



TC.

**DİCLE ÜNİVERSİTESİ TIP FAKÜLTESİ
PLASTİK, REKONSTRÜKTİF VE ESTETİK CERRAHİ ANABİLİM DALI**

**SIÇAN ALT EKSTREMİTE
İSKEMİ REPRFÜZYON MODELİNDE
MESNA(2-MERKAPTO-ETAN-SÜLFONAT)'NIN
ETKİLERİ**

Dr. ÜMMÜ GÜLSÜM BARUTCU

TIPTA UZMANLIK TEZİ

DİYARBAKIR-2022



TC.

DİCLE ÜNİVERSİTESİ TIP FAKÜLTESİ
PLASTİK, REKONSTRÜKTİF VE ESTETİK CERRAHİ ANABİLİM DALI

**SIÇAN ALT EKSTREMİTE
İSKEMİ REPRFÜZYON MODELİNDE
MESNA(2-MERKAPTO-ETAN-SÜLFONAT)'NIN
ETKİLERİ**

Dr. ÜMMÜ GÜLSÜM BARUTCU

TIPTA UZMANLIK TEZİ

TEZ DANIŞMANI

DR.ÖĞR.GRV.SERKAN ERBATUR

DİYARBAKIR-2022

ÖNSÖZ

Tez çalışmamda maddi ve manevi desteğini eksik etmeyen değerli hocam Dr.Öğrt.Grv.Serkan ERBATUR'a, eşsiz tecrübelerini bize aktararak eğitimimde önemli katkıları olan ve her zaman asistanlarını gözeten Anabilim Dalı Başkanımız değerli hocam Dr.Öğr.Grv. M.Fatih AKKOÇ'a ve saygıdeğer hocam Prof.Dr. C.Tayyar SELÇUK'a teşekkür ederim.

Tezimin tüm aşamalarında sağladığı destek ve yardımlar ile her zaman yanımda olan sevgili asistan arkadaşlarıma teşekkür ederim.

Beni bugünlere getiren sevgili aileme ve asistanlık sürecimde sürekli yanımda olup, desteğini esirgemeyen ablama sonsuz teşekkür ederim.

Dr. Ümmü Gülsüm BARUTCU

İÇİNDEKİLER

	Sayfalar
Önsöz.....	ii
İçindekiler.....	iii
Özet.....	v
İngilizce Özet (Abstract).....	vii
Simgeler ve Kısaltmalar Dizini.....	ix
Şekiller Dizini.....	x
Tablolar Listesi.....	xi
1.Giriş ve Amaç.....	1
2.Genel Bilgiler.....	3
2.1.İskemi.....	3
2.2.Reperfüzyon.....	6
2.3.İskemi/Reperfüzyon.....	7
2.3.1.No-reflow fenomeni.....	10
2.3.2.Lökositlerin rolü.....	11
2.3.3.Serbest oksijen radikallerinin rolü.....	14
2.3.3.1.Süperoksit Radikali.....	15
2.3.3.2.Hidrojen Peroksit.....	15
2.3.3.3.Hidroksil Radikali.....	16
2.3.4.Kompleman Sistemi.....	17
2.4.İskelet Kasında İ/R Hasarının Fizyopatolojisi.....	18
2.5.Lipid peroksidasyonu ve Malondialdehit.....	18
2.6.Antioksidanlar.....	20
2.6.1.Süperoksit Dismutaz.....	20
2.6.2.Katalaz.....	20
2.6.3.Glutatyon Peroksidaz.....	21
2.7.Mesna (2-Merkaptoetan Sodyum Sülfonat).....	21
3.Gereç ve Yöntem.....	23
3.1.Mesna Hazırlanması ve Uygulanması.....	23
3.2.Deneklerin Gruplandırılması.....	24

3.3.Cerrahi Teknik.....	24
3.3.1. Alt ekstremite İ/R modeli.....	24
3.3.2. İskemi/ Reperfüzyon.....	24
3.3.3.Doku örnekleme.....	26
3.4.Histopatolojik Değerlendirme.....	28
3.5.Biyokimyasal Değerlendirme.....	30
3.6.İstatiksel Değerlendirme.....	30
4.Bulgular.....	31
4.1.Histopatolojik Bulgular.....	31
4.2.Doku Malondialdehit ve Miyeloperoksidaz Düzeyleri.....	34
5.Tartışma.....	36
6.Sonuçlar.....	42
7.Kaynaklar.....	43

ÖZET

Plastik cerrahide flep cerrahisi, ekstremitelerde kısmi veya tam kopmalar sonrası replantasyonlar, transplantasyonlar güncel pratikte yoğun uğraş verilen alanlardır. Bu tür cerrahilerin başarı oranı iskemi/reperfüzyon(İ/R) hasarı ile yakından ilişkilidir.

Farklı dokularda, iskemi reperfüzyon hasarını azaltmaya yönelik bir çok endojen ve eksojen madde araştırılmış ve araştırılmaya devam edilmektedir. Ancak halen İ/R hasarını tamamen engelleyen farmakolojik ajan bulunamamıştır. 2- merkaptetan sodyum sülfonat(MESNA) iyofosfamid ve siklofosfamid gibi kemoterapötik ajanlara bağlı gelişen hemorajik sistit tedavisinde kullanılan bir ilaçtır. Farklı deneysel çalışmalarda, akciğer, böbrek, over, barsakta İ/R hasarına karşı koruyucu etkileri deneysel olarak gösterilmiştir. Ancak alt ekstremit ve iskelet kasında iskemi reperfüzyon hasarı üzerine herhangi bir çalışma bulunmamaktadır. Bir çok organda İ/R hasarı üzerine olumlu etkileri gösterilen Mesna'nın, alt ekstremit İ/R hasarına olumlu etkileri olabileceği hipoteziyle bu çalışma planlanmıştır.

Gereç ve Yöntem: Çalışmamızda herbir grup 8 adet rattan oluşmak üzere 24 adet Sprague Dawley cinsi erkek rat kullanıldı. Gruplar, kontrol grubu, İ/R grubu ve İ/R + Mesna olacak şekilde üç gruba ayrıldı. Kontrol grubuna herhangi bir işlem uygulanmadı. Diğer iki gruba sağ ekstremit trochanter majusun proksimalinden turnike ile 4 saat iskemi ve 4 saat reperfüzyon uygulandı. İ/R grubuna iskemiden 15 dk ve reperfüzyon anında serum fizyolojik, İ/R+Mesna grubuna ise aynı zamanlarda Mesna 150mg/kg/doz'dan intraperitoneal olarak uygulandı. I/R tamamlandıktan denekler derin anestezi altında intrakardiyak kan alınarak kurban edildi. Daha sonra tüm ratların sağ taraf gastrokinemius kaslarından histopatolojik ve biyokimyasal inceleme için doku örneği alındı.

Bulgular: Kontrol grubu ile İ/R ve İ/R+Mesna gruplarında ekstrasvaze eritrosit varlığı, enine çizgilenme kaybı, çekirdeğin merkeze göçü, kas liflerinde ayrılma, bağ doku artışı, interselüler/interfasiküler ödem ve pnml sayısı istatistiksel olarak anlamlı($p<0,001$) olmasına rağmen, IR ve IR+Mesna grubu istatistiksel olarak aynıdır. Sonuç olarak histolojik olarak ve sayısal ölçümlerde Mesna uygulanan grubun dejeneratif değerlerde düşme sağladığı halde bunun istatistiksel olarak anlamlı düzeyde olmadığı bulunmuştur. Kontrol ve deney grupları arasında lipid peroksidasyonun göstergesi olan MDA ($p=0.860$) enzimi ve antioksidan aktivite açısından değerlendirilmeye dahil edilen MPO açısından anlamlı bir fark bulunamadı($p=0,539$).

Sonuç: Yaptığımız çalışma sonucunda elde ettiğimiz bulgular, Mesna nın alt ekstremitte kas dokusunda iskemi reperfüzyon hasarını istatistiksel olarak anlamlı ölçüde azaltmadığıdır.

Anahtar Kelimeler: Kas dokusu, Mesna, iskemi reperfüzyon

ABSTRACT

In plastic surgery, flap surgery, replantations after partial or complete ruptures in the extremities, and transplantations are areas of intense concern in current practice. The success rate of such surgeries is closely related to ischemia/reperfusion (I/R) injury.

Many endogenous and exogenous substances have been investigated and continue to be investigated to reduce ischemia-reperfusion injury in different tissues. However, there is still no pharmacological agent that completely prevents I/R damage. 2-mercaptoethane sodium sulfonate (MESNA) is a drug used in the treatment of hemorrhagic cystitis due to chemotherapeutic agents such as iophosphamide and cyclophosphamide. In different experimental studies, its protective effects against I/R damage in the lung, kidney, ovary, and intestine have been experimentally demonstrated. However, there are no studies on ischemia-reperfusion injury in lower extremity and skeletal muscle. This study was planned with the hypothesis that Mesna, which has shown positive effects on I/R damage in many organs, may have positive effects on lower extremity I/R damage.

Materials and Methods: In our study, 24 male Sprague Dawley rats, each group consisting of 8 rats, were used. The groups were divided into three groups as control group, I/R group and I/R + Mesna group. No procedure was applied to the control group. In the other two groups, 4 hours of ischemia and 4 hours of reperfusion was applied with a tourniquet from the proximal of the right extremity trochanter majus. In the I/R group, physiological saline was administered for 15 minutes after ischemia and at the time of reperfusion, and 150mg/kg/dose Mesna was administered intraperitoneally to the I/R+Mesna group at the same time. After I/R was completed, the subjects were sacrificed by taking intracardiac blood under deep anesthesia. Tissue samples were then taken from the right gastrocnemius muscles of all rats for histopathological and biochemical examination.

Results: Presence of extravasated erythrocytes, loss of transverse striation, migration of nuclei to the center, separation of muscle fibers, increase in connective tissue, intercellular/interfascicular edema and pnml number in the control group and I/R and I/R+Mesna groups were statistically significant($p<0.001$) Although the IR and IR+Mesna groups are statistically the same. As a result, it was found that although the group in which Mesna was applied histologically and numerically, decreased degenerative values, this was not at a statistically significant level. There was no significant difference between the control and experimental groups in terms of MDA ($p=0.860$), which is an indicator of lipid peroxidation, and MPO, which was included in the evaluation in terms of antioxidant activity ($p=0.539$).

Conclusion: The findings we obtained as a result of our study are that Mesna did not statistically significantly reduce ischemia-reperfusion injury in the lower extremity muscle tissue.

Keywords: Muscle tissue, Mesna, ischemia reperfusion

SİMGELER VE KISALTMALAR

ATP : Adenozin Trifosfat

ADP : Adenozin Difosfat

C1 : Kompleman 1

H₂O₂ : Hidrojen Peroksit

HE : Hematoksilen Eozin

I/R : İskemi/ Reperfüzyon

L- : Lipit Serbest Radikali

LOO- : Lipid Peroksit Radikali

ROOH : Hidroperoksit

MAK : Membran Atak Kompleksi

MASP-2 : Mannan Bağlayıcı Lektin İle İlişkili Proteaz-2

MBL : Mannoza Bağlayıcı Lektin

MCP-1: Monosit Kemotaktik Protein-1

MDA : Malondialdehit

MPO : Miyeloperoksidaz

NAD : Nikotinamid Adenin Dinükleotit

NF-κB : Nükleer Faktör-kappaB

NO : Nitrik Oksit

O₂- : Superoksit

OH- : Hidroksil Radikali

PMNL : Polimorfonükleer Lökosit

SOR : Serbest Oksijen Radikalleri

TNF-α : Tümör Nekrozu Faktörü-α

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 1. Hücre zedelenmesinde kalsiyumun sitoplazmik sebepleri ve sonuçları

Şekil 2. Kantin Oksidaz(KO) sistemi ve serbest oksijen radikali(SOR) oluşumu

Şekil 3. İskemi/Reperfüzyon hasarının mekanizması

Şekil 4. Lökosit ve endotel hücreleri arasında yapışma moleküllerinin aracı olduğu ilişki

Şekil 5. SOR oluşumu ve temizlenmesi

Şekil 6. Üromitexan

Şekil 7. Satürasyon probu ile iskemi uygulanmayan bacakta satürasyon ölçümü

Şekil 8. Satürasyon probu ile iskemi uygulanan bacakta satürasyon ölçümü

Şekil 9. Turnike uygulaması sebebiyle alt ekstremitede oluşan morarma

Şekil 10. Doku örnekleme için gastrokinemius kasının diseksiyonu

Şekil 11. Doku örnekleme için gastrokinemius kasının eksize edilmiş hali

Şekil 12. Gastrokinemius kası HE kesitleri, kontrol grubu

Şekil 13. Gastrokinemius kası HE kesitleri, iskemi/reperfüzyon grubu

Şekil 14. Gastrokinemius kası HE kesitleri, i/R grubu+ Mesna grubu

Şekil 15. Histopatolojik dejeneratif bulguların şema olarak gösterilmesi

Şekil 16. MDA düzeylerinin karşılaştırılmalı dağılımı

Şekil 17. MPO düzeylerinin karşılaştırılmalı dağılımı

TABLÖLAR DİZİNİ

Tablo 1. Dejeneratif bulguların değerlendirilmesinde kullanılan tablo

Tablo 2. Hücre çekirdeğinin merkeze göçü kullanılan tablo

Tablo 3. Histopatolojik skorların gruplara göre ortalamaları ve istatistiksel analizi

Tablo 4. MDA ve MPO düzeylerinin karşılaştırılmalı dağılımı

1. GİRİŞ ve AMAÇ

Plastik cerrahide flep cerrahisi ve replantasyonlar güncel pratikte yoğun uğraş verilen durumlardır. Bu tür cerrahilerin başarı oranı iskemi-reperfüzyon (İ/R) hasarı ile yakından ilişkilidir. Ekstremitelerde iş kazaları, trafik kazaları, tromboembolik hastalıklar, periferik arter hastalıkları, turnike kullanımı vb. birçok sebeple iskemi oluşabilir. Uygun cerrahi veya medikal tedaviler sonrası reperfüzyon sağlanabilir. Bu durumdaki beklenenin aksine, birçok farklı mekanizmanın rol aldığı düşünülen, iskemi reperfüzyon hasarı oluşur. Bu hasar lokal ve sistemik etkiler oluşturarak hastada morbidite ve mortaliteye yol açabilmektedir (1-2). Teknolojik ve bilimsel gelişmelere rağmen bu hasarı önlemeye yönelik kesin bir çözüm bulunamamıştır ve bu da iskemi reperfüzyon hasarını çok araştırılan bir alan haline gelmesine sebep olmaktadır.

