerin yıkımında görev almaktadır. Nükleazların uyarılmasıyla DNA fragmentasyonu ve RNA degradasyonu gerçekleşmektedir (128). Sitokrom-c’ nin sitoplazma içine salınması ile apoptozisin son evresinden sorumlu olan kaspazlar aktive olur. İnflamasyonu uyaran ve ilk kez bir proteaz olarak tanımlanan ICE, prokaspaz-1 olarak adlandırılmıştır (129, 130). Kaspazlar bir seri olaylar dizisinde diğer prokaspazları aktive ederler. Kaspazlar; sitokin üretimine katkıda bulunanlar (kaspaz 1,4,5,13), proteolizisin başlatıcıları (kaspaz 2,8-10) ya da uygulayıcıları (kaspaz 3,6,7) olarak gruplandırılırlar (122, 125). Başlatıcı kaspazlar, adaptör proteinlere bağlanıp ölüme yönlendirirler ama ölümü gerçekleştirmezler. Bunu yapacak olan kaspazları aktifleştirirler. Ölüme gerçekleştiren uygulayıcı (effektör) kaspazlardır. Uygulayıcı kaspazlar, başlatıcı kaspazların akışını uyarırlar (122).

Apoptoz mekanizmasının merkezi bileşeni kaspazlardır (131). Kaspaz inhibitörlerinin (IAP) efektör kaspazları inhibe ederek apoptozu engellediği gösterilmiş olup kaspaz aktivasyonu hücreye özgüdür (122). Ayrıca Inhibitors of Apoptosis (IAP) ailesinin kaspazlardan ayrı olarak, transkripsiyon faktörlerin modülasyonu ve hücre siklusunun kontrolünde de yer alarak apoptozu inhibe ettiği bilinmektedir. Bu inhibitörler malign hücrelerde aşırı olarak gözlenir (122). Kaspazlar, proteinleri yalnızca aspartik asit bulunan bölgelerden keser. Bu nedenle c-aspartatlar olarak bilinirler. Bu nedenle kaspazların sınırlı proteolizisi sebebiyle, hücrede lizis şekillenmeyip apoptotik cisimcikler oluşur (112, 120).

1.3.2. Apoptozun Sitotoksik Düzenlenmesi

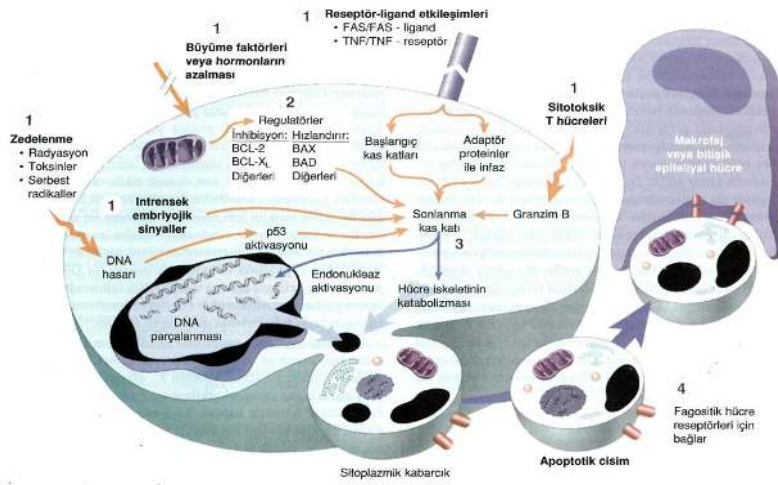
1.3.2.1. Fas - Fas Ligandı veya CD95 Yolu

Fas (CD95), TNF ailesinin bir üyesi olup hücre yüzey reseptörüdür. Apoptotik belirtinin uyarıcısı olan Fas, birçok hücre tipinde sergilenir. Fas ligandı (Fas L), TNF ailesinin bir üyesidir. Özellikle *Naturel Killer* (NK) hücreleri ve sitotoksik T hücrelerinde bulunur. Apoptozu uyaran 40kd'luk tip 2 transmembran proteini (Fas L)'nin Fas reseptörüne bağlanması ile apoptotik işlem başlar. Apoptoz mekanizması, hücre zarında bulunan ölüm reseptörlerinin uyarılmasıyla alakalıdır. Bu mekanizma, T hücrelerinin bir immün tepki sonunda aktive olmasıyla uzaklaştırılması, tümör hücrelerinin yok edilmesi, virüsle enfekte hedef hücrelerin yok edilmesi ve birçok patolojik hücrelerin uzaklaştırılmasında önemli rol oynar. TNF'in TNFR-1'e bağlanmasıyla da benzer olaylar şekillenir. Fas ve TNFR-1 in sitoplazmik uzantısı, bir ölüm alanı Death Domain (DD) içerir. Fas'ın sitoplazmik bölümü Fas Associating Protein with a Death Domain Protein (FADD) ve Receptör Interacting Protein (RIP) ile etkileşimdedir. Ölüm alanlarını içeren TNFR-1 ile TNFR Associated Death Domain Protein (TRADD) ve RIP proteinleri, prokaspaz-8'in aktivasyonu ile apoptozu doğrudan uyarırlar. Aktive olan kaspaz 8 diğer uygulayıcı kaspazları uyararak aktive eder (120).

1.3.2.2. Granzim veya Perforin Sistemi

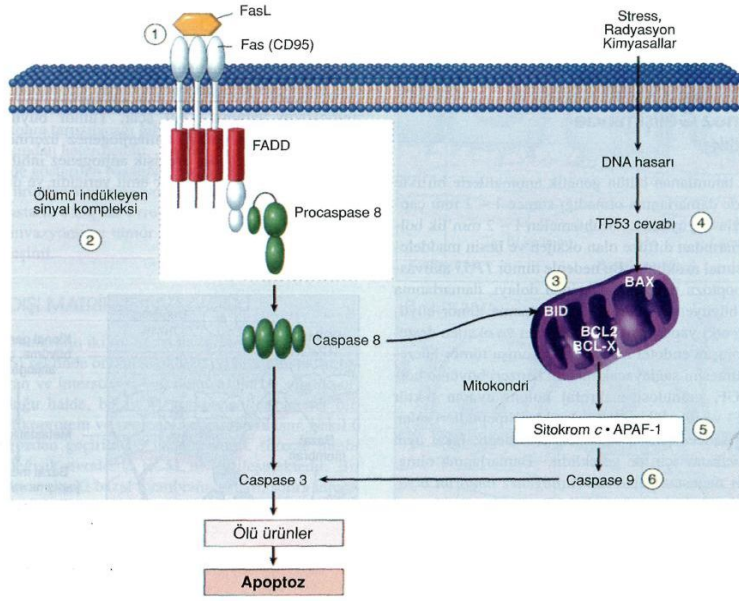
Perforinler ve granzimler, sitotoksik T lenfositler (CTL) ve NK hücrelerinin sitoplazmik salgı granülleri içinde bulunan ve patojenle enfekte hücreler ve tümör

hücrelerinin yok edilmesinde etkili salgısal apoptotik proteinlerdir. CTL reseptörü hedef hücreye bağlandığında, perforinler salgılanır ve salgılanan perforinler hedef hücre üzerinde yuvarlak bir delik oluşturup, hücre içi kalsiyumda hızla artışa neden olur. Hücre içine giren perforin proteini, vezikülden granzim B'nin salıverilmesini sağlar. Granzim B, CTL reseptör aracılığı ile bir vezikül içinde açılan delikten hedef hücreye girer. Bu andan itibaren granzim B hızlı bir şekilde DNA fragmentasyonunu ve apoptoz ile birlikte prokaspaz uyarılmasını başlatır (120).



Şekil 8. Apoptozisteki olayların şematik görünümü (120).

Çeşitli intrinsek ve ekstrinsek tetikleyiciler (1'le işaretli) apoptozis oluşturabilir; Bu tetikler radyasyon veya serbest radikaller (DNA'yı hasarlayan ve TP53 (p53) yollarını aktive eden) gibi zedeleyici uyarıları, reseptör bağlanması (örn., FAS ve tümör nekroz faktör [TNF] reseptörü), veya sitotoksik T hücrelerinden granzimlerin salınmasını kapsar. Bazı stimuluslar (sitotoksik T hücreleri gibi) infaz yolunda direkt olarak kaspazları aktive eder. Diğerleri adaptör proteinler yoluyla veya sitokrom c'nin mitokondrial serbestleşmesi yoluyla etki eder. 2 ile işaretlenenler BCL-2 familyasının regülatör proteinleridir, hücre ölümünü ya inhibe eder ya da hızlandırır. 3 ile işaretli olanlar infaz kaspazları olup hücre iskeleti ve nükleer proteinleri parçalayan latent sitoplazmik endonükleaz ve proteazları aktive eder. Bu hücre iskeletinin yıkımı ve nükleer kromatinin endonükleaz aracılı parçalanmasını içeren hücre içi parçalanma kaskadı ile sonuçlanır. Proteinlerin çapraz bağlanmasıyla hücre iskeletinin katabolizmasına katkıda bulunan transglutaminaz aktivasyonu gösterilmemiştir. Sonuç (4) çeşitli hücre içi organelleri ve diğer sitoplazmik yapıları içeren apoptotik cisimlerin oluşumudur; bu cisimler fagositik hücrelerin bağlanmasını ve alınımını sağlayan yeni bağlara (örn. fosfatidilserin) sahiptir (119).



(1). Azalmış CD95 seviyesi (2). FLICE protein tarafından ölümlü indükleyen sinyal kompleksinin inaktivasyonu (3). Azalmış BCL2 up regülasyonuna sahip mitokondride sitokrom c azalması (4). TP53 kaybı olan proapoptotik BAX seviyelerinde azalma (5) APAF-1 azalması (6) apoptozis inhibitör (IAP)'lerinde upregülasyon.

Şekil 9. CD95 reseptörü ile indüklenmiş ve DNA hasarı ile uyarılmış apoptozis yolları ve tümör hücrelerinin ölümden kaçış mekanizması (119).

1.3.2.3. Apoptozisin Saptanmasında Kullanılan Yöntemler

Apoptozisi tespit etmek için çok çeşitli yöntemler bulunmuş olup apoptozis terimi 1972 yılında ilk kez kullanıldığında hücrenin morfolojik görünümüne göre karar verilmişti. Fakat günümüzde, morfolojik değerlendirmenin yanında apoptozise spesifik olduğu bilinen bazı aktivasyonların (örneğin aktif kaspaz-3 tayini) moleküler düzeyde belirlenmesiyle de tespit edilebilmektedir. Apoptozisin belirlenmesinde kullanılan yöntemler şöyledir (132).

Tablo 5. Apoptozisin belirlenmesinde kullanılan yöntemler

1. Morfolojik görüntüleme yöntemleri
Hematoksilen Boyama
Giemsa Boyama
2. İmmünohistokimyasal yöntemler
Anneksin V Yöntemi
TUNEL Yöntemi (TdT-mediated dUTP-biotin nick end-labeling technique)
M30 Yöntemi
Kaspaz-3 Yöntemi
3. Biyokimyasal yöntemler
Agaroz Jel Elektroforezi
Western Blotting
Flow Sitometri
Malondialdehit (MDA) Yöntemi
4. İmmunolojik yöntemler
ELISA (Enzyme Linked Immunosorbent Assay)
Fluorimetrik Yöntem
5. Moleküler biyoloji yöntemleri
Dna Microarray
Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PZR) Çalışması

1.3.4. İmmünohistokimyasal Yöntem

1.3.4.1. TUNEL Yöntemi (TdT-mediated dUTP-biotin nick end-labeling technique)

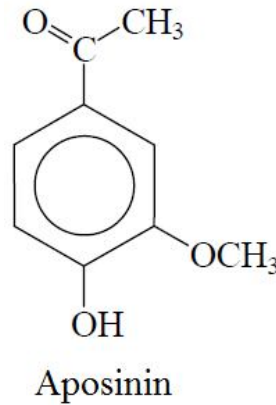
TUNEL, Terminal deoxynucleotidyl transferase (TdT)-mediated dUTP-biotin nick end-labeling kelimelerinin kısaltmasıdır. 1992 yılında Gavrieli ve arkadaşları tarafından bulunan TUNEL yöntemi, apoptotik yolda, DNA kırıklarının saptanmasında yaygın olarak kullanılmaktadır (133). TUNEL yöntemiyle spesifik DNA kırık uçları oluşmaktadır. Apoptotik hücrelerdeki DNA'ları hızla parçaladıkları için kromatin ağın yapısı bozulup 3-OH içeren DNA parçacıklarının sayısı artar (133). Terminal deoksinükleotil transferaz (TdT) enzimi, parçalanmış DNA parçacıklarının serbest 3-OH uçlarına Terminal deoksinükleotil transferaz enzimi biotin-dUTP'yi ekler (134). DNA parçacıkları biotin ile işaretlendikten sonra ortama avidin eklendiğinde görünür hale gelmektedir. Ancak DNA'nın 3-OH kısmı biotin,

digoxigenin ya da florescein gibi nükleotitler vasıtasıyla modifiye edilmiş enzimatik etiketler ile belirlenebilmektedir (135).

Asıl olarak TUNEL metodu serbest 3-OH uçlarının işaretli ve işaretli olmayan nükleotitler kullanılarak apoptozis'in belirlenmesi esasına dayanmaktadır. TdT vasıtasıyla ortama eklenen nükleotitler DNA'ya bağlanır ve nükleotit trifosfatları aktive ederler daha sonra ortama eklenen digoksigenin nükleotitlerle birleşerek 24'lü oligomerik bir yapı oluştururlar ve peroksidaz özellik gösteren antidioksigenin ile bağlanırlar. Bu reaksiyonlar sonucunda peroksidaz antikoru kromojenik substrat ile etkileşime girerek bağlanma meydana gelir ve sonuç olarak Apoptotik cisimlerde 3-OH uçlarının boyanması gerçekleşir (136).

1.4.Aposinin

İlginç faaliyetlere sahip küçük bir molekül olan aposinin, 4'-hidroksi-3'-metoksi-asetofenon, ilk olarak 1883 yılında Schmiedeberg tarafından tanımlanmış ve Apocynum cannabinum (Kanada kenevir otu) köklerinden izole edilmiştir (137). Sonrasında ise, Kanada kenevirotu özleri ödem ve kalp bozukluklarında resmi ilaçlar olarak kullanılmıştır (138) .



Şekil 10. Aposinin (138)

Ayrıca, aposininin 1891 yılında Otto tarafından sentezlenmiş ve tanımlanmış olan asetovanillona da benzer olduğu doğrulanmıştır (139).

Aposinin, 166.17 g/mol moleküler ağırlıklı bir asetofenondur ve sudan kristalleşmesine bağlı olarak ince iğneler oluşturmaktadır. Belirsiz bir vanilya kokusuna ve 115°C'lik bir erime noktasına sahiptir. Madde, soğuk suda hafif çözünür fakat sıcak su, alkol, benzen, kloroform ve eterde serbest çözünürdür.

Aposinin ilk olarak *Apocynum Cannabinum*'dan keşfedilmiş olmasına rağmen, mevcudiyeti *Apocynaceae* familyası ile sınırlı değildir. Aslında, aposininin mevcut olduğu miktarlar türden türe değişiklik gösterebilmesine rağmen birçok bitki türünün ana bileşenidir (140-144).

1971 yılında, Basu ve arkadaşları aposininin *Picrorrhiza kurroa* Royle ex Benth köklerinden izole edildiğini rapor etmiştir (145). *Picrorrhiza kurroa*, Batı Himalayaların yüksek rakımlarında yetişen, yıllardır yaygın bir şekilde kullanılan ve Hindistan ve Sri Lanka'da hala kullanılmakta olan küçük birçok yıllık bitkidir. Ana uygulama alanları ise, karaciğer indükleyici, kardiyotonik sarılık ve astım tedavisidir (146). O sıralarda *Picrorrhiza kurroa* etkinliğini açıklayabilecek olan belirli bir aposininin özelliği bilinmiyor olmasına rağmen, bu bileşenin bu bitkinin tıbbi potansiyeline katkıda bulunan önemli bir bileşen olduğu düşünülmekteydi. 1990 yılında ise, Simons ve arkadaşları *Picrorrhiza kurroa* köklerini aposininin farmakolojik potansiyelini izolasyona tabi tutmuşlardır (147, 148). Aposininin, etkinleştirilmiş polimorfonükleer nötrofiller (PMN) tarafından reaktif oksijen türleri (ROS) üretiminin seçici inhibisyonuna dayanan güçlü bir anti-inflamatuar ajan olduğu kanıtlanmıştır. PMN'ler ve ROS istila edici mikroorganizmalara karşı kalıtsal konakçı savunmada önemli bir rol oynadığından, aposinin faaliyeti pro/inflamatuar araçlar olarak nötrofillerin iştirak ettiği hastalıkların tedavisinde büyük ölçüde önemli olabilir.

