



T.C.
ADNAN MENDERES ÜNİVERSİTESİ
TIP FAKÜLTESİ
GENEL CERRAHİ
ANABİLİM DALI

RATLARDA DENEYSEL İNTESTİNAL İSKEMİ REPERFÜZYON HASARINDA MONOKLONAL ANTİ TNF ANTİKORU UYGULAMASININ ETKİSİ

UZMANLIK TEZİ

DR. EYÜP MURAT YILMAZ

DANIŞMAN

Prof. Dr. Pars TUNÇYÜREK

AYDIN 2012

T.C.
ADNAN MENDERES ÜNİVERSİTESİ
TIP FAKÜLTESİ
GENEL CERRAHİ
ANABİLİM DALI

**RATLARDA DENEYSEL İNTESTİNAL İSKEMİ
REPERFÜZYON HASARINDA
MONOKLONAL ANTİ TNF ANTİKORU
UYGULAMASININ ETKİSİ**

UZMANLIK TEZİ

DR. EYÜP MURAT YILMAZ

DANIŞMAN

Prof. Dr. Pars TUNÇYÜREK

AYDIN 2012

TEŞEKKÜR

Gerek uzmanlık eğitimimde gerekse tezimin tüm aşamalarında bana sonsuz destek olan, katkı sunan ve sabır gösteren Sayın Prof.Dr.Pars TUNÇYÜREK'e;

Tezimin laboratuvar çalışmalarını yürüten Prof. Dr. Çiğdem YENİSEY'e ve patoloji değerlendirme kısmını yürüten Doç. Dr. İbrahim METEOĞLU'na;

Asistanlık eğitimim süresince her zaman bilgi ve deneyimlerinden yararlandığım hocalarım Sayın Prof. Dr. Hedef ÖZGÜN, Sayın Prof. Dr. Şükrü BOYLU, Sayın Prof. Dr. M. Hakan ÇEVİKEL, Sayın Prof. Dr. Ahmet Ender DEMİRKIRAN, Sayın Prof. Dr. Ali Doğan BOZDAĞ, Sayın Doç. Dr. Hakan ERPEK ve Sayın Yrd. Doç. Dr. Aykut SOYDER'e;

Tezimin uygulama aşamasında yardımını esirgemeyen Dr.Berke MANOĞLU başta olmak üzere karşılıklı sevgi ve saygı ile birlikte çalıştığım tüm araştırma görevlisi arkadaşlarıma;

Ve en önemlisi bugüne kadar desteğini hiçbir zaman benden esirgemeyen aileme ve eşime içtenlikle teşekkürlerimi sunarım.

Dr. Eyüp Murat YILMAZ

İÇİNDEKİLER

ŞEKİL LİSTESİ	5
TABLO LİSTESİ	6
RESİM LİSTESİ	7
KISALTMALAR	8
GİRİŞ VE AMAÇ	10
GENEL BİLGİLER	12
1.İntestinal İskemi	12
2. İntestinal I/R Hasarı	12
2.1.İntestinal I/R Hasarında Klinik	
3. Serbest Oksijen Radikalleri	15
3.1. Süperoksit Radikali	
3.2. Hidrojen Peroksit	
3.3. Hidroksil Radikali	
3.4. Nitrik Oksit	
4. Malondialdehid (MDA)	17
5. Myeloperoksidaz (MPO)	17
6. Antioksidan Savunma	18
6.1. Glutasyon (GSH)	
6.2. Glutasyon peroksidaz (GSH-Px)	
6.3. Glutasyon Redüktaz (GR)	
6.4. Süperoksit dismutaz (SOD)	
6.5. Katalaz (CAT)	
7. İnflamatuar Yanıtta Sitokinler	19
8. İnfliximab	20
GEREÇ VE YÖNTEM	22
1.Deneysel Model	22
2. Çalışma Grupları	22
3. Cerrahi İşlem	23
4. Yöntemler	24
4.1. Doku örneklerinin hazırlanması	24

4.1.1. Dokuda CAT Ölçüm Yöntemi	
4.1.2. Dokuda MDA Ölçüm Yöntemi	
4.1.3. Dokuda MPO Ölçüm Yöntemi	
4.1.4. Dokuda GSH Ölçüm Yöntemi	
4.1.5. Dokuda GSH-Px Ölçüm Yöntemi	
4.1.6. Dokuda GR Ölçüm Yöntemi	
4.1.7. Dokuda SOD Ölçüm Yöntemi	
4.1.8. Dokuda NO [•] (nitrit+nitrat) Ölçüm Yöntemi	
4.1.9. Dokuda TNF - α ölçüm yöntemi	
4.2. Kanda Biyokimyasal Analiz	31
4.2.1. Tam kanda GSH Ölçüm Yöntemi	
4.2.2. Eritrositlerde GSH-Px Ölçüm Yöntemi	
4.2.3. Eritrositlerde GR Ölçüm Yöntemi	
4.2.4. Eritrositlerde SOD Ölçüm Yöntemi	
4.2.5. Serum örneklerinde NO [•] (nitrit+nitrat) Ölçüm Yöntemi	
4.2.6. Eritrositlerde CAT Ölçüm Yöntemi	
4.2.7. Serumda MDA Ölçüm Yöntemi	
4.2.8. Plazmada TNF- α ölçüm yöntemi	
5. Histopatolojik İnceleme	33
5.1. Skorelama	
6. İstatistiksel analiz	34
BULGULAR	35
1. Plazma Biyokimya İncelemeleri	35
2. Doku örneklerinin Biyokimyasal İncelemeleri	41
3. Doku örneklerinin Histopatolojik İncelemeleri	47
TARTIŞMA	51
SONUÇ VE ÖNERİLER	61
ÖZET	62
ABSTRACT	64
KAYNAKLAR	66

ŞEKİL LİSTESİ

- Şekil 1:** Oksidatif strese hücrede histolojik değişiklikler
- Şekil 2:** I/R hasarında doku harabiyet mekanizmaları
- Şekil 3:** Geri dönüşümsüz hücre membran hasarı
- Şekil 4:** Endojen enzimatik antioksidanlar
- Şekil 5:** Serum TNF- α değerlerinin gruplar arası karşılaştırılması
- Şekil 6:** Eritrosit GR değerlerinin gruplar arası karşılaştırılması
- Şekil 7:** Eritrosit GSH-Px değerlerinin gruplar arası karşılaştırılması
- Şekil 8:** Eritrosit SOD değerlerinin gruplar arası karşılaştırılması
- Şekil 9:** Eritrosit GSH değerlerinin gruplar arası karşılaştırılması
- Şekil 10:** Eritrosit CAT değerlerinin gruplar arası karşılaştırılması
- Şekil 11:** Serum NO değerlerinin gruplar arası karşılaştırılması
- Şekil 12:** Serum MDA değerlerinin gruplar arası karşılaştırılması
- Şekil 13:** Doku TNF- α değerlerinin gruplar arası karşılaştırılması
- Şekil 14:** Doku GR değerlerinin gruplar arası karşılaştırılması
- Şekil 15:** Doku GSH-Px değerlerinin gruplar arası karşılaştırılması
- Şekil 16:** Doku SOD değerlerinin gruplar arası karşılaştırılması
- Şekil 17:** Doku GSH değerlerinin gruplar arası karşılaştırılması
- Şekil 18:** Doku CAT değerlerinin gruplar arası karşılaştırılması
- Şekil 19:** Doku NO değerlerinin gruplar arası karşılaştırılması
- Şekil 20:** Doku MDA değerlerinin gruplar arası karşılaştırılması
- Şekil 21:** Doku MPO değerlerinin gruplar arası karşılaştırılması
- Şekil 22:** Histopatolojik olarak grupların karşılaştırılması

TABLO LİSTESİ

Tablo I : Serbest oksijen radikalleri

Tablo II : Çalışma grupları

Tablo III: Plazma biyokimyasal değişkenlerinin ortalama değerleri ve standart hataları

Tablo IV: Doku örneklerinin biyokimyasal değişkenlerinin ortalama değerleri ve standart sapmaları

Tablo V: Histopatolojik skarlama

RESİM LİSTESİ

Resim 1: Laparotomi öncesi deney hayvanlarının karın cildinin hazırlanması

Resim 2: Süperior mezenterik arter düzeyinden abdominal aortun diseke edilmesi

Resim 3: SMA düzeyinde abdominal aortun mikrovasküler klemp ile klemplenmesi

Resim 4: İntestinal iskemi oluşturulması

Resim 5: İntestinal iskemi oluşturulması

Resim 6: İntestinal reperfüzyon sonrası yeniden pulsasyon alınan ve rengi pembeleşmeye başlayan ince barsak ansları

Resim 7: Grade I; normal histoloji (HEx100)

Resim 8: Grade II; Hidropik dejenerasyon ve yüzey epitelinin seperasyonu (HEx100)

Resim 9: Grade III; Villus epitelyum hücre nekrozu (HEx100)

Resim 10: Grade IV; Tam villus nekrozu (HEx100)

Resim 11: Grade V; Şiddetli transmural nekroz (HEx100)

KISALTMALAR

AMİ: Akut Mezenter İskemi

ATP: Adenozin Trifosfat

Ca: Kalsiyum

CAT: Katalaz

DNA: Deoksiribonükleik Asit

DTNB: 5,5'-Dithio-bis 2-Nitrobenzoic Acid

EDTA: Ethylenediamin Tetra Acetic Acid

GR: Glutasyon Redüktaz

GSH: Glutasyon

GSH-Px: Glutasyon Peroksidaz

GSSG: Okside Glutasyon

HE: Hematoksilen Eozin

H₂O₂: Hidrojen Peroksit

IFN: İnterferon

IL-1: İnterlökin 1

IL-2: İnterlökin 2

IL-3: İnterlökin 3

IL-4: İnterlökin 4

IL-5: İnterlökin 5

IL-6: İnterlökin 6

IL-7: İnterlökin 7

IL-9: İnterlökin 9

IL-10: İnterlökin 10

IL-11: İnterlökin 11

IL-13: İnterlökin 13

IL-15: İnterlökin 15

I/R: İskemi-Reperfüzyon

LT: Lenfotoksin

MDA: Malondialdehit

MPO: Myeloperoksidaz

NADPH: Nikotinamid adenin dinükleotid fosfat

NO: Nitrik Oksit

NOS: Nitrik Oksit Sentetaz

O₂⁻: Süperoksit Radikal

OH⁻: Hidroksil Radikali

PMNL: Polimorfonükleer Lökosit

PMSF: Phenylmethanesulphonyl Fluoride

SMA: Superior Mezenterik Arter

SOD: Süperoksid Dismutaz

SOR: Serbest Oksijen Radikalleri

Th: T Helper

TMB: Tetrametil Benzidine

TNF- α : Tümör Nekrozis Faktör Alfa

XOD: Ksantin Oksidaz

GİRİŞ VE AMAÇ

İskemi, dokuya oksijen ve besin maddelerinin taşınmasının engellenmesi ile ortaya çıkan, hücrenin oluşturduğu dokunun tamamen fonksiyonsuz kalmasına neden olan bir tablodur. Bu süreç, kan akımının azalması ya da tamamen kesilmesi ile ortaya çıkan patolojik bir durumdur (1). İskemi sonrasında dokuda ortaya çıkan patolojik değişikliklerden kısmen reperfüzyon sorumludur. Reperfüzyon sürecinde dokuda serbest oksijen radikallerinin ve inflamatuvar sitokinlerin oluşturdukları hasar göze çarpmaktadır (2). Reperfüzyon hasarının moleküler mekanizması ile ilgili ilk çalışmalar mikrovasküler hasarın ve parankimal hücre disfonksiyonunun organ yetmezliği tablosuna gidişi hızlandırıldığını göstermektedir. Özellikle, reperfüzyon sırasında mikroçevreye yayılan serbest oksijen radikalleri (SOR) ve polimorfonükleer lökositler (PMNL), doku hasarına yol açabilecek hücre membran hasarından sorumlu tutulmaktadır. Hücre membranının zedelenmesini önleyen ve serbest oksijen radikallerini etkisizleştirerek ortadan kaldıran fizyolojik ve farmakolojik mekanizmalar üzerinde uzun yıllardır çalışılmaktadır (3). Reaktif oksijen metabolitleri hücre membran hasarına yol açan elektron dengesizliği (anyon-kasyon dengesizliği) dokuya oksijenin ulaşmasına neden olan reperfüzyon döneminde yoğunlaşarak spontan parankimal hasara neden olmaktadır (2, 4). Normal kanlanan bir dokuda süperoksit ve hidrojenperoksit gibi hasar verici moleküllerin birikmesi zordur. Ancak bu birikim zaman içerisinde ve küçük dozlar halinde birikerek zarar verebilir. Ancak; normal perfüzyonu olan bir dokuda SOR'nin doku aralığından uzaklaştırılması için geçen süre çok kısadır. Perfüzyon bozukluğunda doku aralığında daha uzun süre kalan moleküllerin fizyolojik arıtma mekanizmaları ile (Scavenger'lar) zararsız hale getirilmesi ileri derecede zorlaşacaktır (5).

Postiskemik hasarın önlenmesinin klinik önemi – hem cerrahi iyileşme sürecinde, hem de ani oklüziv hastalıkların tedavisinde- özellikle cerrahi uygulamalarda hastanın prognozunu belirleyici niteliğe sahiptir. İskemik kalan dokuda hasarın ortaya çıkması için kesinlikle oksijen ile karşılaşmasının gerektiği (6) ve insan bedeninde bu sürecin cerrahi işlemler sonrasında tedavinin ayrılmaz bir parçası olarak (örneğin embolektomi veya damar anastomozu) uygulandığı bir gerçektir.

İskemi-reperfüzyon (I/R) hasarı sırasında hem iskemik dokuda hem de sistemik olarak diğer dokularda ve organ sistemlerinde hücresel düzeyde hasar meydana gelmektedir. İnflamatuvar ve metabolik hasarın başlangıcı için iskeminin şiddetinden çok süresi ve reperfüzyon miktarı önemlidir. İnsanda toksik mediatörlerin etkisi ile karaciğer, akciğer bazal

membranı ve santral sinir sisteminde geri dönüşsüz hasarlanma meydana gelir. Karaciğer sinüzoidlerinde meydana gelen geçirgenlik farklılığı akciğer patolojisi ile birleşerek hızla çoklu organ yetersizliği tablosunun gelişmesine neden olabilir.(7-9).

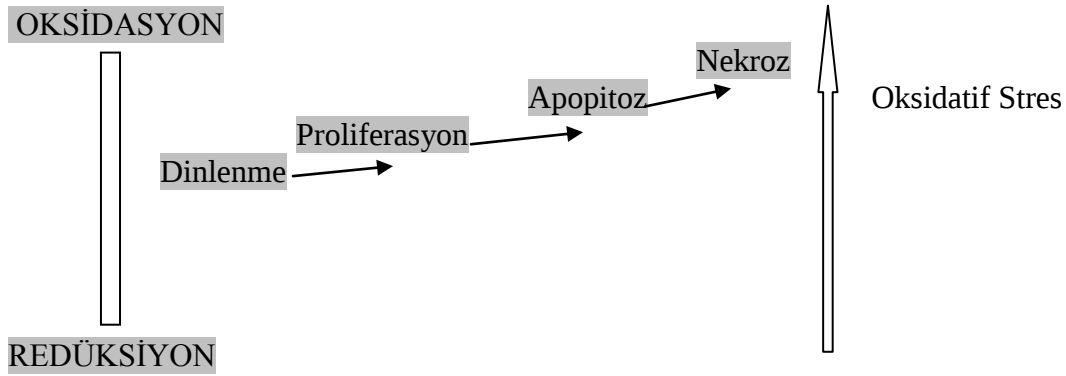
I/R hasarında serbest oksijen radikalleri yanında bazı proinflamatuvar sitokinlerin de rolü mevcuttur. IL-1 (İnterlökin 1), IL-6 (İnterlökin 6) ve Tümör nekrozis faktör alfa (TNF- α) bu sitokinlerin önde gelenlerindendir (10). TNF- α , inflamatuvar mediatörler veya sitokinlerin uyarılması sonucu salınan bir polipeptittir. Başta makrofaj ve lenfositler olmak üzere çeşitli immun ve somatik hücrelerde sentezlenir. Kaşeksi, endotoksik şok, immünite, koagülasyon, iskemi-reperfüzyon hasarında rol oynar. İntestinal ve karaciğer iskemi reperfüzyon hasarında önemli role sahiptir (11). Artmış TNF- α düzeyi mikrovasküler geçirgenlikte artma ve intestinal mukozada harabiyet oluşturur. Reperfüzyon süresinin uzaması ile sitokinlerin sebep olduğu mukozal bariyerde bozulmaya ek olarak lipid peroksidasyonunun da etkisi ile uzak organ hasarı oluşmaktadır (12). İntestinal I/R hasarındaki bu belirtiler septik şoktaki sistemik belirtilere benzer. TNF- α 'nın bu proinflamatuvar etkilerini engellemek için çeşitli farmakolojik ajanlar kullanılmaktadır. Salgılanmış TNF- α 'nın etkilerini nötralize etmek üzere dizayn edilmiş ajanlardan biri, bir monoklonal TNF antikoru olan infliximabtır. TNF- α 'nın transmembran formuna afinite ile bağlanarak etkisini nötralize eder. Biyolojik olarak blokajını sağlayarak proinflamatuvar etkinliğini yok eder (13, 14).

Cerrahi kliniklerinde rastlanan mezenter iskemi tablosunda intestinal I/R hasarını azaltmak için bugüne kadar çok sayıda deneysel model çalışılmıştır. Mediatörlerin etkisini ortadan kaldırmak deneysel çalışmaların günlük pratiğe yansıtmak istediği ana hedef olmuştur (15). İntestinal I/R hasarı üzerine daha önce antioksidatif ve antiinflamatuvar etkileri oldukları bilinen Leflunomid, N Asetisistein, ebselen çoğunlukla mide tarafından salgılandıkları bilinen ve birbirine zıt etkileri olan obestatin ve ghrelin hormonları, sildenafil, yine antioksidan özellikleri bilinen Prostoglandin E, leptin, melatonin, ginkgo gibi çeşitli biyokimyasal ve farmakolojik ajanlar üzerinde çalışmalar yapılmıştır. Deneysel olarak tüm bu ve benzer ajanların intestinal I/R hasarına farklı derecelerde olumlu etkileri saptanmış ancak klinik olarak kanıtlanamamıştır (16-19). Bizim bu çalışmadaki amacımız monoklonal TNF antikoru olan ve antiinflamatuvar etkinliği bilinen infliximabın deneysel olarak ratlarda oluşturulan akut mezenter iskemi modelinde intestinal I/R tablosu ile oluşan oksidatif stres ve histopatolojik değişiklikler üzerine yaptığı etkiyi belirleyerek tedavi edici etkisini araştırmaktır.

GENEL BİLGİLER

1.İntestinal İskemi

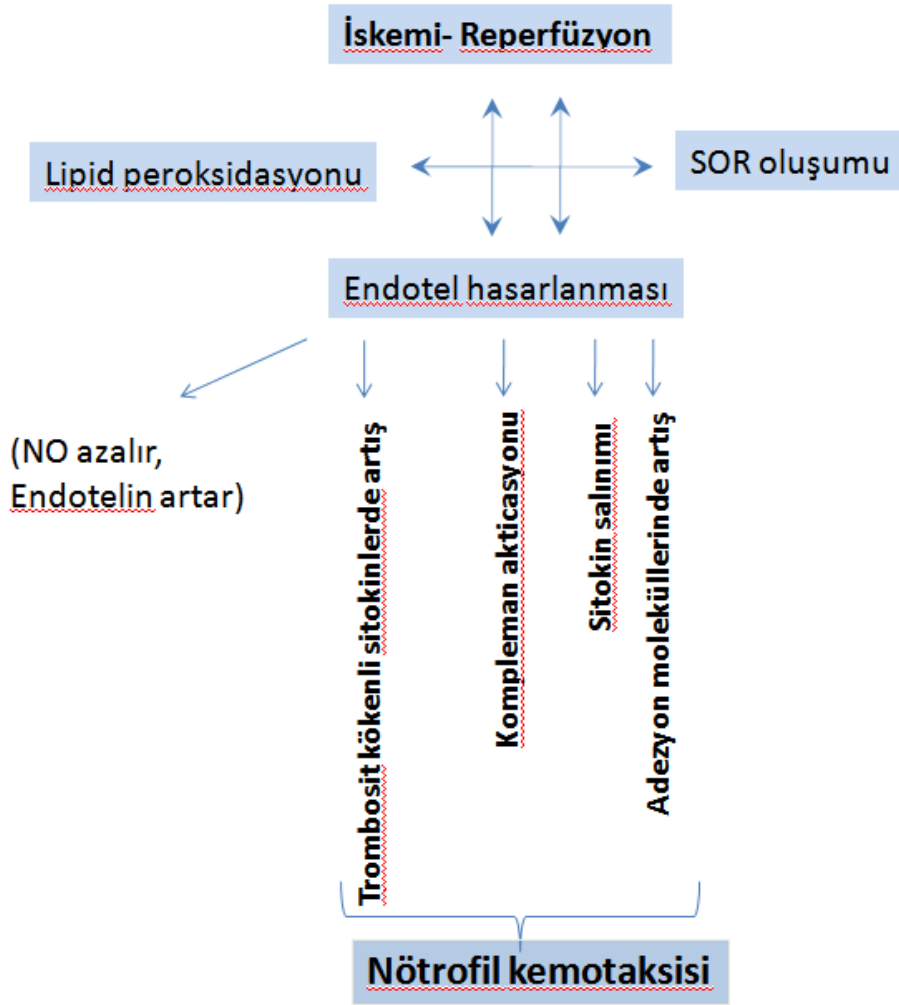
İskemi, dokuya gelen kan akımının azalması ya da tamamen kesilmesi sonucu oksijen ve besin ihtiyacının karşılanamaması durumudur (1). Her doku ve organın iskemiye karşı dayanıklılığı farklıdır. İskelet kası iskemiye ileri derece dirençli iken santral sinir sistemi ve gastrointestinal sistem iskemiye karşı oldukça hassastır (20). Normal hücre fonksiyonlarının sürdürülebilmesi için gerekli enerji Adenozin trifosfat (ATP) ile sağlanır. İskemiye maruziyet söz konusu olduğunda aneorobik metabolizma devreye girer ve laktik asit ile toksik metabolitler birikir (21). Hücre hemostazı için gerekli olan ATP'nin eksilmesi durumunda hücre içi iyon dengesizliği oluşur ve kalsiyum (Ca) birikmesine sebep olur. Bu tablo sonucunda da hücre içi ozmotik dengesizlik, asidoz gibi klinik bulgular ile kromatin kümelenmesi, piknozis, apoptozis ve nekrozis gibi histolojik bulgular takip eder (22).(şekil 1)