Herhangi bir dokuda kan akımının azalması veya tamamen ortadan kalkması sonucu dokunun beslenmesinin ve oksijen ihtiyacının karşılanamaması iskemi olarak tanımlanır. Kan akımının iskemik dokuda tekrar sağlanması durumuna ise reperfüzyon denir (3). Reperfüzyon iskemik dokudaki enerji ihtiyacını tekrar karşılamak ve toksik metabolitleri temizlemek için gerekli bir süreçtir ancak uzun süre iskemik kalmış dokuda metabolik yan ürünlerin üretimini indükleyerek doku hasarını artırır. Bu olay iskemi reperfüzyon hasarı olarak adlandırılır ve iskeminin tek başına verdiği hasarda daha ciddi bir hasara yol açar (3-4).

İskemi ve reperfüzyon hasarı kompleks molekülerin tetiklediği inflamatuvar bir olaydır. Bu olayda temel rol oynayan faktörlerin; lökositler ve serbest oksijen mollekülleri olduğu düşünülmektedir (3). Literatür taramaları yaptığımızda birçok farklı alanda İ/R hasarını azalmak için çok fazla sayıda endojen ve eksojen maddenin bu hasarı azaltmaya yönelik araştırıldığını görmekteyiz. Ancak klinik kullanıma giren ilaç sayısı çok fazla sayıda değildir. Bizim çalışmamızda Mesna(2_Merkaptoetan-Sodyum-Sülfonat) adlı sıklıkla kemoterapötik ajanlara bağlı oluşan hemorajik sistit tedavisinde kullanılan ve antioksidan özellikleri bilinen maddenin araştırılması planlanmaktadır (5-6). Ratlarda daha önce tanımlanmış alt ekstremitte İ/R modeli kullanılarak oluşturulan deneysel modelde, intraperitoneal (İP) yolla 150 mg/kg dozunda iki kere uygulanacak olan bu ilacın İ/R hasarını önleme ya da azaltmaya yönelik etkisinin olup olmadığı değerlendirilmesi amaçlanmaktadır.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. İskemi

Herhangi bir doku veya organda dolaşımın azalması veya tamamen kesilmesi sonucu dokuda veya organda yeterli kan akımının sağlanamaması ve hipoksi oluşması iskemi olarak tanımlanır. İskemi sonucu ortamda toksik metabolit artmaya başlar ve bu olay hücre ölümüne yol açabilmektedir. Kan akımının iskemik dokuda tekrar sağlanması paradoksal olarak iskeminin yarattığı hasara göre çok daha ciddi bir hasara sebebiyet verir (3).

Reperfüzyon evresinde oluşan hasar, hücreye ulaşan oksijen moleküllerinin serbest oksijen radikallerine (SOR) dönüşümü başta olmak üzere birçok mekanizmanın rol aldığı karmaşık bir süreçtir (4). İskemik dokuda mevcut enerji depoları, hücrenin canlılığını sürdürebilmesi için gerekli enerjiyi sağlar. Ancak iskeminin devam etmesi durumunda belli bir süreden sonra bu depolar da tükenir ve hücrede geri dönüşümsüz hasar oluşmaya başlar. İşte bu süre kritik iskemi süresi olarak tanımlanmaktadır ve dokudan dokuya değişkenlik göstermektedir. Normotermik şartlarda bu süre iskelet kasında 4 saat, sinir dokusunda 8 saat, yağ dokusunda 13 saat, deride 24 saat ve kemik dokusuna 4 gün olarak hesaplanmıştır (1).

İskemi hücrede metabolik ve yapısal değişiklikler meydana getirir. İskemik alanda kan akımı azalması ile, hücrelere yeterli miktarda oksijen ulaştırılamaz için oksidatif fosforilasyon azalmaya başlar ve hücre yüksek enerjili fosfat bileşiklerini kaybetmeye başlar(7).

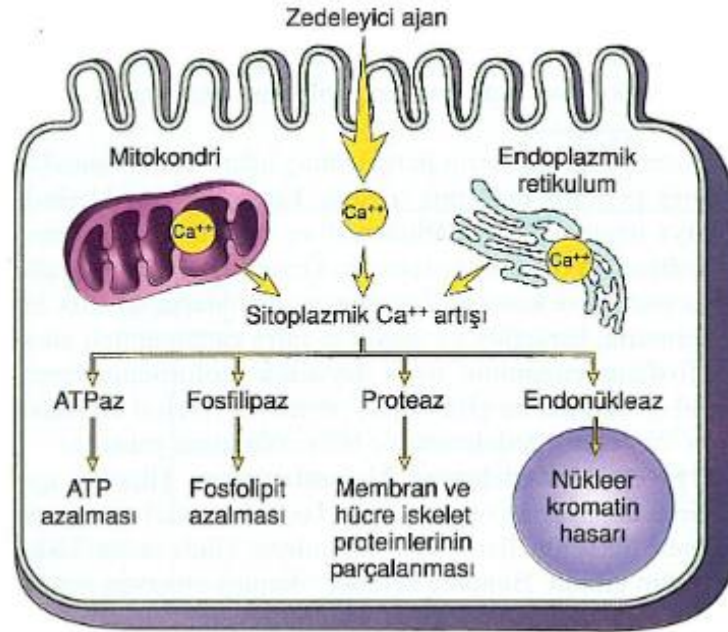
Bu iskemik süreçte ATP üretimi durma evresine gelir ancak dokudaki depolarda kalan ATP yıkıma uğramaya devam eder. ATP yıkımı sonucu sırasıyla adenosindifosfat(ADP), adenosinmonofosfat(AMP), adenosin, inozin ve son olarak da hipoksantin e katabolize olur(8).

Bu yıkım ürünlerinin birikimi sonucu fosfofruktokinaz enzimi aktive olur ve hücresel metabolizma aerobikten anaerobiğe dönmeye başlar. Aktive olan fosfofruktokinaz sayesinde daha az oranda olsa da ATP üretimi olur ancak ciddi oranda glikojen kullanımı gerektirir. İskeminin uzaması hipoksantin ve anaerobik glikoliz metabolitlerinin (laktik asit, hidrojen iyonu, inorganik fosfatlar) hücrede birikerek pH düşüşüne yani asidoza sebep olur. İskemideki uzama ek olarak ksantin dehidrojenazın (KDH), ksantin oksidaza (KO) dönüşümünü de tetikler (8-11).

Meydana gelen asidoz, intrasellüler iyon dengesini bozar. İntrasellüler artan hidrojen iyonunu azaltmak için, $\text{Na}^+ - \text{H}^+$ (sodyum-hidrojen) pompası ile fazla hidrojen hücre dışına atılır ve $\text{Na}^+ - \text{Ca}^{+2}$ pompası ile kalsiyum intrasellüler alana alınır (12-13). Böylelikle hücre içi kalsiyum oranı artmaya başlar. Ve bu artış hücre için sitotoksiktir (15). İskemi süresince hasarlanan endoplazmik retikulum da hücre içine Ca^{+2} salınımına başlar (13,14). Ca^{+2} 'nin hücre içinde aşırı artışı proteolitik enzimler ve fosfolipazların aktivasyonuna yol açar. Fosfolipazların aktivasyonu, mitokondriyal enzim inhibisyonu yapan ve serbest radikal oluşumunu arttıran, araşidonik asit üretimine neden olur (Şekil 1).

Hücre içerisinde oluşan bu sitotoksik mekanizmalar sonucu, ribozomlar granüllü endoplazmik retikulumdan ayrışır. Polizomlar, monozomlara bölünür ve protein sentezi azalmaya başlar. Bu süreçten sonra iskemi durdurulamazsa, geri dönüşümsüz hasar meydana gelir.

Oluşan hasara ilaveten mitokondrilerde şiddetli vakuolizasyon meydana gelir ve matrikste kalsiyumdan zengin amorf yoğunluk birikimi eşlik eder(16). İskemik dönemde oluşan hücresel iyon dengesizliğinin diğer etkisi de proinflamatuvar sitokinlerdeki lökosit adhezyon moleküllerinin sentezinde artma, buna karşılık antioksidan enzimlerin sentezinde azalma olmasıdır. Bu durum olası bir reperfüzyon durumunda hücreyi daha dayanıksız hale getirir(16-17).

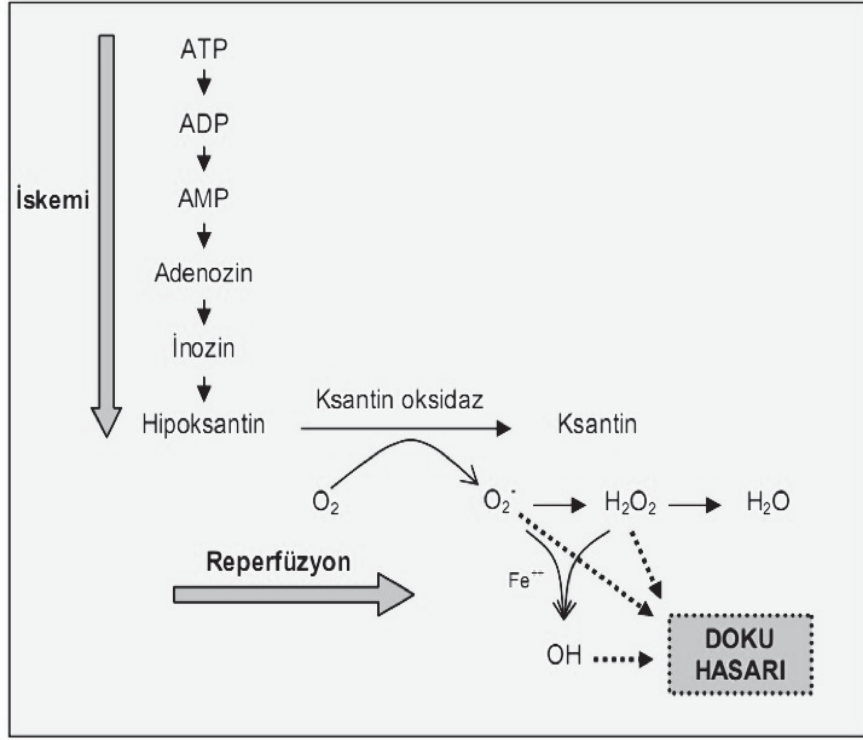


Şekil 1:Hücre zedelenmesinde kalsiyumun sitoplazmik artışının sebepleri ve sonuçları(16).

2.2. Reperfüzyon

Kan akımının iskemik dokuda tekrar sağlanması reperfüzyon olarak adlandırılmaktadır. Bu olay paradoksal olarak iskeminin yarattığı hasara göre çok daha ciddi hasara sebebiyet vermektedir (3). Reperfüzyon evresinde oluşan hasar, hücreye ulaşan oksijenin serbest oksijen radikallerine (SOR) dönüşümü başta olmak üzere birçok mekanizmanın rol aldığı karmaşık bir prosestir (4).

İskemi medikal veya cerrahi olarak ortadan kaldırılrsa bile doku ve organda tam fonksiyonellik sağlanamaz (18,19). Reperfüzyon hasarı SOR, endotelial faktörler ve nötrofillerin sebep olduğu komplike bir sürecin sonucu meydana gelir. Hasar mekanizmasını tetikleyen etkenin, endotel hücrelerindeki hasarlanma olduğu düşünülmektedir (18,20,23-28). Reperfüzyon döneminde oluşan serbest oksijen radikallerinden en çok bilinenleri; Süper oksit (O⁻) anyonu, hidrojen peroksit (H₂O₂) ve hidroksil radikali (OH⁻) dir. Bu ürünlerin oluşumunda nikotinamid adenin difosfonükleotid (NADPH) sistemi ile KO sistemi etkindir (26). Postiskemik dönemde dokuda oluşan serbest radikallerin en önemli kaynağı, KO enzimidir. İskemik dönemde intraselüler Ca²⁺ artışı kalsiyum aracılı proteinazları aktive etmesi sonucu ksantin dehidrojenaz (KDH) dan oluşur. Çalışmalarda KDH nın KO ya dönüşümü intestinal dokuda 10 saniye, miyokard da 8 dakika, karaciğer, dalak, böbrek ve akciğerde 30 dakika sürdüğü gösterilmiştir. Bu enzimatik dönüşümdeki süre farkının, dokuların İ/R hasarına cevabındaki farklılığı ve iskemi süresinin her dokuda farklı olmasını anlamamızı sağlayan bir faktördür. Ek olarak hipoksantin ve ksantin oksidasyonu da serbest radikal kaynağıdır (22,28,29) (Şekil2).



Şekil 2: Ksantin oksidaz sistemi ve SOR oluşumu(106)

Sonuç olarak reperfüzyon süreci dokuda iskemik sürece göre çok daha ağır bir hasarlanmayla sonuçlanır (30).

2.3. İskemi/Reperfüzyon Hasarı

İskemi/reperfüzyon (İ/R) hasarı; travma, myokard enfarktüsü, replantasyonlar, trombembolik hastalıklar, turnike kullanımı, arteriyel oküzyonlar vs. birçok sebeple meydana gelebilmektedir. İ/R hasarı sadece etkilediği organda hasar oluşturmaz, uzak organlarda da hasar oluşturabilmektedir. Uzak organ hasarı, İ/R hasarının esas olduğu organ dışındaki dokularda, böbrek ve akciğer başta olmak üzere, gelişebilen bir hasardır. Yapılan araştırmalarda İ/R nin oluşturduğu bu lokal ve sistemik inflamatuvar yanıt çoklu organ yetmezliği tablosuna hatta mortaliteye sebep olabilmektedir.