1.4.1. Aposinin'in etki mekanizması

Aposinin, etkinleştirilmiş insan nötrofilinde seçici bir NADPH oksidaz faaliyetini ve beraberinde gelen ROS üretimini önleyicidir (147). Fagositoz ve hücre içi öldürmeyi etkilemediğinden, ilginç bir şekilde PMNlerin diğer savunma mekanizmalarını engellemez (149). Bu nedenle aposinin, NADPH oksidaz faaliyetini etkilemede oldukça önemli ve yaygın şekilde kullanılan bir deneysel araç haline gelmiştir.

1.4.2. Toksisite

Aposininin yan etkileri bilinmemektedir. Aposininin, farelerde oral yolla alınmasından sonra oldukça düşük bir toksisiteye (LD50: 9 g/kg) sahiptir (150). Tavşanlara üç aylık bir süre boyunca aposinin uygulaması yapıldıktan sonra dahi,

herhangi bir hastalık belirtisi görülmemiş ve kontrol edilen diğer parametreler de, tedavi yapılmayan hayvanlarla karşılaştırılmıştır (151).

1.4.3. Aposinin kinetiği

Gerçekleştirilen in vivo deneylerde aposininin kinetikleri hakkında çok fazla birşey bilinmemektedir fakat aposininin ilginç metabolik unsurları Daly (152) ve Gjertsen tarafından tanımlanmıştır (153). Ratlara, 120 mg/kg aposininin i.p uygulanmasını takip eden 20 saatlik bir süre sonra aposininin % 80'inin hayvanların idrarında değişmeden geri kazandırıldığını göstermişlerdir. Yaklaşık % 0.5'i, paraizomer, asetoizovanillone dönüştürülmüştür. Ayrıca, 3'4'-hidroksi asetofenon da salgılandığı görülmüştür.

1.4.4. Uyarılmış insan nötrofillerinde NADPH oksidazına bağlı bir ROS üretimi inhibitörü olarak Aposinin

Stolk ve ark. (96) daha önce aposininin NADPH oksidaz kompleksinin toplanmasını engelleyerek PMN'lerdeki ROS üretimini engellediğini öne sürmüşlerdir Buna rağmen, deneylerinde hücre iskeleti stabilizasyonu (154) açısından önemli ve fagositozis açısından gerekli (155, 156) olan F-aktin polimerizasyonunu olumsuz bir şekilde etkileyen sitokalazini kullanmışlardır. Dahası, deneylerinde fagozomlardan ziyade plazma membran parçalarını da analiz etmişlerdir (96).

Worm ve ark. (157) aposininin uyarılmış insan nötrofillerinde güçlü ve özgül bir solunum patlaması inhibitörü olduğu sonucuna varmışlardır.

Bu sebeple biz de iskelet kasında iskemi oluşturmak amacı ile infrarenal abdominal aortaya (İAA) klempe koyarak 2 saat iskemi, 2 saat reperfüzyon sonrasında aposininin doku MDA, TRPM2 immunreaktivitesi, apoptozis ve histopatolojik değişiklikler üzerine korucu etkilerinin olup olmadığını inceledik.

2. GEREÇ VE YÖNTEM

Bu çalışma 03.09.2014 tarihli ve 2014/18 sayılı ve 171 nolu Fırat Üniversitesi etik kurul kararı ile onay alındıktan sonra gerçekleştirildi. Çalışmada, 8-10 haftalık 250 ± 20 gram ağırlığında Sprague Dawley cinsi 30 adet dişi rat kullanıldı. Ratlar deney öncesi ve deney sırasında standart şartlarda 12 saat gece 12 saat gündüz sirkadiyan ritimde, ortam sıcaklığı $24-26^{\circ}\text{C}$ (sabit ısı ve havalandırılmalı odalarda) olacak şekilde 6'lı gruplar halinde özel kafeslerde bekletildi. Ratların beslenmesinde standart ticari pellet yemi ve şehir içme suyu kullanıldı. Tüm ratların bakımları, Tıbbi Araştırmalar Ulusal Derneği tarafından biçimlendirilen, Deney Hayvanlarının Bakım Prensipleri'ne ve Laboratuvar Hayvanı Kaynakları Enstitüsü tarafından (NIH basım no.85-23, 1985 revize edildi), "Laboratuvar Hayvanlarının Bakım ve Kullanımı Kılavuzu" ilkelerine uygun olarak yapıldı.

2.1. Deneyel Grupların Sınıflandırılması

Denekler rastgele seçilerek 5 grup oluşturuldu. Her grupta 6 denek ($n= 6$) olacak şekilde gruplar belirlendi.

Grup 1: (Kontrol grubu): Sadece anestezi verilen herhangi bir işlem yapılmayıp 4 saat sonra örnek alınan grup,

Grup 2: (Sham grubu): Sadece laparotomi yapıp, 4 saat sonra doku örnekleri alınan grup,

Grup 3: (I/R yapılan grup): Laparotomi yapıp, abdominal aortaya 2 saat klemp konup, 2 saat reperfüzyon sağlandıktan sonra doku örnekleri alınan grup,

Grup 4: (Aposinin-iskemi-reperfüzyon=A-I/R yapılan grup): Laparotomi sonrası 20 mg/kg aposinin verilip ardından abdominal aortaya 2 saat iskemi 2 saat reperfüzyon uygulandıktan sonra doku örnekleri alınan grup,

Grup 5: (İskemi-aposinin-reperfüzyon=IAR yapılan grup): Laparotomi yapıp, reperfüzyondan 30 dk. önce aposinin 20 mg/kg dozunda verilip 2 saat iskemi 2 saat reperfüzyon uygulandıktan sonra doku örnekleri alınan grup.

2.2. Anestezi-Cerrahi Teknik ve Örneklerin Alınması

Çalışmamızda ratlara 30 mg/kg dozda ketamine hidroklorür (Ketalar, Pfizer, Groton, Custom Tailored (CT) Farma) ve 3 mg/kg dozda xylazine hydrochloride

(Rompun; Bayer, Leverkusen, Germany) intramusküler olarak uygulanarak anestezi sağlandı. Ratlar gerektiğinde ilk dozun 1/3'ü ilave dozlar ile işlem boyunca solunum kasları spontan devam edecek şekilde uyutuldu. Olabilecek hipotermiyi engellemek için bir ısıtma lambası altında supin pozisyonunda operasyon gerçekleştirildi. Cilt aseptik olarak hazırlandı ve batın orta hattan laparotomi yapıldı. Sıvı dengesini korumak amacıyla, 10 ml ılık serum fizyolojik peritoneal boşluğa verildi. Bağırsaklar ıslak gaz ile sola çekilerek abdominal aortaya ulaşıldı. Kuyruk veninden intravenöz olarak 150 U/kg heparin (Nevparin, Mustafa Nevzat İlaç San.) ile antikoagülasyon deneklere aortik klemp konulmadan 2 dk önce uygulandı. Travmatik olmayan bir mikrovasküler klemp ile infrarenal abdominal aortaya (İAA) klemp konularak ratta alt ekstremité iskemi modeli oluşturuldu. Klempin distalinde HADECO marka ES-101 EX model el dopleri ile akımın olmadığı teyit edildi. Isı ve sıvı kaybını en az miktara indirmek için batın insizyonu kapalı olarak tutuldu. Oluşturulan iskemi 2 saat süre ile gözlemlendi. Oklüzyon sonrası batın tekrar açılarak infrarenal abdominal aortadaki mikrovasküler klemp kaldırıldı ve 2 saat süre ile reperfüzyon sağlandı. Aortik klempleme ile iskemi ve reperfüzyon işlemi, klempleme işlemi sırasında distal aortada akımın kaybolmasının el dopleri ile teyidi, reperfüzyon ise klempin kaldırılması sonrası distal aortada akımın sağlanması el dopleri teyidi ile değerlendirildi. Tüm gruplar deney sonrası anestezi altında sakrifiye edildikten sonra gerekli doku örnekleri alındı.

Kas dokusu örneklerinin bir kısmı alüminyum folyoya sarıldı. -80 °C'de muhafaza edilerek çalışma günü spektrofotometrik olarak doku MDA düzeyleri incelendi. Diğer kas dokusu örnekleri histopatolojik inceleme için % 10'luk formaldehitte tespit edildikten sonra TUNEL boyama, immünohistokimyasal boyama ve Masson Trikrom boyama ile boyanarak histopatolojik olarak incelendi.

2.3. Histopatolojik Değerlendirme ve Ölçüm Yöntemleri

2.3.1. Malondialdehit (MDA) Çalışması

Çalışmada alınan dokular 0.42 gr Tris-Base + 1.43 gr Tris-HCl + 3 gr KCl + 0.5 ml Tween 20, 250 ml distile suda hazırlandı. Hazırlanan bu tampon örneklerin homojenatında kullanıldı. Preparat olarak alınan doku üzerine 5 ml tampon ilave edildi ve parçalandı. Homojenat 5000 rpm de 5 dakika santrifüj edilip süpernatant

kısından 1 ml başka bir tüpe alındı. Alınan 1 ml örnek üzerine 1 ml % 10'luk trichloroanisole (TCA) (10 gr TCA 100 ml distile suda hazırlandı) ilave edildi. Üzerine 1 ml % 0.6 TBA (0.6 gr TBA 100 ml distile suda hazırlanır ve en fazla +4 °C de bir gün saklanabilir) ilave edildi. Üzerine 1 ml distile su ilave edildikten sonra, son olarak 0.5 ml % 4 HCl ilave edildi. (4 ml HCl 100 ml distile suda hazırlanır, asit ve su şiddetli reaksiyona girdiği için asit mümkünse damlalar şeklinde suya ilave edilmelidir). Hazırlanan karışım 90-95°C de 120 dk inkübasyona bırakıldı. İnkübasyon sonrası tüpler oda sıcaklığında soğutulduktan sonra üzerine 3 ml bütanol ilave edilip vortekslendi. Daha sonra tüpler 5 dk 5000 rpm'de santrifüj edildi. Oluşan (bütanol faz) süpernatanttaki kırmızı-pembe renk spektro küvetine pipet yardımıyla alınıp bütanole karşı 532 nm de okundu. Okunan absorbans değeri x: $(\text{okunan}_{\text{ABS}} + 0.0344)/0.0492$ formülüyle hesaplandı. Bulunan değer 5 ile çarpılıp (doku homojenatının 5 ml tamponda hazırlanması nedeniyle) çıkan sonuç homojenatta kullanılan doku ağırlığı kadardır.

2.3.2. TUNEL Metodu

Parafin bloklardan 5-6 µm kalınlığında alınan kesitler polilizinli lamlara alındı. Üretici firmanın talimatları doğrultusunda ApopTag Plus Peroxidase In Situ Apoptosis Detection Kit (Chemicon, cat no: S7101, USA) kullanılarak apoptoza giden hücreler belirlendi. Xylene ile deparafinize edilen dokular, dereceli alkol serilerinden geçirilerek phosphate buffered saline (PBS) ile yıkandı. % 0.05 'lik proteinase K ile 10 dakika inkübe edilen dokular, endojen peroksidaz aktivitesini engellemek için % 3 hydrogen peroxide ile 5 dakika inkübe edildi. PBS ile dokular yıkandıktan sonra, 6 dakika Equilibration Buffer ile inkübe edilip, 37 °C'de nemli ortamda çalışma solüsyonu (% 70 µl Reaction Buffer + % 30 TdT Enzyme) ile 60 dakika inkübe edildi. Stop/Wash Buffer da 10 dakika bekletilen dokular, Anti-Digoxigenin-Peroksidaz ile 30 dakika muamele edildi. Diaminobenzidine (DAB) substratı ile apoptotik hücreler görüntülendi. Harris hematoksilen ile zıt boyası yapılan kesitler uygun kapatma solüsyonu ile kapatıldı. Hazırlanan preparatlar Novel N-800M mikroskopunda incelenerek değerlendirildi ve fotoğraflandı. TUNEL boyamanın değerlendirilmesinde Harris hematoksilen ile maviye boyanmış çekirdekler normal, kahverengi nükleer boyanma gösteren hücreler apoptotik olarak

değerlendirildi. Kesitlerde 10'luk büyütmede rastgele seçilen alanlarda, normal ve apoptotik en az 500 hücre sayıldı. Apoptotik hücrelerin, toplam (normal + apoptotik) hücrelere oranlanması ile Apoptotik İndeks (AI) hesaplanarak istatistiksel analizleri yapıldı. Boyama metodu aşağıdaki tabloda ayrıntılı olarak verilmiştir (Tablo 6).

Tablo 6. TUNEL boyama prosedürü

	İşlem	Süre
1	60 °C etüv	Bir gece
2	Xylol	3x15 dakika
3	% 100, % 96, % 80, % 70 etil alkol	3'er dakika
4	PBS	5 dakika
5	Kesitlerin çevreleri sınırlayıcı kalem ile çizilir.	
6	1:500 dilüsyondaki Proteinaz K solüsyonu	20 dakika
7	PBS	3x5 dakika
8	Endojen peroksit blokajı (% 3 H ₂ O ₂)	3 dakika
9	PBS	3x5 dakika
10	Equilibration tampon solüsyonu	10 dakika
11	Çalışma solüsyonu (% 70 µl Reaction Buffer + % 30 TdT Enzyme) 37 °C'de	60 dakika
12	Stop/Wash Buffer (2 ml) + Distile su (68 ml) Oda sıcaklığında	10 dakika
13	Anti-Digoxigenin-Peroxidase	30 dakika
14	PBS	3x5 dakika
15	DAB Dilution Buffer + DAB Substrate	5-10 dakika
16	PBS	3x5 dakika
17	Distile su	5 dakika
18	Harris hematoksilen	1-5 dakika
19	Distile su	5 dakika
20	% 80, % 96 ve % 100 etil alkol	1'er dakika
21	Xylol	2x5 dakika
22	Kapatma medyumunu kullanılarak lamel ile kapatma.	

2.3.3. İmmünohistokimyasal İnceleme

İskelet kası dokusunda TRPM2 immünreaktivitesinin belirlenmesi için Avidin-Biotin-Peroksidaz Kompleksi yöntemi uygulandı (Tablo 7).

Parafin bloklardan 5–6 µm kalınlığında alınan kesitler polilizinli lamlara alındı. Endojen peroksidaz aktivitesini önlemek için H₂O₂ ile muamele edildi.

Deparafinize edilen dokular dereceli alkol serilerinden geçirilip antigen retrieval için sitrat tampon solüsyonunda pH: 6'da mikrodalga fırında (750W) 12 dakika kaynatıldı. Zemin boyasını engellemek için Ultra V Block (TA-125-UB, Lab Vision Corporation, USA) solüsyonu ile 5 dakika muameleden sonra primer antikor (Rabbit Anti-TRPM2 antibody, ab101738, Abcam, Cambridge, UK) ile 60 dakika inkübe edildi. Dokular, primer antikor uygulanmasından sonra sekonder antikor (Biotinylated Goat Anti-Poliyvalent (anti-mouse/rabbit IgG), TP-125-BN, Lab Vision Corporation, USA) ile 30 dakika nemli ortamda oda ısısında inkübe edildi. Sekonder antikor uygulanmasından sonra Streptavidin Alkaline Phosphatase (TS-060-AP, Lab Vision Corporation, USA) ile 30 dk nemli ortamda oda ısısında inkübe edildikten sonra distile su içerisine alındı. Dokulara Fast Red Substrate System (TA-125-AF, Lab Vision Corporation, USA) solusyonu damlatılıp ışık mikroskopunda görüntü sinyali alındıktan sonra eş zamanlı olarak distile su ile yıkamaya alındı. Mayers hematoksilen ile zıt boyaması yapılan dokular distile sudan geçirilerek uygun kapatma solusyonu (Large Volume Vision Mount, TA-125-UG, Lab Vision Corporation, USA) ile kapatıldı. Pozitif kontrol için, meme dokusu ile karşılaştırıldı. Negatif kontrol için hazırlanan dokularda primer antikor yerine PBS kullanıldı. Diğer basamaklar da aynı şekilde uygulandı. Hazırlanan preparatlar Novel N-800M mikroskopunda incelenerek değerlendirildi ve fotoğraflandı. İmmünohistokimyasal boyanmanın değerlendirilmesinde; immünreaktivitenin yaygınlığı (0.1: <% 25, 0.4: % 26-50, 0.6: % 51-75, 0.9: % 76-100) ve şiddeti (0: yok, +0.5: çok az, +1: az, +2: orta, +3: şiddetli) esas alınarak histoskor oluşturuldu. (Histoskor = yaygınlık x şiddet)

Tablo 7. İmmünohistokimyasal boyama prosedürü

Sıra	İşlem	Süre
1	Xylol I	10 dakika
2	Xylol II	10 dakika
3	Xylol	10 dakika
4	% 100 Alkol	10 dakika
5	% 96 Alkol	10 dakika
6	% 80 Alkol	10 dakika
7	Distile su	5 dakika
8	Mikrodalga	7+5 dakika
9	Oda ısısında soğutma	20 dakika
10	PBS (Phosphate Buffered Saline)	3x5 dakika
11	H ₂ O ₂	10 dakika
12	PBS	3x5 dakika
13	Normal blok solüsyonu	5 dakika
14	Primer antikor	60 dakika
15	PBS	3x5 dakika
16	Sekonder antikor	30 dakika
17	PBS	3x5 dakika
18	Streptavidin Alkaline Phosphatase	20 dakika
19	PBS	3x5 dakika
20	Fast Red Substrate	5 dakika
21	Distile su	5 dakika
22	Zıt boya olarak Mayer's hematoksilen	10 saniye
23	Akarsu	5 dakika
24	Özel kapatma maddesi ile kapatma	

2.3.4. Histolojik Çalışma

Her gruptan alınan iskelet kası dokuları, % 10'luk formaldehit tespit solüsyonunda 24 saat süresince tespit edildikten sonra musluk suyu altında yıkamaya alındı. Musluk suyunda 24 saat yıkanan dokular daha sonra rutin histolojik takip serilerinden geçirildi (Tablo 8). Daha sonra dokular parafin bloklara gömüldü. Bu parafin bloklardan 5–6 µm kalınlığında kesitler alındı. Kesitler masson trikrom ile boyandı. Hazırlanan preparatlar araştırma mikroskobunda (Novel N-800M) incelenip fotoğraflandı.