Şekil 1: Oksidatif streste hücrede histolojik değişiklikler

2. İntestinal I/R Hasarı

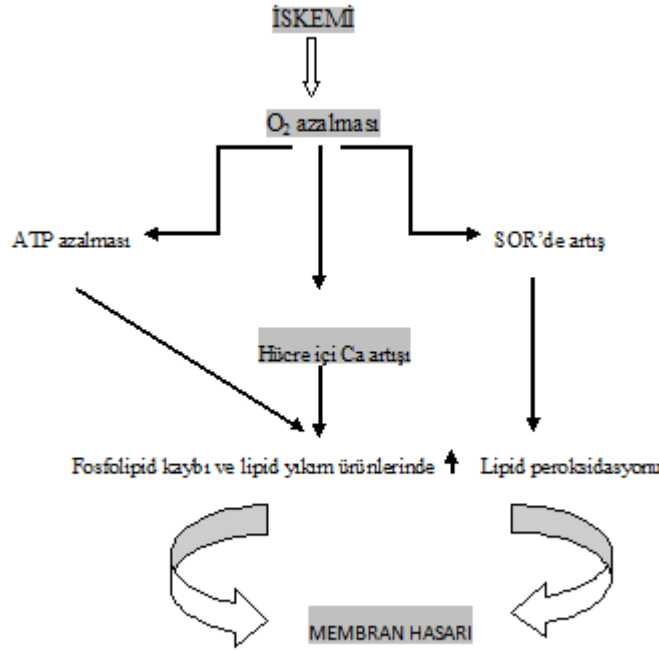
Reperfüzyon, dokuya gelen kan akımının kesilmesine neden olan etkenin ortadan kaldırılarak hedef organın yeniden kanlandırılmasıdır. Reperfüzyon sürecinin başlaması ile hedef organda yeniden ATP yapılması ve toksik metabolitlerin uzaklaştırılması gibi olumlu etkiler olduğu gibi geri dönüşümsüz safhadan sonra oluşan hücre membran hasarı sonucu hedef organda SOR, PMNL ve sitokinlerin başlattığı karmaşık mekanizmalar zinciri ile de olumsuz bir sürece de girilir (21). Reperfüzyon hasarına doğrudan ya da dolaylı birçok faktör sebep olmaktadır. Bu faktörler şunlardır; Ksantin oksidaz (XOD) yolu, PMNL aktivasyonu, endotelial faktörler, trombosit kaynaklı faktörler, kompleman aktivasyonu, sitokin aktivasyonu.(Şekil 2)



Şekil 2: I/R hasarında doku harabiyet mekanizmaları

İskemide hücre zedelenmesinin patogenezinde oksijen yetersizliğinin önemi belirtilmekle birlikte artmış SOR de hücre ölümünün önemli araçlarındandır. Artan bu SOR hücre üzerinde lipid peroksidasyonu ve diğer zararlı etkilere neden olur (21, 23). Hücre membranında lipid peroksidasyonu sonucu son ürün olan malondialdehit (MDA) oluşur. Bu değişiklikleri takiben erken dönemde görülen etkilerden birisi de nitrik oksitte (NO) azalmadır. Bunun sonucunda da vazodilatasyonda azalma ve mikrovasküler hasar meydana gelir (24). Reperfüzyon sonucunda artan SOR hem dokuya doğrudan zarar vermekte hem de hasarlı dokuda PMNL birikimine neden olmaktadır. Dokuya gelen aktive PMNL'ler myeloperoksidaz, elastaz, proteaz, kollajenaz, gibi enzimlerini açığa çıkarırlar. Bu enzimler

hem dokudaki hasarı arttırır, hem de daha fazla radikal oluşmasına neden olur. Tüm bu etkiler sonucunda hücre içi Ca birikmesi ile geri dönüşsüz hücre membran hasarı oluşur.(Şekil 3)



Şekil 3: Geri dönüşsüz hücre membran hasarı

Artan SOR aynı zamanda IL-1 ve TNF- α gibi sitokinlerin de makrofajlardan salınmasına öncülük etmektedirler (25). Bu proinflatuar sitokinler intestinal I/R hasarında lokal ve uzak organ hasarında önemli role sahiptirler (14, 26). IL-1 ve TNF- α 'nın deneysel hayvan modellerinde hemodinamik bozukluğa ve organ hasarına yol açtıkları bildirilmiştir (27). Bu sitokinler salındıktan sonra portal sistemle vücuda yayılarak sistemik inflamatuar yanıtı tetiklerler ve akciğer, karaciğer ve myokard hasarına sebep olurlar (28). İntestinal I/R hasarında ince barsak makrofajlarından salınan TNF- α lökosit aktivasyonuna neden olup doku hasarını başlatmaktadır (29). Bu sebepten yapılan bazı çalışmalarda TNF- α antagonistlerinin bu doku hasarını engellidiği savunulmuştur (30).

2.1.İntestinal I/R Hasarında Klinik

Ciddi mortalite ile seyredip metabolik durumu bozan ve hayatı tehdit eden mezenter iskemi tablosu cerrahi kliniklerinde seyrek rastlanan bir durum değildir. Akut mezenter iskemi (AMİ) tablosu potansiyel olarak superior mezenterik arter (SMA) ve

dallarının kanlanması tamamen veya kısmen bozulması sonucu ortaya çıkan prognozu oldukça kötü bir süreçtir (26, 31). Akut karın tablosuna yol açan bu hadise arteriyel emboli, arteriyel tromboz, venöz tromboz veya nonoklüziv iskemi klinikleriyle ortaya çıkabilir. Kardiyak aritmi, hipertansiyon, koagülopati, diabetes mellitus, hipovolemik şok vb. klinik tablolar etyolojide rol alabilmektedir. Etiyoloji ne olursa olsun bu klinik şiddetli lokal ve sistemik doku hasarına sebep olmaktadır (32).

I/R hasarının şiddetine göre klinik tablonun prognozu da değişmektedir. Barsak mukozasında enfarktüstü tüm barsak katlarını tutan transmural enfarktüse dek uzanan histopatolojik tablo oturabilir. Genellikle nekroz mukozadan dış katmanlara doğru yayılım gösterir. Mukozada ödem ve villus dejenerasyonu ile başlayan tablo klinik başladıktan sonraki 24 saat içerisinde transmural tutulum göstererek bakteriyel translokasyon ve perforasyona zemin hazırlar. Bunu takiben başlayan septik tablo ile sistemik doku hasarı gözlenir (33). Bu yüzden I/R hasarının oluşmaya başlamasından sonraki ilk 7-8 saatlik süreç tedavi açısından altın süre gibi kabul edilir.

Kan akımının ve barsak beslenmesinin bozulmasıyla ilk ortaya çıkan semptom lokalize edilemeyen karın ağrısıdır. Bunu takiben dışkılamada azalma ve bulantı ile rektal kanama görülebilir. Tüm bunlara rağmen ağrı olmadan gelişen distansiyon ile gastrointestinal kanama durumu da AMİ kliniğinde görülebilir. Ateş, kanlı ishal ve kusma AMİ'nin nonspesifik semptomlarındandır. Diffüz veya lokalize abdominal hassasiyet ile birlikte rebound ve barsak seslerinin alınamaması transmural enfarktün habercisi olup geç dönem bulgularındandır. Bu evreyi takiben ciddi sıvı ve elektrolit kaybı başlayıp sistemik çöküş bulguları gözlenir. Hipotansiyon, oligüri, taşikardi ve hiperventilasyon multipl organ yetmezliğinin başlangıç bulgularından bazılarıdır (18, 34).

3. Serbest Oksijen Radikalleri

Oksijen yaşam için hem gerekli hem de toksiktir. ATP üretilmesi, oksidasyon tepkimeleri ve beslenme için gerekli iken tek elektron aldığı zaman hücre lipidlerini ve bazal membranını ileri derece tahrip eden SOR'ne dönüşebilir. SOR bir veya daha fazla çiftlenmemiş elektron taşıyan elektrik yüklü veya yüksüz reaktif atom veya moleküllerdir. Biyolojik sistemdeki en önemli SOR; Hidroksil radikali (OH[•]), süperoksit radikal (O₂^{•-}), hidrojen peroksit (H₂O₂), nitrik oksit (NO)'tir.

3.1. Süperoksit Radikali

Hemen tüm aerobik hücrelerde oksijenin bir elektron alarak indirgenmesi sonucu serbest süperoksit radikal anyonu (O_2^-) meydana gelir. Süperoksit bir radikal olmakla birlikte, kendisi direkt olarak zarar vermez. Asıl önemi, hidrojen peroksit kaynağı olması ve geçiş metalleri iyonlarının indirgeyicisi olmasıdır (24).

3.2. Hidrojen Peroksit

Moleküler oksijenin çevresindeki moleküllerden iki elektron alması veya süperoksitin bir elektron alması sonucu peroksit oluşur. Peroksit molekülü iki hidrojen atomu ile birleşerek hidrojen peroksiti (H_2O_2), oluşturur. Hidrojen peroksit serbest bir radikal olmadığı halde, reaktif oksijen türleri içine girer ve serbest radikal biyokimyasında önemli bir rol oynar (24).

3.3. Hidroksil Radikali

Hidroksil radikali (OH^-) hidrojen peroksitin geçiş metallerinin varlığında indirgenmesiyle meydana gelir. Suyun yüksek enerjili iyonize edici reaksiyona maruz kalması sonucunda da hidroksil radikali oluşur. Son derece reaktif bir oksidan radikaldir. Oluştugu yerde büyük hasara neden olur (24).

3.4. Nitrik Oksit

Ca ve calmodulin bağımlı nitrik oksit sentetaz (NOS) enzimi ile oluşan NO vasküler endotelden salınan bir fizyolojik serbest radikaldir. Endotel hücreleri tarafından salınan süperoksit radikallerini nötralize edebilen endotel koruyucu bir ajan iken aynı zamanda doku harabiyetine de yol açabilen bir SOR'dir. Bu yüzden NO'nin SOR ile etkileşimi ile antioksidan özelliği çelişkilidir. Kısacası NO akut inflamatuvar süreçte hem koruyucu hem de hasar arttırıcı bir molekül olarak gösterilebilir (35). Yarılanma ömrü çok kısa olan NO'nin enfeksiyonlarla savaşmak, damarları kan pıhtısı oluşumundan korumak, sinir sisteminde sinyal molekülü olarak rol almak ve organlarda kan akımını kontrol etmek gibi birçok düzenleyici rolü üstlendiği bulunmuştur (36). (Tablo I)

Tablo I: Serbest oksijen radikalleri

SERBEST RADİKALLER		RADİKAL OLMAYAN TÜRLER	
O_2^-	Süperoksit	H_2O_2	Hidrojen peroksit
$\cdot OH$	Hidroksil radikali	1O_2	Single oksijen
RO_2^-	Peroksi radikali	$ROOH$	Lipit hidroperoksit
RO^-	Alkoksi radikali	$HOCl$	Hipoklorik asit
NO	Nitrik oksit	O_3	Ozon
RS^-	Thiyl radikal	$ONOOH$	Peroksinitrit
R_3C^-	Karbon radikal		

SOR, çok kısa yaşam süreli ancak yapısındaki dengesizlik nedeniyle çok aktiftir, tüm hücre bileşenleri ile etkileşebilme özelliği gösterirler (24). Hücre içinde membran hasarı, otooksidasyon, proteolitik enzimlerin aktivasyonu gibi nedenlerle, hücre dışında ise çevresel ajanlar (alkol, anestezi ajanları vs), bazı viral ajanlar, toksik maddeler gibi uyaranlar ile SOR açığa çıkabilmektedir. SOR'nin plazma membranları ve organellerde yağ asitlerinin peroksidasyonu, sülfhidril içeren enzimlerin oksidasyonu, enzimlerin inaktivasyonu gibi zararlı etkileri vardır (37). Artmış SOR'nin etkisi ile başlayan lipid peroksidasyonu sonrasında oluşan MDA gibi son ürünler artmış vasküler permeabilite sonrasında bulunduğu dokuda hasara yol açabilmektedir (38). Bunun dışında deoksiribonükleik asit (DNA) hasarı, doku harabiyeti, hücre iyon pompalarının harabiyeti gibi zararlı etkileri de mevcuttur.

4. Malondialdehid (MDA)

Serbest radikal oluşumunun en önemli patolojik sonuçlarından biri, lipid peroksidasyonudur. MDA, lipid peroksidasyonunun bir göstergesidir, proteinlerin aminoasit gruplarıyla, fosfolipidlerle ve nükleik asitlerle arasında çapraz bağlar oluşturarak etkisini gösterir. Membran iyon transportunu, akışkanlığını, enzim aktivasyonunu ve deformasyon kabiliyetini bozar, böylece sitotoksiteye, mutajen oluşumuna, membran yıkımına yol açar (39).

5. Myeloperoksidaz (MPO)

Fagositik PMNL'de bulunan lizozomal bir enzimdir. Fagositoz sonrasında bakterisidal olarak kullanılır. Bu etkiyi hidrojen peroksit ve klor iyonlarını bakteriyi öldüren hipoklorik asite çevirerek gösterir. İnflamatuvar süreçte MPO ekstraselüler sahaya salınır. Bu nedendir ki nötrofil sekestrasyonunun kantitatif bir göstergesi olarak kullanılır (40).

6. Antioksidan Savunma

SOR'nin dokuda oluşturduğu hasarı engellemek için gelişen savunma mekanizmasına antioksidan savunma ve bu ajanlara da antioksidan ajanlar denilmektedir. Endojen ve eksojen birçok antioksidan ajan mevcuttur. Bu ajanlardan endojen olanlar; Glutasyon(GSH), glutasyon peroksidaz (GSH-Px) , katalaz (CAT), süperoksid dismutaz (SOD) ve glutasyon redüktazdır(GR) (41). (Şekil 4)

6.1. Glutasyon (GSH)

Birçok hücrede bulunan GSH hücre zarında aminoasitlerin taşınmasında rol alır ve koenzim olarak enzim yapısına girer. Proteinlerin sülfidril yapılarını korur, toksik maddelerin etkilerinin ortadan kaldırılmasında rol oynar (42).

6.2. Glutasyon peroksidaz (GSH-Px)

Hidroksiperoksidlerin indirgenmesinden sorumludur. H_2O_2 tarafından oluşturulan oksidatif tahribata karşı, H_2O_2 'i mitokondri ve sitoplazmada su ve oksijene indirgeyerek GSH ile birlikte koruyucu görev yapar.

6.3. Glutasyon Redüktaz (GR)

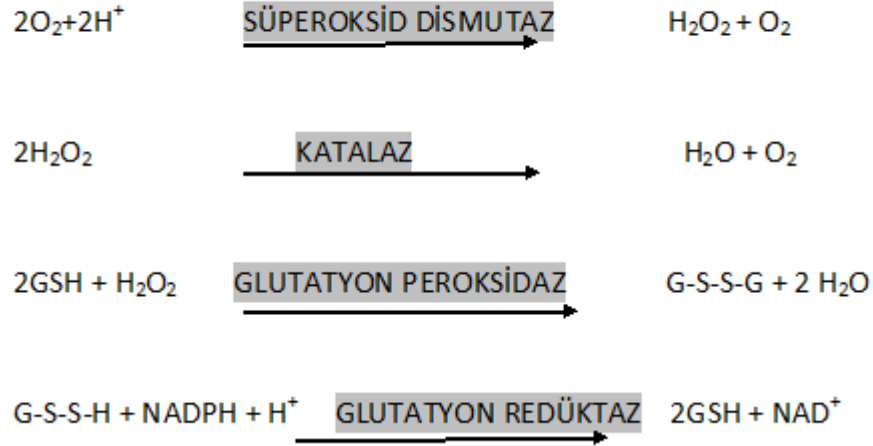
Hem sitozol hemde mitokondride bulunmaktadır. Okside glutasyon (GSSG) hücreyi oksidanlara karşı koruyamaz. Hücre elektron kaynağı olarak Nikotinamid adenin dinükleotid fosfat (NADPH)'ı kullanan GSH redüktazın katalizlediği bir reaksiyonla GSSG tekrar indirgenmiş GSH' a çevrilir. Bu şekilde SOR ile reaksiyona girdikleri ve ayrıca NO oluşumuna yol açtıkları ileri sürülmektedir (41).

6.4. Süperoksit dismutaz (SOD)

Süperoksitin, hidrojen peroksit ve moleküler oksijene dönüşümünü katalizler. Enzimin fizyolojik fonksiyonu oksijeni metabolize eden hücreleri süperoksit serbest radikallerinin zararlı etkilerine karşı korumaktır. Böylece lipid peroksidasyonunu inhibe eder (43).

6.5. Katalaz (CAT)

Canlı organizmada eritrosit, böbrek, karaciğer ve kemik iliği gibi çeşitli dokularda hidrojen peroksiti su ve oksijene indirgeyerek oksidatif stresi azaltır (44).



Şekil 4: Endojen enzimatik antioksidanlar

7. İnflamatuvar Yanıtta Sitokinler

İnsan vücudunda oluşan çeşitli hastalıklar ve travmalar sonucunda hasarlanan dokuları ve mikroorganizmaları ortadan kaldırmak için gelişen inflamasyon olayı doğal yapıda koruyucu bir olaydır. Ancak bu koruyucu olay olurken hasarlı doku yanında normal dokularında ortadan kaldırılması söz konusu olabilmektedir. Birçok mikroorganizma ve hastalıklı dokuyu ortadan kaldırırken normal dokulara da zarar veren inflamatuvar cevap aslında birçok immün olay ve hastalığın patogenizinde yer almaktadır (45).

Hümmoral immün mediyatörlerin önemli sınıflarından birisini de sitokinler oluşturmaktadır. Sitokinler, inflamasyonda hedef hücrenin fonksiyonunu değiştiren (biyolojik yanıt değiştiriciler) ve tek başına hareket eden makrofaj, intestinal epitel gibi hücrelerden salınan bir glikoproteindir. İnflamasyon alanında gereğinden fazla bulunmak sitokinlerin doğasında vardır. Sitokinler yapısına göre 2 tipe ayrılmaktadırlar.

Tip 1 Sitokinler; Reseptörleri ile yapısal benzerlikler gösteren sitokin grubudur. Hematopoetin reseptörleri olarak adlandırılırlar. İnterlökin-2 (IL-2), İnterlökin-3 (IL-3), İnterlökin-4 (IL-4), İnterlökin-5 (IL-5), İnterlökin-6 (IL-6), İnterlökin-7 (IL-7) , İnterlökin-9 (IL-9), İnterlökin-11 (IL-11), İnterlökin-13 (IL-13), İnterlökin-15 (IL-15), granülosit koloni stimulan faktör (G-CSF) proteinlerini içermektedir.

Tip 2 Sitokinler; Bu grup da reseptörleri ile yapısal benzerlikler göstermektedir. İnterferon (IFN)- α , IFN- β , IFN- γ ve İnterlökin-10'u (IL-10) kapsamaktadır.

Sitokinleri gruplandırmanın bir diğer yolu da basit CD4+ T hücrelerinin (Th hücreleri), Th 1 ve Th 2 olarak adlandırılan 2 alt T helper (Th) hücre grubuna farklılaşmasının tanınmasına dayanır. Th 1 hücreleri potent proinflamatuvar sitokinler olan IFN- γ ve lenfotoksin (LT)- α ile IL-2 üretir. Th 2 hücreleri IL-4, IL-5, IL-6, IL-9, IL-10, IL-13'ü üretir. Bu nedenle Th 1 sitokinler sıklıkla proinflamatuvar, buna karşılık Th 2 sitokinler antiinflamatuvar olarak kabul edilir (45, 46).

Tümör Nekroz Faktör (TNF): Retiküloendotelial sistemde birçok hücre tarafından endotoksin, inflamatuvar mediatörler veya sitokinlerin uyarılması sonucu salınan bir polipeptittir. TNF- α ve TNF- β olmak üzere iki formu vardır. TNF- α kaşektin olarak da adlandırılır. Reseptörleri ve etki yolları aynıdır. Makrofajlar başta olmak üzere birçok hücreden salgılanırlar ve geniş biyolojik etkileri mevcuttur. Koagülasyon , septik şok, immun savunma, kaşeksi ve I/R hasarında önemli role sahiptir (26).

İnflamatuvar uyarı sonrasında etkisi 30 dakika içinde başlar ve 90-120 dakika içinde maksimuma ulaşır. Yaklaşık 4 saat sonra etkisi kaybolur. TNF aynı zamanda indüklenebilir Nitrik Oksit Sentetaz (NOS)'ın regülasyonunda rol oynar.

TNF- α 'nın aktif hale gelmesi için trimerik yapı oluşturması gerekir. Yapılan çalışmalarda, membran TNF- α 'larında trimerik yapı oluşturduğu ve bu nedenle membrana bağlı TNF- α 'larda aktif formda oldukları gösterilmiştir. Sitokinlere bağlı otoimmün ve inflamatuvar hastalıkların patogeneğinde hücre dışı boşlukta yer alan soluble sitokinden daha çok hücre-hücre arası iletişim ile aktivasyona sebep olan membran sitokinlerinin daha önemli olduğu düşünülmektedir. Bu nedenle bir hastalığın anti-TNF ilaçlar ile etkin tedavisi için membran TNF- α aktivitesinde baskılanması gereklidir. Monoklonal antikor olan infliximab membran TNF- α 'ları ile sağlam bir kompleks oluşturarak etkisini nötralize eder (14).

8. İnfliximab

TNF- α 'nın hem çözünebilen, hem de transmembranöz formuna kolayca bağlanabilen, TNF- β 'ya etkisi olmayan monoklonal bir antikorudur (26). Proinflamatuvar sitokinlerin salınmasını, lökosit migrasyonunu ve adezyonunu, vasküler permeabilitede geçirgenliğin artmasını engelleyerek doku hasarını azalttığı gösterilmiştir (47). Endotel hücreleri, fibroblastlar, B ve T lenfositler, nötrofiller ve intestinal epitelyum hücrelerinde TNF- α 'nın etkisini bloke ederek akut faz reaktanlarının salınımını indükler (48). %25 fare, %75 insan antikorundan oluşturulmuştur. Yarılanma ömrü ortalama 9-10 gündür. İntravenöz

infüzyon şeklinde tedavide kullanılır. İnflamatuvar hastalıkların tedavisinde 5mg/kg dozunda tedaviye başlanması önerilir ve etkisi görülmezse dozu arttırılabilir. 10mg/kg dozunda etkin teröpatik düzeyde olduğu düşünülmektedir. Dolaşımdan temizlenme hızı 10 ml/h hızındadır. İntraluminal barsak patolojilerinde önerilen doz 5 mg/kg intravenöz infüzyon ile tedaviye başlanması, yanıt alınamazsa ikinci kere denenmesi ve bundan da yanıt alınamaması durumunda son dozun artık denenmemesidir. 20mg/kg'a dek arttırılan çalışmalar bildirilse de toksik doz konusunda net görüş bildirilmemiştir (49). İntestinal mukoza biyopsilerinde yapılan histolojik çalışmalarda infliximabın intraluminal inflamasyon bölgelerine infiltrasyonunu ve bu bölgelerdeki inflamatuvar hadiseleri geriletği gösterilmiştir. Ancak bu etkinlik için periyodik aralıklarla intravenöz infüzyon şeklinin monoterapiden daha etkin olduğu söylenmektedir (50).

Infliximab günümüzde Chron hastalığı, romotoid artrit, psörotik artrit, ankilozan spondilit gibi hastalıklarda FDA onayı almıştır. Enterokutan ve rektovajinal fistül gibi durumlarda kullanılmaktadır (51). Sepsis ve ciddi pnömoni gibi komplikasyonları rapor edilmiştir ve bu yüzden ciddi enfeksiyonu olan hastalarda kullanımı kontrendikedir (14). I/R hasarında kullanımı henüz deneysel aşama düzeyindedir. Ancak intestinal I/R hasarının yol açtığı septik şok sorunu anlaşılması ve çözülmesi zor bir durum gibi gözükse de inflamatuvar olayların spesifik, sitokine yönelik çalışmalar ile tedavi edilmesi cerrahi klinik uygulamalarında önemli bir rol alacakmış gibi görülmektedir (26).

GEREÇ VE YÖNTEM

Çalışma; Adnan Menderes Üniversitesi Veterinerlik Fakültesi Deney Hayvanları Laboratuvarı'nda Eylül – Ekim 2011 tarihleri arasında Üniversite Yerel Hayvan Etik Kurulu onayı alınarak yapıldı (B.30.2.ADÜ.0.00.00.00/050.04/2011/022). Çalışmanın tüm safhalarında yerel etik kurulun 01 Haziran 2011 tarihli yönergelerine uygun hareket edildi.