İskemi-reperfüzyon hasarının klinik yansımaları; yerel, uzak ve sistemik düzeyde etkiler olarak üç başlık altında toplanmıştır. Yerel düzeydeki etkiler çoğu organda ortak bir etyolojiyle oluşmaktadır. Oluşan hücresel değişiklikler organa özledir (31-35). Genellikle sızıntılı kapiller yatakların meydana getirdiği sıvı ekstrasvazasyonu, doku ödemi ile kendini gösteren sistemik düzeydeki etkilerin ve uzak organlardaki disfonksiyonun mekanizması tam anlaşılamamıştır (8).

İskemi-reperfüzyon hasarı; hücrelere yeterli düzeyde oksijen ulaştırılamaması sonucu, hücrede hemostazın sağlanamaması ile başlayıp, nörofiller ve serbest oksijen radikallerinin dahil olduğu kompleks bir süreçtir (36-44). Dokuya giden kan akımı kesildiğinde, hücresel işlev kaybına yol açan biyokimyasal reaksiyonlar başlar. Hücrede normal şartlarda enerji aerobik yolla sağlanırken, enerji ihtiyacı oksijen yoksunluğu sebebi ile anerobik yola döner. Bu da hücrede asidozla, yüksek enerjili fosfat bileşiklerinin azalmasıyla ve son olarak enzimlerin etkinliklerinin değişmesiyle sonuçlanır (37,39-41).

Dokuların iskekiye verdiği cevap doku tipine, iskemik alanın genişliğine, ortamın sıcaklığına ve iskekiye süresine göre farklılık arz eder. Kas dokusunda normotermik şartlarda kritik iskekiye süresi 2 saatten daha uzunken, ince bağırsakta 30 dakika kadardır (37). Yapılan çalışmalar göstermiştir ki, kas dokusunda yaklaşık 3 saatlik iskekiye sonrası geri dönüşümsüz hücresel başlar ve 6 saatte neredeyse doku tamamen nekroze olur (39). Reperfüzyonla birlikte hücre için gerekli enerji sağlanır ve toksik metabolitler ortamdan uzaklaştırılmaya başlanır. Bu süreç iskemik dokuda oluşan hasarın geri döndürülebilmesi için mutlak gereklidir. Ancak reperfüzyon dokuda paradoksal olarak farklı mekanizmalar ile lokal ve sistemik hasara da yol açabilmektedir.

Yapılan klinik ve deneysel çalışmalar iskemi reperfüzyon hasarını büyük oranda reperfüzyon döneminde gerçekleştiğini bildirmektedir (37,48-50).

Doku perfüzyonundaki azalmaya başlayan hasarlanma süreci, damar geçirgenliğinde artış ve interstisyel alana sıvı kaçışı ile oluşan doku ödemiyle bağlantılıdır. Bu mekanizmadan yola çıkılarak, hasarın etkilerini azaltmaya yönelik proflaksi için; damar endotelinin hasarlanmasını engelleyen ve endotel fonksiyonlarını negatif etkileyecek patolojileri azaltan ajanlar ve yaklaşımlar kullanılmış, etkili bulunmuşlardır (40-42,51). İ/R hasarı çok sayıda karmaşık moleküler olayın rol aldığı inflamatuvar bir prosestir (şekil 3). Bu hasara başlıca sebep olan mekanizmalar;

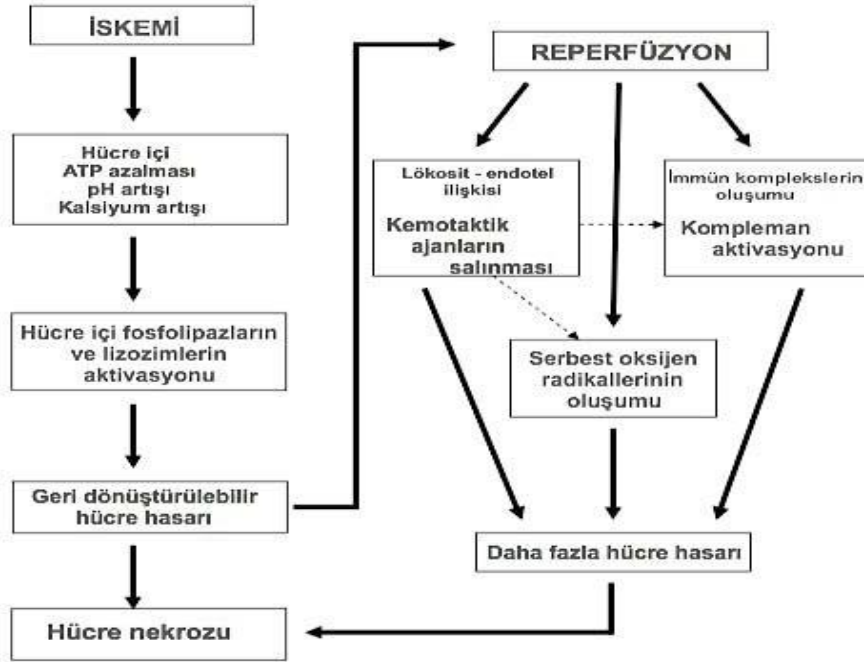
-Polimornükleer lökositlerin(PNML) aktivasyonu

-Serbest oksijen radikallerinin(SOR) ortaya çıkması

-Sitokinlerin salınımındaki artış

-Eikasonoidlerin üretimindeki artış

-Kompleman sisteminin aktivasyonu neden olduğu öne sürölmektedir(31, 52-55).



Şekil 3: İskemi ve reperfüzyon hasarının mekanizması

2.3.1. No-reflow Fenomeni

Uzamış iskemi sonrası reperfüzyon sağlansa bile mikrodolaşımın geri dönüşümsüz olarak kapanması no-reflow fenomeni olarak tanımlanır. İlk kez Ames tarafından tavşan iskemik beyin modelinde tarif edilmiştir (56). Brooks tarafından patolojik olarak tanımlanması yapılmıştır. Yaptığı çalışmada köpeklerde belli alanlarda arteriyel tıkanıklar oluşturulmuş, sonrasında bu alanlarda tekrar kan akımı sağlanmıştır. Ancak reperfüzyon sonrası arterlerde pulsatil akım görülse de, perfüze olmayan alanlar olduğu ve bu alanların histolojik kesitlerde nekroza gittiği gösterilmiştir (57).

Magner bu fenomeni detaylı olarak araştırmıştır. Yaptığı çalışma neticesinde fenomeni açıklayan dört mekanizma olduğunu savunmuştur (58). Bu mekanizmalar:

- Damar içi hemo-konsantrasyon ve trombüs oluşumu

- Kılcal damarlardaki endotel hücrelerinde şişme
- Lökositlerin lümeni tıkaması
- Damar dışı alandaki ödemin lümeni daraltması mikrodolaşımdaki bozukluğun sebepleri olarak tanımlanmıştır.

Çalışmada ayrıca endotel hücrelerindeki şişmenin aktif transport kullanan iyon pompalarının düzgün çalışmaması sebebi ile oluştuğu öne sürülmüştür. Hücrelerin şişmesi kılcal damarlardaki direnci arttırmakta ve reperfüzyonun erken dönemlerinde iyice belirginleşmektedir. Lökosit birikimin, damarları tıkanması bu fenomenin sebeplerinden biri olmaktan ziyade kan akımındaki yavaşlamanın bir sonucu olduğu düşünülmektedir (58).

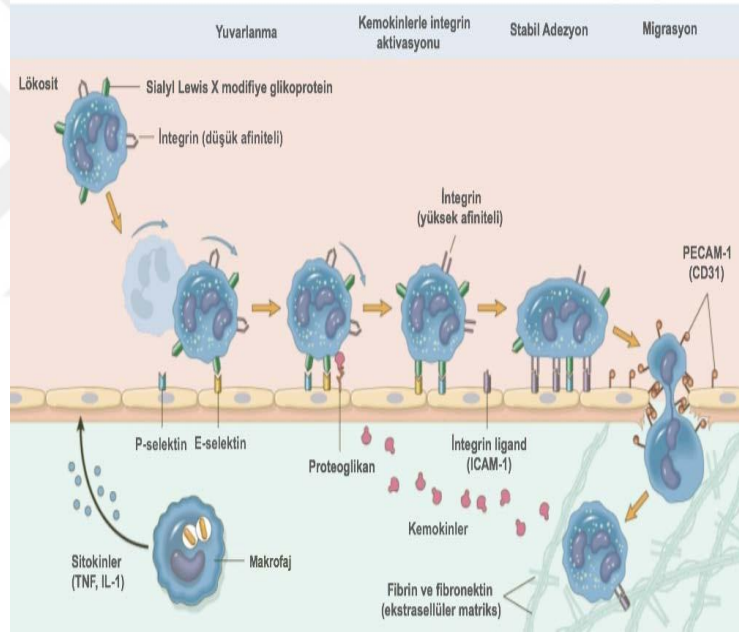
2.3.2. Lökositlerin Rolü

Doku iskemisi sonrası trombositler, endotel hücreleri ve diğer lökositlerden salınan kemotaktik ajanlar; lökosit aktivasyonu, kemotaksis ve lökosit-endotel hücre adhezyonunu meydana getirir (24). Dolaşımda serbest dolaşan nötrofiller aktive olarak, iskemik doku endoteline yapışlar. Daha sonra interstisyel alana geçiş yaparlar. PNML'lerin göçü üç aşamalı olarak gerçekleşmektedir (Şekil 4). Sırasıyla bu göç şu şekilde gerçekleşmektedir;

-ilk olarak adezyon moleküllerinin de yardımıyla endotel boyunca yuvarlanma hareketini gerçekleştirirler (59).

-Daha sonra kendi aralarında oluşturdukları kuvvetli bağlar sayesinde endotel hücrelerine sıkıca tutunurlar. Bu tutunma, lökositlerin hareket etmesi ve SOR salınımı için gereklilik arz etmektedir (60).

-Endotelyal yapışma sonrası lökositler, endotel hücrelerinin aralarında bulunan zayıf bölgelerden interstisyel alana geçiş yaparlar. Ekstravasküler alana ulaşan lökositler, hasarlı bölgeye göç etmeye başlarlar(kemotaksis).



Şekil4: Lökositler ve endotel hücreleri arasında yapışma moleküllerinin aracı olduğu ilişki (31)

İ/R hasarında PNML'in rolü ile ilgili bazı mekanizmalar ileri sürülmüştür (61). Bunlar:

- Mikrovasküler oklüzyon
- Serbest oksijen radikallerinin salınması
- Vasküler permeabilite artışı
- Sitokin salınımında artış

Lökosit göçünde birçok tutunma molekülü rol oynamaktadır (47,48).

Selektinler: Hücre zarı protein olup, adezyonun başlangıç aşamasında rol oynamaktadır. Lökositlerin, doku hasarı olan alanda endotel hücrelerine zayıfça bağlanmasını sağlar ve bu sayede lökositlerin endotel hücreleri boyunca akışının hızını azaltırlar. E, P, L olmak üzere üç alt tipi mevcuttur. İ/R durumunda, endotelde P-selektin ekspresyonu artar ve bunun aracılığıyla lökosit, endotel bağlantısı oluşur.

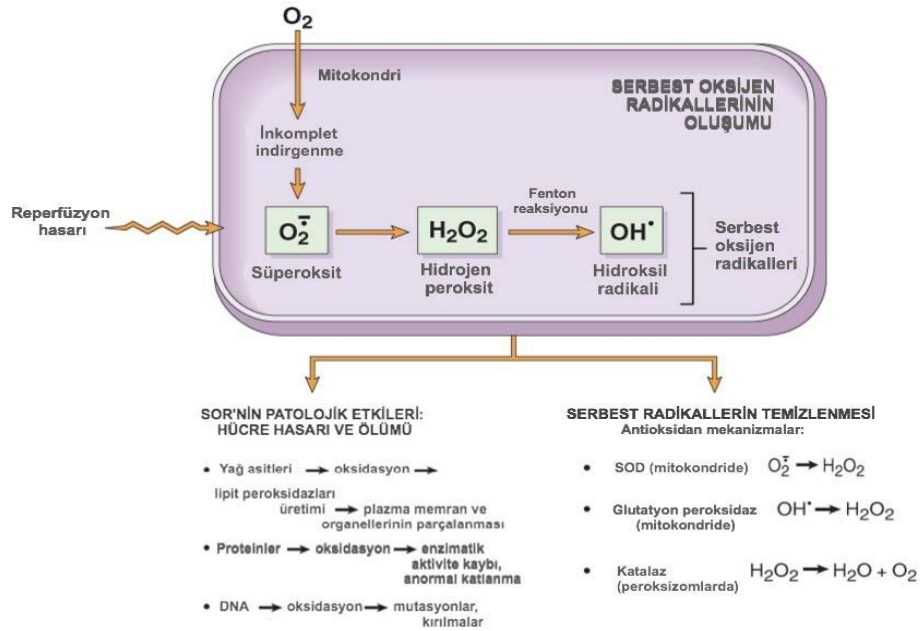
İntegrinler: Lökositlerin endotel hücrelerine kuvvetli bağlanmasını sağlar. Lökositlerin damar duvarında mevcut normal akım varlığında bile hareketsiz olarak durabilmesini sağlayabilmektedirler. Birçok alt tipi mevcuttur ($\beta 1$, $\beta 2$, VLA-4, $\beta 7$, $\alpha 4\beta 7$...). Lökositler Beta-2 integrinler ile endotelyal intraselüler adezyon molekülü-1 ile etkileşimi sonucu kuvvetli bağlanma ve agregasyon gerçekleşir.

İmmünoglobulinler benzeri süper aile: Birçok subgrubu mevcuttur (ICAM-1, ICAM-2, ICAM-3, VCAM-1, PECAM-1, CD-31). Güçlü bağlar kurarak lökositlerin damar lümeninden intersitisyel alana geçişte görev alırlar. PECAM-1 bu aşamada kullanılır.

2.3.3. Serbest Oksijen Radikallerinin Rolü

Serbest oksijen radikalleri eşlenmemiş elektrona sahip, ileri düzeyde reaktif ve stabil olmayan, kısa ömürlü moleküllerdir. Bu moleküller hücrelerin aerobik metabolizmasında oksijenin indirgenmesiyle ara ürün olarak oluşur. SOR'lar normal şartlarda metabolik ara ürün olarak oluşumları düşük miktardadır. Ve farklı enzimatik süreçlerle kolayca vücutta inaktif hale getirilirler. Ayrıca hücrenin mitokondriyal enerji metabolizmasında, prostaglandin sentezinde, fagositozda, ksenobiyotiklerin temizlenmesinde görev alırlar (58,62-63). Üç temel tip serbest oksijen radikali mevcuttur. Süperoksit (O_2^-), hidrojen peroksit (H_2O_2), hidroksil radikali ($OH^\bullet$)'tir.