Tablo 8. Histolojik takip serileri

Sıra	İşlem	Süresi
1	% 70 Alkol	2 saat
2	% 80 Alkol	1.5 saat
3	% 96 Alkol I	30 dakika
4	% 96 Alkol II	30 dakika
5	% 100 Alkol I	30 dakika
6	% 100 Alkol II	30 dakika
7	Alkol + Xylol	15 dakika
8	Xylol I	15 dakika
9	Xylol II	15 dakika
10	Yumuşak parafin + Xylol	45 dakika
11	Yumuşak parafin	1 Saat
12	Yumuşak parafin – Sert parafin	1.5 saat
13	Sert Parafin	3 saat
14	Gömme	

2.4. İstatistiksel Analiz

Elde edilen veriler ortalama $\pm$ sapma olarak belirlendi. Elde edilen verilerin istatistiksel anlamlılık düzeyleri student *t* ve ANOVA testi ile belirlendi. $p > 0.05$ gruplar arasında istatistiksel olarak fark yok (anlamsız) kabul edildi.

3. BULGULAR

3.1. MDA Bulgular

Spektrofotometrik olarak ölçülen doku MDA düzeyleri, kontrol ve sham gruplarında benzerdi. Kontrol ve sham gruplarıyla kıyaslandığında I/R grubunda MDA düzeyleri anlamlı olarak azalmış bulundu ($p<0.05$). I/R grubu ile karşılaştırıldığında; A-I/R grubunda iskelet kası dokularında MDA düzeyi anlamlı olarak artmış ($p<0.05$) iken IAR grubunda ise bir değişiklik izlenmedi (Tablo 9).

Tablo 9. Doku MDA değerleri

Grup	MDA (nmol/g protein)
Kontrol	87.58±8.16
Sham	89.72±9.50
I/R	51.65±13.56 ^a
A-I/R	132.35±8.85 ^{ab}
IAR	48.15±12.82 ^a

Değerler ortalama ± standart sapma olarak verilmiştir.

^a Kontrol grubuna göre karşılaştırıldığında,

^b I/R grubuna göre karşılaştırıldığında, ($p<0.05$).

3.2. TUNEL Bulgular

Apoptotik hücrelerin belirlenmesi için yapılan TUNEL boyamanın ışık mikroskobu altında incelenmesi sonucu; TUNEL pozitifliği iskelet kası dokusunda kontrol (Şekil 11) ve sham (Şekil 12) gruplarında gözlenmedi. Kontrol grubu ile karşılaştırıldığında I/R grubunda (Şekil 13) anlamlı bir artış vardı ($p<0.05$). I/R grubu ile kıyaslandığında A-I/R (Şekil 14) grubunda belirgin bir azalma vardı ve kontrol grubuna benzer şekilde apoptotik hücre izlenmedi ($p<0.05$). Bununla birlikte I/R grubu ile kıyaslandığında IAR grubunda (Şekil 15) apoptotik hücrelerde belirgin bir artış gözlemlendi ($p<0.05$) (Tablo 10).

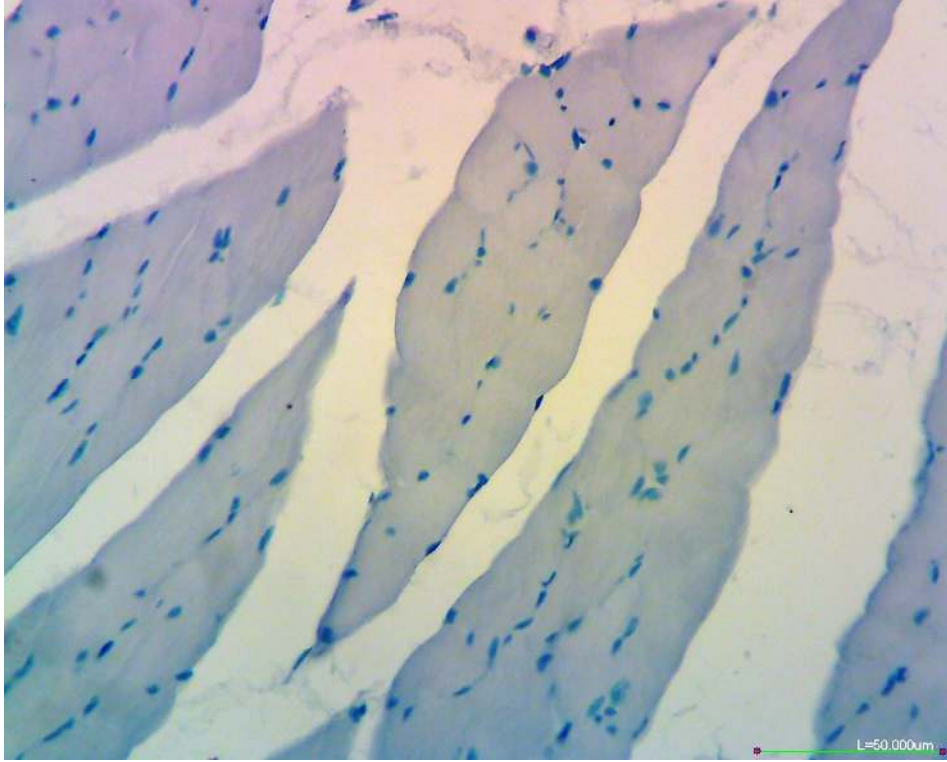
Tablo 10. Apoptotik Indeks (%)

Grup	Apoptotik Indeks (%)
Kontrol	0.00 ± 0.00
Sham	0.00 ± 0.00
I/R	3.16 ± 0.16 ^a
A-I/R	0.00 ± 0.00 ^b
IAR	6.16 ± 0.16 ^{ab}

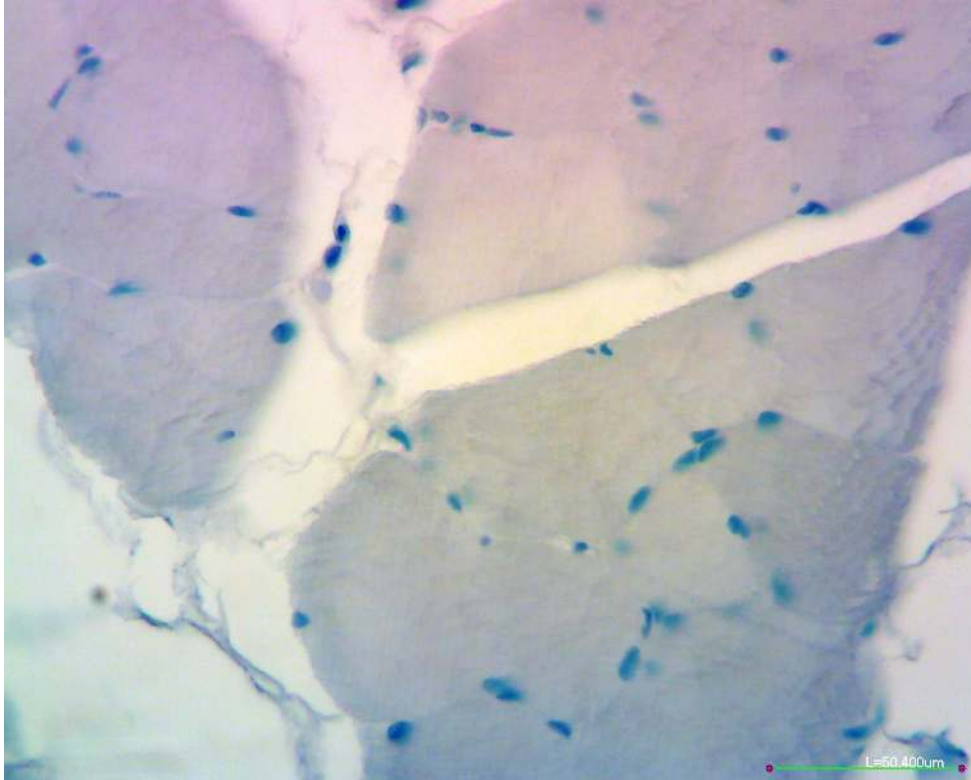
Değerler ortalama ± standart sapma olarak verilmiştir.

^a Kontrol grubuna göre karşılaştırıldığında,

^b I/R grubuna göre karşılaştırıldığında, ($p<0.05$).



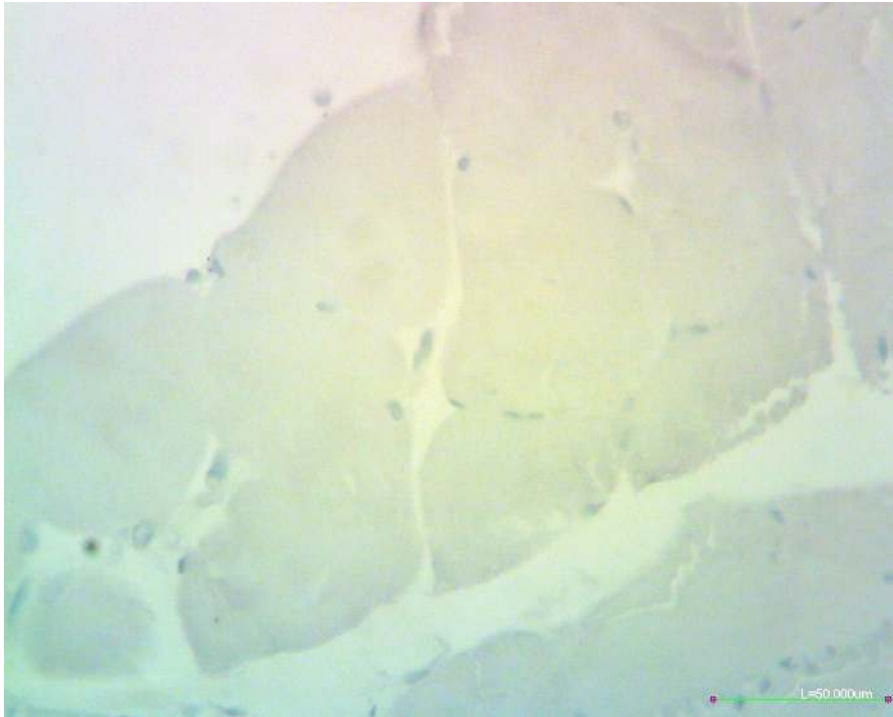
Şekil 11. Kontrol grubuna ait iskelet kası dokusu. TUNEL boyama Skala bar: 50µm.



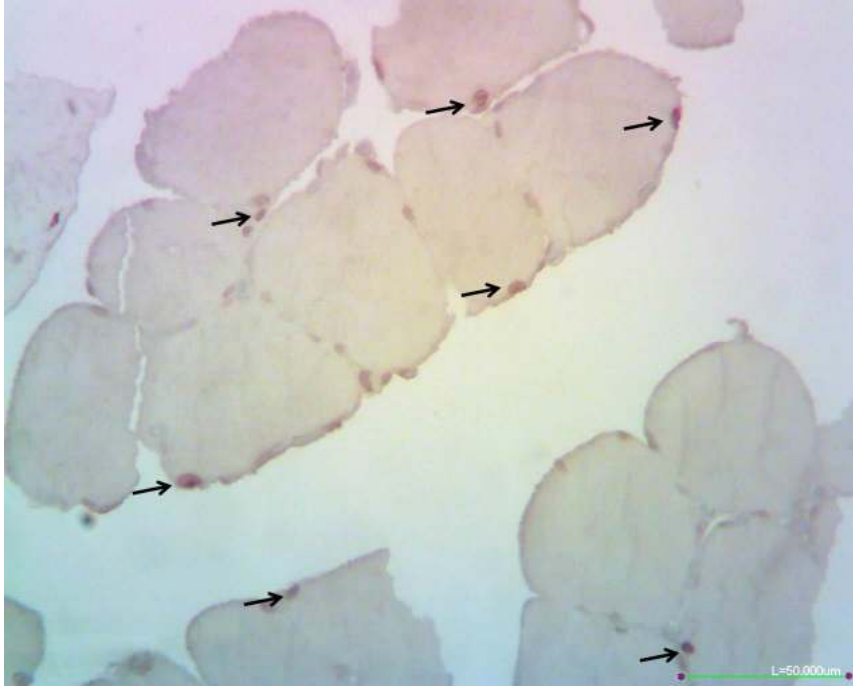
Şekil 12. Sham grubuna ait iskelet kası dokusu. TUNEL boyama Skala bar: 50µm.



Şekil 13. I/R grubuna ait iskelet kası dokusunda TUNEL pozitif hücreler (→). TUNEL boyama Skala bar: 50μm.



Şekil 14. A-I/R grubuna ait iskelet kası dokusu. TUNEL boyama Skala bar: 50μm.



Şekil 15. IAR grubuna ait iskelet kası dokusunda TUNEL pozitif hücreler (→). TUNEL boyama Skala bar: 50µm.

3.3. İmmünohistokimyasal Bulgular

3.3.1. TRPM2 İmmünreaktivitesi

TRPM2 immünreaktivitesi için yapılan immünohistokimyasal boyamanın ışık mikroskopi altında incelenmesi sonucu; TRPM2 immünreaktivitesi iskelet kası dokusunda sarkoplazmada (→) görüldü. TRPM2 immünreaktivitesi kontrol (Şekil 16) ve Sham (Şekil 17) gruplarında benzerdi. Kontrol grupları ile karşılaştırıldığında I/R (Şekil 18) grubunda anlamlı bir azalma vardı ($p<0.05$). I/R grubu ile kıyaslandığında A-I/R (Şekil 19) grubunda anlamlı bir azalma gözlenmekle birlikte IAR grubunda (Şekil 20) bir değişiklik izlenmedi (Tablo 11).

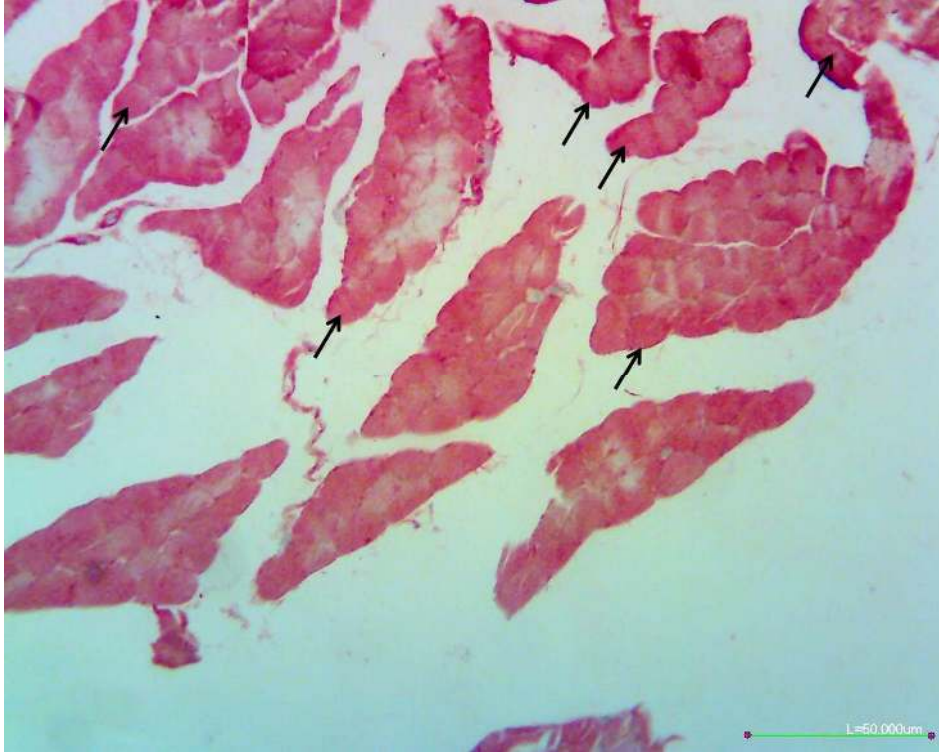
Tablo 11. TRPM2 immünreaktivitesi.