1.Deneysel Model

Çalışmada Adnan Menderes Üniversitesi Tıp Fakültesi Farmakoloji AD. deneysel cerrahi laboratuvarında üretilmiş, ağırlığı 170- 270 gr arasında değişen, 48 adet erkek Wistar-Albino tipi sıçan kullanıldı. Deney süresince sıçanlar 12/12 saat aydınlık ve karanlık ışıklandırması olan, ısı $22^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$ ve nem oramı %45–50 arasında değişen otomatik olarak ayarlanmış odalarda yaşatıldılar. Benzer deneylere başlangıç koşullarına uygunluk sağlanması amacıyla tüm hayvanlar deney öncesinde bir hafta süre ile ortam koşullarına adaptasyon sürecine bırakıldı. Adaptasyon sürecinde sıçanlar polikarbonat şeffaf kafeslerde standart sıçan yemi ve çeşme suyu ile beslendi.

Ratlar, sekizer hayvandan oluşan toplam altı gruba ayrıldı. Çalışmada Anti-TNF monoklonal antikoru olan infliximab (Remicade®) kullanımının intestinal iskemi reperfüzyon hasarına erken dönemde etkisini incelemek için tedavi gruplarına laparotomi ve planlanan sürelerde iskemi reperfüzyon yapılarak intraperitoneal olarak infliximab enjekte edildi. Kontrol gruplarına ise 3 cc %0.9 NaCl intraperitoneal olarak enjekte edildi.

2. Çalışma Grupları

Grup I (Kontrol grubu): Laparotomi yapılan sıçanlarda barsaklar manipüle edildi ve operasyon sonrasında sıçanlar sakrifiye edildi (n=8).

Grup II (Laparotomi + infliximab): Laparotomi yapılan sıçanlara aynı anda intraperitoneal 10 mg/kg infliximab verildi. Operasyon sonrasında sıçanlar sakrifiye edildi (n=8).

Grup III (Laparotomi + 30 dk iskemi + 30 dk reperfüzyon): Laparotomi yapılan sıçanlarda 30 dakika intestinal iskemi sonrası 30 dakika reperfüzyon yapıldı. Operasyon sonrasında sıçanlar sakrifiye edildi (n=8).

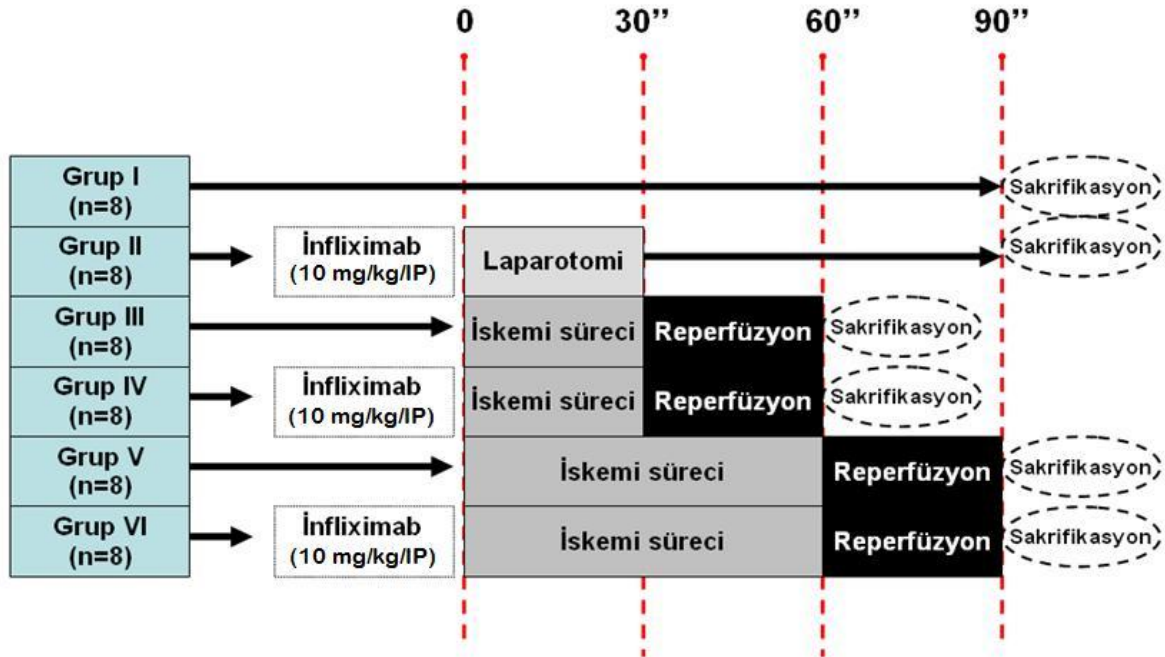
Grup IV (Laparotomi + İnfliximab + 30 dk iskemi + 30 dk reperfüzyo): Laparotomi yapılan sıçanlara aynı anda intraperitoneal 10 mg/kg infliximab verildi. Daha sonra sıçanlarda 30

dakika intestinal iskemi sonrası 30 dakika reperfüzyon yapıldı. Operasyon sonrasında sıçanlar sakrifiye edildi (n=8).

Grup V (Laparotomi + 60 dk iskemi + 30 dk reperfüzyo): Laparotomi yapılan sıçanlarda 60 dakika intestinal iskemi sonrası 30 dakika reperfüzyon yapıldı. Operasyon sonrasında sıçanlar sakrifiye edildi (n=8).

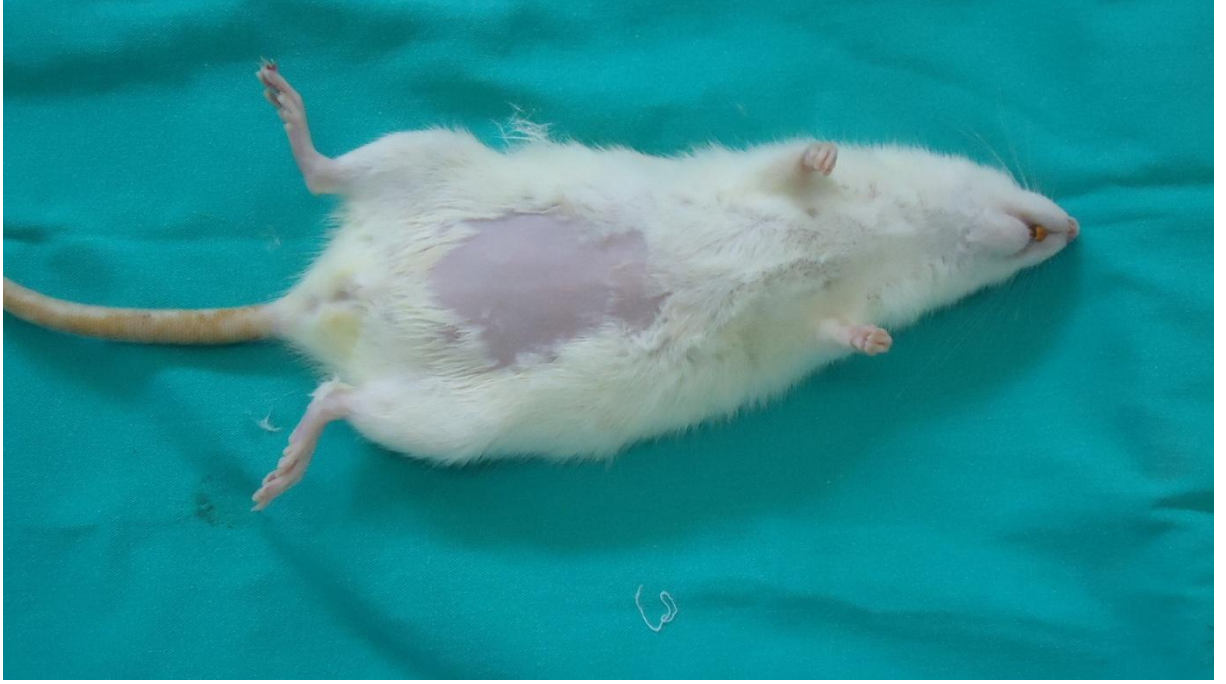
Grup VI (Laparotomi + İnfliximab + 60 dk iskemi + 30 dk reperfüzyo): Laparotomi yapılan sıçanlara aynı anda intraperitoneal 10 mg/kg infliximab verildi. Daha sonra sıçanlarda 60 dakika intestinal iskemi sonrası 30 dakika reperfüzyon yapıldı. Operasyon sonrasında sıçanlar sakrifiye edildi (n=8).(Tablo II)

Tablo II: Çalışma grupları



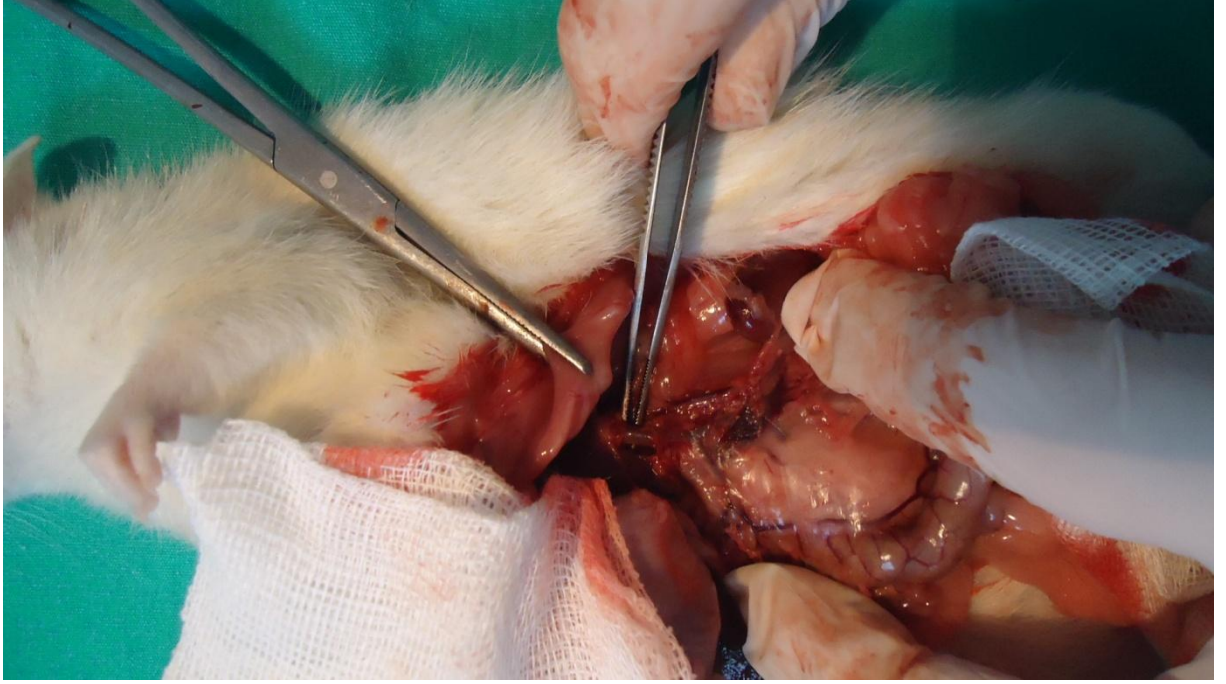
3. Cerrahi İşlem

Anestezi: 40 mg/kg ketamin hidroklorür (Alfamin, Egevet Hayvancılık San. ve Tic. Ltd. Şti) ve 8 mg/kg xylazin (Alfazin, Egevet Hayvancılık San. ve Tic. Ltd. Şti) karışımı intraperitoneal enjeksiyon yolu ile uygulandı. Anestezi uygulamasının ardından sıçanlar tartıldı.

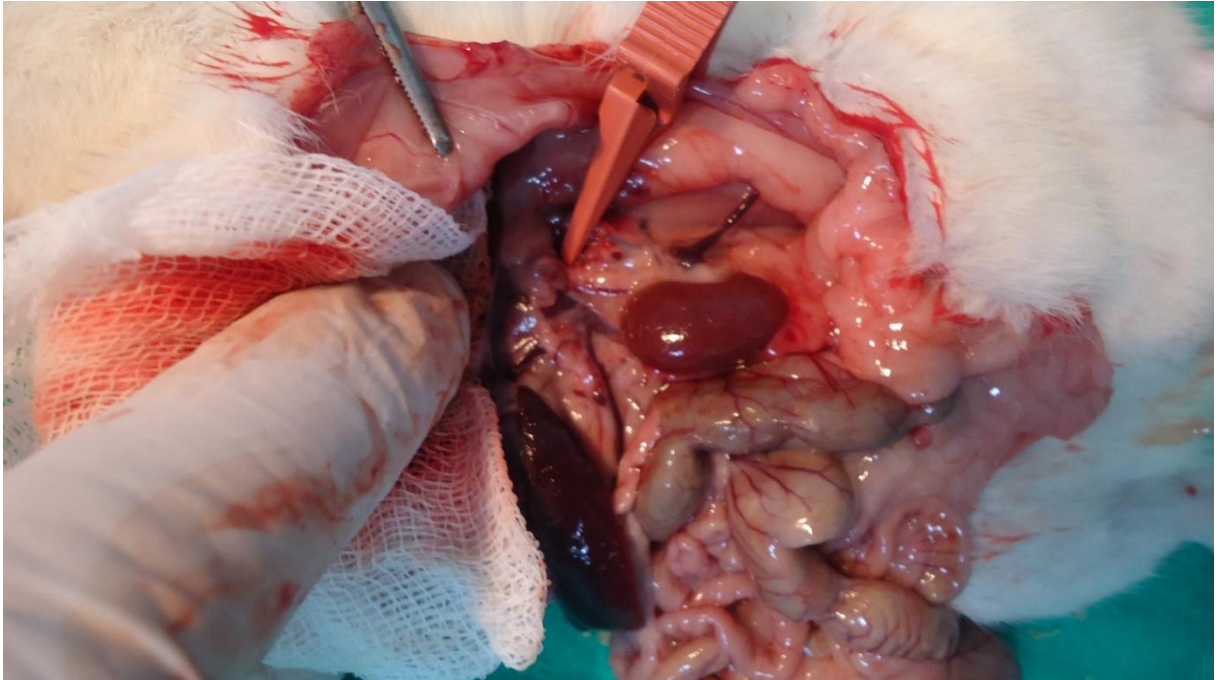


Resim 1: Laparotomi öncesi deney hayvanlarının karın cildinin hazırlanması

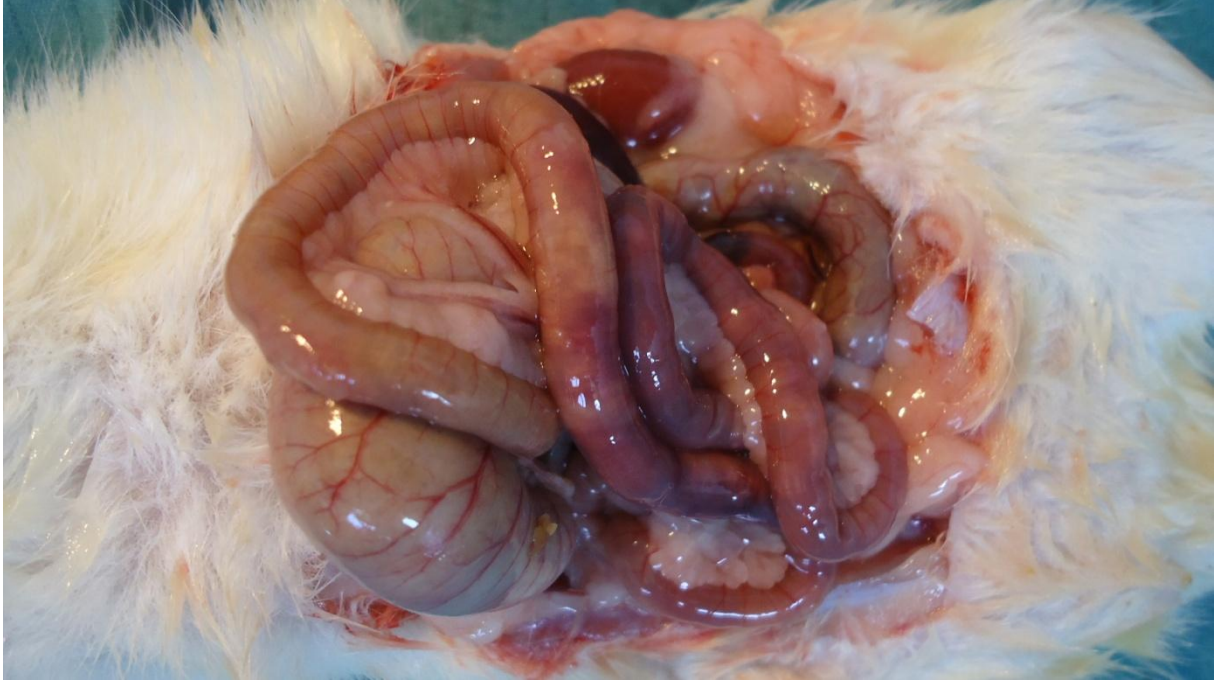
Karın cildi traşlanarak povidone iodine ile temizlendi (Resim 1). Steril aletler kullanılarak orta hat insizyon yapıldı ve karına girildi. İnce barsaklar orta hat kesisinden karın dışına alınarak süperior mezenterik arter düzeyinden abdominal aort bulundu (Resim 2). Dolaşımı engellemek için abdominal aort bu düzeyden mikrovasküler klempler ile klemlendi (Resim 3). İntestinal iskemi pulsasyonun kaybolması ve barsak renginin soluklaşmasıyla doğrulandı (Resim 4-5). İnce barsaklar batın içine geri gönderilerek cilt kapatıldı ve planlanan iskemi sürelerinin dolması beklendi. Planlanan süre sonrasında karın yeniden açıldı ve ince barsaklar dışarı alındı. Mikrovasküler klemp açılarak reperfüzyon sağlandı. Planlanan sürece reperfüzyon yapıldı (Resim 6). Daha sonra terminal ileuma yakın bir kesimdeki ince barsak dokusundan histopatolojik ve biyokimyasal inceleme için örnek alındıktan sonra intrakardiyak ortalama 5 cc kan alınarak ratlar kurban edildi.



Resim 2: Süperior mezenterik arter düzeyinden abdominal aortun diseke edilmesi



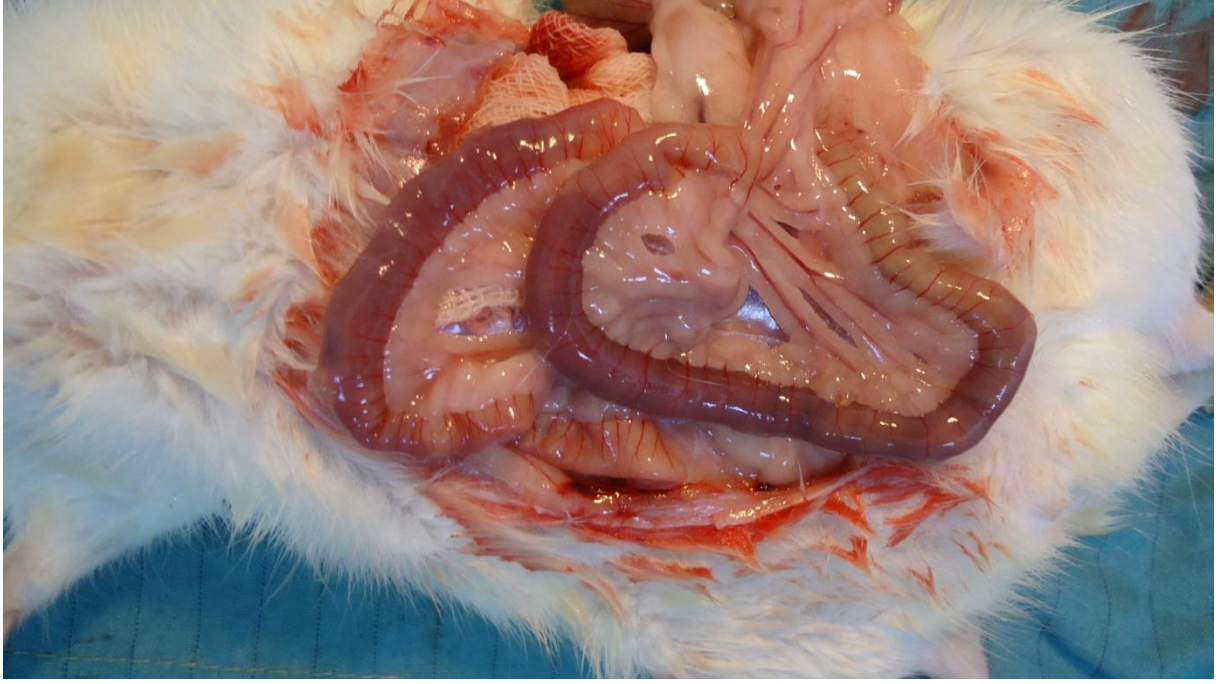
Resim 3: SMA düzeyinde abdominal aortun mikrovasküler klemp ile klemplenmesi



Resim 4: İntestinal iskemi oluşturulması



Resim 5: İntestinal iskemi oluşturulması



Resim 6: İntestinal reperfüzyon sonrası yeniden pulsasyon alınan ve rengi pembeleşmeye başlayan ince barsak ansları

Cerrahi işlem sonrası doku örnekleri biyokimyasal parametreler için Ependorf tüplerine konularak soğuk (-4°C) saklama kabında hızla biyokimya laboratuvarına ulaştırıldı. İntrakardiyak kan örnekleri de biyokimyasal parametreler için biyokimya laboratuvarına ulaştırıldı. Patolojik inceleme için alınan doku örnekleri formol ile ependorf tüplerine alınıp patoloji laboratuvarına ulaştırıldı.

4. Yöntemler

4.1. Doku örneklerinin hazırlanması

Doku örnekleri, proteaz inhibitörü olan $0.2\ \mu\text{M}$ phenylmethanesulphonyl fluoride (PMSF), $1\ \text{mM}$ Ethylenediamin tetra acetic acid (EDTA), $1\ \mu\text{M}$ Leupeptin içeren $50\ \text{mM}$ fosfat tamponunda ($\text{pH}\ 7.4$) ($1/10\ \text{g/ml}$) olacak şekilde 4°C 'de homojenize edildi. Homojenatlar, MPO için örnek ayrıldıktan sonra, $10.000\ \text{rpm}$ 5 dakika santrifüj edildi ve üstteki supernatant eşit olarak ependorflara ayrılarak diğer parametrelerin bakılabilmesi için -80°C 'de donduruldu.

4.1.1. Dokuda CAT Ölçüm Yöntemi

Doku örneklerinde CAT aktivitesi Aebi'nin yönteminine göre saptandı (52). Fosfat tamponu (50 mM pH:7.4) olacak şekilde, potasyum dihidrojen fosfat (KH_2PO_4) ve disodyum hidrojen fosfat ($\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$) ile hazırlandı. H_2O_2 (30 mM) olarak hazırlandı. Tampon ile dilüe edilmiş örneğe, H_2O_2 'li tamponun eklenmesi ile başlayan absorbens değişimi, spektrofotometrede 240 nm'de izlenerek, 15 saniyedeki absorbens değişimi ölçüldü ve aşağıdaki formüle göre hesaplama yapıldı. Sonuçlar U/g yaş doku olarak verildi

$$k = (2.3/\Delta t) \log (\text{Abs}_1/\text{Abs}_2) = 0.1175/\Delta t (\text{sn}^{-1})$$

4.1.2. Dokuda MDA Ölçüm Yöntemi

Doku örneklerinde MDA değerleri Konukoğlu ve ark. yöntemine göre saptandı. %15 TCA + % 37 TBD+ 0,25 M HCl içeren çözelti hazırlandı ve stok solüsyon olarak kullanıldı. 300 µl supernatant üzerine 600 µl stok solüsyon kondu. 90 °C'de 30 dakika kaynatılıp, buzlu suda soğutuldu. 10.000 rpm/5 dakika santrifüj edildikten sonra örneklerdeki absorbensler spektrofotometrede, 540 nm'de mikropate okuyucusunda okundu ve hesaplar otomatik olarak çizilen standart eğriden hesaplandı. Sonuçlar µM/g yaş doku olarak verildi (53).