SOR'lar, özel enzimlerin katalize ettiği reaksiyonlarla birbirlerine dönüşerek organizmada denge halinde bulunurlar (Şekil 5).



Şekil 5: SOR'lerinin oluşumu ve temizlenmesi (16)

2.3.3.1 Süperoksit Radikali

Normal şartlar altında, ATP yıkım ürünü olan hipoksantin, ksantin dehidrogenaz enzimi ile ksantine oksitlenir. Ancak iskemi oluşan bir hücrede ksantin dehidrogenaz, ksantin oksidaza dönüştürülür. Ksantin dehidrogenaz (KDH) substratı nikotinamid adenin dinükleotiti (NAD) iken ksantin oksidaz(KO) substratı oksijendir. İskemi sırasında KDH dönüştüğü için hipoksantin ksantine dönüştürülemez ve dokuda fazlaca hipoksantin birikir. Eğer dokuda reperfüzyon sağlanabilirse, dokuya gelen oksijen yüksek miktardaki hipoksantin, ksantin oksidaz enzimi ile parçalanmasına yol açar. Bu enzimatik reaksiyon sonucu da süperoksit adlı radikal üretimi gerçekleşmiş olur (64, 65). Süperoksit radikali organizmada en sık meydana gelen serbest oksije radikalidir. İskemi süresi uzadıkça, ATP parçalanması ve hipoksantin oluşumu dolayısıyla da reperfüzyon sırasında üretilen süperoksit radikalinin de miktarı da artmış olur.

Süperoksit radikali genellikle reaktivitesi düşük olmakla birlikte geçiş metal iyonları ile reaksiyona girerek hidroksil radikali oluşturabilmektedir (66) (Şekil 5).

2.3.3.2. Hidrojen Peroksit

Süperoksit radikalinin süperoksit dismutaz enzimi (SOD) ile reaksiyona girmesiyle oluşmaktadır. Biyolojik zarları kolayca geçebilen özellikte olmakla birlikte herhangi bir eşleşmemiş elektron içermediğinden radikal niteliği taşımaz.

Hidrojen peroksit'in serbest radikal alt başlığında incelememizin nedeni; ortamda bakır (Cu), demir (Fe) gibi metal iyonları varlığında güçlü bir radikal olan hidroksil radikaline dönüşebilmesidir (66,68) (Şekil 5).

2.3.3.3. Hidroksil Radikali

Tanımlanan reaktif oksijen türleri arasında en güçlü ve en reaktif radikaldir. Yarılanma ömrünün oldukça kısadır ve bu sebeple nerde oluştuysa alanda ve çevresinde etki gösterir. Bu radikal hücrede mevcut tüm molekülleri hasarlayabilecek özelliktedir. Proteinlerde denatürasyon, fonksiyonel bozukluk meydana getirebilirler. Hücre membranındaki yağ asitleri ile reaksiyonları sonucu lipid peroksidasyonuna, hücre membran yapısında bozukluğa ve sonuçta hücre ölümüne neden olabilirler (66-68).

SOR'lar farklı pek çok mekanizma ile doku hasarına sebep olurlar. Potent oksitleyici ve redükte edici ajan olmalarından kaynaklı lipid peroksidasyonu ile hücre membranında direkt hasar oluştururlar (64, 69). Ayrıca araşidonik asit oluşumunu sağlayan plazma membran fosfolipaz A₂ üretimini etkileyerek eikozanoidlerin üretimini de artırmış olur. Artan eikozanoidler de lökosit aktivasyonu ve kemotaksisini artırırlar (69). Ayrıca NF-κB ve aktivatör protein 1 (AP-1) gibi transkripsiyon faktörlerini de uyararak lökosit adezyon molekülü ve sitokin gen ekspresyonunu artırırlar (69).

2.3.4. Kompleman Sistemi

Kompleman sistemi plazmada inaktif olan enzim ve moleküllerin aşamalı antijen-antikor kompleksleri, yabancı mikroorganizmalar vb. yapılarla aktive olduğu bir prosestir. Bu moleküller veya enzimler 3 farklı yolla etkileşerek şiddetli bir inflamatuvar cevap oluşturabilmektedir. Klasik yol, lektin yolu ve alternatif yolu olmak üzere üç ayrı şekilde aktive edilebilirler.

İskemi reperfüzyon hasarında kompleman sisteminin etkisi tam olarak açıklanamamıştır. Bu sistemin aktivasyonu sonrası proinflamatuvar moleküller meydana gelir. Bu moleküller C3a, C5a, iC3b ve C5b-9'dur. C3a ve C5a anaflatoksindirler ve lökosit aktivasyonunda rol oynarlar. C5a lökosit aktivasyonu ve kemotaksise ilaveten makrofaj inflamatuvar protein-1a(MIP-1a), makrofaj inflamatuvar protein-1b(MIP-1b) ve makrofaj inflamatuvar protein-2(MIP-2), monosit kemoatraktan protein-1(MCP-1), TNF-a, IL-1 ve IL-6 sentezlerinin indükleyerek inflamatuvar yanıtı amplifiye eder. Kompleman sistemi Vasküler hücre adhezyon molekülü 1 (VCAM-1) İnterselüler adhezyon molekülü 1 (ICAM-1) E-selektin ve P-selektin olmak üzere dört lökosit adezyon molekülünün üretimini uyarır(107). C5b9 endotelde IL-1a, IL-8 ve MCP-1 moleküllerinin salınımını uyarak lökosit aktivasyonu ve kemotaksisi artışa yol açar. Ayrıca endotel bağımlı vazodilatasyonu inhibe ederek ve endotelde siklik guanozin monofosfatı azaltarak vasküler tonusu bozabilmektedir (108-109).

2.4. İskelet Kasında İskemi Rereperfüzyon Hasarının Fizyopatolojisi

Ekstremitelerde I/R hasarının en hayati bölümünü iskelet kası oluşturur(1). Fizyolojik ve anatomik çalışmalar postiskemik 3. saatte geri dönüşümsüz kas harabiyeti oluştuğunu, 6. saatte de takriben %97'lik fonksiyonel doku kaybının meydana geldiğini göstermiştir (71). Kas dokusu iskemik dönemde mevcut glikojen ve kreatin fosfat depolarını kullanarak iskemiye tolere eder. Ancak iskeminin devamlılığı dokuda enerji depolarının tükenmesi, ATP oluşturulamaması ve kas nekrozuna yol açar. İskeminin 6 saat devam etmesi ATP deposunda %80 azalma ve kas dokusunun tümüne yayılan nekroza yol açar (72).

Kas lifleri, içerdikleri myoglobin miktarına bağlı olarak, kırmızı (tip 1) ve beyaz (tip 2) olarak klasifiye edilir. Kasların çoğunluğu her iki tip lifi de içermekle birlikte biri daha fazla oranda bulunur. Tip 1 (yavaş kasılan) lifler enerji üretiminde aerobik metabolizma, tip 2 (hızlı kasılan) liflerde enerji üretiminde anaerobik metabolizma baskındır. Bu sebeple kaslarda iskemiye duyarlılıkta farklı olabilmektedir (1). İskemi süresi ve etkilenen kastaki lif tipi iskeminin oluşturduğu hasarda etkili olmakla birlikte, kasın vücuttaki yerleşimi de oluşan hasarda etkilidir. Örneğin, distalde oluşan hızlı soğuma sebebiyle, proksimal ekstremitte kas dokusu, distal kas dokusuna göre iskemiye daha duyarlıdır(1).

2.5. Lipid Peroksidasyonu ve Malondialdehit

Serbest radikallerin hücrede başlamasına yol açtığı en önemli ve zararlı olay lipid peroksidasyonudur. Çoklu doymamış yağ asitlerinin oksidatif olarak parçalanmasına lipid peroksidasyonu denir.

Lipid peroksidasyonun başlatıcı mekanizması organizmada oluşan kuvvetli yükseltgen bir radikalin hücre zarındaki çoklu doymamış yağ asidi zincirindeki alfa metilen gruplarından bir hidrojen atomunu uzaklaştırmasıdır. İn vivo şartlarda bu süperoksit radikali ile hidroksil radikalinin olduğu kabul edilir.

Yağ asidi zincirinden bir hidrojen atomunun uzaklaştırılması ile yağ asidi zinciri radikale dönüşür. Bundan sonra oluşan radikal alkil radikali olup dayanıksız bir türevidir ve bir dizi değişiklik geçirir. Özellikle molekül içi çift bağ aktarımı ile dien konjugatları ve sonrasında lipid radikalinin moleküler oksijenle reaksiyonu sonucu lipid peroksi radikali (LOO-) meydana gelir. Lipid peroksi radikali hücre membranındaki diğer çoklu doymamış yağ asitlerini de etkiler ; hidroperoksit (ROOH) ve yeni bir alkil radikali oluşturur. Lipid peroksidasyonu, lipid hidroksiperoksitlerinin aldehit ve diğer karbonil bileşikleri ile etkileşmesi sonucu etan, pentan gibi uçucu gazlara dönüşür. Yani ya hücre düzeyinde metabolize olurlar ya da zararlı etkileri çevre hücrelerde yayılır (19,29,73,75). Lipid peroksidasyonu hücre zarında akıcılığın kaybına, membran potansiyelinde azalmaya, hidrojen ve diğer iyonlara karşı geçirgenliğin artmasına, böylelikle hücrede hasara ve hücre içeriğinin serbestleşmesine sebebiyet verir. Ek olarak lipid peroksidasyonunun son ürünlerinden biri olan malondialdehit (MDA) hücre zarı yapısındaki bileşenlerin polimerizasyonuna ve çapraz bağ yapmalarına sebebiyet verebilmektedir. Böylelikle, hücre yüzeyinin durumunu, enzim aktivitesini, iyon transportunu etkileyebilir. MDA lipid peroksidasyon göstergesi olarak kabul edilmektedir (29, 74-75).

2.6. Antioksidanlar

Organizmada farklı enzimatik reaksiyonlarla sürekli bir serbest oksijen radikali oluşumu vardır. Ancak oluşan radikallerin zararlı etkilerini ortadan kaldıracabilecek antioksidan sistemler de mevcuttur.

Bu sebeple organizmada üretilen serbest radikaller istenmeyen bir hasara yol açmaz (111). Organizmada oksidan ve antioksidan sistemler denge halinde olmalıdır. Serbest radikallerde artış olup bunun antioksidan sistemlerle dengelenememesi durumunda oksidatif stres dolayısıyla oksidatif hasar ortaya çıkabilmektedir (29). Antioksidanlar serbest radikal oluşumunu engellemek, oluşan radikali etkisiz hale getirmek, oksidatif hasar oluşumunu engellemek, hasarlanmış yapıları tamir etmek vb. etkilere sahiptir (112). Organizmamızda birçok antioksidan enzim ve molekül mevcuttur. Başlıca enzimler; süperoksit dizmutaz, katalaz, glutatyon peroksidaz ve glutatyon redüktaz'dır (20).

2.6.1. Süperoksit Dismutaz (SOD)

SOD, O_2^- 'nin hidrojen peroksit ve moleküler oksijene dönüşümünü katalize etmektedir. Organizmada oksidatif stres oluştuğu zaman ilk savunma mekanizmasını oluşturur ve enzim aktivitesini artırır. Aerobik tüm hücrelerde mevcuttur(110).

2.6.2. Katalaz

Hücre içinde yoğun şekilde peroksizomların içinde yer alır ve yapısında dört adet hem grubu içerir. Hidrojen peroksitin suya ve oksijene dönüşümünü katalize eden enzimdir. Böylece hidroksil radikallerine dönüşümü engellemiş olur (114)

2.6.3. Glutatyon Peroksidaz(GPO)

Hücre içinde yer alır ve yapısında selenosistein bulunmaktadır. Hidrojen peroksit ve organik hücre içi enzim olup aktif merkezinde selenosistein içerir. Hidrojen peroksit ve lipid hidroperoksitlerini hücrede zararsız hale getirilmesinde rol alır ve böylece hücre zarının hasar görmesini engeller (115). Eritrositlerde bulunan en etkili antioksidan enzimdir (116).

2.6.4. Glutatyon Redüktaz

Yapısında selenyum bulunduran bu enzim, yükseltgenmiş glutatyonu NADPH varlığında indirgenmiş glutatyonla dönüştürür. Bu yolla hücreleri oksidatif hasara karşı korur (115-117).

Vücutta antioksidan olarak bulunup enzim işlevi olamayan başlıca maddeler; vitamin C, ürik asit, glukoz, sistein, vitamin E, beta karoten, bilirubin, ubikinol ve flavanoidlerdir. Ayrıca metal iyonlarını bağlayarak antioksidan etkinlik gösteren diğer moleküller; ferritin, transferin, haptoglobulin, hemopeksin, seruloplazmin ve albümindir (20).

2.7. MESNA (2-MERKAPTOETAN SODYUM SÜLFONAT)

Mesna bir tiyol birleşigidir. Farmakokinetik olarak rat üzerine yapılan çalışmalarda intravenöz uygulamada Mesna periferik kanda hızla metabolit mesna disülfide(dimesna) oksitlenir. Mesna ve dimesna barsaktan emilir, burada dimesna redüksiyona uğrar ve değişmeden hepatik damarlardan geçer.

Böbreklerde dimesna glomerüler filtrasyona tabi tutulur ve ardından tekrar emilir. Renal tübüler epitelyumda glomerüler filtrasyona uğrayan dimesna'nın %30-50 si mesna ya indirgenir. Mesna daha sonra tübüler lümene ve dolayısıyla idrara geri atılır. Böylece dimesna hem barsak hem de böbrek epitel hücrelerinde aktif tiyol formuna indirgenir. Bu indirgeme mekanizması muhtemelen glutatyon redüktaz ve tiyol transferaz enzimlerini aracılığıyla olur(85).