Grup	TRPM2 immünreaktivitesi
Kontrol	2.55 ± 0.36
Sham	2.40 ± 0.46
I/R	0.86 ± 0.16^a
A-I/R	0.36 ± 0.081^{ab}
IAR	0.93 ± 0.20^a

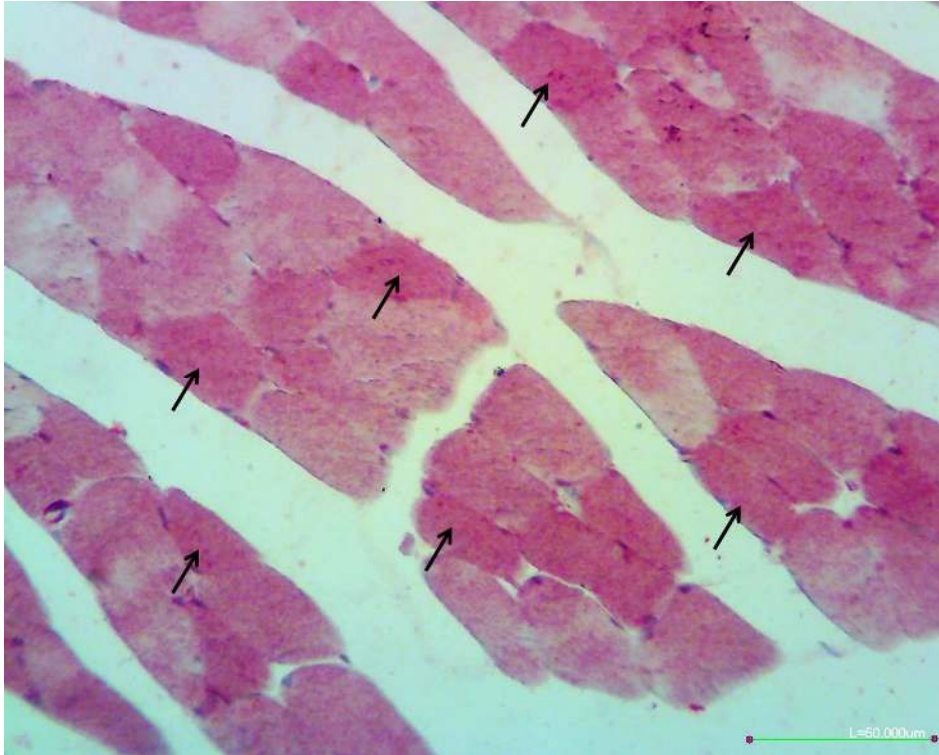
Değerler ortalama $\pm$ standart sapma olarak verilmiştir.

^a Kontrol grubuna göre karşılaştırıldığında,

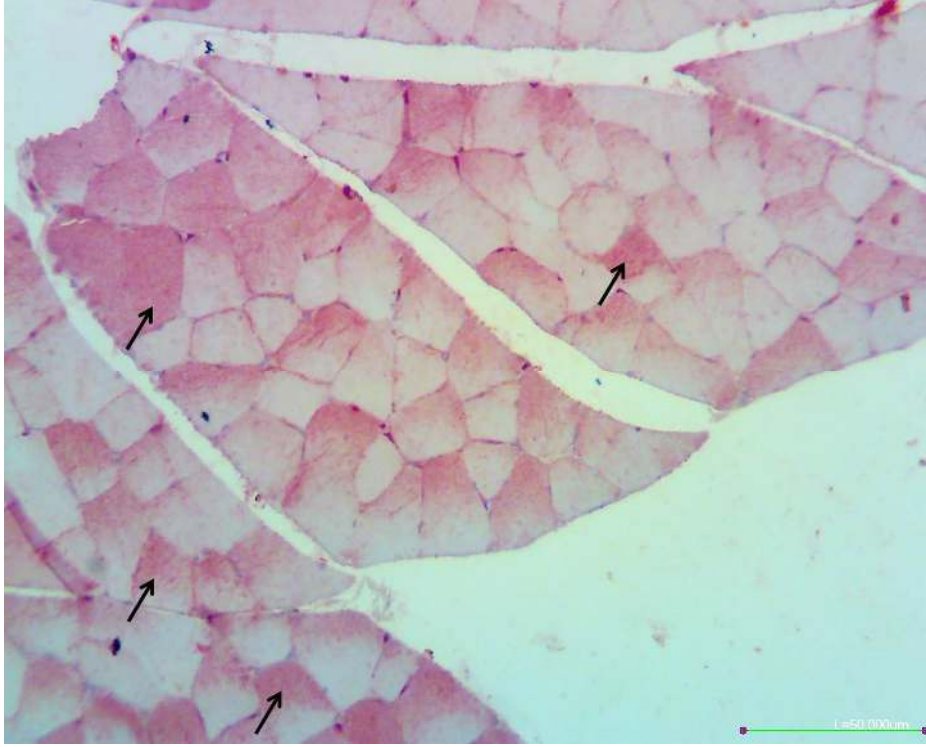
^b I/R grubuna göre karşılaştırıldığında, ($p<0.05$).



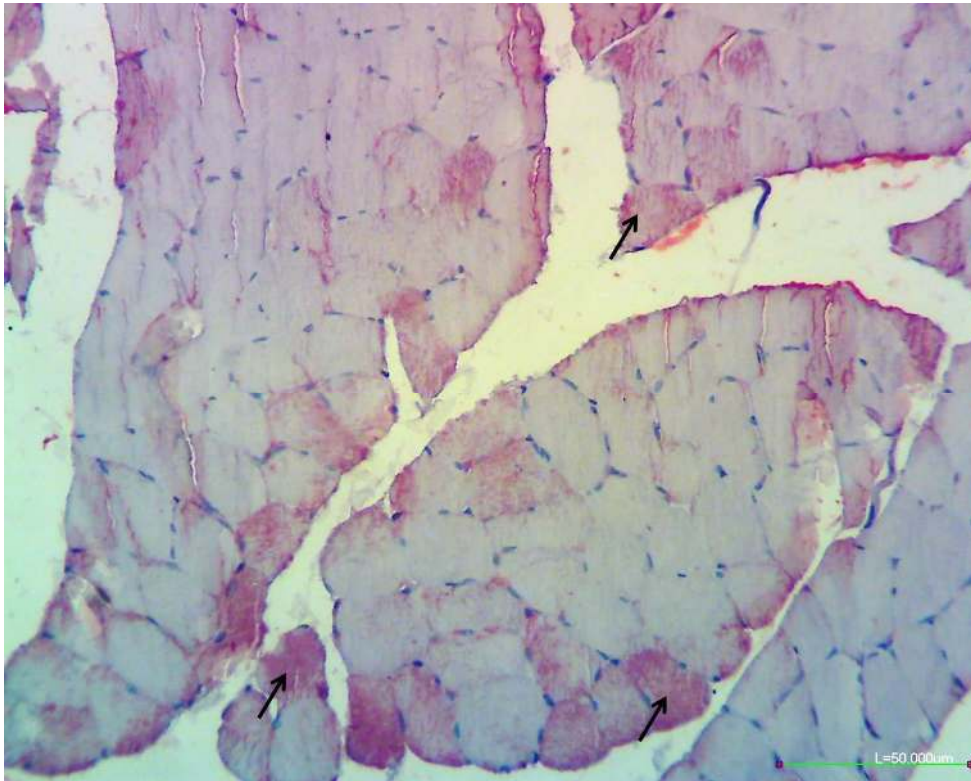
Şekil 16. Kontrol grubuna ait iskelet kası dokusunda TRPM2 immunreaktivitesi (→).
Skala bar: 50µm.



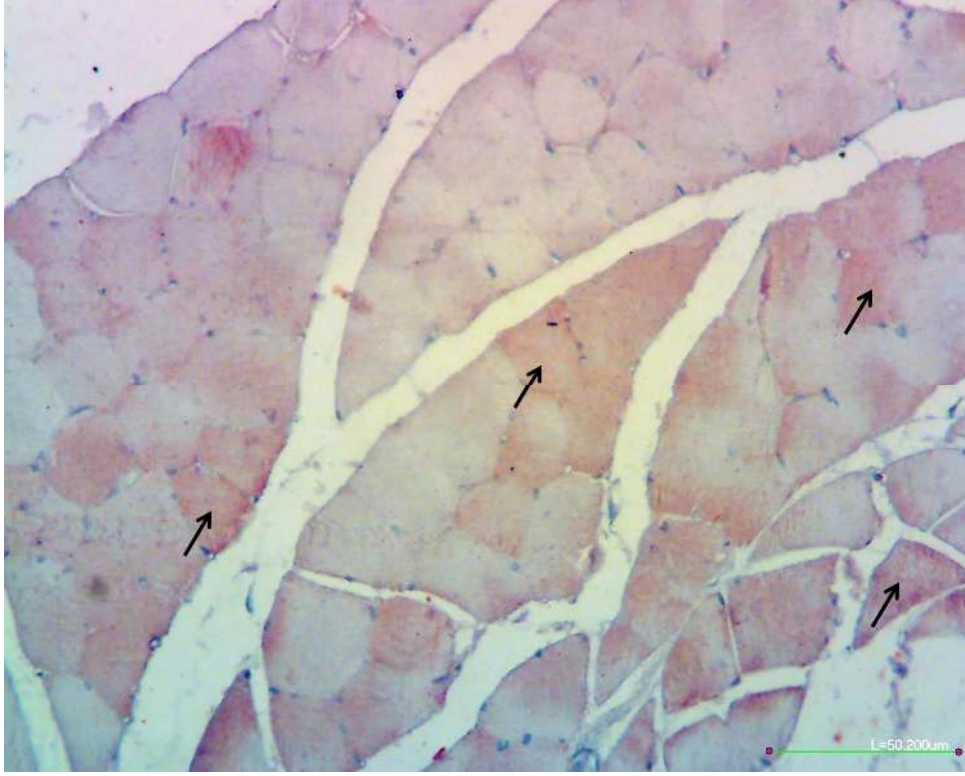
Şekil 17. Sham grubuna ait iskelet kası dokusunda TRPM2 immunreaktivitesi (→).
Skala bar: 50µm.



Şekil 18. I/R grubuna ait iskelet kası dokusunda TRPM2 immunreaktivitesi (→).
Skala bar: 50µm.



Şekil 19. A-I/R grubuna ait iskelet kası dokusunda TRPM2 immunreaktivitesi (→).
Skala bar: 50µm.



Şekil 20. IAR grubuna ait iskelet kası dokusunda TRPM2 immunreaktivitesi (→).
Skala bar: 50µm.

3.4. Histolojik Bulgular

Tüm grupların masson trikrom boyalı preparatlarının ışık mikroskopi altında incelenmesi sonucu; kontrol (Şekil 21) ve sham (Şekil 22) grupları normal görünümdeydi.

Kontrol grubu ile karşılaştırıldığında I/R grubunda (Şekil 23, 24) istatistiksel olarak anlamlı bir şekilde çizgilenme kaybı (→), ödem (★), konjesyon (→) ve kas hücrelerinde belirgin ayrılma ve bozulmalar (★) izlendi ($p<0.05$).

I/R grubu ile karşılaştırıldığında ise A-I/R (Şekil 25, 26) grubunda ödem hariç diğer tüm parametrelerde istatistiksel olarak anlamlı düzelme gözlemlendi ($p<0.05$). IAR (Şekil 27, 28) grubunda beklenenin aksine I/R grubu ile kıyaslandığında tüm parametrelerde önemli bir değişiklik izlenmemekle beraber inflamatuvar hücre artışı (→) belirgindi (Tablo 12).

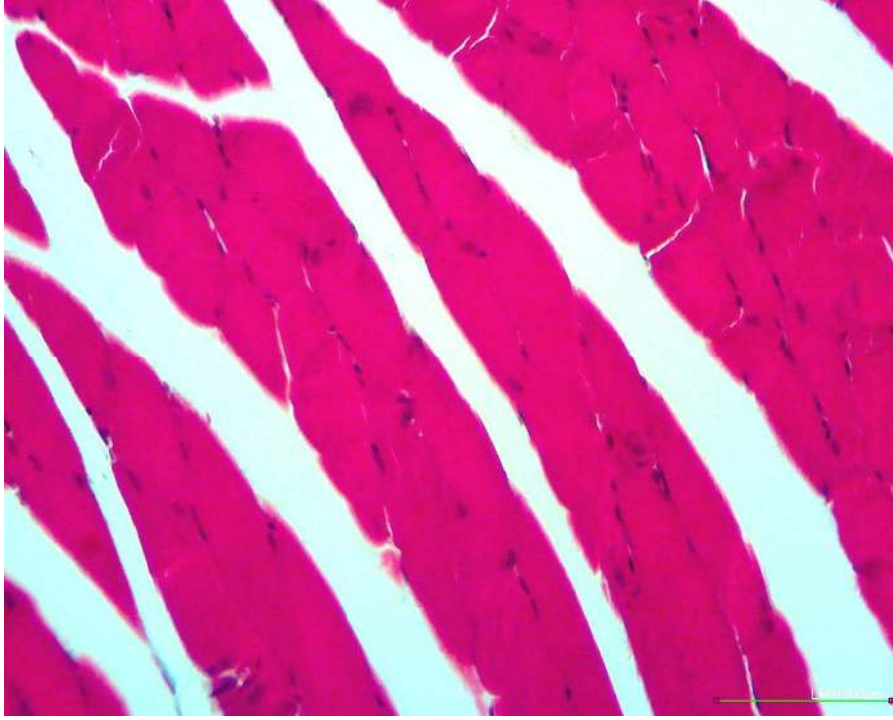
Tablo 12. Histoskor

	Inflamatuvar hücre artışı	Çizgilenme kaybı	Ödem	Konjesyon	Hücreler arası ayrılma ve bozulmalar
Kontrol	0,00±0,00	0,00±0,00	0,00±0,00	0,00±0,00	0,00±0,00
Sham	0,00±0,00	0,00±0,00	0,00±0,00	0,00±0,00	0,00±0,00
I/R	0.83±0.75	2.50±0.54 ^a	2.33±0.81 ^a	2.00±0.89 ^a	2.33±0.81 ^a
A-I/R	0.16±0.40	2.00±0.89 ^a	0.33±0.51 ^b	0.33±0.51 ^b	0.83±1.16 ^b
IAR	2.33±0.81 ^{ab}	2.66±0.51 ^a	2.83±0.40 ^a	2.83±0.40 ^a	2.83±0.40 ^a

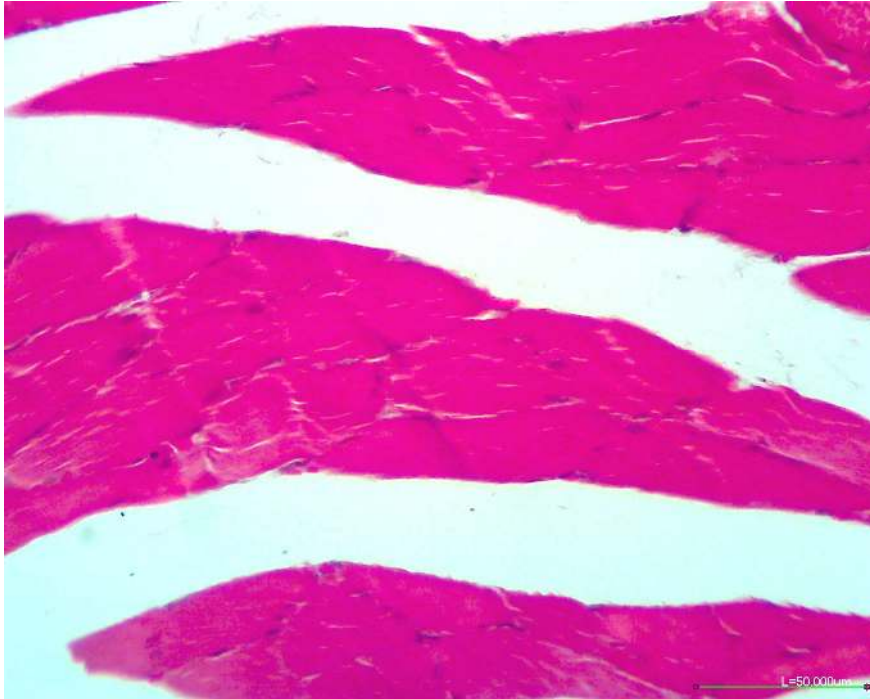
Değerler ortalama ± standart sapma olarak verilmiştir.