4.1.3. Dokuda MPO Ölçüm Yöntemi

Dokuda MPO aktivitesi Suzuki ve ark.'nın yönteminine göre saptandı (54). Yöntem sentetik bir substrat olan 3,3',5,5'-tetrametil benzidine (TMB)'in MPO yoluyla yıkılımının ölçülmesine dayanmaktadır. Belli miktardaki doku homojenatı 7.000 rpm 5 dakika santrifüj edildi. Üstteki kısım atıldı ve alttaki kalan doku kısmı deterjanlı tampon ile çözüldü (160 mM potassium phosphate buffer, pH 5.4, 1% hexadecyltrimethylammonium bromide, HETAP). Reaksiyon H_2O_2 'in 37 °C'de reaksiyon karışımına eklenmesi yolula başlatıldı. MPO'nun katalizlediği reaksiyonda TMB oksidasyona uğramakta olup, reaksiyon sırasında absorbens artışı 655 nm'de 15 saniye ölçülmekte ve 1 dakikadaki MPO aktivitesi hesaplanmaktadır. MPO aktivitesi U/g yaş doku olarak verilmektedir.

4.1.4. Dokuda GSH Ölçüm Yöntemi

Dokuda GSH Beutler ve ark.'nın yöntemine ölçüldü (55). Presipite edici solüsyon; metafosforik asit, disodyum EDTA ve sodyum klorür (NaCl) kullanılarak hazırlandı. Disodyum fosfat solüsyonu; di sodyum hidrojen fosfat (Na_2HPO_4) ile hazırlandı. DTNB solüsyonu; [5,5'-Dithio-bis (2-nitrobenzoic acid)] ve sodyum sitrat ile hazırlandı.

GSH standardı; (reduced glutathione) kullanılarak 1-60 mg/dl'lik standartlar olarak hazırlandı. Standartlar ve örnekler spektrofotometrede 412 nm'de köre karşı okutuldu. Sonuçlar mg/ g yaş doku olarak verildi

4.1.5. Dokuda GSH-Px Ölçüm Yöntemi

Dokuda GSH-Px aktivitesi, Kakkar ve ark.'nın yöntemine göre minör modifikasyonla saptandı (56). GSH-Px reaksiyon karışımı; 75 mmol fosfat tamponu (pH 7.0), 60 mmol GSH, 30U/ml GR, 15 mmol Na_2EDTA içermektedir. Küvet 37 °C'ye ayarlanan sperofotometreye kondu. Küvetin içine reaksiyon karışımı konarak gerektiği kadar, dilüe edilmiş hemolizat eklendi. Reaksiyon H_2O_2 (%30) ile başlatıldı ve NADPH'daki absorbansın azalması 340 nm'de 3 dakika izlendi. Non enzimatik reaksiyon hızı kör çalışılarak hesaplandı ve elde edilen sonuçlardan çıkartıldı. Sonuçlar mU/g yaş doku olarak verildi.

4.1.6. Dokuda GR Ölçüm Yöntemi

Dokuda GR aktivitesi, Racker ve ark.'nın yöntemine göre saptanmıştır (57). Reaksiyon karışımı; 50 mmol/L Tris tamponu, Ph 7.6, 100 $\mu\text{mol/L}$ EDTA, 4 mmol/L GSSG (oksidlenmiş glutatyon), 120 $\mu\text{mol/L}$ NADPH ile hazırlandı. Reaksiyon karışımı küvetlere kondu ve uygun oarnda eritrositlerden hazırlanmış hemolizat konarak reaksiyon başlatıldı. 340 nm'de 37°C'de NADPH'ın oksidasyonunun izlenmesi yoluyla GR düzeyleri saptandı. Örnek yerine su kullanılarak, aynı şekilde kör çalışılarak elde edilen sonuç, örneklerden elde edilen sonuçtan çıkartıldı. Reaksiyon 3 dakika izlendi. Sonuçlar U/g yaş doku olarak verildi.

4.1.7. Dokuda SOD Ölçüm Yöntemi

Dokuda SOD ölçümü, Sun ve ark.'nın yöntemine göre saptandı (58). Doku süpernatantı kloroform, etanol ile iyice çalkalandı ve örnekler içindeki SOD 12.000g'de 1 saat santrifüjlendikten sonra ekstrakte edildi. SOD deney çözeltisi; 0.3 mmol/L xantine, 0.6

mmol/L EDTA, 150 µmol/L nitroblue tetrazolium (NBT), amonyum sülfat (NH₄SO₄), 20167 U/L xantine oxidase (XOD) içermektedir. Bu çalışma çözeltisine örnekler eklendikten sonra 25° C’de su banyosunda, XOD çözeltisi eklendi. Reaksiyon bakır klorür (Cu₂Cl) eklenerek durduruldu. Ayrıca kör çözeltisi hazırlandı. Deney sonunda oluşan renk 560 nm’de spektrofotometrede ölçüldü.

SOD standardı (Cu,ZnSOD porcine erythrocytes) ile, 0-270 ng/tüp ve % inhibisyon değerleri karşılıklı gelecek şekilde oluşturuldu. İnhibisyon değerleri aşağıdaki formülden hesaplandı. Her örnek için elde edilen inhibisyon değeri, grafik kullanılarak SOD değeri saptandı. SOD düzeyleri ng/g yaş doku olarak verildi.

$$\% \text{ inhibisyon} = \frac{(\text{Absorbans}_{\text{Kör}} - \text{Absorbans}_{\text{Örnek}})}{\text{Absorbans}_{\text{Kör}}}$$

4.1.8. Dokuda NO• (nitrit+nitrat) Ölçüm Yöntemi

Dokuda NO• düzeyleri, Navarro-Gonzalves ve ark.’nın yöntemine göre saptandı (59). Doku supernatantı önce proteinlerinden ayrıldı. Glisin-NaOH tamponu; glisin ve sodyum hidroksit kullanılarak hazırlandı. Glisin- NaOH tamponu içindeki CuSO₄ çözeltisi; glisin, NaOH ve bakır sülfat kullanılarak hazırlandı. Sülfanilamid çözeltisi; hidroklorid asid %37 ve sülfanilamid ile hazırlandı. NED çözeltisi [N-(1-Naphtyl) Ethyl-Enediamine dihydrochloride] kullanılarak hazırlandı. Standartlar, sodyum nitrit (NaNO₂) kullanılarak, 2-80 µg konsantrasyonlarda hazırlandı.

Örneklerdeki NO• konsantrasyonu, Griess reaksiyonu sonucunda ölçüldü. Örnekler ve standartlar, ELISA mikrotiplerinde okuyucuda 540 nm’de okutuldu. Konsantrasyon hesapları otomatik olarak cihaz tarafından hesaplanmış olup, sonuçlar µM/g yaş doku olarak verildi.

4.1.9. Dokuda TNF -α ölçüm yöntemi

Eppendorf içinde saklanan doku örneklerinde TNF-α düzeyleri rat spesifik ELİSA kiti kullanılarak değerlendirildi. Standart rekombinant TNF-α eğrisi kullanılarak TNF-α konsantrasyonları hesaplandı. Değerler pg/ml olarak ifade edildi

4.2. Kanda Biyokimyasal Analizi

Kan örnekleri jelli rutin biyokimya testlerinde kullanılan tüplere alınmış olup, alındıktan sonra 4.000 g'de 10 dakika santrifüj edildikten sonra her bir örnek iki ependorf tübüne ayrılmış ve derin dondurucuda (-85 °C) deneyler gerçekleştirilemeye kadar saklandı.

4.2.1. Tam kanda GSH Ölçüm Yöntemi

Tietze'in metoduna göre tam kanda ölçüldü (60). Presipite edici solüsyon; metafosforik asit, disodyum EDTA ve sodyum klorür (NaCl) kullanılarak hazırlandı. Disodyum fosfat solüsyonu; di sodyum hidrojen fosfat (Na₂HPO₄) ile hazırlandı. DTNB solüsyonu; [5,5'-Dithio-bis (2-nitrobenzoic acid)] ve sodyum sitrat ile hazırlandı.

GSH standardı; (reduced glutathione) kullanılarak 1-60 mg/dl'lik standartlar olarak hazırlandı. Standartlar ve örnekler spektrofotometrede 412 nm'de köre karşı okutuldu. Sonuçlar mg/ g Hb ve mg/g yaş doku olarak verildi.

4.2.2. Eritrositlerde GSH-Px Ölçüm Yöntemi

Eritrositlerde GSH-Px aktivitesini saptamak için dondurulmuş hemolizat örnekleri çözüldükten sonra 1/5 oranında saf su ile dilüe edildi ve bu örnekler 10.000 rpm/5 dakika santrifüj edildi. Hemolizat örneklerindeki parçalanmış eritrositler çöktükten sonra üstte kalan sıvıdan 20 µl'lik örnek 100 µl Drabkin çözeltisi ile yine 1/5 olacak şekilde dilüe edildi ve bu örneklerde GSH-Px aktivitesi saptandı. Tampon çözelti Tris-buffer, Na₂EDTA, NADPH reduced GSH, glutathione reductase içermekte olup, örneklerdeki GSH-Px aktivitesi H₂O₂ yardımıyla NADPH'daki absorbansın düşmesinin 340 nm'de 37°C'de 3 dakika boyunca izlenmesi yoluyla saptanmıştır. Sonuçlar U/g Hb olarak verildi (61).

4.2.3. Eritrositlerde GR Ölçüm Yöntemi

Eritrositlerde GR aktivitesi, Racker ve ark.yöntemine göre saptanmıştır. Reaksiyon karışımı; 50 mmol/L Tris tamponu, Ph 7.6, 100 µM EDTA, 4 mM GSSG (oksidlenmiş glutatyon), 120 µM NADPH ile hazırlandı. Reaksiyon karışımı küvetlere kondu ve uygun oranda eritrositlerden hazırlanmış ve Drabkin çözeltisi ile dilüe edilmiş örnekler konarak reaksiyon başlatıldı. 340 nm'de 37°C'de 3 dakika boyunca NADPH'ın

oksidasyonunun izlenmesi yoluyla saptandı. Örnek yerine su kullanılarak, aynı şekilde kör çalışılarak elde edilen sonuç, örneklerden elde edilen sonuçtan çıkartıldı. Reaksiyon 3 dakika izlendi. Sonuçlar eritrositlerde U/gHb olarak verildi (57).

4.2.4. Eritrositlerde SOD Ölçüm Yöntemi

Eritrositlerde SOD ölçümü Sun ve ark. yöntemine göre saptandı (58). Öncelikle eritrositlerden elde edilen hemolizat ve süpernatant örnekleri kloroform, etanol ile iyice çalkalandı ve örnekler içindeki SOD 12.000rpm'de 60 dakika santrifüjlendikten sonra ekstrakte edildi. SOD deney çözeltisi; 0.3 mM xantine, 0.6 mM EDTA, 150 µM nitroblue tetrazolium (NBT), amonyum sülfat (NH_4SO_4), 20167 U/L xantine oksidase (XOD) içermektedir. Bu çalışma çözeltisine örnekler eklendikten sonra 25° C'de su banyosunda, 30 saniye aralıklarda toplam 20 dakika boyunca XOD çözeltisi eklendi. Reaksiyon yine her 30 saniyede bir 200 µl bakır klorür (Cu_2Cl) eklenerek durduruldu. SOD düzeyleri eritrositlerde g/g Hb olarak verildi.

4.2.5. Serum örneklerinde NO• (nitrit+nitrat) Ölçüm Yöntemi

Serum NO• düzeyleri, Navarro-Gonzalves ve ark. yöntemine göre saptandı (59). Glisin-NaOH tamponu; glisin ve sodyum hidroksit kullanılarak hazırlandı. Glisin- NaOH tamponu içindeki CuSO_4 çözeltisi; glisin, NaOH ve bakır sülfat kullanılarak hazırlandı. Sülfanilamid çözeltisi; hidroklorid asid %37 ve sülfanilamid ile hazırlandı. NED çözeltisi [N-(1-Naphtyl)Ethyl-Enediamine dihydrochloride] kullanılarak hazırlandı. Standartlar, sodyum nitrit (NaNO_2) kullanılarak, 2-80 µg konsantrasyonlarda hazırlandı.

Örneklerdeki NO• konsantrasyonu, Griess reaksiyonu sonucunda ölçüldü. Örnekler ve standartlar, ELISA mikropate okuyucuda 540 nm'de okutuldu. Konsantrasyon hesapları otomatik olarak cihaz tarafından hesaplanmış olup, sonuçlar µM/g Hb olarak verildi.

4.2.6. Eritrositlerde CAT Ölçüm Yöntemi

Eritrositlerde elde edilen süpernatantlarda Aebi'nin yöntemine göre saptandı (52). Fosfat tamponu (50 mM pH:7.4) olacak şekilde, potasyum dihidrojen fosfat (KH_2PO_4) ve disodyum hidrojen fosfat ($\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$) ile hazırlandı. H_2O_2 (30 mM) olarak hazırlandı.

Tampon ile dilüe edilmiş örneğe, H₂O₂'li tamponun eklenmesi ile başlayan absorbans değişimi, spektrofotometrede 240 nm'de izlenerek, 15 saniyedeki absorbans değişimi ölçüldü ve aşağıdaki formüle göre hesaplama yapıldı. Sonuçlar U/g Hb olarak olarak verildi.

$$k = (2.3/\Delta t) \log (Abs_1/Abs_2) = 0.1175/\Delta t \text{ (sn}^{-1}\text{)}$$

4.2.7. Serumda MDA Ölçüm Yöntemi

Serumda MDA saptanması Ohkawa'nın yöntemine göre yapıldı (62). % 0,67'lik TBA (2-Thiobarbutiric acid) çözeltisi ve n-butanol kullanıldı. Tiyobarbitürik asid ile MDA'nın reaksiyona girmesinden sonra reaksiyon ürünü n-butanol ile ekstrakte edildi. MDA standardı olarak, malonaldehit bis-(dimetil asetal) kullanılarak, 1-40 nmol'lük standartlar hazırlandı.

Örneklerdeki absorbanslar spektrofotometrede, 540 nm'de mikropate okuyucusunda okundu ve hesaplar otomatik olarak çizilen standart eğriden hesaplandı. Sonuçlar µM olarak verildi.

4.2.8. Plazmada TNF-α ölçüm yöntemi

Plazma TNF-α düzeyleri rat spesifik ELİSA kiti kullanılarak değerlendirildi. Standart rekombinant TNF-α eğrisi kullanılarak TNF-α konsantrasyonları hesaplandı. Değerler pg/ml olarak ifade edildi

5. Histopatolojik İnceleme

Alınan barsak örnekleri Adnan Menderes Üniversitesi Tıp Fakültesi Patoloji Anabilim Dalı laboratuvarında %4'lük formalin fiksasyonu sonrası rutin doku takip kesitler alınarak ışık mikroskopunda (Olympus, BX51, Tokyo, Japan) incelendi. Tüm örnekler uzman bir patolog tarafından 1'den 5'e kadar değişen mikroskopik hasar skorlamasına göre semikantitatif olarak değerlendirildi (63).

5.1. Skorlama:

Grade 1: Normal histoloji

Grade 2:(Minimal) Hidropik dejenerasyon ve/veya yüzeyel epitel hücrelerinin seperasyonu

Grade 3: (Hafif) Villus epitel hücre nekrozu

Grade 4: (Orta) Tam villus nekrozu

Grade 5: (Şiddetli) Transmural nekroz.

6. İstatistiksel analiz:

Çalışmanın istatistiksel değeriendirilmesinde; biyokimya incelemeleri için tek yönlü varyans analizi (ANOVA) ve post-hoc testler uygulandı. Sonuçlar ortalama (mean)±standart hata olarak verildi. Histopatoloji skorlarının kıyaslanması için Kruskal-Wallis ve Dunn testi kullanıldı, sonuçlar median±range olarak verildi. Çalışmamızda p değeriinin 0.05'den küçük olması gruplar arası anlamlı fark olduğunu göstermekteydi.

BULGULAR

Çalışmada Adnan Menderes Üniversitesi Tıp Fakültesi Farmakoloji AD. deneysel cerrahi laboratuvarında üretilmiş, ağırlığı ortalama 170-270 gr arasında değişen, sekizer adet erkek Wistar-Albino tipi sıçan bulunan toplam altı eşit grup mevcuttu. Biyokimyasal değerlerin ortalama değerleri ve standart hataları ile histopatolojik sonuçlar aşağıdaki tablo ve grafilerde gösterilmiştir.

1.Plazma Biyokimya İncelemeleri

TNF- α (pg/ml): III. grubun (30 dk. İskemi + 30 dk. Reperfüzyon) değerleri yalnızca kontrol grubundan yüksekti ($p=0,0079$).

Eritrosit GR (U/g Hb): Gruplar arasında fark yoktu ($p=0,0901$).

Eritrosit GSH-Px (U/g Hb): Kontrol grubu ve II.grubun (laparotomi + infliximab) değerleri diğer gruplardan yüksekti. III. grubun değerleri VI. gruptan (60 dk iskemi + 30 dk. Reperfüzyon + infliximab) yüksekti ($p=0,0006$).

Eritrosit SOD (ng/g Hb): III. grubun değerleri ve IV. grubun (30 dk iskemi + 30 dk. Reperfüzyon + infliximab) değerleri diğer gruplara göre düşüktü ($p<0,0001$).

Eritrosit GSH (mg/g Hb): Gruplar arasında fark yoktu ($p=0,2281$).

Eritrosit CAT (U/g Hb): II. grubun değerleri III. grup, IV. grup, V. grup (60 dk iskemi + 30 dk. Reperfüzyon) ve VI. Grubun değerlerinden yüksekti. III. grubun değerleri ise kontrol grubundan düşüktü ($p<0,0001$).

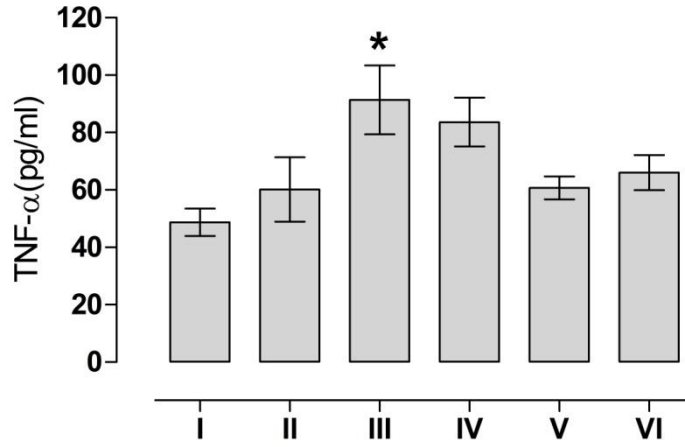
Serum NO ($\mu\text{mol/L}$): IV. grubun değerleri kontrol grubu, II.grup, V.grup ve VI. grubun değerlerine göre yüksekti ancak III. grup ile arasında anlamlı fark saptanmadı. Yine III. Grubun değerleri ise II.gruba göre yüksekti ($p<0,0001$).

Serum MDA (μM): Gruplar arasında fark yoktu ($p=0,0952$). (Tablo III)

Tablo III: Plazma biyokimyasal değişkenlerinin ortalama değerleri ve standart hataları.

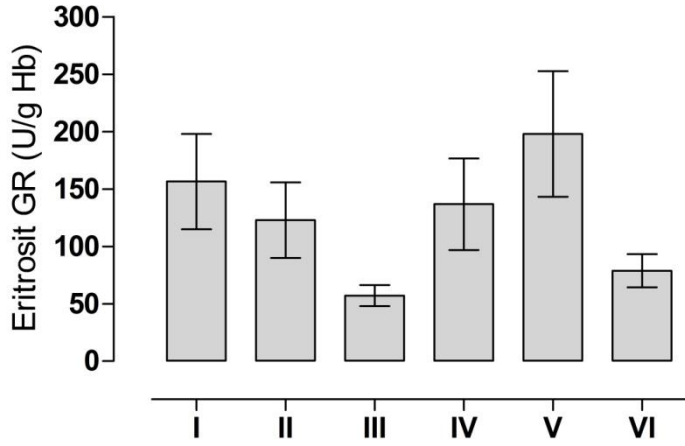
	TNF-alfa (pg/ml)	Eritrosit GR (U/g Hb)	Eritrosit GSH-Px (U/g Hb)	Eritrosit SOD (ng/g Hb)	Eritrosit GSH (mg/g Hb)	Eritrosit CAT (U/g Hb)	Serum NO (μ mol/L)	Serum MDA (μ M)
Kontrol	48,73 $\pm$ 4,8	156,4 $\pm$ 41,5	4,46 $\pm$ 0,3	1269 $\pm$ 76,8	2,46 $\pm$ 0,12	33,49 $\pm$ 2,4	71,91 $\pm$ 11,1	7,457 $\pm$ 0,9
Laparotomi + infliximab	60,13 $\pm$ 11,2	122,8 $\pm$ 32,9	4,02 $\pm$ 0,4 ²	1134 $\pm$ 63,0	2,32 $\pm$ 0,08	38,39 $\pm$ 5,1 ⁵	26,08 $\pm$ 4,9	7,651 $\pm$ 1,56
30 dk iskemi	91,41 $\pm$ 12,0 ¹	57,05 $\pm$ 9,2	1,880 $\pm$ 0,16 ³	502,6 $\pm$ 65,9 ⁴	2,324 $\pm$ 0,09	18,30 $\pm$ 1,056 ⁶	89,01 $\pm$ 8,8 ⁷	7,37 $\pm$ 1,5
İnfliximab + 30 dk iskemi	83,65 $\pm$ 8,4	136,7 $\pm$ 39,9	1,43 $\pm$ 0,1	549,8 $\pm$ 37,6	2,16 $\pm$ 0,05	24,38 $\pm$ 2,9	136,1 $\pm$ 15,5 ⁸	9,84 $\pm$ 0,7
60 dk iskemi	60,71 $\pm$ 3,9	197,9 $\pm$ 54,8	0,86 $\pm$ 0,2	1151 $\pm$ 124,1	2,22 $\pm$ 0,09	22,06 $\pm$ 1,63	76,99 $\pm$ 20,8	11,83 $\pm$ 1,6
İnfliximab + 60 dk iskemi	66,04 $\pm$ 6,1	78,70 $\pm$ 14,4	0,53 $\pm$ 0,07	1049 $\pm$ 98,8	2,37 $\pm$ 0,06	21,43 $\pm$ 0,91	48,75 $\pm$ 8,69	7,97 $\pm$ 0,6

1: III.grubun (30 dk. İskemi + 30 dk. Reperfüzyon) TNF- α değerleri yalnızca kontrol grubundan yüksekti (p=0,0079).
2: Kontrol grubu ve II.grubun (Laparotomi + infliximab) GSH-Px değerleri diğer gruplardan yüksekti (p=0,0006).
3: III.grubun GSH-Px değerleri VI. grubun (60 dk iskemi + 30 dk reperfüzyon + infliximab) GSH-Px değerlerinden yüksekti (p=0,0006).
4: III.ve IV.grubun (30 dk. İskemi + 30 dk. Reperfüzyon + infliximab) SOD değerleri diğer gruplara göre düşüktü (p<0,0001).
5: II.grubun CAT değerleri III. IV. grup, V. grup (60 dk iskemi + 30 dk reperfüzyon) ve VI. grubun CAT değerlerinden yüksekti (p<0,0001).
6: III.grubun CAT değerleri ise kontrol grubundan düşüktü (p<0,0001).
7: IV.grubun NO değerleri kontrol grubu, II., V. ve VI.grubların NO değerlerine göre yüksekti ancak III. grup ile arasında anlamlı fark saptanmadı (p<0,0001).
8: III. Grubun NO değerleri ise II gruba göre yüksekti (p<0,0001).