Genel kullanım alanları; solunum yolu hastalıklarında mukolitik, otolojik-nörolojik ameliyatlarda kimyasal diseksiyon aracı ve bazı kemoterapötiklere bağlı gelişen hemorajik sistit tedavisidir (81-84). Mesna sitoprotektif bir etki gösterir. Bunu da iofosfamid ve siklofosfamidin yıkım ürünlerine bağlanarak, daha az zararlı ürünler oluşturarak sağlar (83).

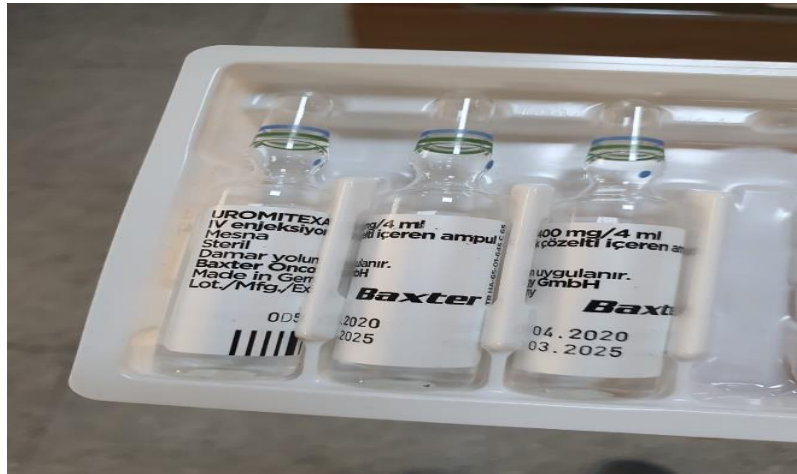
Mesna sülfidril grupları üzerinden oluşturduğu etki ile potansiyel serbest radikal temizleyicisidir (86). Bu da barsak, karaciğer, kolon, over, pankreas ve akciğer gibi birçok farklı organda SOR ilişkili doku toksistesinin aza indirildiğinin deneysel olarak gösterilmesine dayandırılarak öne sürülmektedir (87-92). Ayrıca hidrojen peroksit üretimi üzerindeki direkt supresif etkisi sebebi ile tiyol içeren Mesna, oksidatif yaralanmalarda serbest radikallerin toksik etkilerini sınırlayabilmektedir. Dolayısı ile antioksidan olarak değerlendirilebilir (91,122).

3.GEREÇ ve YÖNTEM

Bu tez çalışması, Dicle Üniversitesi Rektörlüğü Deney Hayvanları Etik Kurul Başkanlığının 2021/24 protokol numaralı çalışması olarak onay alındı, Dicle Üniversitesi Deneysel Araştırmaları Merkezinde uygulandı. Çalışmamızda ağırlıkları 200-250 gram olan 24 tane Wistar Albino cinsi erkek sıçan deneyde kullanıldı. Sıçanlar uygun kafeslerde, 21 ± 2 C° sıcaklıkta ve 12 saat karanlık - 12 saat aydınlık ortamın sağlandığı şartlarda barındırıldı. Deneklerin beslenme ihtiyaçları, standart laboratuvar yemi ve su verilerek düzenli olarak karşılandı. Cerrahi işlemlerimin hepsi % 10'luk ketamin HCl (50 mg/kg) ve ksilazin HCl (10 mg/kg) anestezisi ve steril şartlar altında, aynı cerrah tarafından yapıldı. Deney süresince herhangi bir deney havanı kaybı yaşanmadı.

3.1 Mesna Uygulanması

Üromitexan 400 mg/ml intravenöz enjeksiyonluk çözelti içeren ampul Baxter Oculogy GmbH lisanslı EİP Eczacıbaşı İlaç Pazarlama A.Ş. tarafından sağlandı(Şekil 6). 30 °C altında muhafaza edildi. İskemiden 15 dakika, reperfüzyondan hemen önce olmak üzere 150mg/kg dozda olmak üzere intraperitoneal yolla iki defa uygulandı.



Şekil 6: Uromitexan

3.2 DENEKLERİN GRUPLANDIRILMASI

Ratlar, eşit sayıda (n=8) ve rastgele üç gruptan birine dahil edildi.

Kontrol Grubu: Herhangi bir işlem uygulanmadı.

İskemi-reperfüzyon grubu: Sol alt ekstremiteye iskemiden 15 dk ve reperfüzyondan hemen önce olmak üzere iki defa intraperitoneal olarak SF yapıldı.

İskemi reperfüzyon+Mesna grubu: Sol alt ekstremiteye iskemiden 15 dk ve reperfüzyondan hemen önce olmak üzere iki defa intraperitoneal olarak 150mg/kg Mesna yapıldı.

3.3. Cerrahi Teknik

3.3.1 Alt Ekstremitte İskemi / Reperfüzyon Modeli

Literatürde yer alan alt extremitte reperfüzyon modeli baz alınarak çalışmaya başlandı. Kontrol grubuna herhangi bir işlem uygulanmadı. İ/R ve İ/R+Mesna gruplarına 4 saat iske mi sonrası 4 saat reperfüzyon uygulandı. I/R tamamlandıktan sonra tüm ratların sağ taraf gastrokinemius kaslarından histopatolojik ve biyokimyasal inceleme için doku örneği alındı. Denekler derin anestezi altında intrakardiyak kan alınarak sakrifiye edildi.

3.3.2. İskemi-Reperfüzyon

Sıçanların sağ arka bacaklarına iske mi uygulamak amacıyla kalça eklemi hizasında 2,0 mm kalınlığında ip ile turnike yapıldı. Sol alt ekstremitte ye turnike uygulanmadan satürasyon probu yerleştirilerek satürasyon ölçüldü (Şekil 7).

İskemi oluşturulan sağ bacakta satürasyon kontrolü yapıldı (Şekil 8). İskemi süresince alt ekstremitede gittikçe artan morarmama izlendi (Şekil 9). Dört saatlik iskemi süresi sonunda turnike makas yardımıyla kesildi ve reperfüzyon evresi başlatıldı.



Şekil 7: Satürasyon probu ile iskemi uygulanmayan bacakta satürasyon ölçümü



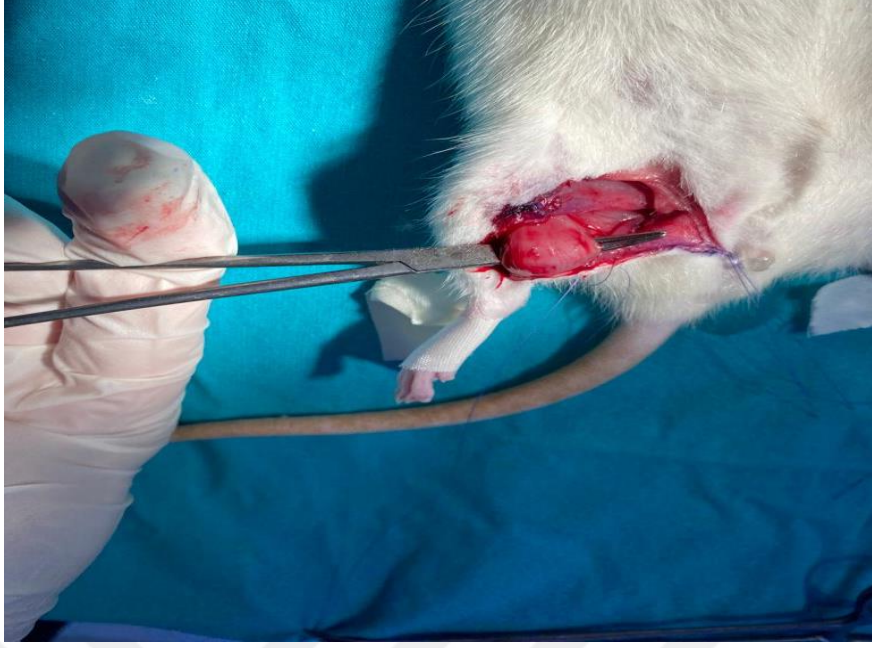
Şekil 8: Satürasyon probu ile iskemi uygulanan bacakta satürasyon ölçümü



Şekil 9: Turnike uygulaması sebebiyle alt ekstremitelerde oluşan morarma

3.3.3. Doku Örneklemesi

Dörder saatlik iskemi reperfüzyon döngülerinin sonunda tüm ratlar derin anestezi altında intrakardiyak kan alınarak kurban edildi. Tüm ratların sağ taraf gastrokinemius kası incelenme için dişke edildi (Şekil 10). Daha sonra eskize edildi. Alınan doku örnekleri histopatolojik ve biyokimyasal incelemeler için parçalara bölündü (Şekil 11).



Şekil 10: Doku örnekleme sonrası gastrokinemius kasının diseke edilmiş hali



Şekil 11: Doku örnekleme için gastrokinemius kasının eksize edilmiş hali

3.4. Histopatolojik Değerlendirme

Kontrol grubu(grup1), İ/R uygulanan grup (grup 2) ve İ/R uygulanıp iki defa Mesna uygulanan grup (grup 3) her biri için 8'er sıçan kullanıldı. Gastrokinemius kaslarından alınan örnekler histopatolojik inceleme için %10'luk tamponlu formaldehite konularak tespit edildi. Tespit edilen dokular standart ışık mikroskobu takip yönteminden geçirilerek parafin bloklar oluşturuldu. Parafin bloklardaki örneklerden mikrotom ile 5-µm kalınlıkta kesitler alındı ve her örnek hematoxilen-eozin (HE) boyası ile boyandı. HE boyalı kesitler ışık mikroskopunda histopatolojik olarak değerlendirildi. Her örnekte 5 seri kesit incelendi. Tüm patolojik incelemeler, kesitlerin hangi gruba ait olduğu bildirilmeden tek bir patolog tarafından kör olarak yapıldı.

Preparatlar ışık mikroskobu altında dejeneratif bulguları skorlamak için (0-4 puanlama) incelendi(Tablo 1). Ayrıca bu seri kesitlerin herbirinin rastgele 5 ayrı alanında PNML sayısı sayılarak toplandı ve ortalaması alındı. Dejeneratif bulgular;

- ekstravaze eritrosit varlığı
- enine çizgilenme kaybı
- çekirdeğin merkeze göçü
- kas liflerinde ayrılma
- bağ dokusu artışı
- interselüler ve interfaziküler ödem varlığı
- inflamatuvar hücre sayısı(PNML)

Dejeneratif bulguların değerlendirilmesinde kullanılan skorlama:

- 0= dejeneratif bulgu yok
- 1= az düzeyde dejeneratif bulgu
- 2= orta düzeyde dejeneratif bulgu

3= orta-çok düzeyde dejeneratif bulgu

4= yüksek düzeyde dejeneratif bulgu

Tablo1: Dejeneratif bulguların değerlendirilmesinde kullanılan tablo

	Bulgu yok	Az	Orta	Orta-çok	Yüksek
Ekstravaze eritrosit varlığı	0	+1	+2	+3	+4
Enine çizgilenme kaybı	0	+1	+2	+3	+4
Çekirdeğin merkeze göçü	0	+1	+2	+3	+4
Kas liflerinde ayrılma	0	+1	+2	+3	+4
Bağ doku artışı	0	+1	+2	+3	+4
İnterselüler ve interfasiküler ödem varlığı	0	+1	+2	+3	+4

Çekirdeklerin merkeze göçün değerlendirilirken her hayvan için beşer tane preparat üzerinde bütün alanlar değerlendirildi (Tablo 2). Merkeze göç eden kas hücresi çekirdeği hiç 0 (bulgu yok), 1-3 aralığında çekirdek izlendiyse +1 (az) , 4-7 aralığında çekirdek izlendiyse +2 (orta), 8-10 aralığında çekirdek izlendiyse +3 (orta-çok), 10 taneden fazla çekirdek izlendiyse +4 (yüksek) olarak puanlandırıldı. Daha sonra bu skorlar istatistiksel olarak anlamlılık ifade edip, etmediği program aracılığıyla değerlendirildi.

Tablo 2: Çekirdeğin merkeze göçünü gösteren tablo

	Bulgu yok (0)	Az (+ 1)	Orta (+ 2)	Orta- Çok (+ 3)	Yüksek (+ 4)
Merkeze göç eden kas hücresi çekirdeği sayısı	0	1-3	4-7	8-10	>10

3.5. Biyokimyasal Değerlendirme

Biyokimyasal analiz için alınan rat deri dokuları %10 (w/v) olacak şekilde pH 7.4 fosfat tamponu içinde homojenizatörle homojenize edildi. Homojenizasyon sonrası örnekler 10.000 g' de 10 dakika santrifüj edildi. Süpernatanttan, Sunred marka Rat MDA ve MPO Elisa Kitleri ile malondialdehit (MDA) ve miyeloperoksidaz (MPO) düzeyleri tayin edildi. Sonuçlar MDA da, nmol/mg protein (mg/ml ve MPO'da pg/ml cinsinden belirlendi

3.6. İstatiksel Değerlendirme

Çalışmamızda, üç grup oluşturulmuş ve bu gruplarda histopatolojik ve biyokimyasal parametreler kıyaslanmıştır. Biyokimyasal olarak doku MPA ve MPO enzimleri, histopatolojik olarak kas dokusunun dejenerasyon bulguları karşılaştırılmıştır. Bağımsız grupların karşılaştırılması amacıyla denek sayısı göz önünde bulundurularak normallik testleri uygulanmaksızın parametrik olmayan Tek Yönlü Varyans Analizi (Kruskal Wallis) uygulanmıştır. Sonuçlar ilgili tablolarda ortalama±st. Sapma ve ortanca (minimum – maksimum) kullanılarak özetlenmiştir. Oluşturulan tablolarda istatistiksel olarak, $p<0,05$ seviyesinde anlamlılık ifade edilmiştir. Analizlerin gerçekleştirilmesi amacıyla SPSS 15.0 paket programı kullanılmış ve istatistiksel anlamlılık sınırı olarak $p<0.05$ kabul edilmiştir.