^a Kontrol grubuna göre karşılaştırıldığında,

^b I/R grubuna göre karşılaştırıldığında, ($p<0.05$).



Şekil 21. Normal görünümlü kontrol grubuna ait iskelet kası dokusu. Masson trikrom. Skala bar: 50µm.

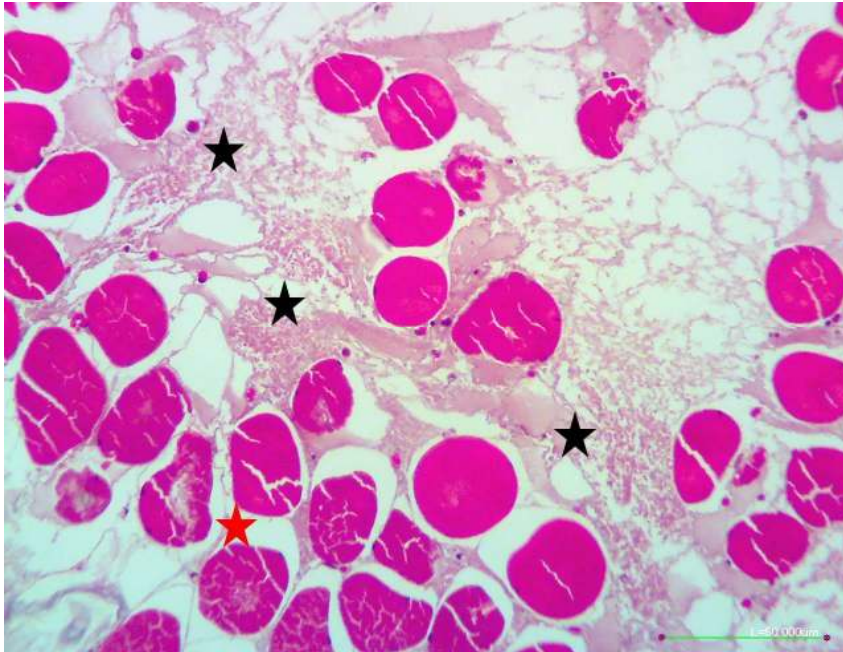


Şekil 22. Normal görünümlü sham grubuna ait iskelet kası dokusu. Masson trikrom. Skala bar: 50µm.



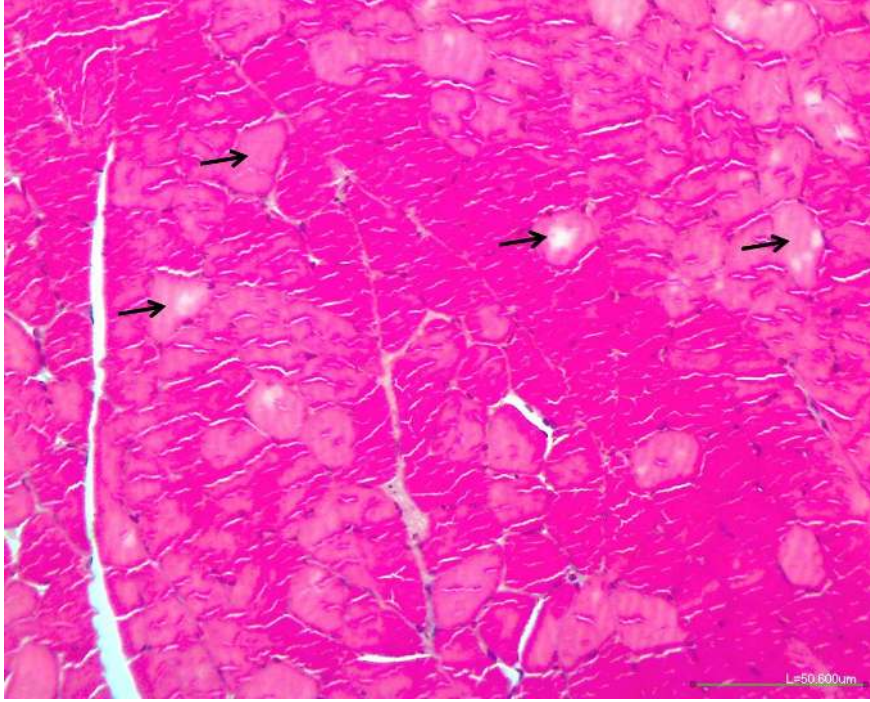
→ : çizgilenme kaybı → : konjesyon ★ : kas hücrelerinde ayrılma ve bozulmalar: → inflamatuvar hücre artışı

Şekil 23. I/R grubuna ait histolojik değişikliklere sahip iskelet kası dokusu. Masson trikrom. Skala bar: 50µm.



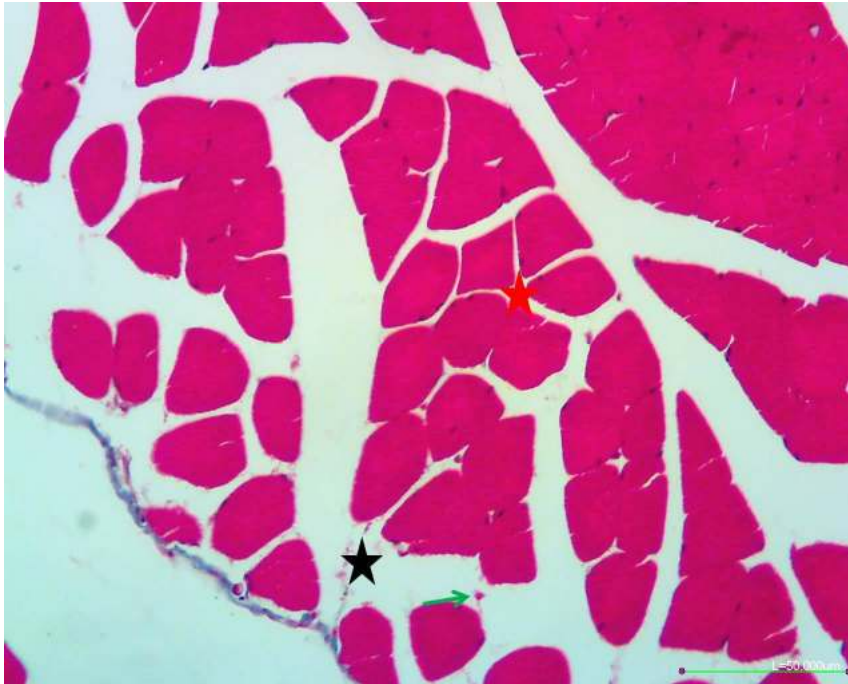
★ : kas hücrelerinde ayrılma ve bozulmalar ★ : ödem

Şekil 24. I/R grubuna ait histolojik değişikliklere sahip iskelet kası dokusu. Masson trikrom. Skala bar: 50µm.

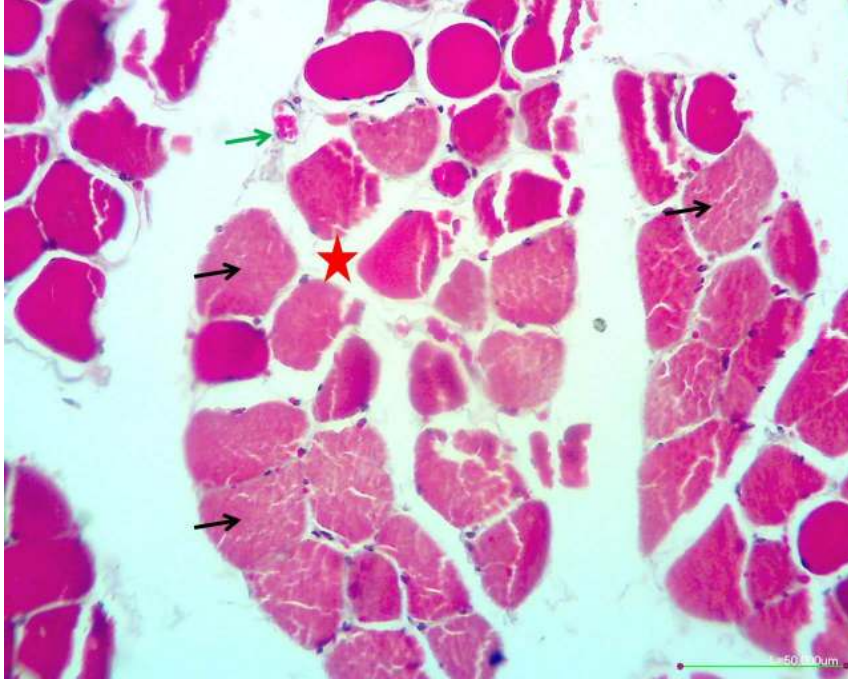


→ : çizgilenme kaybı

Şekil 25. A-I/R grubuna ait histolojik değişikliklere sahip iskelet kası dokusu. Masson trikrom. Skala bar: 50µm.

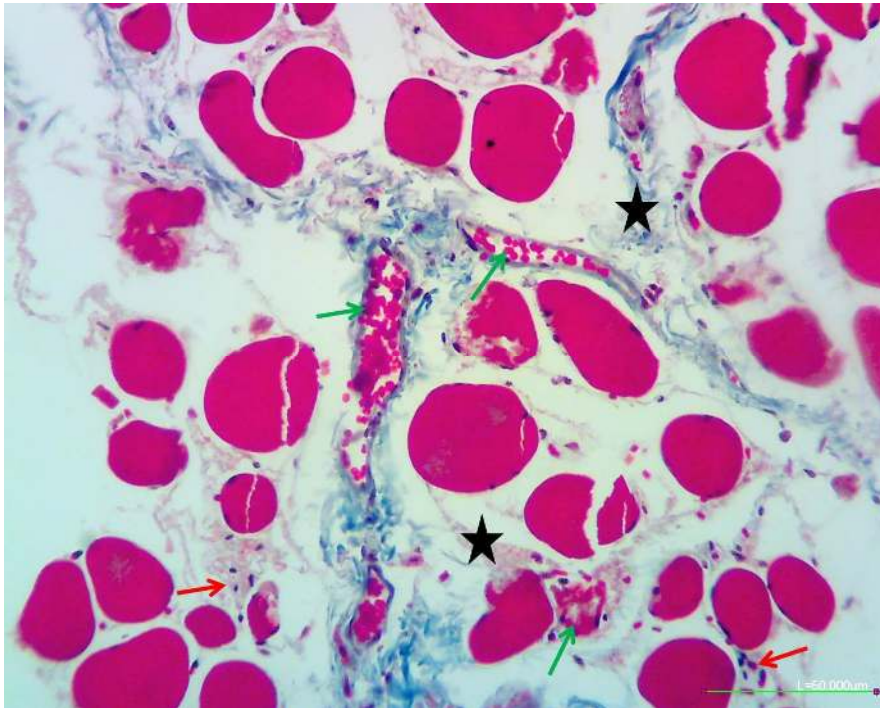


★ : kas hücrelerinde ayrılma ve bozulmalar ★: ödem → : konjesyon
Şekil 26. A-I/R grubuna ait histolojik değişikliklere sahip iskelet kası dokusu. Masson trikrom. Skala bar: 50µm.



→ : çizgilenme kaybı → : konjesyon ★ : kas hücrelerinde ayrılma ve bozulmalar

Şekil 27. IAR grubuna ait histolojik değişikliklere sahip iskelet kası dokusu. Masson trikrom. Skala bar: 50µm.



→ : konjesyon → : inflamatuvar hücre artışı ★ : ödem

Şekil 28. IAR grubuna ait histolojik değişikliklere sahip iskelet kası dokusu. Masson trikrom. Skala bar: 50µm.

4. TARTIŞMA

İskemi, dokunun oksijen ve diğer metabolitlere olan ihtiyacının dolaşım tarafından sağlanamaması ve oluşan fazla ürünlerin uzaklaştırılamaması olarak tanımlanabilir (1).

Reperfüzyon ise, iskemi sonucu doku veya organların enerji ihtiyaçlarının giderilmesi ve zararlı metabolitlerin uzaklaştırılması için doku ya da organa yeniden kan akımının sağlanması olayıdır. İskemik dokunun reperfüzyonu, dokuda paradoksal olarak sadece iskemi ile oluşan hasara göre çok daha ciddi hasarlara yol açabilmektedir (158).

İskemi reperfüzyon hasarı, trombolitik tedavi, organ nakli, koroner anjioplasti, kardiyopulmoner bypass, ortopedik cerrahi, uzamış turnike süresi, ekstremitte arter travması, rekonstrüktif mikrocerrahi ve akut kompartman sendromunda sık karşılaşılan iskemik durumlardandır (159-163). I/R hasarında temel patofizyoloji, iskemik dokuların reperfüzyonu sonrası gelişen mikrovasküler disfonksiyondur. Bu durum kendini arteriyollerde endotel bağımlı dilatasyonda bozulma, kapillerlerdeki sıvı filtrasyonunda ve lökosit tıkanmasında artma, postkapiller venüllerde lökositlerin sıkışması ve son olarak plazma proteinlerinin ekstrasvazasyonu şeklinde gösterebilmektedir.

Reperfüzyon döneminde gözlenen hasarda, hücre içine moleküler oksijen girişi ile hızla oluşan serbest oksijen radikalleri (SOR) ve türevleri başta olmak üzere birçok mekanizma rol oynayabilmektedir (164).

Organizma, serbest radikallerin meydana getirdiği doku hasarını önlemek için antioksidan savunma sistemi geliştirmiştir. Bu antioksidan savunma sistemi, dolaylı veya doğrudan etki etmektedir (165).

Hücre membranının oksijen radikalleri ile reaksiyonu ve meydana gelen lipid peroksidasyonu ile birlikte hücre ölümleri başlamaktadır. Dokularda meydana gelen lipid peroksidasyon oluşumu ve buna bağlı olarak MDA artışı, hücrede membran bütünlüğünün bozulmasına, permeabilitenin artmasına neden olmaktadır. Bu durum hücrelere kalsiyum ve sodyum gibi elektrolit geçişlerinin hızlanmasına ve dolayısıyla ATP kaybına, DNA hasarına ve apoptozise neden olabilmektedir. Bundan dolayı yapılan çalışmalarda reperfüzyon öncesi ve iskemi süresince verilen antioksidan ajanların reperfüzyon hasarını azalttığı bildirilmiştir (166).

Her dokuya ait kritik iskemi süresi bulunmaktadır. İskemiye bağlı hasarın şiddeti ise hipoperfüzyon zamanı ve miktarı ile orantılı olup, hücre tipine, travmaya karşı duyarlılığına, kan ihtiyacı ve metabolizmasına göre değişiklik göstermektedir. İskemik hasara karşı kas dokusundaki değişiklikler için 4 saat, sinir dokusundaki değişiklikler için 8 saat, yağ dokusundaki değişiklikler için 13 saat, deridekiler için 24 saat ve kemik dokusundaki değişiklikler için 4 güne kadar geri dönüşümlü olabilir (5).

İskelet kası, iskemik hasara en hassas doku olması sebebiyle alt ekstremitte I/R hasarında önemli rol oynar. Reperfüzyonla oluşmuş inflamatuvar yanıt, geri dönüşümlü zedelenme miktarı ile doğru, nekrotik kas miktarı ile ters orantılıdır (21, 22). İskemiye takiben yaklaşık üçüncü saatte ciddi kas hasarı ve altıncı saatte yaklaşık % 97 fonksiyonel doku kaybı olduğu (geri dönüşümsüz zedelenme) spektrofotometrik (triphenyltetrazolium chloride) yöntemlerle gösterilmiştir (24).

Aposinin, etkinleştirilmiş insan nötrofilinde seçici bir NADPH oksidaz ve beraberinde gelen ROS üretimi önleyicidir. Daha önceki yapılan çalışmalarda anti-inflamatuvar ve antioksidan olduğu saptanmıştır. Bu nedenle de aposinin, NADPH oksidaz faaliyetini etkilemede oldukça önemli ve yaygın bir şekilde kullanılan deneysel bir ajan haline gelmiştir (147).