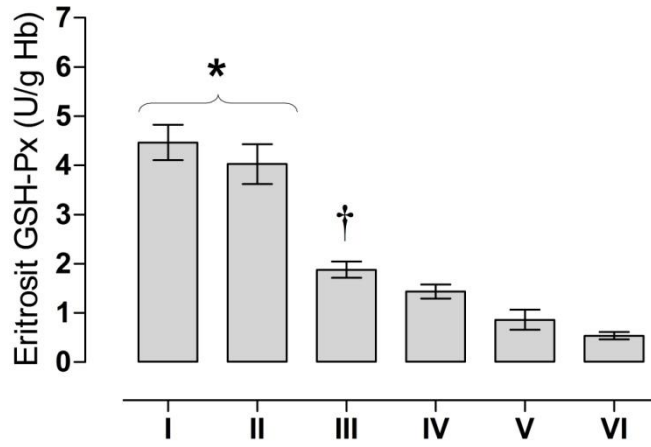
Şekil 5: Serum TNF-α değerlerinin gruplar arası karşılaştırılması

*III. grubun (30 dk. İskemi + 30 dk. Reperfüzyon) değerleri yalnızca kontrol grubundan yüksekti (p=0,0079).



Şekil 6: Eritrosit GR değerlerinin gruplar arası karşılaştırılması

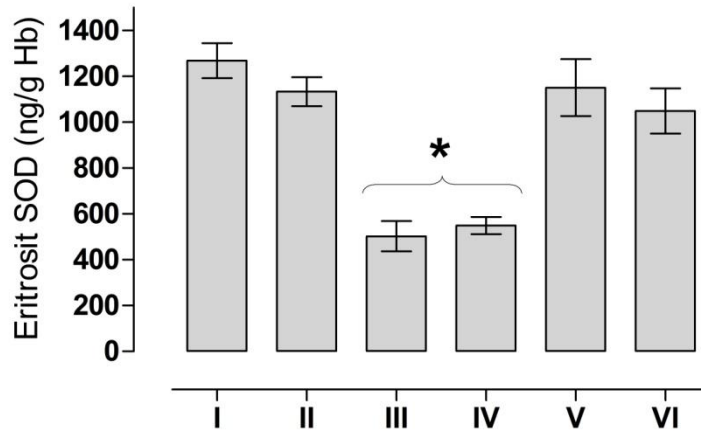
Eritrosit GR değerlerinin karşılaştırılmasında gruplar arasında fark yoktu (p=0,0901).



Şekil 7: Eritrosit GSH-Px değerlerinin gruplar arası karşılaştırılması

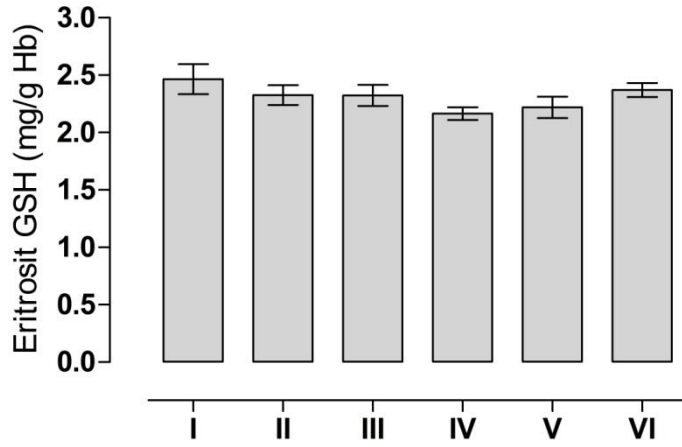
* Kontrol grubu ve II. grubun değerleri diğer gruplardan yüksekti.

† III.grubun değerleri VI.grubun değerlerinden yüksekti (p=0,0006).



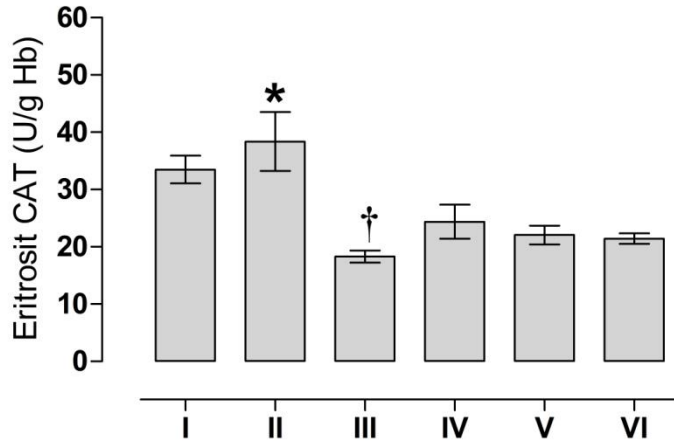
Şekil 8: Eritrosit SOD değerlerinin gruplar arası karşılaştırılması

* III.ve IV.grubun değerleri diğer gruplara göre düşüktü (p<0,0001).



Şekil 9: Eritrosit GSH değerlerinin gruplar arası karşılaştırılması

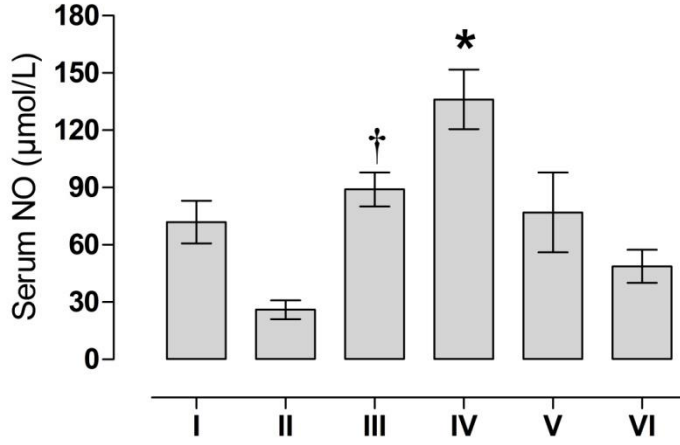
Eritrosit GSH değerlerinin gruplar arasında karşılaştırılmasında gruplar arasında fark saptanmadı ($p=0,2281$).



Şekil 10: Eritrosit CAT değerlerinin gruplar arası karşılaştırılması

* II.grubun değerleri III. Grup, IV. Grup, V.grup ve VI. grubun değerlerinden yüksekti.

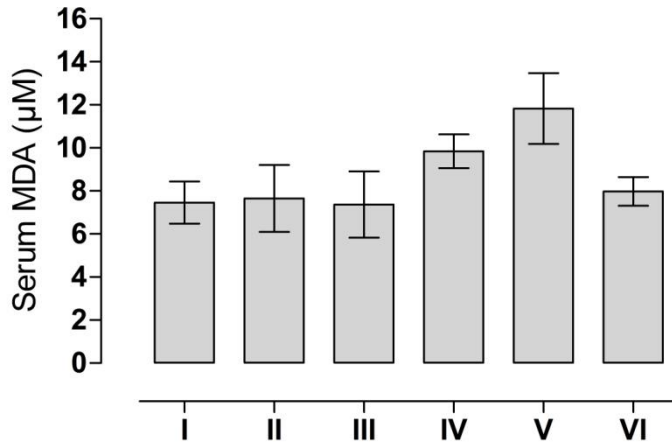
† III.grubun değerleri ise kontrol grubundan düşüktü ($p<0,0001$).



Şekil 11: Serum NO değerlerinin gruplar arası karşılaştırılması

*IV.grubun değerleri kontrol grubu, II.grup, V.grup ve VI.grubun değerlerine göre yüksekti ancak III. grup ile arasında anlamlı fark saptanmadı.

† III. grubun değerleri ise II.gruba göre yüksekti ($p<0,0001$).



Şekil 12: Serum MDA değerlerinin gruplar arası karşılaştırılması

Serum MDA değerlerinin karşılaştırılmasında gruplar arasında fark yoktu ($p=0,0952$).

2. Doku örneklerinin Biyokimyasal İncelemeleri

Doku TNF-alfa (pg/g): Gruplar arasında fark saptanmadı ($p=0,064$).

Doku GR (mU/g): IV grubun değerleri I, II ve V. gruptan yüksekti ($p=0,0015$).

Doku GSH-Px (mU/g): IV. grubun değerleri I, II, III ve VI. gruptan yüksek iken V. grupla aralarında fark yoktu ($p=0,021$).

Doku SOD (ng/g): III. grubun değerleri kontrol grubuna göre düşüktü ($p=0,0183$).

Doku GSH (mg/g): III. grubun değerleri II. gruba göre düşüktü ($p=0,0329$).

Doku CAT (U/g): IV. grubun değerleri I, II, V ve VI gruba göre yüksek iken III grup ile aralarında fark yoktu ($p=0,0003$).

Doku NO ($\mu\text{M}/\text{mg}$): IV. grubun değerleri I, II ve III. gruptan daha yüksekti ($p=0,0073$).

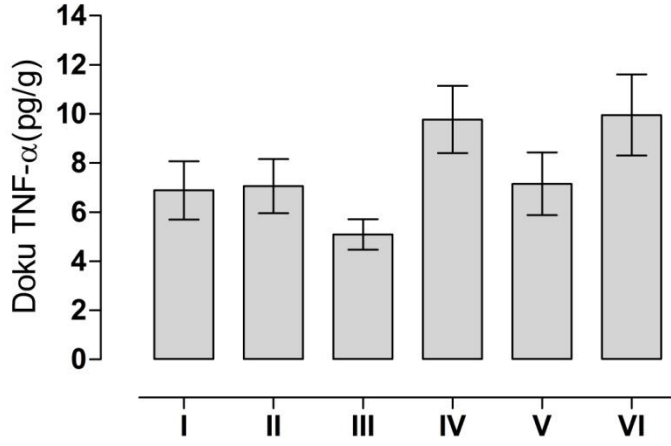
Doku MDA ($\mu\text{M}/\text{g}$): II grubun değerleri IV ve VI. gruptan daha yüksekti ($p=0,0064$).

Doku MPO (U/g): III grubun değerleri V gruptan daha yüksekti ($p=0,0065$). (Tablo IV)

Tablo IV: Doku örneklerinin biyokimyasal değişkenlerinin ortalama değerleri ve standart sapmaları.

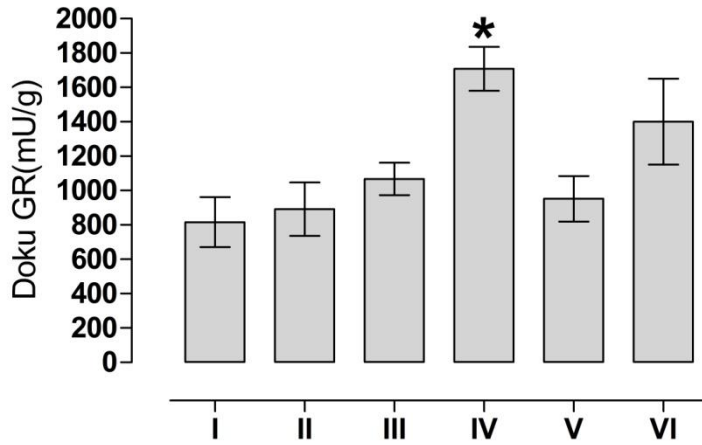
	Doku TNF-alfa (pg/g)	Doku GR (mU/g)	Doku GSH-Px (mU/g)	Doku SOD (ng/g)	Doku GSH (mg/g)	Doku CAT (U/g)	Doku NO (μmol/L)	Doku MDA (μM/g)	Doku MPO (U/g)
Kontrol	6,88±1,1	816,5±144,8	252,9±37,8	306,3±37,3	4,05±0,5	5,61±1,0	1,16±0,1	0,12±0,01	343,3±81,1
Laparotomi + infliximab	7,05±1,1	891,6±155,6	253,2±36,3	276,8±26,9	4,38±0,4	3,73±0,6	1,05±0,09	0,14±0,01 ⁷	246,2±67,5
30 dk iskemi	5,08±0,6	1068±94,9	163,6±19,7	194±13,1 ³	2,84±0,1 ⁴	8,14±1,5	1,22±0,1	0,11±0,01	686,9±16 ⁸
Infliximab + 30 dk iskemi	9,77±1,3	1709±128,2 ¹	472,2±93,1 ²	221,2±14,5	3,85±0,3	10,67±1,2 ⁵	2,84±0,6 ⁶	0,08±0,008	465,9±118,7
60 dk iskemi	7,15±1,2	952,1±132,4	319,4±42,8	251,4±11,4	3,28±0,2	4,68±0,6	1,4±0,3	0,11±0,009	152,9±32,4
Infliximab + 60 dk iskemi	9,95±1,6	1400±249,8	248,2±25,5	260,8±21,2	3,46±0,2	5,08±0,9	2,03±0,3	0,08±0,006	564,8±109,6

- 1: IV grubun GR değerleri I., II. ve V. gruplardan yüksekti (p=0,0015).
2: IV. grubun GSH-Px değerleri I., II., III. ve VI. gruplardan yüksek iken V. gruba aralarında fark yoktu. (p=0,021).
3: III. grubun SOD değerleri kontrol grubuna göre düşük bulundu. Diğer gruplar ile aralarında istatistiksel fark saptanmadı. (p=0,0183).
4: III. grubun GSH değerleri II. gruba göre düştü (p=0,0329). Diğer gruplar ile aralarında istatistiksel fark saptanmadı.
5: IV. grubun CAT değerleri I., II., V. ve VI. gruplara göre yüksek iken III. grup ile aralarında fark yoktu (p=0,0003).
6: IV. grubun NO değerleri I., II. ve III. gruplardan daha yüksekti (p=0,0073). Diğer gruplar ile aralarında istatistiksel fark saptanmadı.
7: II. grubun MDA değerleri IV. ve VI. gruplardan daha yüksekti (p=0,0064). Diğer gruplar ile aralarında istatistiksel fark saptanmadı.
8: III. MPO grubun değerleri V. gruptan daha yüksekti (p=0,0065). Diğer gruplar ile aralarında istatistiksel fark saptanmadı.



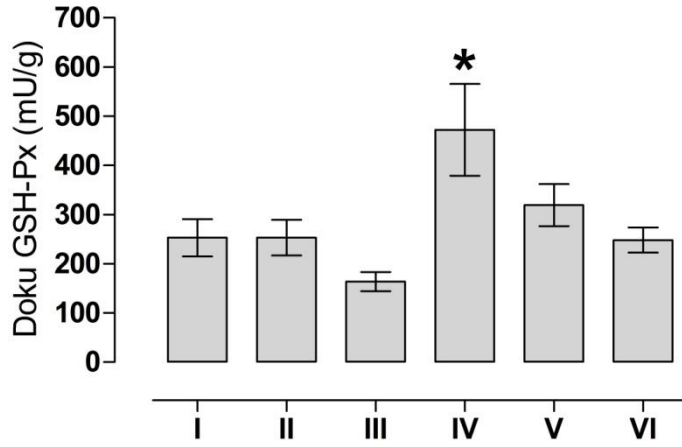
Şekil 13: Doku TNF- α değerlerinin gruplar arası karşılaştırılması

Doku TNF- α değerlerinin gruplar arası karşılaştırılmasında gruplar arasında fark saptanmadı ($p=0,064$).



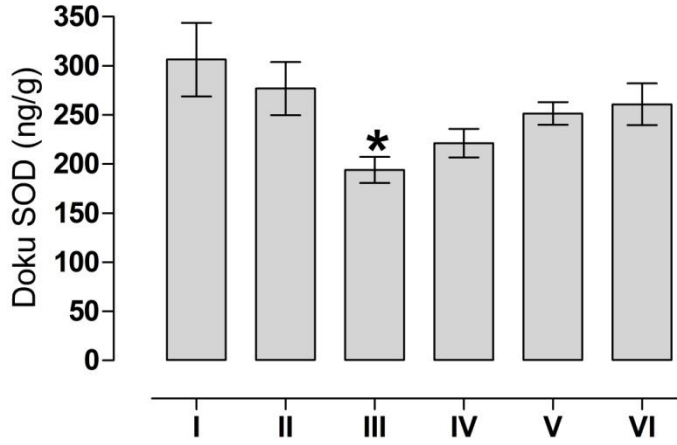
Şekil 14: Doku GR değerlerinin gruplar arası karşılaştırılması

*IV grubun değerleri I, II ve V. Gruptan yüksekti ($p=0,0015$).



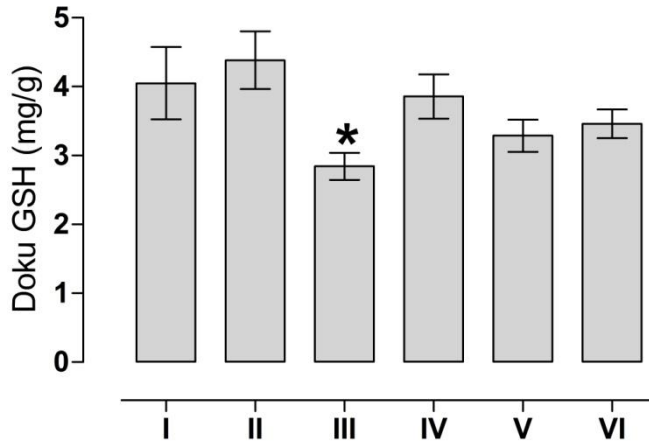
Şekil 15: Doku GSH-Px değerlerinin gruplar arası karşılaştırılması

*IV. grubun değerleri I, II, III ve VI. gruptan yüksek iken V. grupta aralarında fark yoktu (p=0,021).



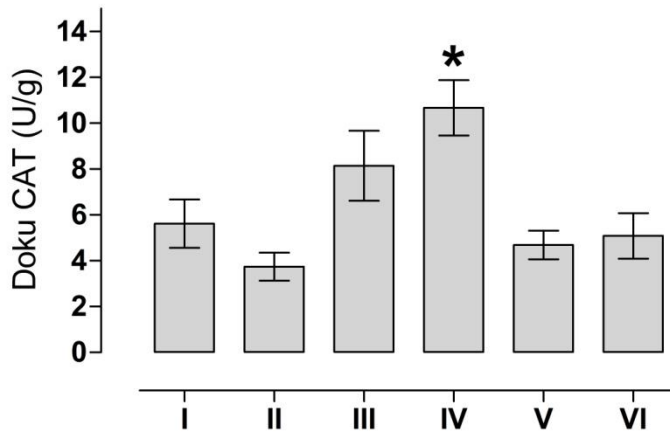
Şekil 16: Doku SOD değerlerinin gruplar arası karşılaştırılması

*III. grubun değerleri kontrol grubuna göre düşük bulundu. Diğer gruplar ile aralarında istatistiksel fark saptanmadı (p=0,0183).



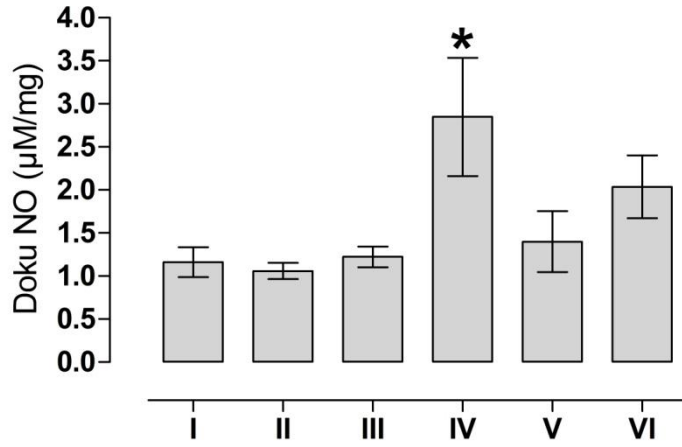
Şekil 17: Doku GSH değerlerinin gruplar arası karşılaştırılması

*III. grubun değerleri, II. gruba göre düşüktü ($p=0,0329$). Diğer gruplar ile aralarında istatistiksel fark saptanmadı.



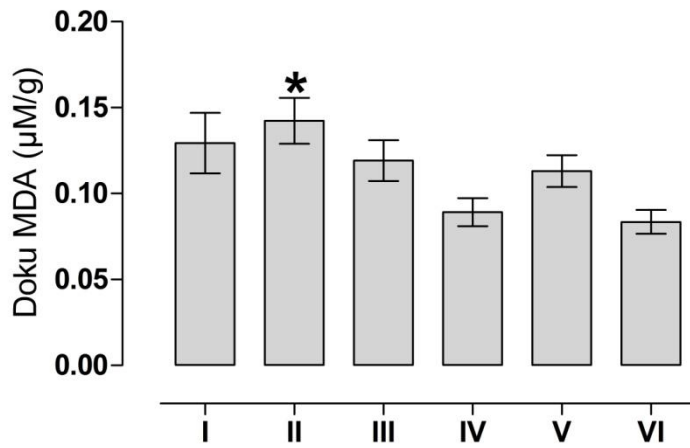
Şekil 18: Doku CAT değerlerinin gruplar arası karşılaştırılması

*IV. grubun değerleri I, II, V ve VI gruba göre yüksek iken III grup ile aralarında fark yoktu ($p=0,0003$).



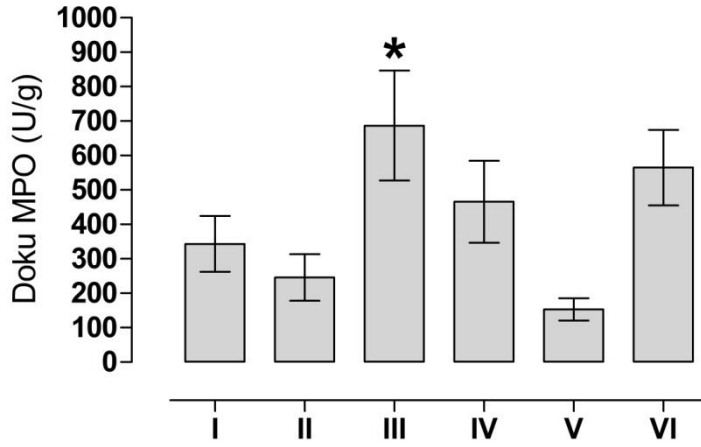
Şekil 19: Doku NO değerlerinin gruplar arası karşılaştırılması

*IV. grubun değerleri I, II ve III. gruptan daha yüksekti ($p=0,0073$). Diğer gruplar ile aralarında istatistiksel fark saptanmadı.



Şekil 20: Doku MDA değerlerinin gruplar arası karşılaştırılması

*II grubun değerleri IV ve VI. gruptan daha yüksekti ($p=0,0064$). Diğer gruplar ile aralarında istatistiksel fark saptanmadı.