4. BULGULAR

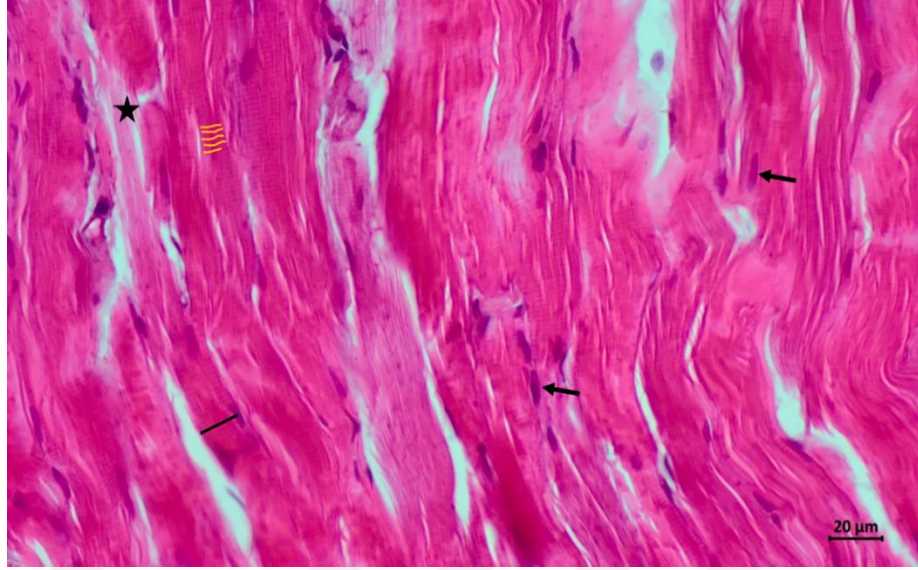
4.1 Histopatolojik Bulgular

Kas dokularında dejeneratif bulgular değerlendirildi ve skorlamaları yapıldı. Deneklerin dejeneratif histoloji skorlarında ayrı ayrı aldıkları puanlar Tablo 4.1’de gösterilmiştir. Dejeneratif histoloji skorları en yüksek İ/R grubunda ölçülmüştür.

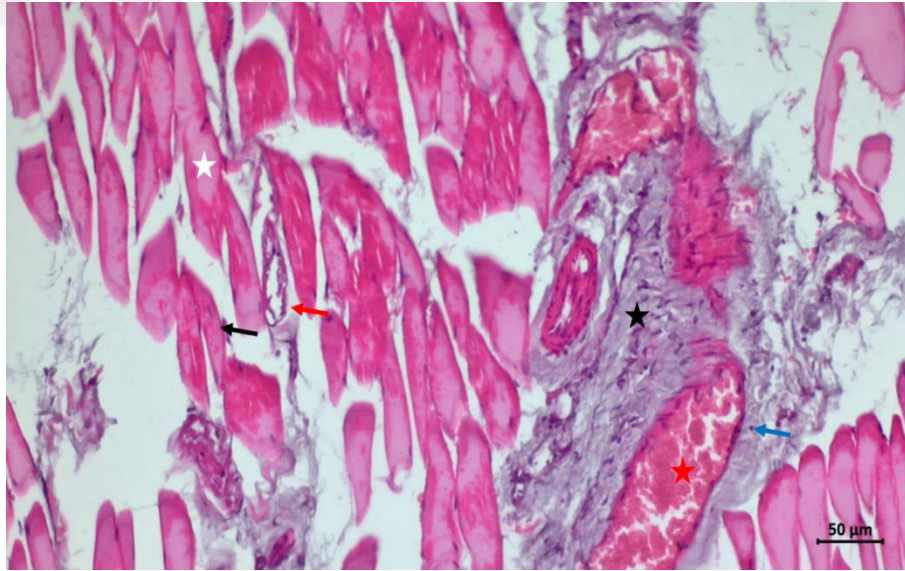
Kontrol grubuna herhangi bir işlem uygulanmadı ve bu grubun kas kesitlerinde, kas liflerinin longitudinal ve düzgün şekilde seyrettiği, bağ doku alanlarındaki kollajen lif dağılımının düzenli olduğu , çizgili kas çekirdeklerinin kas lifinin periferinde ve çok sayıda olduğu gözlemlendi. Kas liflerinde enine çizgilenmelerin (A ve I bandları) belirgin olduğu gözlemlendi (Şekil 12).

İ/R grubunda ;transversal ve longitudinal kas kesitlerinde, kas liflerinde dejenerasyon, bağ doku alanında yoğun fibrozis ve pmnl , artmış ödem, vasküler konjesyon ve dilatasyon , damar endotelinde bazal membran kalınlığı dikkati çekti (Şekil 13).

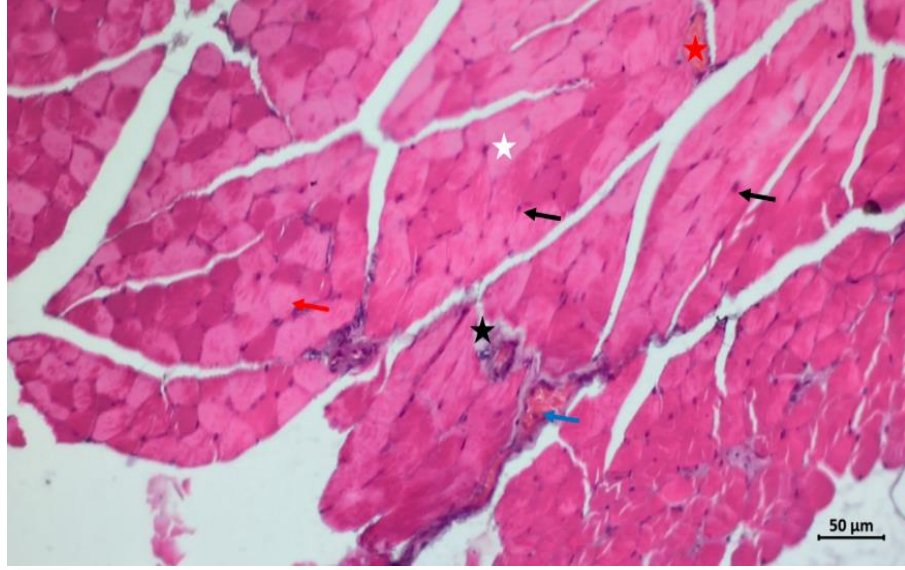
İ/R ve Mesna uygulanan grupta; grubu transversal kas kesitlerinde, kas liflerinin normale yakın görünümde ve dizilimde olduğu, çekirdeklerin kas liflerinin periferinde ve çok sayıda olduğu gözlemlendi . Vasküler konjesyon ve dilatasyonda , pmnl sayısında , ödem ve fibrozis yoğunluğunda azalma izlendi (Şekil 14).



Şekil 12: Gastrocnemius Kası HE Kesitleri: Kontrol grubu: Kontrol grubu kas kesitlerinde, kas liflerinin longitudinal ve düzgün şekilde seyrettiği (çizgi), bağ doku alanlarındaki kollajen lif dağılımının düzenli olduğu (siyah yıldız), çizgili kas çekirdeklerinin kas lifinin periferinde ve çok sayıda olduğu (siyah ok) gözlemlendi. Kas liflerinde enine çizgilenmelerin (A ve I bandları) belirgin olduğu gözlemlendi (sarı çizgiler).



Şekil 13: Gastrocnemius Kası HE Kesitleri-İskemi reperfüzyon grubu: İskemi reperfüzyon grubu transversal ve longitudinal kas kesitlerinde, kas liflerinde dejenerasyon (siyah ok), bağ doku alanında yoğun fibrozis (siyah yıldız) ve pml (mavi ok), artmış ödem (beyaz ok), vasküler konjesyon ve dilatasyon (kırmızı yıldız), damar endotelinde bazal membran kalınlığı (kırmızı ok) dikkati çekti.

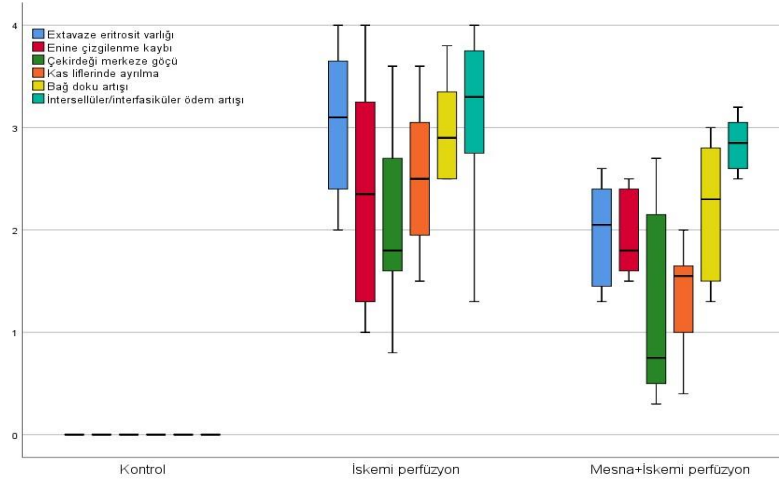


Şekil 14: IR+Mesna grubu transversal kas kesitlerinde, kas liflerinin normale yakın görünümde ve dizilimde olduğu, çekirdeklerin kas liflerinin periferinde ve çok sayıda olduğu gözlemlendi (siyah ok). Vasküler konjesyon ve dilatasyonda (kırmızı yıldız), pmnl sayısında (mavi ok), ödem (beyaz yıldız) ve fibrozis yoğunluğunda (siyah yıldız) azalma izlendi.

Kontrol grubu ile İ/R ve İ/R+Mesna gruplarında ekstrasvaze eritrosit varlığı, enine çizgilenme kaybı, çekirdeğin merkeze göçü, kas liflerinde ayrılma, bağ doku artışı, interselüler/interfasiküler ödem ve pmnl sayısı istatistiksel olarak farklı olmasına rağmen, IR ve IR+Mesna grubu istatistiksel olarak aynıdır. Sonuç olarak histolojik olarak ve sayısal ölçümlerde Mesna uygulanan grubun dejeneratif değerlerde düşme sağladığı halde bunun istatistiksel olarak anlamlı düzeyde olmadığı bulunmuştur (Tablo 3) (Şekil 15).

Tablo3: Histopatolojik skorların gruplara göre ortalamaları ve istatistiksel analizi.

	Kontrol	IR	IR+Mesna	p
Extavaze eritrosit varlığı	0(0-0) ^a 0,0±0,0	3,04±0,72 3,1(2-4) ^b	1,96±0,5 2,6) ^b	<0,001
Enine çizgilenme kaybı	0(0-0) ^a 0,0±0,0	2,35±1,11 4) ^b	1,95±0,41 2,5) ^b	<0,001
Çekirdeği merkeze göçü	0(0-0) ^a 0,0±0,0	2,08±0,88 3,6) ^b	1,23±0,97 2,7) ^b	<0,001
Kas liflerinde ayrılma	0(0-0) ^a 0,0±0,0	2,51±0,71 3,6) ^b	1,35±0,56 2) ^b	<0,001
Bağ doku artışı	0(0-0) ^a 0,0±0,0	2,98±0,49 3,8) ^b	2,19±0,7 3) ^b	<0,001
İnterselüler/interfasiküler	0(0-0) ^a 0,0±0,0	3,11±0,89 4) ^b	2,84±0,26 3,2) ^b	<0,001
pmnl	0(0-0) ^a 0,0±0,0	63,5(44-93) ^b	50(38-76) ^b	<0,001



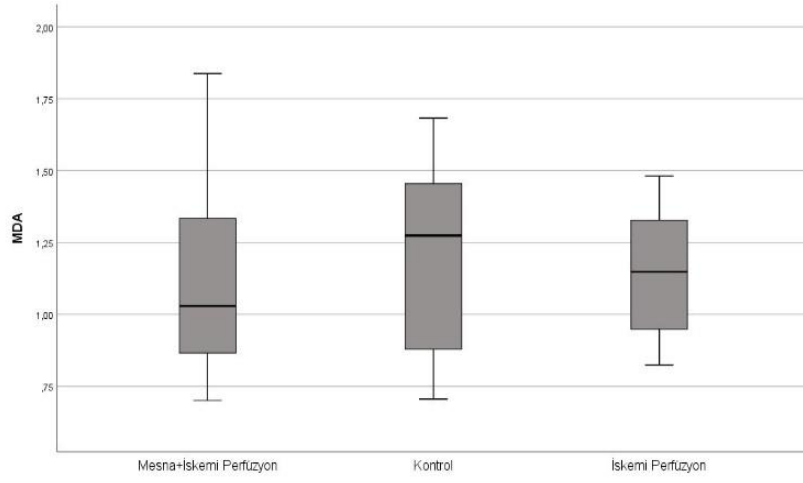
Şekil 15: Histopatolojik dejeneratif bulguların şema olarak gösterimi

4.2. Doku Malondialdehit (MDA) ve Miyeloperoksidaz (MPO) Düzeyleri

MDA ve MPO değişkenleri bağımsız 3 grup (Mesna+İskemi Perfüzyon, Kontrol ve İskemi Perfüzyon) arasında Kruskal Wallis testi ile karşılaştırılmıştır. Sonuç olarak bu üç grup ortancaları (medyan)arasında istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık bulunmamıştır (sırasıyla p; 0.860 ve 0.539) (tablo4) (Şekil 16,17).

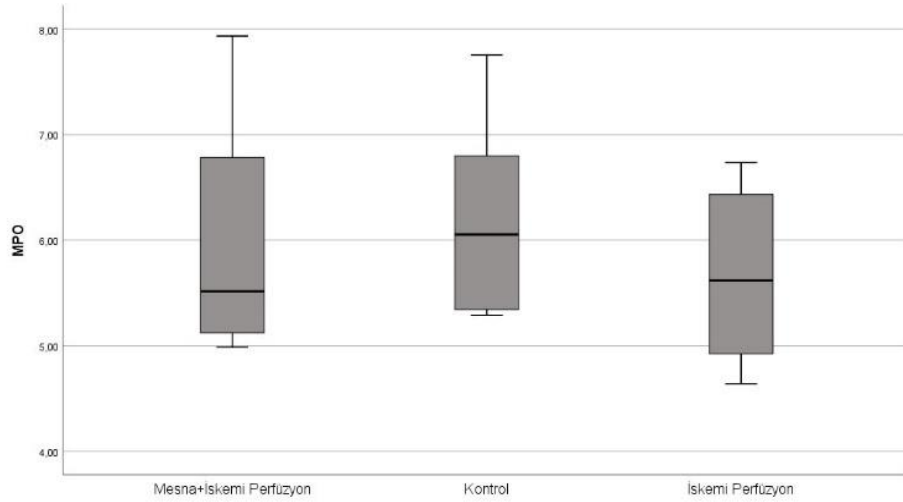
Tablo4: MDA ve MPO Düzeylerinin Karşılaştırılmalı Dağılımı. Kontrol ve deney grupları arasında MDA enzimi (p=0.860) ve MPO enzimi(p=0,539) açısından anlamlı bir fark bulunamadı.