Çalışmamızda daha önce yapılan deneysel modellere uygun olarak infrarenal abdominal aortaya mikrovasküler klemp konularak I/R modeli kullanılmıştır (167-172). Her ne kadar noninvaziv ve kolay uygulanabilir oluşu nedeniyle turnike yöntemini savunan araştırmacılar olsada, uzamış mekanik kompresyon sonucu venöz ve lenfatik oklüzyon, kas ve sinir zedelenmesine neden olabileceği gibi yeterli iskemi oluşturamaması nedeniyle turnike yöntemi bu çalışmada tercih edilmemiştir (173-175). Siemionow ve ark. (176) farklı iskemi zamanlarında, vücutta oluşan süperoksit radikali miktarını sitokrom-c bazlı biyosensör vasıtasıyla ölçmüşler ve süperoksit radikalinin en yüksek değerlerine iki saatlik iskemi sonrası ulaştığını ve bu sürede aynı zamanda doku hasarında belirgin hale getirdiğini göstermişlerdir. Bizde bu sebeple iskelet kasında iskemi oluşturmak amacı ile infrarenal abdominal aortaya (İAA) klemp koyarak 2 saat iskemi, 2 saat reperfüzyon sonrasında aposininin doku MDA, TRPM2 immunreaktivitesi, apoptozis ve histopatolojik değişiklikler üzerine koruyucu etkilerinin olup olmadığını inceledik.

Çalışmamızda yapılan histopatolojik inceleme sonucunda; kontrol grubu ile karşılaştırıldığında I/R grubunda belirgin çizgilenme kaybı, ödem, konjesyon ve kas hücrelerinde belirgin ayrılma ve bozulmalar izlendi. I/R grubu ile karşılaştırıldığında ise A-I/R grubunda ödem hariç diğer tüm parametrelerde istatistiksel olarak anlamlı düzelme gözlenmesine rağmen IAR grubunda ise beklenenin aksine I/R grubuna benzer bulgular izlendi. Çalışmamızdaki I/R ve A-I/R grubundaki bulgular daha önce antioksidan ve anti-inflamatuar maddelerle yapılan çalışmalara benzerlik göstermekteydi (177, 178).

Erdem ve ark. (177) çalışmamıza benzer şekilde ratlarda I/R oluşturmuş ve tedavi olarak antioksidan etkisi bilinen melatoninin kullanarak ve I/R grubunda kas dokusunda enflamasyon ve dejenerasyon tespit etmişlerdir. Bununla birlikte tedavi olarak melatonin verdikleri grupta kas dokusunda histopatolojik bulgulara belirgin düzelme izlenmiştir. Yapılan bir başka I/R çalışmasında ise antiapoptotik ve antioksidan etkisi olan selenyumun gastrokinemius kasında mast hücrelerinin miktarını azaltarak intersitisyel ödem, kas lifleri ve kas dokusu dejenerasyonunu ve inflamatuvar hücre infiltrasyonunu önlediği tespit edilmiştir (178).

Apoptozis, yıpranmış veya biyolojik ömrünü tamamlanmış hücrelerde biyokimyasal ve morfolojik değişimlere bağlı olarak gerçekleşen hücre ölümüdür (107). Hücre içi elektron dengesinin bozulması, oksidatif stres, mitokondrial defektler ve antioksidan sistemin yetersiz kalması apoptozis oluşumunu tetikleyebilmektedir (179).

Çalışmamızda; apoptotik hücrelerin belirlenmesi için yapılan TUNEL boyamanın ışık mikroskopi altında incelenmesi sonucu; iskelet kası dokusunda kontrol ve sham gruplarında TUNEL pozitifliği gözlenmedi. Kontrol grubu ile karşılaştırıldığında I/R grubunda anlamlı bir artış vardı. I/R grubu ile kıyaslandığında A-I/R grubunda belirgin bir azalma vardı ve kontrol grubuna benzer şekilde apoptotik hücre izlenmedi. Bununla birlikte I/R grubu ile kıyaslandığında IAR grubunda apoptotik hücrelerde anlamlı bir şekilde artış gözlemlendi.

Wang ve ark. (180) ile Armstrong ve ark. (181) yaptıkları çalışmalarda çalışmamıza benzer şekilde I/R'nin belirgin apoptotik hücre artışına neden olduğunu saptamışlardır.

Altıntaş ve ark. (182) renal I/R modellerinde aposinin verdikleri gruplarda apoptozisin I/R grubuna göre belirgin şekilde azaldığını belirtmişlerdir. Yapılan bir çalışmada ise travmatik beyin hasarı oluşturulan farelerde aposinin verilen gruplarda apoptotik hücre sayısında istatistiksel olarak anlamlı düşüş olduğunu saptamışlardır (183).

İnsan beyin mikrovasküler endotelial hücreleri ve astrositler ile yapılan hücre kültürü çalışmalarında NADPH oksidaz inhibitörü olan aposininin TNF- α 'nın potansiyalize ettiği kan-beyin bariyeri bozukluğunu apoptozisi azaltarak önlediği tespit edilmiştir (184).

Malondialdehit lipid peroksidasyonun en önemli göstergesidir (77, 78). Dokularda lipid peroksidasyon oluşumu ve buna bağlı olarak MDA artışı, hücrede membran bütünlüğünün yok olmasına, permeabilitenin artmasına, hücrelere kalsiyum ve sodyum gibi elektrolit geçişlerinin hızlanması sonucu ATP kaybına, DNA hasarına ve hücre ölümleri ile sonuçlanan fizyolojik, metabolik ve işlevsel bozukluklara yol açabilmektedir (79). Çalışmamızda; spektrofotometrik olarak ölçülen doku MDA düzeyleri, kontrol ve sham gruplarında benzerdi. Kontrol ve sham gruplarıyla kıyaslandığında I/R grubunda MDA düzeyleri anlamlı olarak azalmış bulundu. I/R grubu ile karşılaştırıldığında; A-I/R grubunda iskelet kası dokularında MDA düzeyi anlamlı olarak artmış iken IAR grubunda ise bir değişiklik izlenmedi. Çalışmamızdaki I/R grubunda ölçülen MDA değerlerinin kontrol grubuna göre belirgin olarak azalması en dikkat çekici bulguydu. Histopatolojik bulguları düzelttiği ve apoptozisi azalttığı izlenen A-I/R grubunda ise MDA artmıştı. Bu bulgularımız çoğu çalışmaya zıtlık göstermekteydi (177, 185,186).

Bununla birlikte literatür çalışmamıza benzerlik gösteren yayınlarda vardı. Ulus ve ark. (187) yaptıkları spinal kord yaralanma çalışmalarında MDA değerinin injuri grubunda kontrol grubuna göre azaldığını tespit etmişlerdir. Ayrıca Li ve ark. (188) Kupfer hücre inhibitörü olan ve oksidatif hasarı arttırdığı bilinen Gadolinium chloride ile yapılan karaciğer hasarı modelinde ise MDA'nın düşük olduğunu bildirmişlerdir. Yine çalışmamıza benzer şekilde Güneş ve ark. (189) çalışmalarında MDA değerini I/R grubunda düşük olduğunu göstermişlerdir.

Normal şartlarda oluşan serbest oksijen radikalleri antioksidan enzim sistemleri ile nötralize edilir fakat reperfüzyon süresinde oluşan serbest radikal

miktarı çok birikir ve oksidatif stres meydana gelir (190). Yapılan I/R çalışmalarında, bu savunma sistemlerinin üyeleri olan antioksidan enzim aktivitelerinin azaldığı (191) veya arttığı (192) yönünde zıt bulgulara rastlanmıştır. Okatani ve ark. (191) antioksidan enzim aktivitelerinin azalmasını, artan oksidatif strese bağlı olarak bu enzimlerin kullanımındaki artışa bağlamışlardır. Çalışmamızdaki I/R grubunda azalan MDA değerleri artan endojen antioksidan düzeylerine bağlı olabilir. I/R grubunda MDA değerindeki azalma kompanse edilebilir mekanizma (antioksidan sistemler) ile açıklanabilir. Çalışmamızdaki A-I/R grubundaki MDA seviyesinin yüksek bulunması da aposininin endojen antioksidanları baskıladığı şeklinde yorumlanabilir.

Transient reseptör potansiyel melastatin 2 Ca^{+2} iyonuna geçirgen, seçici olmayan çok fonksiyonlu katyon kanalıdır. Hücre zarında bulunan TRPM2 iyon kanalı oksidatif stres ile aktive olmaktadır. TRPM2 kanallarının başlıca kemik iliği ve beyin olmak üzere bağırsak, karaciğer, böbrek, pankreas, akciğer, iskelet kası, testis, prostat, lökositler ve arka kök gangliyonları gibi birçok doku ve hücrede varlığı belirlenmiştir (193). Bu kanallar sodyum ve potasyuma geçirgen olmasının yanı sıra hücreye kalsiyumun girmesinde de oldukça önemli bir role sahiptir. Oksidatif stres ile aktive olabilen TRPM2 katyon kanalları doku, organ ve sistemlerde bir takım fonksiyon bozuklukları meydana getirebilmektedir (194). ADPR veya bileşenleri TRPM2 metabolik bölgesinin uyarılmasına neden olduklarından dolayı TRPM2 hücre ölümünde önemli rol oynamaktadır (103). TRPM2 oksidatif stres tarafından aktive edilebildiği için, son zamanlarda miyokardiyal enfarktüs, diabet, inflamasyon ve nörodejeneratif hastalıklar da dahil olmak üzere, oksidatif strese bağlı hastalıklara karşı potansiyel bir hedef olarak ortaya çıkmıştır (104).

Çalışmamızda oksidatif stres ile aktive olduğu bilinen TRPM2 katyon kanalları I/R grubunda kontrol grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı ölçüde azalmıştı ($p<0.05$). I/R grubu ile kıyaslandığında ise A-I/R grubunda anlamlı bir azalma izlendi. Düşmez ve ark. (195) ratların böbrek dokularında deneysel olarak I/R oluşturup TRPM2 düzeylerine bakmışlardır. Çalışmamıza benzer şekilde kontrol grubuna göre I/R grubunda TRPM2'nin azaldığını göstermişlerdir. Bu bulgular vücudun savunma mekanizması olarak yorumlanabilir. Çalışmamızda apoptozis ve kas hasarlanmasından anlamlı olarak koruyucu olduğu gözlenen A-I/R grubunda

TRPM2 düşüklüğü tüketilmişliğin ve kullanımın neticesiyle olabileceği düşünülmüştür. Gao ve ark. (196) böbrek I/R modelinde TRPM2 negatif ratlarda yaptıkları çalışmalarda I/R hasarının daha az oluştuğunu saptamışlardır. Çalışmamızda NADPH oksidaz inhibitörü olan aposinin verilmesi TRPM2 seviyelerini I/R grubuna göre daha da azaltarak vücudun endojen savunma mekanizmasına katkı sağlayarak koruyucu etkinlik gösterdiği söylenebilir.

Sonuç olarak; Deneysel alt ekstremite I/R modelinde aposininin iskelet kası üzerine koruyucu etkisini incelemek amacıyla yaptığımız bu çalışmada; I/R'nin apoptozisi arttırdığı ve belirgin kas hasarı yaptığı, I/R öncesi verilen aposininin koruyucu etkisi olduğu, bununla birlikte reperfüzyon öncesi aposinin kullanımının fayda sağlamadığı, I/R'de doku MDA değerlerindeki azalmanın endojen antioksidan aktivitesine bağlı olabileceği, kontrol grubuna benzer olan A-I/R grubunda TRPM2 düşüklüğü tüketilmişliğin ve kullanımın neticesi olabileceği, TRPM2 ile yapılacak daha kapsamlı çalışmalarla patofizyolojik mekanizmalar aydınlatılabildiği takdirde klinik açıdan TRPM2'ye yönelik tedavi seçeneklerinin söz konusu olabileceği kanaatine varılmıştır.

5. KAYNAKLAR

1. Majino G, Jorris I. Apoptosis, oncosis, and necrosis. An overview of the cell death. *Am J Pathol* 1995; 146: 3-9.
2. Ege T. Kalp ve damar hastalıklarında iskemi/reperfüzyon hasarı. Duran E (Ed). Kalp ve damar cerrahisi. I. Baskı. İstanbul: Çapa Tıp Kitabevi, 2004: 197-215.
3. Zimmerman BJ, Granger DN. Reperfusion injury. *Surg Clin North Am* 1992; 72: 65-83.
4. Montalvo-Jave EE, Escalante-Tattersfield T, Ortega-Salgado JA, Piña E, Geller DA. Factors in the pathophysiology of the liver ischemia-reperfusion injury. *J Surg Res* 2008; 147: 153-159.
5. Hammersen F. The ultrastructure of microvessels and their contents following ischemia on reperfusion. *Prog Appl Microcirc* 1989; 13: 1-26.
6. Koksall C, Bozkurt AK, Sirin G, Konukoglu D, Ustundag N. Aprotinin ameliorates ischemia/ reperfusion injury in a rat hind limb model. *Vascul Pharmacol* 2004; 41: 125-129.
7. Colletti LM, Kunkel SL, Walz A, Burdick MD, Kunkel RG, Wilke CA, et al. Chemokine expression during hepatic ischemia/ reperfusion-induced lung injury in the rat. The role of epithelial neutrophil activating protein. *J Clin Invest* 1995; 95: 134-141.
8. Şirin H, Sarıbulbul O, Cerrahoğlu M, Aksoy Ö, Baltarlı A, Saçar M. Alt ekstremité iskemi reperfúzyonunun yol açtığı pulmoner hasarda aprotininin koruyucu etkinliği. *Türk Göğüs Kalp Damar Cer Derg* 2001; 9: 233-237.
9. Siemionow M, Arslan E. Ischemia/reperfusion injury: a review in relation to free tissue transfers. *Microsurgery* 2004; 24: 468-475.
10. Kumar V, Abbas AK, Fausto N (eds). Robbins and Cotran Pathologic Basis of Disease, 7th Edition, Philadelphia: Elsevier Saunders, 2004.
11. Von Volkmann R. Die Ischämischen muskellähmungen und-kontrakturen. *Zentralbl Chir* 1981; 8: 801-803.

12. Cannon WB. Traumatic Shock. New York: Appletonand Co, 1923.
13. Jepson PN. Ischemia contracture: an experimental study. *Ann Surg* 1926; 84: 785–795.
14. Husveldt E, Bjering T. Renallesions from traumatic shock. *Acta Med Scand* 1937; 91: 279.
15. Bywaters EGL. Ischemic muscle necrosis, crushing injury, traumatic edema, the crush syndrome, traumatic anuria, compression syndrome: a type of injury seen in air raid casualties following burial beneath debris. *JAMA* 1944; 124: 1103–1109.
16. Haimovici H. Metabolic complications of acute arterial occlusions and related conditions: myoneuropathic-metabolic syndrome. Futura Publ Co, Mount Kisco, 1988.
17. Tekin İ. İloprost'un Deneysel Aortik İskemi/reperfüzyon Modelinde Femoral Arter Endoteli Ve Gastrokinemius Kası Hasarı Üzerine Etkisi Uzmanlık Tezi. Isparta. Süleyman Demirel Üniversitesi Tıp Fakültesi 2007.
18. Seal JB, Gewertz BL. Vascular dysfunction in ischemia-reperfusion injury. *Ann Vasc Surg* 2005; 19: 572-84.
19. Norwood MGA, Bown MJ, Sayers RD. Ischemia-reperfusion injury and regional inflammatory responses in abdominal aneurysm repair. *Eur J Vasc Endovasc Surg* 2004; 28: 234-245.
20. Blaisdell FW. The pathophysiology of skeletal muscle ischemia and the reperfusion syndrome: a review. *Cardiovasc Surg* 2002; 10: 620-630.
21. Ege T. Kalp ve damar hastalıklarında iskemi/reperfüzyon hasarı. Duran E (Ed). *Kalp ve Damar Cerrahi. I. Baskı. İstanbul: Çapa Tıp Kitabevi; 2004. s.197-215.*
22. Carden DL, Granger DN. Pathophysiology of ischeamia-reperfusion injury. *J Pathol* 2000; 190: 255-266.
23. Blaisdell FW. The pathophysiology of skeletal muscle ischemia and the reperfusion syndrome: a review. *Cardiovasc Surg* 2002; 10: 620-630.