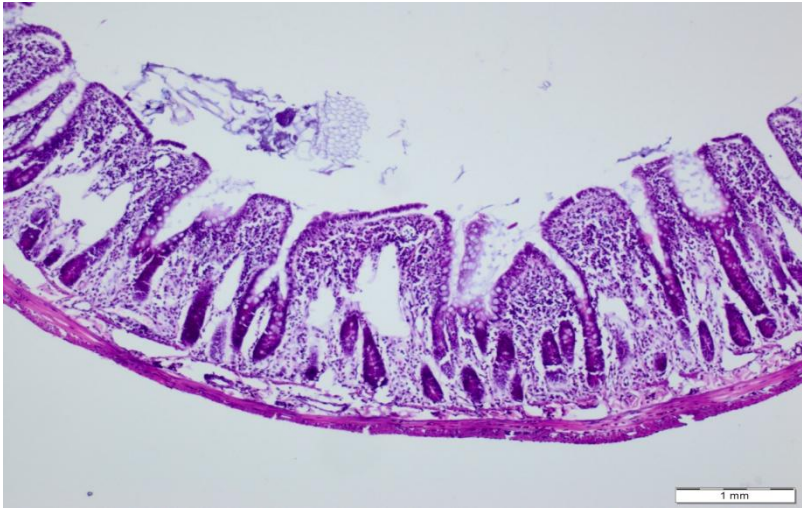


Şekil 21: Doku MPO değerlerinin gruplar arası karşılaştırılması

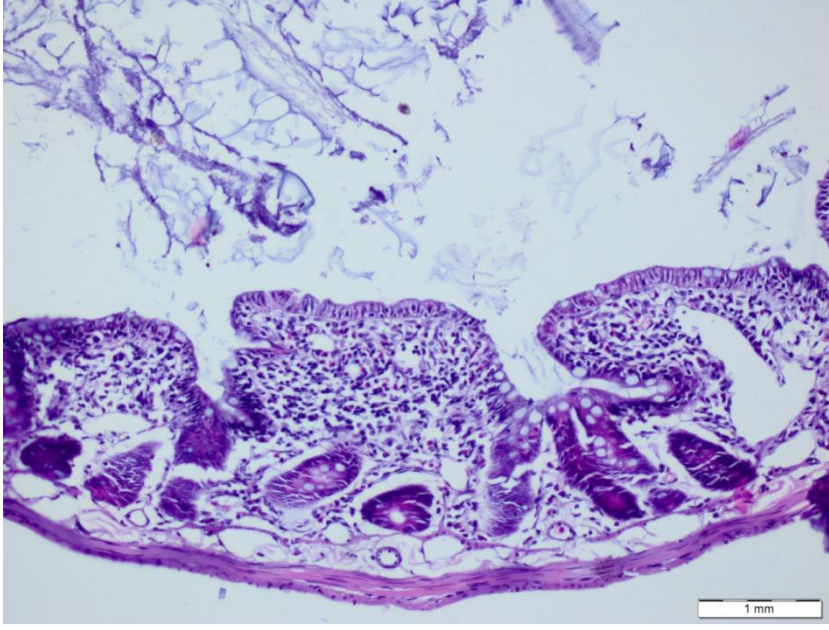
*III grubun değerleri V gruptan daha yüksekti ($p=0,0065$). Diğer gruplar ile aralarında istatistiksel fark saptanmadı.

3. Doku örneklerinin Histopatolojik İncelemeleri

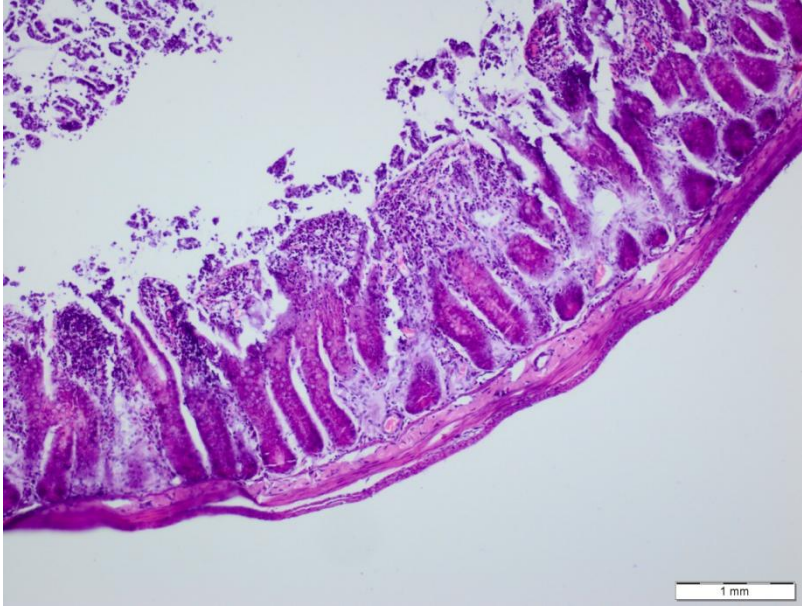
Histopatolojik incelemede mikroskopik hasarlama skorlamasına göre genel olarak tedavi gruplarının skorlarının I/R gruplarının skorlarına göre daha düşük olduğu görüldü.



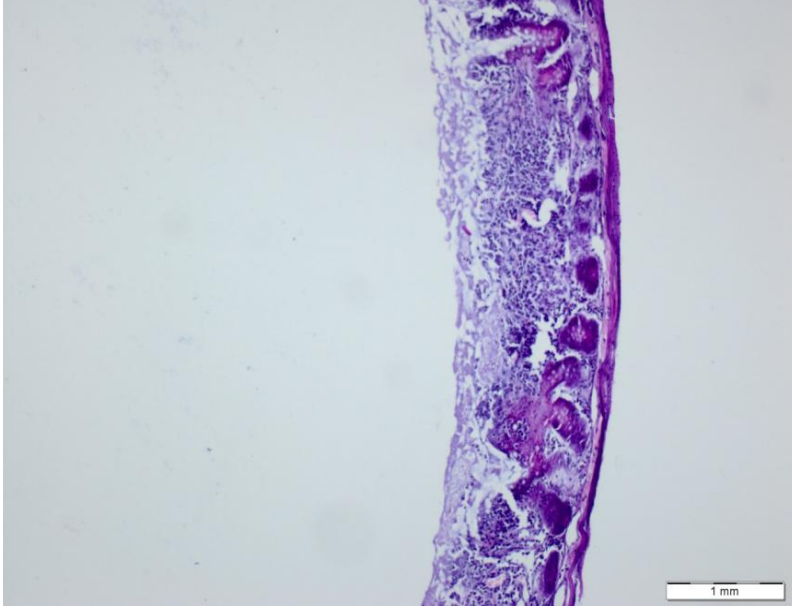
Resim 7: Grade I; normal histoloji (HEx100)



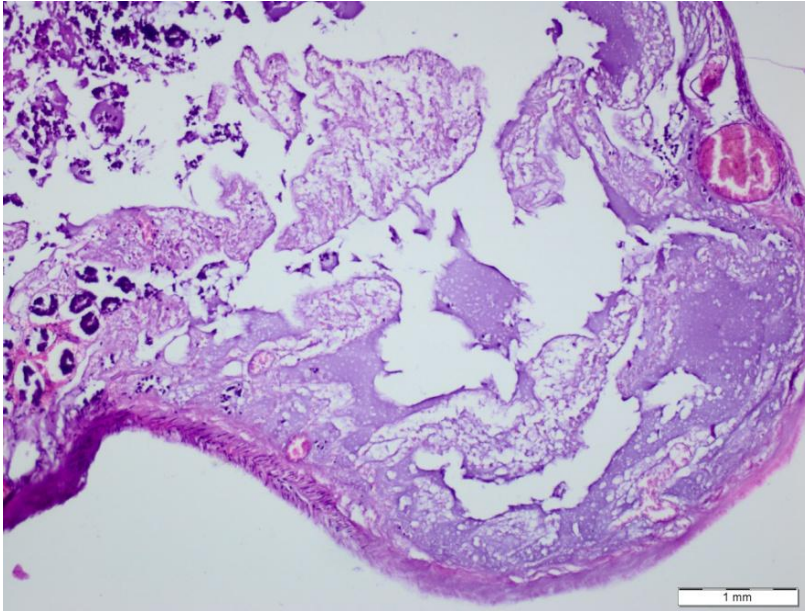
Resim 8: Grade II; Hidropik dejenerasyon ve yüzey epitelinin seperasyonu (HEx100)



Resim 9: Grade III; Villus epitelyum hücre nekrozu (HEx100)



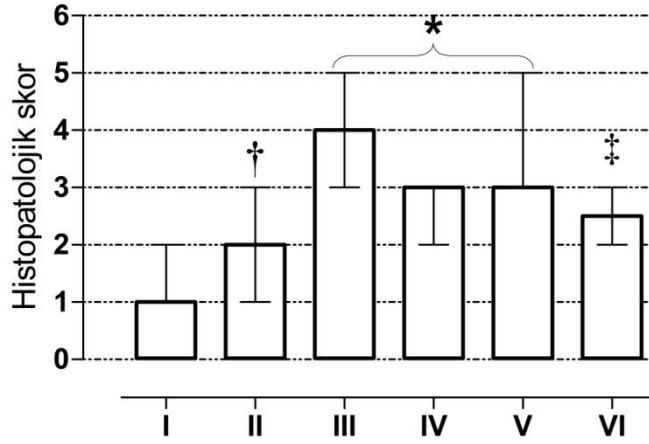
Resim 10: Grade IV; Tam villus nekrozu (HEx100)



Resim 11: Grade V; Şiddetli transmural nekroz (HEx100)

Tablo V: Histopatolojik skorlama

	Minimum	%25 Percentile	Median	%75 Percentile	Maksimum
Kontrol	1	1	1	2	2
Laparotomi + infliximab	1	1,25	2	2	3
30 dk iskemi	3	4	4	5	5
İnfliximab + 30 dk iskemi	2	3	3	3	3
60 dk iskemi	3	3	3	3,75	5
İnfliximab + 60 dk iskemi	2	2	2,5	3	3



Şekil 22: Histopatolojik olarak grupların karşılaştırılması

* III, IV ve V. grubun kontrol grubundan daha yüksek skoru olduğu saptandı.

† II. grubun skoru III ve V. gruptan düşüktü.

*VI grubun skoru III. gruptan düşüktü ($p<0,0001$).

TARTIŞMA

İskemi, dokuya oksijen taşınmasının engellenmesi ile ortaya çıkan, hücrenin oluşturduğu dokunun tamamen fonksiyonsuz kalmasına neden olan patolojik bir tablodur. Bu tabloya dokuya gelen kan akımının azalması ya da tamamen kesilmesi yol açmaktadır. Reperfüzyon ise kesilen ya da azalan kan akımının yeniden sağlanması sonucu dokunun yeniden beslenmesi durumudur (2, 3). Dokunun canlılığı için iskemiye takiben reperfüzyon kaçınılmaz iken reperfüzyon hasarının tek başına iskeminin yaptığı hasardan daha zararlı olduğu gösterilmiştir (64).

Akut intestinal iskemi zemininde gelişen intestinal I/R hasarına bağlı klinik tablo günümüzde halen genel cerrahi yoğun bakım ünitelerinde tedavisi yüz güldürücü olmayan, yüksek mortalite ile seyreden bir durumdur. İntestinal mukoza I/R hasarına oldukça hassastır. Bunun muhtemel sebebi SOR'nin temel kaynağı olan ksantin oksidazı en fazla bulunduran doku olmasıdır (65). İntestinal iskemiye takiben dokuda artan SOR barsak mukozasında hasara yol açmakta ve bunun sonucunda bakteriyel translokasyon gelişip lümeninde lokalize olan inflamasyon tüm sisteme yayılmaktadır. Tüm bu olaylar sırasında oluşan reperfüzyon ile I/R hasarı başlamakta ve antioksidan savunma artan SOR'nin neden olduğu membran hasarını engelleyememektedir. Bu süreçte olay sadece intestinal dokuda sınırlı kalmayıp jeneralize sistemik inflamasyona neden olmakta ve pulmoner, hepatik ve vasküler yataktaki inflamasyon uzak organ hasarına yol açmaktadır (8). Bu nedenle multipl organ yetmezliği tablosuna yol açan I/R hasarını engellemek için bugüne dek çok sayıda fizyolojik ve farmakolojik ajan üzerinde çalışmalar yapılmıştır. Schmeling ve ark. (66) yaptıkları bir çalışmada ratlarda ince barsakta 120 dakika iskemi ve 60 dakika reperfüzyon yapıp antiinflamatuvar etkili diklofenak sodyum kullanmışlar ve bu ajanın I/R hasarını azalttığını söylemişlerdir. Yine Ceran ve ark. (67) yaptıkları çalışmada ratlarda 45 dakika iskemi ve 60 dakika reperfüzyon yapmışlardır. İşlemden iki saat önce bilirubin vermişler ve bilirubinint intestinal I/R hasarını azalttığını göstermişlerdir. Yoshida ve ark. (68) yaptıkları çalışmada ise ratlara ince barsakta 40 dakika iskemi ve 110 dakika reperfüzyon yapıp E vitamini, selenyum ve taurini karşılaştırmışlardır. Sonuç olarak selenyumun diğerlerinden antioksidan etkinliğinin daha fazla olduğunu söylemişlerdir.

İnflamasyon sistemin kendisini koruması için, hasarlı ve nekrotik dokulara karşı organları savunucu temel koruyucu bir cevaptır. Fakat bu hasarlı dokulara karşı sistemin

korunması yanında normal fonksiyonlu hücre ve dokuların da zarar görmesi inflamasyonun birçok immun hastalık ve sendromdaki patolojisinin nedenidir. İnflamasyonda rolü olan mediatörlerden en önemlilerinden birisi sitokinlerdir. TNF- α makrofaj ve lenfositlerden salgılanan proinflamatuvar bir sitokin olup sitokinlerin salınmasını, lökosit migrasyonunu ve adezyonunu, vasküler permeabilitede geçirgenliğin artmasını engelleyerek doku hasarını azalttığı gösterilmiştir (47). I/R hasarındaki rolü de önemlidir (14). İntestinal I/R hasarında SOR'nin etkisi ile birlikte doku hasarına yol açtığı gösterilmiştir. Bu sebepten bu proinflamatuvar sitokinin etkinliği azaltıcı ajanlar bulunmuştur.

Salgılanmış TNF- α 'nın etkisini azaltıp nötralize edici ajanlardan birisi de bir monoklonal anti-TNF antikoru olan infliximabtır. Çok sayıda in vitro incelemede infliximabın TNF- α 'nın fonksiyonel aktivitesini inhibe ettiği gösterilmiştir (69). Günümüzde birçok inflamatuvar ve otoimmün hastalıkta kullanım endikasyonları olduğu gibi inflamatuvar durumların spesifik, sitokine yönelik yaklaşımlar ile tedavisi dahiliye ve cerrahinin klinik uygulamalarında önemli bir rol alacak gibi görünmektedir (70). İnfliximabın I/R hasarını antiinflamatuvar etkinliğini araştırmak için çeşitli merkezlerde deneysel çalışmalar yapılmıştır. Guven ve ark.(71) ratlarda spinal kordun I/R hasarı üzerine yaptıkları çalışmada infliximabın antiinflamatuvar etkinliği olduğunu göstermişlerdir. Yine Mahmoud ve ark.'nın (72) karaciğer dokusundaki I/R hasarında infliximabın antioksidan ve antiinflamatuvar etkili oldukları deneysel olarak gösterilmiştir. Ayrıca Guzel ve ark.'nın (14) akut akciğer yetmezliğinde oluşan I/R hasarında infliximabın olumlu etkileri olduğunu gözlemişlerdir. Bunlardan yola çıkılarak mezenter iskemide oluşan intestinal I/R hasarını önlemek için infliximabın etkinliği araştırılmıştır. Pergel ve ark. (26) intestinal I/R hasarını önlemede infliximabın antiinflamatuvar etkinliğini deneysel olarak çalışmışlardır. Bu çalışmada MDA gibi nötrofil infiltrasyonu ve inflamasyon belirteci olabilecek markerlar ile GSH-Px ve SOD gibi antioksidan markerlar kullanmışlar ve infliximab tedavisi verilen gruplarda I/R hasarına bağlı oluşan doku hasarının azaldığını göstermişlerdir. Biz de çalışmamızda bu çalışmalar ve bilgiler doğrultusundan yola çıkarak farklı iskemi ve reperfüzyon sürelerinde infliximabın intestinal I/R hasarı üzerine antiinflamatuvar ve antioksidan etkinliğini araştırdık.

TNF- α proinflamatuvar bir sitokin olup inflamasyon anında ilk salgılanan mediatörlerdendir. Bu sebeple I/R hasarı ve septik şokta görevi olan öncül sitokinlerdendir. Sorkine ve ark. (7) intestinal mukozal bariyerin bozulması sonucu kana geçen endotoksinlerin TNF- α salınımını arttırdığını göstermişlerdir. Biz de çalışmamızda inflamasyon belirtecinin

göstergelerinden birisi olarak dokuda ve kanda TNF- α düzeyleri üzerinde çalıştık. Serum TNF- α değerlerine bakıldığında III. grubun (30 dk iskemi + 30 dk reperfüzyon) değerlerinin infalamasyona bağlı olarak yükseldiği ve IV. grubun (infliximab + 30 dk iskemi + 30 dk reperfüzyon) değerlerinin de bu gruptan daha düşük olduğu ancak istatistiksel bir fark saptanmadığı görülmüştür. İskemi sürelerinin 60 dakikaya çıkarıldığı gruplarda ise herhangi bir fark saptanmamıştır. İstatistiksel olarak anlamlı bulunan ise III. grubun değerlerinin kontrol grubuna serum TNF- α değerlerinin artmış olması idi ($p=0,0079$). Doku TNF- α değerlerine bakıldığında ise gruplar arasında anlamlı bir fark saptanmadı. Caty ve ark. (73) tavşanlarda yaptıkları çalışmada çeşitli sürelerde iskemi ve reperfüzyon yapıp tedavi gruplarına anti-TNF antikoru vermişlerdir. Plazmada bakılan TNF- α düzeylerinde ise 120 dakika iskemi yapılan gruba dek TNF- α düzeyine değişiklik gözlememişlerdir. TNF- α intestinal vasküler yataktaki makrofajlardan salgılandıktan sonra portal ven yoluyla ortalama 30 dakikada sistemik salınımına geçer. Ancak yapılan çeşitli çalışmalar ve bu konu ile ilgili yayınlanan literatürleri taradığımızda bu yolla sistemik geçiş katıldığında kayda değer pik değerinin ortalama 90-120 dakika içinde olduğu dikkat çekmektedir (14, 74). Bizim çalışmamızda ise iskemi süreleri 30 ve 60 dakika reperfüzyon süreleri ise 30 dakika olduğu için anlamlı fark olmamasının buna bağlı olabileceğini düşündük. Bu yüzden TNF- α düzeylerinin daha uzun iskemi ve reperfüzyon sürelerinde ve aralıklarında bakılmasının daha faydalı olacağını düşündük.

İntestinal I/R hasarında ksantin oksidaz enzimi ile başlayan ve SOR'nin oluşması ile devam eden tablo multipl organ yetmezliğine dek sürmektedir. SOR'nin oluşturduğu membran hasarını engellemek için endojen enzimatik antioksidanlar devreye girmektedir (4, 38). Biz de çalışmamızda membran hasarını ve dolayısı ile doku hasarını koruyucu enzimatik antioksidanların kan ve doku değerlerini çalıştık. GR hem sitozol hem de mitokondride bulunan ve hücreyi zararlı etmenlerden koruyan bir endojen enzimatik antioksidandır. GR, GSSG'den GSH'nin tekrar elde edilmesi için çok önemlidir. I/R hasarında oluşan SOR'ne karşı hasarlı dokuda çeşitli tepkimelerde rol alarak antioksidan olarak dokunun hasara karşı korunmasında rol alır (41). Bu şekilde SOR ile reaksiyona girdikleri ve ayrıca NO oluşumuna yol açtıkları ileri sürülmektedir. Çalışmamızda eritrositlerde bakılan GR değerleri karşılaştırdığında gruplar arasında anlamlı fark saptanmamıştır. Dokuda bakılan GR değerlerinde ise I/R yapılan III. ve V. gruplarda GR değerlerinin düştüğü ve tedavi verilen IV. ve VI. gruplarda GR değerlerinin yükseldiği gözlenmiştir. İstatistiksel olarak bakıldığında ise IV. grubun değerlerinin kontrol grubu, II. ve

V. grubun değerlerinden anlamlı olarak yüksek olduğu gözlenmiştir ($p=0,0015$). I/R hasarında oksidatif strese SOR'nin artıp antioksidanların azalması yönünde değişen dengeler bizim çalışmamızda da gözlenmiş ve infliximab verilen gruplarda da bu dengenin GR değerinde artma yönünde değiştiği gözlenmiştir. Ancak eritrosit değerlerinde bu tablo gözlenmemiştir.

SOR'nin dokuda oluşturduğu hasara karşı dokular GSH-Px, SOD, katalaz gibi enzimler taşırlar. Bu enzimler de SOR ve H_2O_2 'yi temizleyip inaktive ederler (53). Bu sebeple bu enzimlerin ölçümü de oksidatif hasar ve I/R hasarında doku hasarı hakkında indirekt bilgi sahibi olmamızı sağlar. Glutasyon peroksidaz, fagositik hücrelerin zarar görmesini önleyen, eritrositlerde oksidatif strese karşı en etkili antioksidanlardandır. I/R hasarında GSH-Px aktivitesindeki azalma şiddetli hücre hasarına yol açar (75). Pergel ve ark. (26) yaptıkları çalışmada I/R hasarı yapılan grupta GSH-Px değerlerinde düşme ve infliximab ile tedavi edilen grupta GSH-Px değerinde yükselme saptamışlardır. Ancak bazı otörler hepatik I/R hasarında GR ve GSH-Px değerlerinde değişiklik olmadığını göstermişlerdir (76). Bizim çalışmamızda kontrol grubu ve II. grubun eritrosit GSH-Px değerleri diğer grupların değerlerinden yüksek idi ($p=0,0006$). Yine III. grubun eritrosit GSH-Px değerleri VI. grubun değerlerinden yüksek bulundu. Kontrol grubu ve II. grupta herhangi bir iskemi ve reperfüzyon işlemi yapılmadığı için burada SOR'nin olmaması, diğer gruplarda ise tedavi dahi verilse sonuçta bir inflamasyon tablosu ve I/R hasarı olması GSH-Px değerinin düşük çıkma sebebi olarak gösterilebilir. VI.grupta tedavi verilmesine rağmen III. gruptan düşük GSH-Px değeri saptanması bu gruptaki şiddetli doku hasarına cevabın bir göstergesi olarak düşünülebilir ve 60 dakika iskemide tedaviye rağmen oluşan doku hasarının 30 dakika iskemiden çok daha fazla olduğu söylenebilir. Doku GSH-Px değerlerinde ise IV. grubun değerleri ile V. grubun değerleri arasında fark saptanamaz iken IV. grubun değerleri diğer gruplardan anlamlı derecede yüksek bulundu ($p=0,021$). Bu sonuçlar yine I/R yapıp tedavi verilen grupta GSH-Px değerlerinin doku hasarına karşı direnç gösterdiğinin göstergesi olarak kabul edilebilir. Ancak V. grup ile arasında fark olmaması yine 60 dakika iskeminin tedaviye rağmen 30 dakika iskemi yapılan durumdan çok daha fazla doku hasarına yol açtığı olarak yorumlanabilir.

En önemli enzimatik antioksidanlardan bir diğeri SOD olarak kabul edilebilir. Membran hasarını önlemede önemli role sahip bir enzimdir. Lipid peroksidasyonunu inhibe edip MDA gibi zararlı son ürünlerin oluşumunu önlemeye katkıda bulunur (43). Guven ve ark. (71) yaptıkları bir çalışmada tavşanlarda spinal kord I/R hasarı oluşturmuşlar ve tedavi

grubuna infliximab vermişlerdir. I/R hasarı olan grupta SOD değerleri düşük çıkarken tedavi grubunda bu değerler yüksek bulunmuştur. Bizim çalışmamızda eritrosit SOD değerleri III. grup ve IV. grupta diğer gruplara göre düşük bulundu ($p<0,0001$). Doku SOD değerlerinde ise yine III. grubun değerleri kontrol grubuna göre düşük iken diğer gruplar ile arasında anlamlı fark saptanmadı ($p=0,0183$).