	MDA		MPO	
	Mean±S.Dev.	Median (Min.-Max.)	Mean±S.Dev.	Median (Min.-Max.)
Mesna+İskemi Perfüzyon	1.12±0.37	1.03(0.7-1.84) 1.27(0.71-1.68)	5.97-1.19	5.52(4.99-7.93) 6.05(5.29-7.76)
Kontrol	1.2±0.35	1.15(0.82-1.48)	6.18-0.91	5.62(4.64-6.74)
İskemi Perfüzyon	1.14±0.24		5.67-0.8	
p		0.860		0.539



Şekil 16: MDA Düzeylerinin Karşılaştırmalı Dağılımı.

Kontrol ve deney grupları arasında istatistiksel olarak farklılık izlenmedi($p=0.860$).



Şekil 17: MPO Düzeylerinin Karşılaştırmalı Dağılımı.

Kontrol ve deney grupları arasında istatistiksel olarak farklılık izlenmedi($p=0.539$).

5. TARTIŞMA

Herhangi bir doku veya organda dolaşımın azalması veya tamamen kesilmesi sonucu dokuda veya organda yeterli kan akımının sağlanamaması ve hipoksi oluşması iskemi olarak tanımlanır. İskemi sonucu ortamda toksik metabolit artmaya başlamakta ve bu olay hücre ölümüne yol açabilmektedir. Kan akımının iskemik dokuda tekrar sağlanması paradoksal olarak iskeminin yarattığı hasara göre çok daha ciddi bir hasara sebebiyet verir (3).

İskemi reperfüzyon hasarı lokal olarak kalmayıp sistemik etki edebilmektedir. Vücutta yaygın hücre harabiyetine sebep olup çoklu organ yetmezliğine ilerleyen tablolar oluşturabilmektedir. Vücuttaki bu yıkım süreci lökosit migrasyonu, mikrosirkülasyondaki düzensizlikler, serbest oksijen radikallerinin artması, endotelyal hasar ve kompleman sisteminin uyarılması gibi bir çok mekanizma öne sürülmektedir(53-69)

Reperfüzyon sonrası oluşan hasarda, hücreye ulaşan oksijen moleküllerinin serbest oksijen radikallerine (SOR) dönüşümü önemli bir yere sahiptir (4). Çalışmalar SOR'lerinin nötrofillerin postiskemik dokuya alınımında rol aldığını ancak aynı zamanda aktive nötrofillerin potansiyel bir SOR kaynağı olduğunu da öne sürmüştür(35,101) Arato ve ark.larının alt extremité üzerinde yaptıkları çalışmada revaskülarizasyon yapıldıktan sonra erken dönemde SOR'lerinin ciddi miktarda arttığını göstermişlerdir(63). SOR'leri potent oksitleyici ve redükte edici özellikleri sebebi ile lipid peroksidasyonuna sebep olarak direkt hücre zarına hasar verirler (68-69). Ayrıca mezenşial hücreler ve nötrofiller kemotaktik faktörler salgılayarak hasarlı alana nötrofil migrasyonuna sebep olur. Çalışmalarda mezenşial hücreler ve nötrofil salınımına yol açan kemotaktik faktörler(IL-8 gibi) dokuya nötrofil migrasyonuna,nötrofil aktivasyonuna ve böylelikle daha fazla doku hasarına yol açtığı gösterilmiştir (102,103).

İskelet kası iskemiye duyarlılığı ile bilinen bir dokudur ve kritik iskemi süresi 2.5-4 saat olarak tespit edilmiştir (37,93,94). Kritik iskemi süresi; iskemi başlangıcından, hürede kalıcı hasar oluşmaya başladığı evreye kadar geçen süre olarak tanımlanır (95). İskelet kası için farklı araştırmalarda farklı kritik iskemi süreleri gösterilmiştir. Bunun sebepleri kasın tipi, ortam sıcaklığı, vücut ısı ve kollateral dolaşım mevcudiyeti farklı olması olarak gösterilmiştir(94). Bu bilgiler ışığında çalışmamızda kas dokusunda nekrozun geliştiği ancak geri dönüşün de mümkün olabildiği bir iskemi süresi olarak 4 saat seçilmiştir (96-98).

Plastik cerrahlar olarak klinik pratiğimizde uyguladığımız serbest kas flepleri, serbest kas-deri flepleri, ekstremitte transplantasyonlarında halen iskemi reperfüzyon hasarı yeterli düzeyde engellenebilmiş değildir. Literatürde çok farklı endojen ve eksojen madde bu hasarı azaltmak amacı ile araştırılmış ve araştırılmaktadır. Ancak İ/R hasarının kompleks pek çok mekanizma sonucu oluşması sebebi tam engellenebilmiş değildir.

Mesna kanser kemoterapisinde kullanılan iyofosfamid ve siklofosfamid e bağlı oluşan hemorajik sistit tedavisinde kullanılan bir tiyoldür. Üroprotektif etkisinin, iyofosfamid ve siklofosfamidin yıkım ürünlerine bağlanarak sağlar (86). Mesna sülfidril grupları üzerinden oluşturduğu etki ile potansiyel bir serbest radikal temizleyicisidir (86) Bu da barsak, karaciğer, kolon, over, pankreas ve akciğer gibi birçok farklı organda SOR ilişkili doku toksisitesini azaltabilmektedir (87-92). Hidrojen peroksid üretimi üzerindeki direkt etkisi sebebi ile tiyol içeren Mesna bütün oksidatif yaralanmalarda serbest radikallerin toksik etkilerini sınırlandırmak amacı ile kullanılabilir bir antioksidan madde olarak görülmektedir (92).

Literatürde alt ekstremitede oluşturulan İ/R hasarında ilişkin bir yayına rastlanmadı Biz de çalışmamızda alt ekstremitede oluşturulan iskemi ve reperfüzyon hasarının önlenmesinde Mesna'nın etkinliğini değerlendirmeyi planladık.

Çalışmamızda alt extremitte I/R modellerinden 1969 yılında Strock tarafından tanımlanan turnike modeli uygulaması uygulandı (99). Bu yöntemin tercih edilmesinin sebebi Barie ve ark. yaptığı çalışmada turnike uygulamasının kan akımını tamamen kesen ve tam bir iskemi oluşturan model olduğunun kanıtlamasıdır (100). Çalışmamızda trochanter majörün proksimaline turnike uygulandı ve tüm denekler pediatrik pulse oksimetre cihazı ile nabız ve saturasyonun olmadığı kontrol edilerek deney yapıldı. Deney sırasında 4 saatlik iskemi ve sonrasında 4 saat reperfüzyon uygulandı. Bu kaslarda kritik iskemi süresi baz alınarak belirlendi. Mesna üzerine yapılan farklı çalışmalarda 180mg/kg/doz kullanıldığından ve ip olarak verildiğinden de bu yöntemi kullanıldı(92).

Myeloperoksidaz, nötrofillerde granül yapısının içinde yer alan bu enzim, fagositoz sırasında hücre içine alınan bakterilerin yok edilmesinde önemli bir yer tutar. Bu enzim hidrojen peroksiti ,hipoklorik asit (HOCl) e dönüştürür. Hipoklorik asit bakterisidal etki gösterir ayrıca çok kuvvetli bir oksidandır. Hücre membran geçirgenliğini arttırarak doku hasarına neden olur. Ayrıca bazı moleküllerle tepkimeye girerek ROM'ların oluşumunu sağlar (76-78) Postiskemik dokuda serbest oksijen radikallerinin majör kaynağı aktive nötrofillerdir (3). Nötrofillerin oluşturduğu reperfüzyon hasarını belirlemek için birçok yöntem kullanılabilir. Literatür taramalarında MPO'nun nötrofil spesifik enzim olarak oksidan üretiminde temel rol oynayan enzimlerden biri olduğu için sık bir şekilde kullanıldığını görmekteyiz (104-105). Ayrıca Jeelani ve ark. yaptıkları bir çalışmada Mesna'nın MPO üzerinde regülatör bir etkiye sahip olduğunu göstermişlerdir. MPO nun potent inhibitörü, ayrıca katalitik aktivitesini ve fonksiyonunu üzerinde düzenleyici bir etkileri ortaya konmuştur (124). Bu sebeplerden dolayı çalışmada MPO doku enzim aktivitesi çalışılması planlandı.

Lipid peroksidasyonunun son ürünü olan MDA, hücre membranındaki lipidler üzerindeki serbest radikal etkisinin ölçülebilen kimyasal bir belirteçdir. Bu nedenle İ/R olgularında serbest radikal aktivitesini tespit etmek için MDA kullanılmaktadır (29). Mesna'nın antioksidan özelliğini araştırmak amacı ile MDA çalışmamızda doku enzim parametresi olarak araştırılması planlandı.

Literatürü taradığımızda farklı birçok dokuda Mesna'nın İ/R hasarı üzerine etkilerinin araştırılmış olduğunu görmekteyiz.

Elbased ve ark. mesna'nın barsakta oluşturulan iskemi ve reperfüzyon sonucu akciğerde oluşan hasarı azaltmaya yönelik etkileri araştırılırken; 100mg/kg dozdan ip olarak iskemiden 60 dk önce ve reperfüzyondan sonra uygulamışlardır. Mesna'nın akciğer dokusundaki apoptozu azalttığı, sistemik oksijenasyonu da iyileştirdiği ve nötrofil infiltrasyonunu baskıladığı (MPO seviyesindeki azalma) gösterilmiştir (120).

Umemura ve ark. yaptığı deneysel çalışmada ferrik nitriloasetat ile ratlarda böbrekte oksidatif hasar oluşturmuşlardır. Elde edilen sonuçlarda oksidatif hasara karşı koruyucu etkileri göstermişlerdir (121). Ypsilantis ve ark. ları deneysel olarak intestinalmukozda İ/R hasarı oluşturup, 100mg/kg dozda intraperitoneal olarak iskemiden 60 dk önce, iskemi başlatıldığında ve reperfüzyon anında Mesna uygulamışlardır. Sonuçta apoptoziste ve oksidatif hasarda (GSH/GSSG'nin dokuda ölçümü ile) azalma olduğunu göstermişlerdir (87).

Şener ve ark. larının rat karaciğerinde oluşturulan iskemi reperfüzyon hasarı üzerine Mesna'nın etkisini araştırdıkları çalışmada; 150mg/kg dan iskemiden 15 dk önce ve reperfüzyon anında mesna uygulamışlardır. Dokuda MDA VE MPO seviyelerinin düştüğünü göstermişlerdir. Ayrıca karaciğer fonksiyon testleri de değerlendirilmiş ve ALT, AST nin kontrol grubuna göre yüksek ancak İ/R grubuna göreyse anlamlı düşük olduğu gösterilmiştir (123).

Kabasakal ve ark. deneysel olarak sıçan böbreğinde oluşturdukları İ/R hasarında, rata 150mg/kg'dan ip olarak iskemiden 15 dk önce ve reperfüzyon anında Mesna uygulamışlardır. Böbrek dokusunda MDA ve MPO değerleri bakılmış ve ikisinde de azalma olduğu gösterilmiştir. Ek olarak çalışma içeriğinde bakılan böbrek fonksiyonu ve mikroskobik hasarı da tersine çevirdiği için böbrekte oluşan İ/R'na bağlı hasara karşı koruyucu olabileceği sonucuna varmışlardır (92).

Li ve ark. rat overlerinde siplatin ile hasar oluşturup, Mesna'nın hasar üzerine etkisini araştırmışlardır. Overde oksidatif stresi deplese ettiğini, MDA'yı azalttığı, antioksidan özellikleri ile bilinen GSH konsantrasyonunu ve SOD enzim aktivitesini arttırdığı gösterilmiştir.

Amirshahrokhi ve ark. midede etanol ile oluşturulan akut mukozal ülserde Mesna'nın etkisi araştırılmış. Mesna ile tedavi edilen grupta gastrik lezyonların gerilediği, gastrik dokuda glutatyon, SOD ve katalaz aktivitesinin arttığı izlenmiştir. Ayrıca MDA ve MPO değerlerinin düştüğü izlenmiştir. Bu çalışmada sonucunda Mesna'nın gastroprotektif etkisi lipid peroksidasyon sürecini azaltması, antioksidan kapasiteyi arttırması ve inflamatuvar cevabı bakılmasına bağlanmıştır(125).

Shusterman ve ark. Mesna'nın deneysel kolit (trinitrobenzen sulfonik asit ile oluşturulmuş) etkileri araştırılmıştır. Çalışma 14 gün boyunca her gün iki kere intrarektal olarak Mesna uygulanmış. Dokudaki inflamasyonun 14 gün sonunda tamamına yakın gerilediği halde iNOS mRNA ekspresyonu ve MPO aktivitesinin akut fazda arttığı izlenmiştir. Çalışma sonucunda Mesna'nın PNML infiltrasyonunu azaltmasına bağlı olarak SOR üretimini azalttığı için inflamasyonu baskıladığı öne sürülmüştür. MPO bu çalışmada ilk 3 gün

artış gösterip sonrasında azalma göstermiştir. Bu erken dönemde NO'nın aşırı üretimi PNML için kemotaktik ajan olması ile açıklanmıştır (126).

Çalışmamızda MPO ve MDA(sırasıyla $p=0,539$ ve $p=0,860$) değerleri karşılaştırıldığında, İ/R+Mesna grubunda, İ/R grubuna göre sayısal olarak azalma olmasına rağmen, istatistiksel anlamlı bir sonuç bulunamıştır. PNML infiltrasyonuna baktığımızda, Mesna ve İ/R grubunda PNML infiltrasyonunun İ/R grubuna göre azaldığını görmekteyiz. Ancak istatistiksel olarak kıyasladığımızda farklılık izlenmedi. Literatürde MDA, MPO değerlerinde ve PNML sayısında Mesna azalma etkisi gösterirken; çalışmamızda istatistiksel olarak anlamlı düzeyde bir azalmaya yol açmamıştır.