24. Belkin M, Brown RD, Wright JG. A new quantitative spectrophotometric assay of ischemia reperfusion injury in skeletal muscle. *Am J Surg* 1988; 156: 83–86.
25. Boğa M. Akut ekstremité iskemisi. *Türk Aile Hek Derg* 2009; 13: 11-15.
26. Liu DL, Jeppsson B, Hakansson CH, Odselius R. Multiple system organ damage resulting from prolonged hepatic in flow interruption. *Arch Surg* 1996; 131: 442-7.
27. Liu P, Yin K, Yue G, Wong P. Role of nitricoxide in hepatic ischemia-reperfusion with endotoxemia. *J Inflamm* 1995; 46: 144-154.
28. Carden DL, Young JA, Granger DN. Pulmonary microvascular injury after in testinal ischemia- reperfusion: role of P-selectin. *J Appl Physiol* 1993; 75: 2529-2534.
29. Poggetti RS, Moore FA, Moore EE, Koeike K, Bannerjee A. Simultaneous liver and lung in jury following gut ischemia is mediated by xanthine oxidase. *J Trauma* 1992; 32: 723-727
30. Barry MC, Wang JH, Kelly CJ, Sheehan SJ, Redmond HP, Bouchier-Hayes DJ. Plasma factor saugment neutrophil and endothelial activation during aortic surgery. *Eur J Vasc Endovasc Surg* 1997; 13: 381-387.
31. Barry MC, Kelly C, Burke P, Sheehan S, Redmond HP, Bouchier-Hayes DJ. Immunologica land physiological responses to aortic surgery: effect of reperfusion on neutrophil and monocyte activation and pulmonary function. *Br J Surg* 1997; 84: 513-519.
32. Harward TR, Welborn MB, Martin TD. Visceral ischemia and organ dysfunction after thoracoabdominal aortic aneurysm repair. A clinical and cost analysis. *Ann Surg* 1996; 223: 729-734.
33. Livingston DH, Mosenthal AC, Deitch EA. Sepsis and multiple organ dysfunction syndrome: a clinical-mechanistic overview. *New Horizon* 1995; 3: 257-266.
34. Gallay P, Jongeneel CV, Barras C: Short time exposure to lipopolysaccharide is sufficientto activate human monocytes. *J Immunol* 1993; 150: 650-693.
35. Eppihimer MJ, Wolitzky B, Anderson DC, Labow MA, Granger DN. Heterogeneity of expression of E- and P-selectins in vivo. *CircRes* 1996; 79: 560-569.

36. Eppihimer MJ, Russell J, Anderson DC, Wolitzky BA, Granger DN. Endothelial cell adhesion molecule expression in gene-targeted mice. *Am J Physiol* 1997; 273: 1903-1908.
37. Foulds S, Mireskandari M, Kalu P. Visceral ischemia and neutrophil activation in sepsis and organ dysfunction. *J Surg Res* 1998; 75: 170-176.
38. Upperman JS, Deitch EA, Guo W, Lu Q, Xu D. Posthemorrhagic shock mesenteric lymph is cytotoxic to endothelial cells and activates neutrophils. *Shock* 1998; 10: 407-414.
39. Murray JF, Matthay MA, Luce JM, Fick MR. An expanded definition of the adult respiratory distress syndrome. *Am Rev Respir Dis* 1988; 138: 720-723.
40. Carden DL, Xiao F, Moak C, Willis BH, Robinson-Jackson S, Alexander S. Neutrophil elastase promotes lung microvascular injury and proteolysis of endothelial cadherins. *Am J Physiol* 1998; 275: 385-392.
41. Xiao F, Eppihimer MJ, Young JA, Nguyen K, Carden DL. Lung neutrophil retention and injury following intestinal ischemia-reperfusion. *Microcirculation* 1997; 4: 359-367.
42. Granger DN. Role of xanthine oxidase and granulocytes in ischemia-Reperfusion injury. *Am J Physiol* 1988; 255: 1269-1275.
43. Dick F, Li J, Giraud M-N, Kalka C, Schmidli J, Tevæarai H. Basic control of reperfusion effectively protects against reperfusion injury in a realistic rodent model of acute limb circulation. 2008; 118: 1920-1928.
44. Bilal M, Sarioğlu T. İskemik miyokard injurisi ve intraoperatif miyokard korunmasına genel bir bakış. *GKD Cer Derg* 1992; 1: 118-126
45. Schoenberg MH. Reperfusion injury after intestinal ischemia. *Crit Care Med* 1993; 21: 1376- 86.
46. Collard CD, Gelman S. Pathophysiology, clinical manifestations and prevention of ischemia-reperfusion injury. *Anesthesiology* 2001; 94: 1133-1138.

47. 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.
48. Altan N, Sepici Dinçel A, Koca C. Diabetes Mellitus ve Oksidatif Stres. *Türk Biyokimya Dergisi* 2006; 31; 51–56.
49. Akkuş Ş, 1995, Serbest Radikaller ve Fizyopatolojik Etkileri, Mimoza Yayınları, Konya.
50. Mc Cord JM. The evolution of free radicals and oxidative stres. *Am J Med* 2000; 108: 652-659.
51. Stahl W, Sies H. Introduction: Reactive oxygen species. *Research Monographs*, 2002; 1-2.
52. Henry LEA, Halliwell B and Hall DO. The superoxide dismutase activity of various photosynthetic organisms measured by a new and rapid assay technique. *Febs Letters* 1976; 66: 2.
53. 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.
54. Pham-Huy L A, He H, Pham-Huy C. Free Radicals, Antioxidants in disease and health *Int J Biomed Sci* 2008; 4: 89-96.
55. Davies SJ, Reichardt-Pascal SY, Vaughan D, Russell GI. Differential effect of ischaemia-reperfusion injury on anti-oxidant enzyme activity in the rat kidney. *Experimental nephrology* 1995; 3: 348-354.
56. Stahl W and Sies H. Introduction: Reactive oxygen species. *Research Monographs*. 2002; 1-2.
57. Anaya-Prado R, Toledo-Pereyra LH, Lentsch AB, Ward PA. Ischemia/ reperfusion in jury. *The Surg Res* 2002; 105: 248-258.
58. Springer TA. Traffic signals for lymphocyte recirculation and leukocyte emigration: the multistep paradigm. *Cell* 1994; 76: 301-314.

59. Phillips L, Toledo AH, Lopez-Neblina F, Anaya-Prado R, Toledo-Pereyra LH. Nitricoxide mechanism of protection in ischemia and reperfusion injury. *J Invest Surg* 2009; 22: 46-55.
60. Yavaş D, Zengin M, Kaklıkaya İ, Uzun Z, Ören A, Elşin M C, Değer O, Özcan F. Serbest oksijen radikal temizleyici olarak aprotininin rolü (deneysel çalışma). *GKD Cer Derg* 1994; 2: 208-215.
61. Serizawa A, Nakamura S, Suzuki S, Baba S, Nakano M. Involvement of platelet activating factor in cytokine production and neutrophil activation after hepatic ischemia-reperfusion. *Hepatology* 1996; 23: 1656-1663.
62. Kumar V, Abbas A, Fausto N, Mitchell R. Robbins Basic Pathology. 8th Edition, WB. Saunders Elsevier 2007: 482.
63. Reffelmann T, Hale SL, Dow JS, Kloner RA. No-reflow phenomenon persists long-term after ischemia/reperfusion in the rat and predicts infarct expansion. *Circulation* 2003;108, 2911–2917.
64. Majno G, Ames A III, Chiang J. No reflow after cerebral ischemia. *Lancet* 1967; 2: 569–70.
65. Granger DN. Role of xanthine oxidase and granulocytes in ischemia-reperfusion injury. *Am J Physiol* 1988; 255: 1269-1275.
66. Gillani S, Cao J, Suzuki T, Hak DJ. The effect of ischemia reperfusion injury on skeletal muscle Injury. *Int J Care Injured* 2011; 4590-6: 1-6.
67. Gautam N, Olofsson AM, Herwald H, Iversen LF, Lundgren-Akerlund E, Hedqvist P et al. Heparin-binding protein (HBP/CAP37): A missing link in neutrophil-evoked alteration of vascular permeability *Nat Med* 2001; 7: 1123-1127.
68. García-Villalón AL, Amezcua YM, Monge L, Fernández N, Salcedo A, Diéquez G. Endothelin-1 potentiation of coronary artery contraction after ischemia-reperfusion. *Vascul Pharmacol* 2008; 48: 109-114.
69. Becker M, Menger MD, Lehr HA. Heparin-released superoxide dismutase inhibits postischemic leukocyte adhesion to venular endothelium. *Am J Physiol* 1994; 297: 925-930.

70. Valko M, Leibfritz D, Moncol J, Cronin M, Mazur M, Telser J. Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease. *Int J Biochem Cell Biol* 2007; 39: 44-84.
71. Halliwell B, Gutteridge JM. *Free Radicals in Biology and Medicine*, Oxford University Press, Oxford, 1999.
72. Nakazawa H, Genka C, Fujishima M. Pathological aspects of active oxygens/free radicals. *Jpn J Physiol* 1996; 46: 15-32.
73. Yalçın AS. Antioksidanlar. *Klinik Gelişim* 1998; 11: 342 -346.
74. Günaydın B, Çelebi H. Genel anesteziğin serbest radikaller ve antioksidanlarla ilişkisi. *Anestezi Derg* 2003; 11: 87-98.
75. Demiryürek AT, Kennedy S, Wainwright CL, Wadsworth RM, Kane KA. Influence of nitric oxide on luminol-enhanced chemiluminescence measured from porcine-stimulated leukocytes. *J Cardiovasc Pharmacol* 1997; 30: 332-337.
76. Bray TM. Dietary antioxidants and assessment of oxidative stress, *Nutrition* 2000; 16: 578-581.
77. Iwama KG. Stress in fish. *Fish Biology Fisheries* 2004; 8: 35-56.
78. Moraes G, Metabolical responses in adaptation to stress in fish. Brazil: International Congress on the Biology of Fish 2004: 47.
79. Tarin JJ, Brings J, Cano A. Serbest radikalleri antioksidanlar ve infertilite ile klinik ilişkiler, *Human Reproduction*, 1998; 13: 2371-2376.
80. Uchida K. Role of reactive aldehyde in cardiovascular disease. *Free Radical Biol Med* 2000; 28:1685-96.
81. Holley AE, Cheeseman KH. Measuring free radical reactions in vivo. *Brit Med Bull* 1993; 49:494-505.
82. Guyton AC, Hall EJ. *Textbook of Medical Physiology*. 11th Ed. Philadelphia: Saunders, 2006.
83. Cummings B. *Get Ready for Biology*. San Francisco: Pearson Education Inc 2007.

84. Abe K, Puertollano R. Role of TRP Channels in the Regulation of the Endosomal Pathway. *Physiology (Bethesda)* 2011; 26: 14-22.
85. Cosens DJ, Manning A. Abnormal electroretinogram from a *Drosophila* mutant. *Nature* 1969; 224: 285–287.
86. Nilius B. Transient receptor potential (TRP) cation channels: rewarding unique proteins. *Bull Mem Acad R Med Belg* 2007; 162: 244–253.
87. Venkatachalam, K. & Montell, C. TRP channels. *Annu Rev Biochem* 2007; 387-417.
88. Sumoza-Toledo A, Penner R. TRPM2: a multifunctional ion channel for calcium signalling. *J Physiol* 2011; 589: 1515–1525.
89. Clapham DE. TRP channels as cellular sensors. *Nature* 2003; 426:517-524.
90. Liedtke WB, Heller S (eds). *TRP Ion Channel Function in Sensory Transduction and Cellular Signaling Cascades*. Boca Raton (FL): CRC Press, 2007: 213-214.
91. Hardie C, Regulation of TRP channels via lipid second messengers. *Annu Rev Physiol* 2003; 55: 735-736.
92. Montell, C. TRP channels: it's not the heat, it's the humidity. *Curr Biol R* 2008: 123-126.
93. Nazıroğlu M. Molecular role of catalase on oxidative stress-induced Ca^{+2} signaling and TRP cation channel activation in nervous system. *J. Recept. Signal Transduct. Res* 2012; 32: 134-141.
94. Fleig A, Penner R. The TRPM ion channel subfamily: molecular, biophysical and functional features. *Trends Pharmacol Sci* 2004; 25: 633- 639.
95. Watanabe H, Murakami M, Ohba T, Takahashi Y, Ito H, TRP channel and cardiovascular disease. *Pharmacol Therapeut* 2008; 118: 337-351.
96. Nagamine K, Kudoh J, Minoshima S, Kawasaki K, Asakawa S, Ito F, Shimizu N. Molecular cloning of a novel putative Ca^{+2} channel protein (TRPC7) highly expressed in brain. *Genomics* 1998; 54: 124–131.

97. Perraud A, Shen B, Dunn C. NUDT9, a member of the Nudix hydrolase family, is an evolutionarily conserved mitochondrial ADP-ribose pyrophosphatase. *J Biol Chem* 2003; 278: 1794-1801.
98. Clapham D. Calcium signaling. *Cell* 2007; 131: 1047-1058.
99. Perraud AL, Fleig A, Dunn CAADP-ribose gating of the calciumpermeable LTRPC2 channel revealed by Nudix motif homology. *Nature* 2001; 411: 595–599.
100. Tong Q. Regulation of the transient receptor potential channel TRPM2 by the Ca²⁺ sensor calmodulin. *J Biol Chem* 2006; 90: 76-85.
101. Chen Q, Olney JW, Lukasiewicz PD, Almlı T, Romano C. Fenamates protect neurons against ischemic and excitotoxic injury in chick embryo retina. *Neurosci Lett* 1998; 242: 163–166.
102. Zhang W. TRPM2 is an ion channel that modulates hematopoietic cell death through activation of caspases and PARP cleavage. *Am J Physiol Cell Physiol C* 2006; 11: 46-49.
103. Nazıroğlu M, Özgöl C, Çelik Ö, Çığ B, Sözbir E. Aminoethoxydiphenyl borate and flufenamic acid inhibit Ca⁺² influx through TRPM2 channels in rat dorsal root ganglion neurons activated by ADP-ribose and rotenone. *J Membr Biol* 2011; 241: 69-75.
104. Takahashi N, Kozai D, Kobayashi R, Ebert M, Mori Y Roles of TRPM2 in oxidative stress. *Cell Calcium* 2011; 50: 279–287.
105. Wehage E, Einfeld J, Heiner I, Jungling E, Zitt C, Luckhoff A. Activation of the cation channel long transient receptor potential channel 2 (LTRPC2) by hydrogen peroxide. A splice variant reveals a mode of activation independent of ADP-ribose. *J Biol Chem* 2002; 277: 23150–23156.
106. Nazıroğlu M. TRPM2 cation channels, oxidative stress and neurological diseases: where are we now? *Neurochem Res* 2011; 36: 355-366.
107. Chao DT, Korsmeyer SJ. BCL-2 family: regulators of cell death. *Annu Rev Immunol* 1998; 395-419.

108. Hengartner MO, Ellis RE, Horvitz HR. *Caenorhabditis elegans* gene *ced-9* protects cells from programmed cell death. *Nature* 1992; 356: 494-499.
109. Bellamy COC, Malcomson RDG, Harrison DJ and Wyllie AH. Cell death in health and disease: the biology and regulation of apoptosis. *Seminar in Cancer Biol* 1995; 6: 3-16.
110. Thompson CB. Apoptosis in the pathogenesis of autoimmune disease. *Clin Immunol Immunopatho* 1995; 267: 1456-1462.
111. Chen Q, Fisher AB, Strayer DS, Bates SR. Mechanism for secretagogue-induced surfactant protein A binding to lung epithelial cells. *Am J Physiol* 1998; 275: 38-46.
112. Hampton MB, Orrenius S. Redox regulation of apoptotic cell death. *Biofactors* 1998; 8: 1-5.
113. Oren M, Rotter V. Introduction: p53 the first twenty years. *Cell Mol Life Sci* 1999; 55: 9-11.
114. Hızel N. Apoptoz (Programlanmış Hücre Ölümü). *Sürekli Tıp Eğitimi Dergisi* 1997; 6: 196-197.
115. Thompson EB. Apoptosis and steroid hormones. *Mol Endocrinol* 1994; 8: 665-73.
116. Lipponen P, Aaltomaa S, Kosma VM, Syrjänen K. Apoptosis in breast cancer as related to histopathological characteristics and prognosis. *Eur J Cancer*. 1994; 14: 2068-2073.
117. Earnshaw WC, Martins LM, Kaufmann SH. Mammalian caspases: structure, activation, substrates, and functions during apoptosis. *Annu Rev Biochem* 1999; 68: 383-424.
118. Walker NI. Patterns of cell death. *Methods Achiev Exp Pathol* 1988; 13:18-32.
119. Kumar V, Ramzi CS, Stanley LR, Basic Pathology, (Çev. Ed. Çevikbaş U), s. 27. Nobel Tıp Kitapları, İstanbul 2003:
120. Israels LG, Israels ED. Apoptosis. *The Oncologist* 1999; 4: 332-339.