Katalaz, H_2O_2 'i parçalayarak hücre membran hasarını önleyen böylece SOR'nin doku hasarı oluşturmalarını inhibe eden endojen antioksidan bir enzimdir (24). I/R hasarında lipid peroksidasyonu sonucu ortaya çıkan zararlı ürünlere karşı membran hasarını önlemede etkin rolü olduğu düşünülmektedir. İskemi ve inflamasyon sonucu doku bütünlüğünün zarar görmesi ile önce lokalize alanda, sonra da sistemik olarak işlevsellik kazanır. Biz de bu verilerden yola çıkarak doku hasarını ve tedaviye yanıtı indirekt değerlendirmek amacıyla çalışmamızda doku ve eritrositte CAT değeri ölçümü yapıp gruplar arasında karşılaştırdık. Eritrosit CAT değerlerinin karşılaştırdığımızda II.grubun değerleri III. grup, IV. grup, V.grup ve VI. grubun değerlerinden yüksekti. III. grubun değerleri ise kontrol grubundan düşüktü ($p<0,0001$). Bu veriler ışığında herhangi bir I/R işlemi yapmayıp sistemik olarak dolaşıma verdiğimiz (II. grup) infliximabın diğer I/R hasarı oluşan gruplardan ve hatta tedavi ettiğimiz gruplardan daha yüksek değerde CAT sonucu oluşturduğu ve infliximabın antioksidan etkinliği olduğunu düşünebiliriz. Ancak tedavi verdiğimiz gruplarda, I/R yaptığımız gruplara oranla değişiklik olmaması oluşan I/R hasarının yarattığı doku hasarına etkin bir tedavi dozu ya da etkin sürede olmadığını göstermektedir. Doku CAT değerlerine baktığımızda ise I/R hasarı yaptığımız gruplarda CAT değerleri tedavi verdiğimiz gruplardan daha düşük olarak gözlemlendi. Bu da inflamasyona bağlı oksidatif stresin göstergesi ve tedavinin etkin olduğunu göstermektedir. Ancak istatistiksel olarak bakıldığında IV. grubun değerleri kontrol grubu, II.grup , V. grup ve VI. grubun doku CAT değerlerinden yüksek bulunurken III. grup ile arasında anlamlı fark saptanmadı ($p=0,0003$). Demir ve ark. (77) yaptığı çalışmada lökositlerin inflamasyon sahasına geliş süresinin saatler sürdüğü ve erken dönemde SOR ile antioksidanların sağlıklı veriler olamayacağını bildirilmiştir. Doku CAT değerlerinde tedavi verilen IV. grup ile aynı sürede I/R yapılan III. grup arasında fark saptanmamasının nedeni iskemi ve reperfüzyon süresinin 30'ar dakika olması olabilir. Bu sebeple antioksidan enzimlerin indirekt etkinliği açısından farklı sürelerde kan ve dokuda bakılması daha faydalı olabilir.

Glutasyon, strese ve zamana bağılı olarak düzeyi artan bir parametredir. Direkt olarak serbest radikal temizleyicisi olarak görev yapan GSH, aynı zamanda, H_2O_2 'in H_2O 'ya indirgenmesini ve katalize eden bir enzim olan GSH-Px enziminin ko-substratıdır. Bu sırada lipid hidroperoksidler GSH'yi, disülfid şekline (GSSG) okside ederler. Eğer bu oran GSSG lehine değişir ise, yani GSSG oranı daha da yükselir ise, bu hücreler için oldukça zararlı olmaktadır. Sitozolik bir enzim olan glutasyon redüktaz, GSSG'den GSH'nin tekrar elde edilmesi için çok önemlidir. Bütün aeroblarda, hücrelerde redoks durumlarının sürdürülebilmesi için mutlak surette glutasyonun indirgenmiş formunda yani GSH olarak tutulması gerekmektedir (42). Teke ve ark. (18) ratlarda yaptıkları çalışmada 60 dakika iskemi ve 120 dakika reperfüzyonu oluşturdıkları grup ile aynı sürelerde pirilodin ditiyokarbamat verdikleri grubu karşılaştırmışlardır. I/R grubunda doku GSH değerleri düşerken tedavi verilen grupta doku GSH değerlerinin anlamlı derecede yüksek olduğunu saptamışlardır. Bizim çalışmamızda eritrosit GSH değerlerine baktığımızda tüm gruplarda birbirine yakın değerler olduğunu ve aralarında istatistiksel olarak anlamlı fark olmadığını gözledik. Doku GSH değerlerinde ise I/R hasarı olan grupların değerleri tedavi gruplarından daha düşük olarak görüldü. İstatistiksel olarak ise III. grubun değerleri II. gruba göre düşüktü ($p=0,0329$). Diğer gruplar ile arasında anlamlı fark saptanmadı. Endojen bir antioksidan olan GSH'un infliximab verilen II. grupta yükselmesi ve 30 dakika iskemi ve sonrasında 30 dakika reperfüzyon hasarı yaptığımız grupta düşmesi literatürdeki bilgilere paralel olup infliximabın dokuda lokalize antioksidan etkisini göstermektedir. Ancak eritrosit değerlerinde fark saptanmaması sistemik etkinlik konusunda yeterli olmadığını düşündürmektedir.

NO endotel hücreleri tarafından salınan süperoksit radikallerini nötralize edebilen endotel koruyucu bir ajan iken aynı zamanda doku harabiyetine de yol açabilen bir SOR'dır. Nitrik oksid sentetaz vasıtasıyla antimikrobiyal aktiviteye sahip savunmacı bir fonksiyonu varken, süperoksit radikali ile etkileşince peroksinitrit oluşur ve fizyolojik etkisi inhibe edilip oksidatif etkisi ortaya çıkar. Bu yüzden NO'nin SOR ile etkileşimi ile antioksidan özelliği çelişkilidir. Kısacası NO akut inflamatuvar süreçte hem koruyucu hem de hasar arttırıcı bir molekül olarak gösterilebilir (35). I/R hasarı sonrasında süperoksit dengesinde süperoksit yönünde kayma olup önce vasküler hasar sonrasında da doku hasarı olduğu bildirilmiştir (78). Bizim çalışmamızda serum NO değerlerinin karşılaştırılmasında IV. grubun değerleri kontrol grubu, II.grup, V.grup ve VI.grubun değerlerine göre yüksekti ancak III. grup ile arasında anlamlı fark saptanmadı. III. grubun değerleri ise II.gruba göre yüksekti ($p<0,0001$). Doku

NO değerlerinin karşılaştırılmasında ise IV. grubun değerleri kontrol grubu , II. grup ve III. grubun değerlerinden yüksek iken diğer gruplar ile arasında fark saptanmadı ($p=0,0073$). Özellikle 60 dakika iskemi yapılan gruplarda fark saptanmaz iken 30 dakika iskemi yapıp infliximab uyguladığımız grubun değerlerinin diğer gruplardan yüksek çıkması NO'in yarılanma ömrünün çok kısa olmasına bağlı olabilir (79). Ayrıca tedavi grubunda NO değerinin yüksek çıkması oluşan inflamasyona bağlı vasküler yatakta vazodilatasyon olduğunu ve bu bölgede doku hasarına karşın lokalize olarak NO'in antioksidan savunma yaptığını düşünebiliriz. Ancak yine de bizim çalışmamızda bu veriyi destekleyecek kanıtımız yoktur.

Vücuttaki ciddi bir travmadan sonra SOR'nin etkisi ile lipid peroksidasyonu başlamaktadır (56). MDA lipid peroksidasyonunun son ürünü olup yağ asidi oksidasyonunun spesifik bir gstergeci olmayıp lipid peroksidasyonunun derecesiyle iyi korelasyon göstermektedir. Membran iyon transportunu, akışkanlığını, enzim aktivasyonunu ve deformasyon kabiliyetini bozar. Böylece sitotoksisiteye, mutajen oluşumuna, membran yıkımına yol açar (39). MPO ise fagositik nötrofillerden salgılanan bir enzim olup hidrojenperoksit ve süperoksit radikali ile birlikte hipoklorik asit oluşumunu katalizler ve böylece bakterisidal bir etki göstermektedir. İskemi esnasında ortamda bulunan MPO düzeyi 5-7 kat artarken reperfüzyon esnasında 18 kata kadar artabilmektedir. Bu yüzden ortamda bulunan nötrofil sekestrasyonunun kantitatif bir gstergeci olarak kabul edilebilir (40, 80). Koga ve ark. (40) yaptıkları çalışmada ratlarda 60 dakika iskemi ve 24 saat reperfüzyon yapmışlar ve bu süre sonunda serum MPO değerlerinde yükselme bulmuşlardır. Güven ve ark. (71) tavşanlarda spinal kordda I/R hasarı üzerine yaptıkları çalışmada ise iskemi yapılıp 48 saat reperfüzyon yapıldıktan sonra bakılan değerlerde doku MDA değerlerinin yükseldiğini görmüşlerdir. Bizim alışmamızda serum MDA değerlerine baktığımızda tüm grupların birbirine yakın değerlerinin olduğunu ve istatistiksel olarak anlamlı fark saptanmadığını gördük. Doku MDA değerlerinde ise I/R yapılan grupların değerleri tedavi gruplarına gore yüksek bulunurken istatistiksel bakıldığında anlamlı olarak II grubun değerleri IV. ve VI. gruptan daha yüksekti ($p=0,0064$). Doku MPO değerlerinde ise III grubun değerleri V gruptan daha yüksekti ($p=0,0065$). Diğer gruplar ile aralarında istatistiksel fark saptanmadı. Bu sonuçlara bakılınca doku MDA değerleri literatürlerdeki bilgilerle paralellik gösterirken I/R hasarı olmayan II. grupta yüksek çıkması bu paralelliği bozmaktadır. MPO değerlerinde ise reperfüzyon süresi uzadıķa değerin daha yüksek çıkması beklendiği için

anlamlılık görülememiştir. Nötrofillerden salınan ve indirekt nötrofil sekestrasyonunun belirteci olarak kabul edilen MPO için Koga ve ark. (40) tarafından yapılan diğer çalışmada reperfüzyon süresi 24 saat olarak belirlenmiş ve bu süre sonunda I/R hasarı olan grupta MPO değeri yüksek çıkarken E vitamini ile tedavi verilen grupta bu değerin düştüğü görülmüştür. Bilindiği gibi inflamasyon başlangıcından sonra lökositlerin inflamasyon sahasına geliş süresinin saatler almaktadır ve bu nedenle erken dönemde lökositler ile bakılan belirteçler sağlıklı sonuçlar veremeyebilir (77). Bizim çalışmamızda da iskemi ve reperfüzyon süreleri 30 dakika ve 60 dakika gibi kısa süreler olduğu için bu değerlerin literatür bilgileri ile paralel lökosit aracılıklı I/R hasarına cevap verilememesinin nedeni olabilir. Bu yüzden antioksidanlar da olduğu gibi lipid peroksidasyon son ürünü olan MDA ve nötrofillerden salınan MPO gibi belirteçlere bakarken de değişik zaman aralıklarında sonuçları değerlendirmek daha sağlıklı olacaktır.

İntestinal mukoza I/R hasarı açısından oldukça hassas bir dokudur (33). Mukozada başlayan hasarı takiben uzamış iskemi ve sonrasında reperfüzyon ile kanama ve ülserasyon tabloları gözlenir. Mukozada iskeminin başlaması ile nötrofil infiltrasyonu gözlenir ve hidropik dejenerasyon ile devam eden tablo transmural nekroza dek uzanan histolojik değişiklikler gösterir (1). Biz de çalışmamızda bu patolojik değişiklikleri gözlemek için histopatolojik skora yaptık. Tüm I/R yapılan grupların tedavi gruplarından yüksek skoru olduğu gözlemlendi. II. grubun skoru I/R yapılan III. grup ve V. grubun skorlarından düşük olarak bulundu ($p<0,0001$). Aynı şekilde III. grup, IV. grup ve V. grubun skorlarının kontrol grubundan yüksek olduğu gözlemlendi. Bu veriler değerlendirdiğinde infliximab ile tedavi verilen gruplarda histolojik olarak diğer gruplardan daha düşük skor olduğu ve hücresel düzeyde I/R hasarının azaltıldığı söylenebilir. Ancak tedavi verilse de sonuçta I/R hasarı olan grupların da kontrol gruplarına göre yüksek skorlarda olması I/R hasarının tam olarak engellenemediğinin göstergesi olarak kabul edilebilir.

Günümüzde intestinal iskemi hala genel cerrahi yoğun bakımlarında mortalitesi yüksek seyreden bir klinik durum olarak görülmektedir. Bu yüzden bu konu ile ilgili deneysel çalışmalar çok popüler olmakla beraber klinik uygulamaya yansımamaktadır. İntestinal I/R hasarı üzerine bugüne dek bir çok ajan denenmiş ve çeşitli ölçülerde olumlu etkileri gözlenmiştir. Biz de çalışmamızda Anti-TNF antikoru olan infliximabın etkilerini araştırdık.

Bilindiği gibi I/R hasarında SOR'nin etkisi ile çeşitli sitokinler salınmakta ve bu sitokinlerin doku hasarı başlamaktadır (3). $\text{TNF-}\alpha$, I/R hasarında salınan bir proinflamatuvar

sitokindir. Oluşturduğu doku hasarı ile septik şok ve multipl organ yetmezliği tablosuna yol açmaktadır. Günümüzde de anti TNF- α ilaçların endikasyonlarını genişletmeye yönelik çalışmalar yaygınlaşmaktadır. Bu yüzden çalışmamızda TNF- α 'nın bu etkisini bloke edecek ajan olan infliximabı kullandık. Yapılan çalışmalarda bu ajanın proinflamatuvar sitokinlerin salınmasını , lökosit migrasyonunu ve adezyonunu, vasküler permeabilitede geçirgenliğin artmasını engelleyerek doku hasarını azalttığı gösterilmiştir (47). Belirteç olarak da oksidatif strese karşı salınan çeşitli endojen antioksidan enzimler ile nötrofillerden salınan MPO ile lipid peroksidasyonu son ürünü olan MDA ile inflamasyon belirteci olan TNF- α 'yı kullandık. Ayrıca dokuların histopatolojik skorlamasını da inceledik.

İntestinal mukozada oluşan oksidatif strese bağlı etkiler endojen antioksidan enzimlerin etkisi ile olmaktadır. Ancak bu antioksidanlar stresin derecesine ve zamana bağlı olarak salınmaktadırlar. Litaratür taramasına baktığımızda 120 dakika ve üstü reperfüzyon sürelerinde anlamlı çıkabilen bu antioksidanların bazıları bizim çalışmamızda da literatüre paralellik gösterirken bir kısmı da iskemi ve reperfüzyon süresinin kısa olmasına bağlı olarak anlamsız bulundu. Ayrıca NO'nun yarılanma ömrünün çok kısa olması da 30 dakika I/R yaptığımız grupta anlamlı çıkarken diğer gruplar da anlamsız çıkmasının nedeni olarak açıklanabilir (79). Bu yüzden aslında bizim çalışmamızın infliximabın I/R hasarının erken dönem etkileri üzerine olduğunu söyleyebiliriz.

Infliximabın yarılanma ömrü ortalama 9-10 gündür. İntravenöz infüzyon şeklinde tedavide kullanılır. İnflamatuvar hastalıkların tedavisinde 5mg/kg dozunda tedaviye başlanması önerilir ve etkisi görülmezse dozu arttırılabilir. 10mg/kg dozunda etkin teröpatik düzeyde olduğu düşünülmektedir. Dolaşımdan temizlenme hızı 10 ml/h hızındadır. İntraluminal barsak patolojilerinde önerilen doz 5 mg/kg intravenöz infüzyon ile tedaviye başlanması, yanıt alınamazsa ikinci kere denenmesi ve bundan da yanıt alınamaması durumunda son dozun artık denenmemesidir. 20mg/kg'a dek arttırılan çalışmalar bildirilse de toksik doz konusunda net görüş bildirilmemiştir (49). İntestinal mukoza biyopsilerinde yapılan histolojik çalışmalarda infliximabın intraluminal inflamasyon bölgelerine infiltrasyonunu ve bu bölgelerdeki inflamatuvar hadiseleri geriletliği gösterilmiştir. Ancak bu etkinlik için periyodik aralıklarla intravenöz infüzyon şeklinin monoterapiden daha etkin olduğu söylenmektedir (50). Biz çalışmamızda infliximabı 10mg/kg dozda intraperitoneal olarak monoterapötik olarak kullandık. İskemi ve reperfüzyon sürelerinin geçmesine kadar sistemik etkinliğe geçişinin az olması ve periyodik aralıklarla infüzyon şeklinde tedaviye devam etmememiz

anlamalı fark bulunamayan grupları açıklayabilen bir neden olabilir. Ayrıca TNF- α 'yı indükleyen etkenin iskemi ve sonrasında reperfüzyon olduğunu düşünürsek ve TNF- α 'nın portal venden sistemik dolaşıma geçip plazmada kayda değer pik değerinin ortalama 90-120 dakika içinde olduğunu düşünürsek yine infliximabın etkisini göstereceği etkin sürenin olmadığını düşünmekteyiz (74). Bunun yanında inflamatuvar barsak hastalıkları gibi intestinal I/R hasarında da intestinal mukozada olan patolojinin intraluminal başlangıçlı olduğu ve tedavinin intraluminal yapılmasının daha etkin olabileceği düşünülebilir (81). Biz çalışmamızda tedavi gruplarına infliximabı sistemik olarak verdik ve etkin teröpatik doz için geçerli süreyi kullanmadık. Bu da bazı biyokimyasal parametrelerde anlamalı fark olmamasının sebebi olabilir. Histopatolojik olarak bakıldığında ise infliximab verilen gruplarda skorun düşük, I/R hasarı olan gruplarda ise yüksek olduğu görülmekte idi. Bu sonuca göre infliximabın sistemik dolaşıma geçmesi için gerekli süre olmamasına rağmen hücresel düzeyde erken dönem etkilerinin olumlu olduğunu söyleyebiliriz. Bizim çalışmamızda bir kısım doku ve plazma biyokimyasal değerlerine bakarak infliximabın I/R hasarında antioksidan ve antiinflamatuvar etkili olduğunu söyleyebilirken diğer bir kısım doku ve plazma biyokimyasal değerlerinde bu sonucu görmemekteyiz. Her ne kadar diğer bir kısım doku ve plazma biyokimyasal parametrelerine yansımada da TNF- α 'nın infliximab kullanımı ile inhibisyonu sonucunda intestinal mukozayı içeren mikroçevre üzerinde belirgin antiinflamatuvar ve antioksidan etki oluştuğunu düşünmekteyiz. Ayrıca erken dönemde TNF- α 'nın inhibisyonu ile intestinal I/R hasarı üzerine hücresel düzeyde olumlu etkisi olduğunu görmekteyiz. Ancak çalışmamızda bunun geç dönemini gösteren veriler olmaması sebebiyle geç dönem etkiler üzerinde çalışmalar yapılmasının faydalı olacağını düşünmekteyiz.

SONUÇ VE ÖNERİLER

Çalışmamız monoklonal Anti-TNF antikoru olan infliximabın günümüzde bilinen endikasyonları dışında yeni kullanım endikasyonları açısından yapılmakta olan ve ilerde yapılacak çalışmalara ışık tutabilir. Bu çalışmadan elde edilen sonuçlar ile infliximabın deneysel intestinal I/R hasarı üzerine erken dönem etkilerinin olumlu olduğunu düşünmekteyiz. Aynı zamanda histopatolojik olarak sistemik etkinliğe geçmeden hücresel düzeyde de olumlu etkileri olduğunu görmekteyiz. Ancak infliximabın erken dönem ve monoteröpatik olumlu etkileri olduğunu düşünmemize rağmen sistemik etkileri ve tedaviye devam edilmesi halinde oluşabilecek etkileri hakkında net bilgi sahibi değiliz. Çalışmamızdan elde edilen veriler doğrultusunda infliximabın intestinal I/R hasarında erken dönemde antiinflamatuvar ve antioksidan olumlu etkisi olduğunu görmekteyiz. Ancak infliximabın olası yeni klinik rolünün bulunması ve sistemik geç dönem etkilerinin anlaşılması için daha uzun iskemi ve reperfüzyon süreleri ile ayrıntılı araştırmalara ihtiyaç vardır.

ÖZET

Amaç: Ratlarda deneysel intestinal iskemi reperfüzyon hasarında monoklonal Anti TNF antikoru olan infliximab uygulamasının etkisini araştırmak

Materyal ve Metot: Ağırlığı 170- 270 gr arasında değişen, 48 adet erkek Wistar-Albino tipi sıçan kullanıldı. Ratlar, kontrol grubu , laparotomi + infliximab (II. grup, n=8) , 30 dk. iskemi + 30 dk. reperfüzyon (III. grup, n=8), infliximab+ 30 dk. iskemi + 30 dk. reperfüzyon (IV. grup, n=8), 60 dk. iskemi + 30 dk. reperfüzyon (V. grup, n=8), İnfliximab+ 60 dk. iskemi + 30 dk. reperfüzyon (VI. grup, n=8) olmak üzere altı eşit gruba ayrıldı. Tedavi gruplarına laparotomi ve planlanan sürelerde iskemi reperfüzyon yapılarak intraperitoneal olarak infliximab (10 mg/kg) enjekte edildi. Kontrol gruplarına ise 3 cc % 0.9 NaCl intraperitoneal olarak enjekte edildi. İşlem sonunda ratlar sakrifiye edildi ve kan ile doku örnekleri alındı. Alınan kan ve doku örneklerinden tümör nekroz faktör alfa, glutatyon, glutatyon peroksidaz glutatyon redüktaz, katalaz, süperoksid dismutaz, myeloperoksidaz , malondialdehit , nitrik oksit gibi parametreler bakıldı. Ayrıca doku örnekleri %4'lük formalin fiksasyonu sonrası rutin doku takip kesitler alınarak ışık mikroskopunda incelendi.

Bulgular: Belirlenen I/R süreleri sonunda alınan kanların incelenmesinde GR, GSH ve MDA sonuçlarında gruplar arasında anlamlı fark yoktu ($p=0,0952$). III.grubun (30 dk. iskemi + 30 dk. reperfüzyon) TNF- α değerleri yalnızca kontrol grubundan yüksekti ($p=0,0079$). Eritrosit GSH-Px değerlerinde kontrol grubu ve II. grubun (laparotomi + infliximab) değerleri diğer gruplardan yüksekti. III.grubun değerleri ise VI.gruptan (60 dk iskemi + 30 dk. reperfüzyon + infliximab) yüksekti ($p=0,0006$). Eritrosit SOD değerlerinde III. grubun değerleri ve IV.grubun (30 dk iskemi + 30 dk. reperfüzyon + infliximab) değerleri diğer gruplara göre düşüktü ($p<0,0001$). Eritrosit CAT değerlerine bakıldığında ise II. grubun değerleri III.grup, IV. grup, V.grup (60 dk iskemi + 30 dk. reperfüzyon) ve VI. grubun değerlerinden yüksekti. III. grubun değerleri ise kontrol grubundan düşüktü ($p<0,0001$). Serum NO değerlerinde IV.grubun değerleri kontrol grubu, II. grup, V. grup ve VI. grubun değerlerine göre yüksekti ancak III. grup ile arasında anlamlı fark saptanmadı. Yine III. grubun değerleri ise II. gruba göre yüksek bulundu ($p<0,0001$). Doku TNF- α değerlerinde gruplar arasında anlamlı fark saptanmadı ($p=0,064$). Doku GR değerlerinde IV grubun değerleri I, II ve V. gruptan yüksekti ($p=0,0015$). Doku SOD değerlerinde ise III. grubun değerleri kontrol grubuna göre düşüktü ($p=0,0183$). Doku GSH-Px değerlerinde IV. grubun değerleri I, II, III ve VI. gruptan yüksek

iken V. grupla aralarında fark yoktu ($p=0,021$). Doku GSH değerlerinde III. grubun değerleri II. gruba göre düşüktü ($p=0,0329$). Doku CAT değerlerinde IV. grubun değerleri I, II, V ve VI gruba göre yüksek iken III grup ile aralarında fark yoktu ($p=0,0003$). Doku NO değerlerinde IV. grubun değerleri I, II ve III. gruptan daha yüksekti ($p=0,0073$). Doku MDA gruplarına bakıldığında II grubun değerleri IV ve VI. gruptan daha yüksek bulunurken ($p=0,0064$), doku MPO değerlerinde III grubun değerleri V gruptan daha yüksekti ($p=0,0065$).