121. Renehan AG, Booth C, Potten CS. What is apoptosis, and why is it important? British Medical Journal (BMJ) 2001; 322:1536-1538.
122. Budihardjo I, Oliver HLM. Biochemical pathways of caspase activation during apoptosis. Ann Rev Cell Dev Biolog 1999; 15: 269-290.
123. Behnia M, Robertson KA, Martin WJ. Role of apoptosis in host defense and pathogenesis of disease. Official Publication of The American College of Chest Physicians (CHEST) 2000; 117:1771-1777.
124. Roulston A, Marcellus RC, Branton PE. Viruses and Apoptosis. Ann Rev Microbiol 1999; 53: 577-628.
125. Büyükgebiz O, Caferler JS. Apoptoz. Sendrom 2001; 13: 102-107.
126. Hetts SW. To die or not to die. JAMA 1998; 279: 300-307.
127. Eichhorst ST, Krammer PH. Derangement of apoptosis in cancer. The Lancet 2001; 358: 345-346
128. King KL, Cidlowski JA. Cell cycle regulation and apoptosis. Annual Review of Physiology 1998; 60: 601-617.
129. Wang J, Chun HJ, Wong W, Spencer DM, Lenardo MJ. Caspase-10 is an initiator caspase in death receptor signaling. PNAS 2001; 98: 13884-13888.
130. Strasser A, O'Connor L, Dixit VM. Apoptosis signaling. Annual Review of Biochemistry 2000; 69: 217-245.
131. Hampton MB, Orrenius S. Redox regulation of apoptotic cell death. Biofactors 1998; 8: 1-5.
132. Karaboğa F. Deneysel Diyabetik Fare Beyin Dokusundaki Apoptotik Değişiklikler Üzerine D₃ Vitamininin Etkisinin Araştırılması. Uzmanlık Tezi, Elazığ: Fırat Üniversitesi Tıp Fakültesi Noroloji Anabilim Dalı, 2010.
133. Schandalik R, Gatti G, Perucca E. Pharmacokinetics of silybin in bile following administration of silipide and silmarin in cholecystectomy patients. Arzneimittel forschung 1992; 42: 964-968.

134. Agarwal R. Silibinin decreases prostate-specific antigen with cell growth inhibition via G1 arrest, leading to differentiation of prostate carcinoma cells: implications for prostate cancer intervention. *Proc Natl Acad Sci USA* 1999; 96: 7490-7495.
135. Miguez MP, Anundi I, Sainz-Pardo LA. Hepatoprotective mechanism of silmarin: no evidence for involvement of cytochrome P450 2E1. *Chem Biol Interact* 1994; 91: 51-63.
136. Hasselbaink DM, Glatz JFC, Luiken JJ, Roemen THM, Vusse, GJV. Ketone bodies disturb fatty acid handling in isolated cardiomyocytes derived from control and diabetic rats, *Biochem J* 2003; 371: 753-760.
137. Schmiedeberg O. Über die wirksamen best and the ile der wurzel von Apocynum cannabinum L. *Arch Exp Path Pharm* 1983; 16: 161-164.
138. Wood HC. A study of Apocynum cannabinum. *J Am Med Assoc* 43: 1953-1957; 1904.
139. Otto TH. Über die synthese des acetovanillons aus guajacol und eisessig. *Berichte* 1991; 24: 2869-2870.
140. Dominguez XA, Pugliese OA chemical study of Mammillaria runyoni: The isolation of acetovanillone and a new triterpenoid, mamillarol. *Planta Med* 1967; 15: 401-403.
141. Pyysalo T, Honkanen E. The influence of heat on the aroma of cloudberries (*Rubus chamaemorus* L.). *Z. Lebensm. Unters. Forsch* 1977; 163: 25-30.
142. Swart P, Merwe KJ, Swart AC, Todres PC, Hofmeyr JHS. Inhibition of cytochrome P-45011by some naturally occurring acetophenones and plant extracts from the shrub *Salsola tuberculatiformis*. *Planta Med* 1993; 59: 139-143.
143. Kokubun T, Harborne JB. Phytoalexin induction in the sapwood of plants of the Maloideae (Rosaceae): biphenyls or dibenzofurans. *Phytochemistry* 1995; 40: 1649-1654.
144. Mühlenbeck U, Barz W. Cytochrome-P450-dependent formation of hydroxyacetovanillone from acetovanillone in *Solanum khasianum*. *Phytochemistry* 1997; 44: 865-867.

145. Basu K, Dasgupta B, Bhattacharya SK, Debnath PK. Chemistry and pharmacology of apocynin, isolated from *Picrorhiza kurroa* Royle ex Benth. *Curr Sci* 1971; 40: 603-604.
146. Sharma PV. *Classical Uses of Medicinal Plants*. India: Chaukhambha Visvabharati, Varanasi, 1996.
147. Simons JM, Hart BA, Ip Vai C. TRAM, Dijk H, van RP. Labadie. Metabolic activation of natural phenols into selective oxidative burst antagonists by activated human neutrophils. *Free Radic Biol Med* 1990; 8: 251-258.
148. Simons JM. Immunomodulation by *Picrorhiza kurroa*: basis for its ethnomedical use? Thesis Universiteit Utrecht 1989.
149. Stolk J, Hiltermann TJ, Dijkman JH, Verhoeven AJ. Characteristics of the inhibition of NADPH oxidase activation in neutrophils by apocynin, a methoxy-substituted catechol. *Am J Respir Cell Mol Biol* 1994; 11: 95-102.
150. Gajewska R, Ganowiak Z, Grzybowski J, Radecki A, Wrzesniowska K. Analysis of an industrial smoke preparation. *Bromat Chem Toksykol* 1981; 14: 1981.
151. Holland JA, Johnson DK. Prevention of atherosclerosis using NADPH oxidase inhibitors. United States Patent, Patent Number 1999; 5: 831.
152. Daly JW, Axelrod J, Witkop B. Dynamic aspects of enzymatic o-methylation and -demethylation of catechols in vitro and in vivo. *J Biol Chem* 1960; 235: 1155-1159.
153. Gjertsen FB, Solheim E, Scheline RR. Metabolism of aromatic plant ketones in rats: acetovanillone and paeonol. *Xenobiotica* 1988; 18: 225-234.
154. Wiles ME, Dykens JA, Wright CD. Regulation of polymorphonuclear leukocyte membrane fluidity: effects of cytoskeletal modification. *J Leukoc Biol* 1994; 56: 192-199.
155. Carpenter CL. Actin cytoskeleton and cell signalling. *Crit Care Med* 2000; 8: 94-99.
156. Ydrenius L, Majeed M, Rasmussen BJ, Stendahl O, Sarndahl E. Activation of cAMPdependent protein kinase is necessary for actin rearrangements in human neutrophils during phagocytosis. *J Leukoc Biol* 2000; 67: 520-528.

157. Worm van den E, DeLeo FR, Beukelman CJ, van den Berg AJJ, Labadie RP, Dijk van H, Nauseef WM. Apocynin, an inhibitor of NADPHoxidase-dependent ROS production in stimulated human neutrophils. The studies presented in this thesis were performed at the Department of Medicinal Chemistry, Utrecht Institute for Pharmaceutical Sciences, Faculty of Pharmacy, Utrecht University. The Netherlands (Chapter 2), 2012.
158. Zimmerman BJ, Granger DN. Reperfusion injury. *Surg Clin North Am* 1992; 72: 65-83.
159. Teke Z, Kabay B, Özden A. İskemi/Reperfüzyon hasarının patofizyolojisi. *Pamukkale Tıp Dergisi*, 2008; 1: 65-72.
160. Klenerman L, Biswas M, Hulands GH, Rhodes AM. Systemic and local effects of the application of a tourniquet. *J Bone Joint Surg [Br]* 1980; 62: 385-388.
161. Patterson S, Klenerman L. The effect of pneumatic tourniquets on the ultrastructure of skeletal muscle. *J Bone Joint Surg [Br]* 1979; 61: 178-183.
162. Sanders WE. Principles of microvascular surgery. Green DP (ed). *Operative hand surgery*. 3rd ed. New York: Churchill Livingstone, 1993: 1039-1083.
163. Wang WZ, Fang XH, Stephenson LL, Baynosa RC, Khiabani KT, Zamboni WA. Microcirculatory effects of melatonin in rat skeletal muscle after prolonged ischemia. *J Pineal Res* 2005; 39: 57-65.
164. Wilhelm J. Metabolic aspects of membrane lipid peroxidation. *Acta Univ Carol Med Monogr* 1990; 137:1-53.
165. Matés JM. Effects of antioxidant enzymes in the molecular control of reactive oxygen species toxicology. *Toxicology* 2000; 153: 83-104.
166. Günel E, Çağlayan F, Çağlayan O, Dilsiz A, Duman S, Aktan M. Treatment of intestinal reperfusion injury using antioxidative agents. *J Pediatr Surg* 1998; 33: 1536-1539.
167. Belkin M, Brown RD, Wright JG. A new quantitative spectrophotometric assay of ischemia reperfusion injury in skeletal muscle. *Am J Surg* 1988; 156: 83-86.
168. Hayes G, Liauw S, Romaschin AD, Walker PM. Separation of reperfusion injury from ischemia-induced necrosis. *Surg Forum* 1988; 39: 306-308.
169. Şener G, Yeğen BÇ. İskemi reperfüzyon hasarı. *Klinik Gelişim Derg* 2009; 22: 5-14.

170. Çavdar C, Sifil A, Çamsarı T. Reaktif oksijen partikülleri ve antioksidan savunma. *Türk Nefroloji Diyaliz ve Transplantasyon Dergisi* 1997; 3-4: 92-95.
171. Chang WC, Hsu FL. Inhibition of platelet aggregation and arachidonate metabolism in platelets by procyanidins. *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids* 1989; 38: 181-188.
172. Bagchi D, Garg A, Krohn RL. Oxygen free radical scavenging abilities of vitamins C and E, and a grape seed proanthocyanidin extract in vitro. *Res Commun Mol Pathol Pharmacol* 1997; 95: 179-189.
173. Cell Injury, Cell Death and Adaptations. Kumar V, Abbas AK, Fausto N (eds) Robbins and Cotran Pathologic Basis of Disease, 8th Edition. Philadelphia: Elsevier Saunders, 2007: 1-29.
174. Ernster L. Biochemistry of reoxygenation injury. *Crit Care Med* 1988; 16: 947-953.
175. Parvums DV. The pathology of ischemia/reperfusion. Grace PA, Mathie RT (eds). *Ischemia-reperfusion injury*. London: Blackwell Science 1999: 3-19.
176. Siemionow M, Arslan E. Ischemia/reperfusion injury: a review in relation to free tissue transfers. *Microsurgery* 2004; 24: 468-475.
177. Erdem M, Bostan B, Güneş T, Özkan F, Sen C, Özyurt H, et al. Protective effects of melatonin on ischemia-reperfusion injury of skeletal muscle. *Ekleml Hastalıkları Cerrahisi* 2010; 21: 166-171.
178. Gholami M, Zendedel A, Khanipour Khayat Z, Ghanad K, Nazari A, Pirhadi A. Selenium Effect on Ischemia-Reperfusion Injury of Gastrocnemius Muscle in Adult Rats 2014.
179. Oren M, Rotter V. Introduction: p53 the first twenty years. *Cell Mol Life Sci* 1999; 55: 9-11.
180. Wang WZ, Fang XH, Stephenson LL, Khiabani KT, Zamboni WA. Ischemia-reperfusion-induced necrosis and apoptosis in the cells isolated from rat skeletal muscle. *J Orthop Res* 2008; 26: 351-356.
181. Armstrong DM, Armstrong Ada C, Figueiredo RC, Florentino JE, Saad PF, Fox-Talbot K, Halushka MK, Berkowitz DE, Taha MO, Fagundes DJ. Sildenafil citrate protects skeletal muscle of ischemia-reperfusion injury: immunohistochemical study in rat model. *Acta Cir Bras* 2013; 28: 282-287.

182. Altintas R, Polat A, Vardi N, Oguz F, Beytur A, Sagir M, et al. The protective effects of apocynin on kidney damage caused by renal ischemia/reperfusion. *J Endourol* 2013; 27: 617-624.
183. Lu XY, Wang HD, Xu JG, Ding K, Li T. NADPH oxidase inhibition improves neurological outcome in experimental traumatic brain injury. *Neurochemistry International* 2014; 69: 14–19.
184. Abdullah Z, Bayraktutan U. NADPH oxidase mediates TNF- α -evoked in vitro brain barrier dysfunction: roles of apoptosis and time. *Mol Cell Neurosci* 2014; 61: 72-84.
185. Elmalı N, Esenkaya I, Karadağ N, Taş F, Elmalı N. Effects of resveratrol on skeletal muscle in ischemia-reperfusion injury. *Ulus Travma Acil Cerrahi Derg* 2007; 13: 274-280.
186. Tekin İ, Kirişi İ, Karahan N, Aktürk O, Delibaş N, Öcal A. İloprostun Deneysel Aortik İskemi/Reperfüzyon Modelinde İskelet Kası Hasarına Etkisi. *Türkiye Klinikleri J Cardiovasc Sci* 2009; 21:135-146.
187. Ulus AT, Turan NN, Seren M, Budak B, Tütün U, Yazicioğlu H, et al. In which period of injury is resveratrol treatment effective: ischemia or reperfusion? *Ann Vasc Surg*. 2007; 21: 360-366.
188. Li JY, Gu X, Zhang WH, Jia S, Zhou Y. GdCl₃ abates hepatic ischemia-reperfusion injury by inhibiting apoptosis in rats. *Hepatobiliary Pancreat Dis Int* 2009; 8: 518-523.
189. Güneş TÜ, Badak Mİ, Kurtoğlu T, Karul A, Özkısacık EA, Dişçigil B. Rat Alt Ekstremitte İskemi/Reperfüzyon Modelinde İskemik Önkoşullama ve Ard koşullamanın Erken Dönem Etkileri. *Adnan Menderes Üniversitesi Tıp Fakültesi Dergisi* 2011; 12: 21-27.
190. Schoots IG, Levi M, Roossink EH. Local intravascular coagulation and fibrin deposition on intestinal ischemia/reperfusion in rats, *Surg* 2003; 133: 411.
191. Okatani Y, Wakatsuki A, Reiter RJ, Enzan H, Miyahara Y. Protective effect of melatonin against mitochondrial injury induced by ischemia and reperfusion of rat liver. *Eur J Pharmacol* 2003; 469: 145-152.
192. Ozyurt H, Ozyurt B, Koca K, Ozgocmen S. Caffeic acid phenethyl ester (CAPE) protects rat skeletal muscle against ischemia-reperfusion-induced oxidative stress. *Vascul Pharmacol* 2007; 47: 108-112.

193. Hecquet CM, Malik AB. Role of H₂O₂-activated TRPM2 calcium channel in oxidant-induced endothelial injury. *Thromb Haemost* 2009; 101: 19-25.
194. Kühn FJ, Heiner I, Lückhoff A. TRPM2: a calcium influx pathway regulated by oxidative stress and the novel second messenger ADP-ribose. *Pflügers Arch* 2005; 51: 12-22.
195. Dusmez D, Cengiz B, Yumrutas O, Demir T, Oztuzcu S, Demiryurek S, et al. Effect of Verapamil and Lidocaine on TRPM and NaV1.9 Gene Expressions in Renal Ischemia-Reperfusion Transplantation Proceedings, 2014; 46, 33-39.
196. Gao G, Wang W, Tadagavadi RK, EB Nicole, Love MI, Miller BA, Reeves WB. TRPM2 mediates ischemic kidney injury and oxidant stress through RAC1. *J Clin Inv* 2014; 124: 49-89.

6. ÖZGEÇMİŞ

1982 Elazığ doğumluyum. İlk öğrenimimi Elazığ Gaziosmanpaşa İlköğretim okulu ve Yücel İlköğretim Okulu'nda, orta öğrenimimi Elazığ Atatürk Orta Okulu'nda tamamladım. Lise eğitimimi Elazığ Korgeneral Hulusi Sayın Lisesi'nde tamamladıktan sonra 2001 yılında İstanbul Üniversitesi Cerrahpaşa Tıp Fakültesi'ne başladım. 2007 yılında Tıp Fakültesinden mezun oldum. Aynı yıl mecburi hizmet görevim için Ordu Aybastı Devlet Hastanesi'nde pratisyen hekim olarak göreve başladım. İhtisasıma 2010 yılında Fırat Üniversitesi Tıp Fakültesi Kalp ve Damar Cerrahisi Anabilim Dalı'nda başladım. 2015 yılında ihtisasımı tamamlamış bulunmaktayım. Evliyim. 2 çocuk babasıyım.