Sonuç: Çalışmamızdan elde edilen veriler doğrultusunda infliximabın intestinal I/R hasarında erken dönemde antiinflamatuvar ve antioksidan olumlu etkisi olduğunu görmekteyiz. Ancak infliximabın olası yeni klinik rolünün bulunması ve sistemik geç dönem etkilerinin anlaşılması için daha uzun iskemi ve reperfüzyon süreleri ile ayrıntılı araştırmalara ihtiyaç vardır.

Anahtar kelimeler: İntestinal iskemi/reperfüzyon hasarı, İnfliximab, TNF- α

ABSTRACT

Aim: To study the effects of infliximab application, which is a monoclonal anti TNF anticor, in experimental intestinal ischemia reperfusion injury in rats.

Material and Method: In this study, 48 male Wistar-Albino type rats whose weights ranged between 170 and 270 gr were used. The rats were equally divided into 6 groups, as the control group (Group I, n=8), laparotomy+infliximab (Group II, n=8), 30 minutes ischemia+30 minutes reperfusion (Group III, n=8), infliximab+ 30 minutes ischemia+ 30 minutes reperfusion (Group IV,n=8), 60 minutes ischemia+30 minutes reperfusion (Group V, n=8), and infliximab+ 60 minutes ischemia+30 minutes reperfusion (Group VI, n=8). Treatment groups were done ischemia reperfusion for planned periods of times and laparotomy, and were injected infliximab (10 mg/kg) intraperitoneally. The control group was given 3 cc %0.9 NaCl intraperitoneally. After the operation, the rats were sacrificed and blood and tissue samples were taken. The blood and tissue samples were examined by parameters such as tumor necrosis factor alfa, glutathione, glutathione peroksidaz, glutathione reductose, katalas, superoxide dismutase, myeloperoksidaz, malondialdehit, and nitric oxide. In addition to these, the tissue samples were examined by light microscope being taken routine tissue follow up sections after %4 formalin fixation.

Results: Following the defined I/R periods, it was understood that there were no significant differences among groups for GR, GSH, and MDA results ($p=0.0952$). Group III (30 minutes ischemia+ 30 minutes reperfusion) TNF- α values were only higher than the control group ($p=0.0079$). For eritrosid GSH-Px values, the values of the control group and Group II (laparotomy + infliximab) were higher than the other groups'. Similarly, the values of Group III were higher than Group VI (60 minutes ischemia+30 minutes reperfusion + infliximab) values ($p=0.0006$). For Eritroside SOD, the values of Group III and Group IV (30 minutes ischemia+ 30 minutes reperfusion +infliximab) were lower when compared to the values of other groups. When it came to Eritrosid CAT values, the readings of Group II were higher than Group III, Group IV, Group V (60 minutes ischemia+30 minutes reperfusion) and Group VI values. The values of Group III were lower than the control group ($p<0.0001$). For serum NO, Group IV values were higher than the control group, Group II, Group V, and Group VI; however, there was not a significant difference with Group III. Even so, Group III values

were found high in comparison with Group II values ($p < 0.0001$). There were not significant differences among groups for tissue TNF- α values ($p = 0.064$). In tissue GR values, Group IV was higher than Group I, II, and V ($p = 0.0015$). For tissue SOD values, Group III was lower than the Control group ($p = 0.0813$). As for tissue GSH-Px values, while Group IV was higher than Groups I, II, III, and VI, there was no difference with Group V ($p = 0.021$). Group III tissue GSH values were lower according to Group II ($p = 0.0329$). While Group IV tissue CAT values were higher than groups I, II, V and VI, they were similar to Group III ($p = 0.0003$). In tissue NO values, Group IV was higher than Groups I, II, and III ($p = 0.0073$). When tissue MDA groups were examined, it was seen that Group II values were higher than Groups IV and VI ($p = 0.0064$), and for MPO, Group III values were higher than Group V ($p = 0.0065$).

Result: We can see that infliximab has a positive anti inflammatory and antioxidant effect in the early period on intestinal I/R injury. However, more detailed research with longer ischemia and reperfusion period is needed for the determination of the possible new clinical role of infliximab and for the understanding of the later period systematic effects of it.

Key Words: Intestinal ischemia/reperfusion injury, Infliximab, TNF- α

KAYNAKLAR

- 1- Noda T, Iwakiri R, Fujimoto K, Matsuo S, Aw TY. Programmed cell death induced by ischemia-reperfusion in rat intestinal mucosa. *Am J Physiol* 1998; 274: G270-276.
- 2- Granger DN, Korthuis RJ. Physiologic mechanisms of postischemic tissue injury. *Annu Rev Physiol* 1995; 57: 311-332.
- 3- Zimmerman BJ, Granger DN. Mechanisms of reperfusion injury. *Am J Med Sci* 1994; 307: 284-292.
- 4- Grisham MB, Granger DN. Metabolic sources of reactive oxygen metabolites during oxidant stress and ischemia with reperfusion. *Clin Chest Med* 1989; 10: 71-81.
- 5- Jerome SN, Akimitsu T, Korthuis RJ. Leukocyte adhesion, edema, and development of postischemic capillary no-reflow. *Am J Physiol* 1994; 267: H1329-1336.
- 6- Korthuis RJ, Smith JK, Carden DL. Hypoxic reperfusion attenuates postischemic microvascular injury. *Am J Physiol* 1989; 256: H315-319.
- 7- Sorkine P, Szold O, Halpern P, Gutman M, Gremland M, Rudick V, Goldman G. Gut decontamination reduces bowel ischemia-induced lung injury in rats. *Chest* 1997; 112: 491-495.
- 8- Towfigh S, Heisler T, Rigberg DA, Hines OJ, Chu J, McFadden DW, Chandler C. Intestinal ischemia and the gut-liver axis: an in vitro model. *J Surg Res* 2000; 88: 160-164.
- 9- Isik S, Tuncyurek P, Zengin NI, Demirbag AE, Atalay F, Yilmaz S, Orug T. Antithrombin prevents apoptosis by regulating inflammation in the liver in a model of cold ischemia/warm reperfusion injury. *Hepatogastroenterology* 2012; 59: 453-457.
- 10- Yuan Y, Guo H, Zhang Y, Zhou D, Gan P, Liang DM, Chen JY. Protective effects of L-carnitine on intestinal ischemia/reperfusion injury in a rat model. *J Clin Med Res* 2011; 3: 78-84.
- 11- Squadrito F, Altavilla D, Iocolano M, Calapai G, Zingarelli B, Saitta A, Campo GM, Rizzo A, Caputi AP. Passive immunization with antibodies against tumor necrosis factor (TNF-alpha) protects from the lethality of splanchnic artery occlusion shock. *Circ Shock* 1992; 37: 236-244.

- 12- Di Paola R, Impellizzeri D, Torre A, Mazzon E, Cappellani A, Faggio C, Esposito E, Trischitta F, Cuzzocrea S. Effects of palmitoylethanolamide on intestinal injury and inflammation caused by ischemia-reperfusion in mice. *J Leukoc Biol* 2012.
- 13- Cury DH, Costa JE, Irika K, Mijji L, Garcez A, Buchiguel C, Silva I, Sipahi A. Protective effect of octreotide and infliximab in an experimental model of indomethacin-induced inflammatory bowel disease. *Dig Dis Sci* 2008; 53: 2516-2520.
- 14- Guzel A, Kanter M, Pergel A, Erboga M. Anti-inflammatory and antioxidant effects of infliximab on acute lung injury in a rat model of intestinal ischemia/reperfusion. *J Mol Histol* 2012.
- 15- Hirose K, Okajima K, Taoka Y, Uchiba M, Tagami H, Nakano K, Utoh J, Okabe H, Kitamura N. Activated protein C reduces the ischemia/reperfusion-induced spinal cord injury in rats by inhibiting neutrophil activation. *Ann Surg* 2000; 232: 272-280.
- 16- Yildiz Y, Kose H, Cecen S, Ergin K, Demir EM, Serter M. Protective effects of leflunomide on intestinal ischemia-reperfusion injury: leflunomide against intestinal ischemia-reperfusion. *Dig Dis Sci* 2010; 55: 245-252.
- 17- Gao C, Sun X, Zhang G, Zhang H, Zhao H, Yang Y, Han L, Xu L, Chai W. Hyperoxygenated solution preconditioning attenuates lung injury induced by intestinal ischemia reperfusion in rabbits. *J Surg Res* 2008; 146: 24-31.
- 18- Teke Z, Kabay B, Aytekin FO, Yenisey C, Demirkan NC, Sacar M, Erdem E, Ozden A. Pyrrolidine dithiocarbamate prevents 60 minutes of warm mesenteric ischemia/reperfusion injury in rats. *Am J Surg* 2007; 194: 255-262.
- 19- Atahan E, Ergun Y, Belge Kurutas E, Cetinus E, Guney Ergun U. Ischemia-reperfusion injury in rat skeletal muscle is attenuated by zinc aspartate. *J Surg Res* 2007; 137: 109-116.
- 20- Mojzis J, Hviscova K, Germanova D, Bukovicova D, Mirossay L. Protective effect of quercetin on ischemia/reperfusion-induced gastric mucosal injury in rats. *Physiol Res* 2001; 50: 501-506.
- 21- Semenza GL. Cellular and molecular dissection of reperfusion injury: ROS within and without. *Circ Res* 2000; 86: 117-118.
- 22- Girotti AW. Lipid hydroperoxide generation, turnover, and effector action in biological systems. *J Lipid Res* 1998; 39: 1529-1542.

- 23- Koltuksuz U, Ozen S, Uz E, Aydinc M, Karaman A, Gultek A, Akyol O, Gursoy MH, Aydin E. Caffeic acid phenethyl ester prevents intestinal reperfusion injury in rats. *J Pediatr Surg* 1999; 34: 1458-1462.
- 24- Toyokuni S. Reactive oxygen species-induced molecular damage and its application in pathology. *Pathol Int* 1999; 49: 91-102.
- 25- Savas C, Ozogul C, Karaoz E, Delibas N, Ozguner F. Splenectomy reduces remote organ damage after intestinal ischaemia-reperfusion injury. *Acta Chir Belg* 2003; 103: 315-320.
- 26- Pergel A, Kanter M, Yucel AF, Aydin I, Erboga M, Guzel A. Anti-inflammatory and antioxidant effects of infliximab in a rat model of intestinal ischemia/reperfusion injury. *Toxicol Ind Health* 2011.
- 27- Pirat A, Zeyneloglu P, Aldemir D, Yucel M, Ozen O, Candan S, Arslan G. Pretreatment with simvastatin reduces lung injury related to intestinal ischemia-reperfusion in rats. *Anesth Analg* 2006; 102: 225-232.
- 28- Yamamoto S, Tanabe M, Wakabayashi G, Shimazu M, Matsumoto K, Kitajima M. The role of tumor necrosis factor-alpha and interleukin-1beta in ischemia-reperfusion injury of the rat small intestine. *J Surg Res* 2001; 99: 134-141.
- 29- Vejchapipat P, Leawhiran N, Poomsawat S, Theamboonlers A, Chittmittrapap S, Poovorawan Y. Amelioration of intestinal reperfusion injury by moderate hypothermia is associated with serum sICAM-1 levels. *J Surg Res* 2006; 130: 152-157.
- 30- Souza DG, Ferreira FL, Fagundes CT, Amaral FA, Vieira AT, Lisboa RA, Andrade MV, Trifilieff A, Teixeira MM. Effects of PKF242-484 and PKF241-466, novel dual inhibitors of TNF-alpha converting enzyme and matrix metalloproteinases, in a model of intestinal reperfusion injury in mice. *Eur J Pharmacol* 2007; 571: 72-80.
- 31- Ballehaninna UK, Hingorani A, Ascher E, Shiferson A, Marks N, Aboian E, Jimenez R, Jacob T, McIntyre T. Acute superior mesenteric artery embolism: reperfusion with AngioJet hydrodynamic suction thrombectomy and pharmacologic thrombolysis with the EKOS catheter. *Vascular* 2012.
- 32- Prager M, Teufelsbauer H, Nanobashvili J, Kretschmer G, Trubel W, Huk I, Laggner A, Zimpfer M, Haider W, Herold C, Polterauer P. [Abdominal vascular surgery

- emergencies: abdominal aortic aneurysm, acute mesenteric ischemia--indications, technique, results]. *Acta Med Austriaca* 2000; 27: 145-151.
- 33- Ozturk C, Avlan D, Cinel I, Cinel L, Unlu A, Camdeviren H, Atik U, Oral U. Selenium pretreatment prevents bacterial translocation in rat intestinal ischemia/reperfusion model. *Pharmacol Res* 2002; 46: 171-175.
 - 34- Yasuhara H. Acute mesenteric ischemia: the challenge of gastroenterology. *Surg Today* 2005; 35: 185-195.
 - 35- Kuyumcu A, Duzgun AP, Ozmen MM, Besler HT. [The role of nitric oxide in trauma and infection]. *Ulus Travma Acil Cerrahi Derg* 2004; 10: 149-159.
 - 36- Predmore BL, Kondo K, Bhushan S, Zlatopolsky MA, King AL, Aragon JP, Grinsfelder DB, Condit ME, Lefer DJ. The Polysulfide, Diallyl trisulfide, Protects the Ischemic Myocardium by Preservation of Endogenous Hydrogen Sulfide and Increasing Nitric Oxide Bioavailability. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2012.
 - 37- George TJ, Arnaoutakis GJ, Beaty CA, Jandu SK, Santhanam L, Berkowitz DE, Shah AS. Hydrogen sulfide decreases reactive oxygen in a model of lung transplantation. *J Surg Res* 2012.
 - 38- Baskar AA, Al Numair KS, Gabriel Paulraj M, Alsaif MA, Muamar MA, Ignacimuthu S. beta-Sitosterol Prevents Lipid Peroxidation and Improves Antioxidant Status and Histoarchitecture in Rats with 1,2-Dimethylhydrazine-Induced Colon Cancer. *J Med Food* 2012; 15: 335-343.
 - 39- Baskol G, Korkmaz S, Erdem F, Caniklioglu A, Kocyigit M, Aksu M. Assessment of nitric oxide, advanced oxidation protein products, malondialdehyde, and thiol levels in patients with restless legs syndrome. *Sleep Med* 2012; 13: 414-418.
 - 40- Koga H, Hagiwara S, Mei H, Hiraoka N, Kusaka J, Goto K, Kashima K, Noguchi T. The Vitamin E Derivative, ESeroS-GS, Attenuates Renal Ischemia-Reperfusion Injury in Rats. *J Surg Res* 2011.
 - 41- Wang NP, Bufkin BL, Nakamura M, Zhao ZQ, Wilcox JN, Hewan-Lowe KO, Guyton RA, Vinten-Johansen J. Ischemic preconditioning reduces neutrophil accumulation and myocardial apoptosis. *Ann Thorac Surg* 1999; 67: 1689-1695.
 - 42- Mates JM, Perez-Gomez C, Nunez de Castro I. Antioxidant enzymes and human diseases. *Clin Biochem* 1999; 32: 595-603.

- 43- Halliwell B. Superoxide, iron, vascular endothelium and reperfusion injury. *Free Radic Res Commun* 1989; 5: 315-318.
- 44- Wang J, Liu YM, Cao W, Yao KW, Liu ZQ, Guo JY. Anti-inflammation and antioxidant effect of Cordymin, a peptide purified from the medicinal mushroom *Cordyceps sinensis*, in middle cerebral artery occlusion-induced focal cerebral ischemia in rats. *Metab Brain Dis* 2012.
- 45- Neher MD, Weckbach S, Huber-Lang MS, Stahel PF. New insights into the role of peroxisome proliferator-activated receptors in regulating the inflammatory response after tissue injury. *PPAR Res* 2012; 2012: 728461.
- 46- O'Garra A. Cytokines induce the development of functionally heterogeneous T helper cell subsets. *Immunity* 1998; 8: 275-283.
- 47- Papamichael K, Archavlis E, Lariou C, Tsigka A, Mantzaris GJ. Granular cell tumour in a patient with Crohn's disease treated with infliximab: coincidence or causal relationship? *Eur J Gastroenterol Hepatol* 2012.
- 48- Pech T, Fujishiro J, Finger T, Ohsawa I, Praktiknjo M, von Websky M, Wehner S, Abu-Elmagd K, Kalff JC, Schaefer N. Perioperative infliximab application has marginal effects on ischemia-reperfusion injury in experimental small bowel transplantation in rats. *Langenbecks Arch Surg* 2012; 397: 131-140.
- 49- Gisbert JP, Gonzalez-Lama Y, Mate J. Systematic review: Infliximab therapy in ulcerative colitis. *Aliment Pharmacol Ther* 2007; 25: 19-37.
- 50- Yamamoto-Furusho JK. Innovative therapeutics for inflammatory bowel disease. *World J Gastroenterol* 2007; 13: 1893-1896.
- 51- Riis A, Martinsen TC, Waldum HL, Fossmark R. Clinical experience with infliximab and adalimumab in a single-center cohort of patients with Crohn's disease. *Scand J Gastroenterol* 2012.
- 52- Aebi H. Catalase in vitro. *Methods Enzymol* 1984; 105: 121-126.
- 53- Konukoglu D, Iynem H, Ziylan E. Antioxidant status in experimental peritonitis: effects of alpha tocopherol and taurolin. *Pharmacol Res* 1999; 39: 247-251.
- 54- Suzuki K, Ota H, Sasagawa S, Sakatani T, Fujikura T. Assay method for myeloperoxidase in human polymorphonuclear leukocytes. *Anal Biochem* 1983; 132: 345-352.

- 55- Beutler E, Duron O, Kelly BM. Improved method for the determination of blood glutathione. *J Lab Clin Med* 1963; 61: 882-888.
- 56- Kakkar R, Mantha SV, Radhi J, Prasad K, Kalra J. Increased oxidative stress in rat liver and pancreas during progression of streptozotocin-induced diabetes. *Clin Sci (Lond)* 1998; 94: 623-632.
- 57- Racker E. Glutathione reductase (liver and yeast). In : *Methods in Enzymology*, vol 2, Colowick SP, Kaplan NO (Editors), pp 722-729, Academic Pres, New York, 1955.
- 58- Sun Y, Oberley LW, Li Y. A simple method for clinical assay of superoxide dismutase. *Clin Chem* 1988; 34: 497-500.
- 59- Navarro-Gonzalvez JA, Garcia-Benayas C, Arenas J. Semiautomated measurement of nitrate in biological fluids. *Clin Chem* 1998; 44: 679-681.
- 60- Tietze F. Enzymic method for quantitative determination of nanogram amounts of total and oxidized glutathione: applications to mammalian blood and other tissues. *Anal Biochem* 1969; 27: 502-522.
- 61- Pleban PA Munyani A, Beachum J. Determination of selenium concentration and glutathione peroxidase activity in plasma and erythrocytes.
- 62- Ohkawa H, Ohishi N, Yagi K. Assay for lipid peroxides in animal tissues by thiobarbituric acid reaction. *Anal Biochem* 1979; 95: 351-358.
- 63- Ozkan KU, Ozokutan BH, Inanc F, Boran C, Kilinc M. Does maternal nicotine exposure during gestation increase the injury severity of small intestine in the newborn rats subjected to experimental necrotizing enterocolitis. *J Pediatr Surg* 2005; 40: 484-488.
- 64- Walensi M, de Groot H, Schulz R, Hartmann M, Petrat F. Mesenteric ischemia-reperfusion injury: Clearly improved hemodynamics but only minor protection of the rat small intestine by (sub)therapeutic heparin sodium and enoxaparin doses. *J Surg Res* 2012.
- 65- Yuan HJ, Zhu XH, Luo Q, Wu YN, Kang Y, Jiao JJ, Gao WZ, Liu YX, Lou JS. Noninvasive Delayed Limb Ischemic Preconditioning in Rats Increases Antioxidant Activities in Cerebral Tissue during Severe Ischemia-Reperfusion Injury. *J Surg Res* 2012; 174: 176-183.

- 66- Schmeling DJ, Caty MG, Oldham KT, Guice KS. Cytoprotection by diclofenac sodium after intestinal ischemia/reperfusion injury. *J Pediatr Surg* 1994; 29: 1044-1048.
- 67- Ceran C, Sonmez K, Turkyilmaz Z, Demirogullari B, Dursun A, Duzgun E, Basaklar AC, Kale N. Effect of bilirubin in ischemia/reperfusion injury on rat small intestine. *J Pediatr Surg* 2001; 36: 1764-1767.
- 68- Yoshida WB, Alasio T, Mazziotta R, Qin F, Kashani M, Lee S, Dardik H, Becker R. Effect of alpha-tocopherol, taurine and selenium on the attenuation of ischemia/reperfusion injury of splanchnic organs. *Cardiovasc Surg* 1998; 6: 178-187.
- 69- Sandborn WJ. Mucosal healing with infliximab: results from the active ulcerative colitis trials. *Gastroenterol Hepatol (N Y)* 2012; 8: 117-119.
- 70- Nattiv R, Wojcicki JM, Garnett EA, Gupta N, Heyman MB. High-dose infliximab for treatment of pediatric ulcerative colitis: A survey of clinical practice. *World J Gastroenterol* 2012; 18: 1229-1234.
- 71- Guven C, Borcek AO, Cemil B, Kurt G, Yildirim Z, Ucankus NL, Kilic N, Ceviker N. Neuroprotective effects of infliximab in experimental spinal cord ischemic injury. *J Clin Neurosci* 2010; 17: 1563-1567.
- 72- Mahmoud MF, El Shazly SM, Barakat W. Inhibition of TNF-alpha protects against hepatic ischemia-reperfusion injury in rats via NF-kappaB dependent pathway. *Naunyn Schmiedeberg's Arch Pharmacol* 2012; 385: 465-471.
- 73- Caty MG, Guice KS, Oldham KT, Remick DG, Kunkel SI. Evidence for tumor necrosis factor-induced pulmonary microvascular injury after intestinal ischemia-reperfusion injury. *Ann Surg* 1990; 212: 694-700.
- 74- Yucel AF, Kanter M, Pergel A, Erboga M, Guzel A. The role of curcumin on intestinal oxidative stress, cell proliferation and apoptosis after ischemia/reperfusion injury in rats. *J Mol Histol* 2011; 42: 579-587.
- 75- Tong N, Zhang Z, Gong Y, Yin L, Wu X. Diosmin Protects Rat Retina from Ischemia/Reperfusion Injury. *J Ocul Pharmacol Ther* 2012.
- 76- Portakal O, Inal-Erden M. Effects of pentoxifylline and coenzyme Q10 in hepatic ischemia/reperfusion injury. *Clin Biochem* 1999; 32: 461-466.
- 77- Demir S, Inal-Erden M. Pentoxifylline and N-acetylcysteine in hepatic ischemia/reperfusion injury. *Clin Chim Acta* 1998; 275: 127-135.

- 78- Bir SC, Xiong Y, Kevil CG, Luo J. Emerging role of PKA/eNOS pathway in therapeutic angiogenesis for ischemic tissue diseases. *Cardiovasc Res* 2012.
- 79- Tuncyurek P, Yenisey C, Doger FK, Soyder A, Bicakci T, Cevikel MH. Nitric oxide as an independent regulatory factor in regenerating rat liver. *Acta Chir Belg* 2006; 106: 581-587.
- 80- Douzinas EE, Livaditi O, Tasoulis MK, Prigouris P, Bakos D, Goutas N, Vlachodimitropoulos D, Andrianakis I, Betrosian A, Tsoukalas GD. Nitrosative and oxidative stresses contribute to post-ischemic liver injury following severe hemorrhagic shock: the role of hypoxemic resuscitation. *PLoS One* 2012; 7: e32968.
- 81- Sasaki M, Joh T. Oxidative stress and ischemia-reperfusion injury in gastrointestinal tract and antioxidant, protective agents. *J Clin Biochem Nutr* 2007; 40: 1-12.