Kontrol grubu ile İ/R ve İ/R+Mesna gruplarında ekstrasvaze eritrosit varlığı, enine çizgilenme kaybı, çekirdeğin merkeze göçü, kas liflerinde ayrılma, bağ doku artışı, interselüler/interfasiküler ödem ve pnml sayısı istatistiksel olarak farklı olmasına rağmen, IR ve IR+Mesna grubu istatistiksel olarak aynıdır. Sonuç olarak histolojik olarak ve sayısal ölçümlerde Mesna uygulanan grubun dejeneratif değerlerde düşme sağladığı halde bunun istatistiksel olarak anlamlı düzeyde olmadığı bulunmuştur. Denek sayısının sınırlı olması ve kas dokusunun çalışılan tüm dokulardan farklı bir metabolizmaya sahip olması sebebi ile olabileceği düşünülmektedir.

6. SONUÇLAR

Alt ekstremitede iskemi ve reperfüzyon hasarını önlemek için Mesna'nın etkinliğini göstermeye yönelik yaptığımız çalışmada elde edilen sonuçlar şöyledir;

-Rat alt ekstremitte gastrokinemius kasında bakılan dejeneratif bulgulara anlamlı bir azalmaya yol açmamıştır.

-Kas dokusunda bakılan nötrofil sayısı, MDA ve MPO'ın tedavi grubu, İ/R grubuna göre düşürse de istatistiksel olarak anlamlı düzeyde azaltamamıştır. Bu bulgu bize Mesna'nın İ/R hasarını önlemede en önemli mekanizmalardan biri olan antioksidan etkinliği kas dokusu için geçerli olmadığı yönde olarak değerlendirilebilir.

-Kas dokusunda İ/R hasarını histolojik bulguları sayısal olarak azaltsa da, istatistiksel olarak anlamlı değildir. Çalışmamızda etik kaygılar sebebi ile denek sayısının sınırlı sayıda tutulması göz önünde bulundurulması gereken bir etmendir. Ek olarak histolojik parametreler elektron mikroskobu ile incelenmesi, sonuçlarımızı doğrulama açısından ek fikir verebilir.

Literatürde Mesna'nın kas dokusu üzerine etkinliği ile ilgili çalışma mevcut değildir. Diğer doku ve organlar üzerine de çoğu in-vitro olmak üzere az sayıda çalışma bulunmaktadır. Çalışmamız literatüre baktığımızda Mesna'nın alt ekstremitte İ/R hasarı üzerine etkisini inceleyen ilk çalışmadır.

Çalışma sonucumuz Mesna'nın kas dokusunda İ/R hasarını azaltmayı etkin bir şekilde sağladığı gösterilemese de, denek sayısının artırıldığı, daha fazla antioksidan parametrenin araştırıldığı ve elektrofizyolojik çalışma ile desteklendiği çalışmalarla daha ayrıntılı bilgi sahibi olabiliriz.

7. KAYNAKÇA

1. Blaisdell FW. The pathophysiology of skeletal muscle ischemia and the reperfusion syndrome: a review. *Cardiovasc Surg.* 2002 Dec;10(6):620-30.
2. Schlag MG, Harris KA, Potter RF. Role of leukocyte accumulation and oxygen radicals in ischemia-reperfusion-induced injury in skeletal muscle. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 2001 Apr;280(4):H1716-21.
3. Zimmerman BJ, Granger DN. Reperfusion injury. *Surg Clin North Am.* 1992 Feb;72(1):65-83.
4. Wilhelm J. Metabolic aspects of membrane lipid peroxidation. *Acta Univ Carol Med Monogr.* 1990;137:1-53.
5. Haldar S, Dru C, Bhowmick NA. Mechanisms of hemorrhagic cystitis. *Am J Clin Exp Urol.* 2014 Oct 2;2(3):199-208.
6. Keeney JTR, Ren X, Warriar G, Noel T, Powell DK, Brelsfoard JM, Sultana R, Saatman KE, Clair DKS, Butterfield DA. Doxorubicin-induced elevated oxidative stress and neurochemical alterations in brain and cognitive decline: protection by MESNA and insights into mechanisms of chemotherapy-induced cognitive impairment ("chemobrain"). *Oncotarget.* 2018 Jul 13;9(54):30324-30339.
7. Jennings RB, Reimer KA. The cell biology of acute myocardial ischemia. *Annu Rev Med.* 1991;42:225-46.
8. Parks DA, Williams TK, Beckman JS. Conversion of xanthine dehydrogenase to oxidase in ischemic rat intestine: a reevaluation. *Am J Physiol.* 1988 May;254(5 Pt 1):G768-74.

9. Orrenius S, Burkitt MJ, Kass GE, Dypbukt JM, Nicotera P. Calcium ions and oxidative cell injury. *Ann Neurol*. 1992;32 Suppl:S33-42.
10. Chung HY, Baek BS, Song SH, Kim MS, Huh JI, Shim KH, Kim KW, Lee KH. Xanthine dehydrogenase/xanthine oxidase and oxidative stress. *Age (Omaha)*. 1997 Jul;20(3):127-40.
11. Newmeyer DD, Ferguson-Miller S. Mitochondria: releasing power for life and unleashing the machineries of death. *Cell*. 2003 Feb 21;112(4):481-90.
12. Baines CP. The mitochondrial permeability transition pore and ischemia-reperfusion injury. *Basic Res Cardiol*. 2009 Mar;104(2):181-8.
13. Ozcan O., Erdal H., Yonden Z. İskemi-Reperfüzyon Hasarı ve Oksidatif Stres İlişkisine Biyokimyasal Bakış. *Mustafa Kemal Üniversitesi Tıp Dergisi*. 2015; 6(23): 27-33.
14. Sanada S, Komuro I, Kitakaze M. Pathophysiology of myocardial reperfusion injury: preconditioning, postconditioning, and translational aspects of protective measures. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 2011 Nov;301(5):H1723-41.
15. Widgerow AD. Ischemia-reperfusion injury: influencing the microcirculatory and cellular environment. *Ann Plast Surg*. 2014 Feb;72(2):253-60. S

16. Kumar V, Abbas AK, Fausto N, Aster JC. Robbins and Cotran pathologic basis of disease, professional edition e-book: elsevier health sciences; 2014.
17. Best BP. Vascular and neuronal ischemic damage in cryonics patients. Rejuvenation Res. 2012 Apr;15(2):165-9.
18. Semenza GL. Cellular and molecular dissection of reperfusion injury ROS within and without. Circulation Research 2000; 86:117-118.
19. Kuzu MA, Koksoy C, Kale IT, Tanik A, Terzi C, Elhan AH. Reperfusion injury delays healing of intestinal anastomosis in a rat. American Journal of Surgery 1998; 176:348-351.
20. Girotti AW. Lipid hydroperoxide generation, turnover, and effector action in biological systems. Journal of Lipid Research 1998; 39:1529-1542.
21. Walker PM. Ischemia/reperfusion injury in skeletal muscle. Ann Vasc Surg. 1991 Jul;5(4):399-402.
22. Tapuria N, Kumar Y, Habib MM, Abu Amara M, Seifalian AM, Davidson BR. Remote ischemic preconditioning: a novel protective method from ischemia reperfusion injury-a review. Journal of Surgical Research 2008; 150:304-330.
23. Siemionow M, Arslan E. Ischemia/reperfusion injury: a review in relation to free tissue transfers. Microsurgery 2004; 24:468-475.

24. İşlekel H, İşlekel S, Güner G. Biochemical mechanism and tissue injury of cerebral ischemia and reperfusion. *Journal of the Neurological Sciences* 2000; 7:1984-2000.
25. Al-Qattan M, Al-Kattan W. Skin wound healing, ischemia-reperfusion injury and nerve regeneration: Similarities in the sequential events and molecular basis. *Can J Plast Surg.* 2004 Fall;12(3):131-3.
26. Morris SF, Pang CY, Zhong A, Boyd B, Forrest CR. Assessment of ischemia-induced reperfusion injury in the pig latissimus dorsi myocutaneous flap model. *Plastic and Reconstructive Surgery* 1993; 92:1162-1172.
27. Bathe OF, Chow AW, Phang PT. Splanchnic origin of cytokines in a porcine model of mesenteric ischemia-reperfusion. *Surgery* 1998; 123:79-88.
28. Terzi C, Kuzu A, Tanık A, Kale T, Aşlar K, Elhan A. Sıçanlarda intestinal iskemi modelinde proflaktik kısa ve uzun süreli yüksek doz Allopurinol kullanımının mortaliteye etkisi. *Klinik ve Deneysel Cerrahi* 2000; 8:10-16.
29. Ertan T, Soran A, Kılıç M, Aşlar AK, Koç M, Cengiz Ö. Kan Malondialdehid ve total antioksidan seviyesinin (TAS) önemi. *Cerrahi Tıp Bülteni* 2001; 2:154-167.

30. Dennis SC, Shattock MJ, Hearse DJ, Ball MR, Sochor M, McLean P. Two different metabolic responses to ischaemia: inherent variability or artefact?. *Cardiovascular Research* 1983; 17:489-498.
31. Carden DL, Granger DN. Pathophysiology of ischaemia–reperfusion injury. *The Journal of pathology*. 2000;190(3):255-66.
32. Davidge ST. Prostaglandin H synthase and vascular function. *Circ Res* 2001; 89(8):650-660.
33. de Rougemont O, Lehmann K, Clavien PA. Preconditioning, organ preservation, and postconditioning to prevent ischemia-reperfusion injury to the liver. *Liver Transpl* 2009; 15(10):1172-1182.
34. Gourdin MJ, Bree B, De Kock M. The impact of ischaemia-reperfusion on the blood vessel. *Eur J Anaesthesiol* 2009; 26(7):537-547.
35. Granger DN, Korthuis RJ. Physiologic mechanisms of postischemic tissue injury. *Annu Rev Physiol* 1995; 57:311-332.
36. Dammers R, Wehrens XH, Egbrink MG, Slaaf DW, Kurvers HA, Ramsay G. Microcirculatory effects of experimental acute limb ischaemia-reperfusion. *British Journal of Surgery* 2001; 88:816-824.
37. Alizan A, Khalil C, Farah A, John C. Reperfusion injury. *Plastic and Reconstructive Surgery* 2006; 117:1024-1033.

38. Cerra FB, Lajos TZ, Montes M, Siegel JH. Hemorrhagic infarction: A reperfusion injury following prolonged myocardial ischemic anoxia. *Surgery* 1975; 78:95-104.
39. Duru S, Koca U, Oztekin S, Olguner C, Kar A, Coker C, Ulukus C, Tascl C, Elar Z. Antithrombin III pretreatment reduces neutrophil recruitment into the lung and skeletal muscle tissues in the rat model of bilateral lower limb ischemia and reperfusion: a pilot study. *Acta Anaesthesiologica Scandinavica* 2005; 49:1142-1148.
40. Gute DC, Ishida T, Yarimizu K, Korthuis RJ. Inflammatory responses to ischemia and reperfusion in skeletal muscle. *Molecular and Cellular Biochemistry* 1998; 179:169-187.
41. Hobson RW, 2nd, Neville R, Watanabe B, Canady J, Wright JG, Belkin M. Role of heparin in reducing skeletal muscle infarction in ischemia-reperfusion. *Microcirculation, endothelium, and lymphatics* 1989; 5:259-276.
42. Koksall C, Bozkurt AK, Sirin G, Konukoglu D, Ustundag N. Aprotinin ameliorates ischemia/reperfusion injury in a rat hind limb model. *Vascular Pharmacology* 2004; 41:125- 129.
43. Leena S, Korvenoja M, Markku A. Glucose, lactate and pyruvate response in an experimental model of microvascular flap ischemia and reperfusion: A Microdialysis Study. *Microsurgery* 2004; 24:223-231.
44. Tokito A, Silva J. Ischemia and reperfusion syndrome of hind limbs functional and histological renal changes in rats. *Medicine Riberio Preto* 2005; 38:294-300.

45. Arasa O, Dilsizian V. Targeting ischemic memory. *Current Opinion in Biotechnology* 2007; 18:46- 51.

46. Collard CD, Gelman S. Pathophysiology, clinical manifestations, and prevention of ischemiareperfusion injury. *Anesthesiology* 2001; 94:1133-1138. 45

47. Schoenberg MH, Beger HG. Reperfusion injury after intestinal ischemia. *Critical Care Medicine* 1993; 21:1376-1386.

48. Gillani S, Cao J, Suzuki T, Hak DJ. The effect of ischemia reperfusion injury on skeletal muscle. *Injury*. 2012 Jun;43(6):670-5.

49. Parks DA, Granger DN. Contributions of ischemia and reperfusion to mucosal lesion formation. *American Journal of Physiology* 1986; 250:749-753.

50. Belkin M, LaMorte WL, Wright JG, Hobson RW 2nd. The role of leukocytes in the pathophysiology of skeletal muscle ischemic injury. *J Vasc Surg*. 1989 Jul;10(1):14-8; discussion 18-9.

51. Rupinski S. Effect of tourniquet ischemia of the arm on changes in selected parameters of muscle metabolism. *Annales Academiae Medicae Stetinensis* 1989; 35:131-143.

52. Rose S, Floyd RA, Eneff K, Buehren V, Massion W. Intestinal ischemia: reperfusion-mediated increase in hydroxyl free radical formation as reported by salicylate hydroxylation. *Shock*. 1994;1(6):452-6.

53. Shames BD, Barton HH, Reznikov LL, Cairns CB, Banerjee A, Harken AH, et al. Ischemia alone is sufficient to induce TNF- α mRNA and peptide in the myocardium. *Shock*. 2002;17(2):114-9.

54. Myers S, Hernandez R, Turnage R, Bartula L, Taylor-Kalley B. Resuscitation of ischemia/reperfusion with hyperalimentation increases intestinal PGI₂ synthase (PS) content and PGI₂ release. *Shock* (Augusta, Ga). 1995;3(6):422-9.

55. Riedemann NC, Ward PA. Complement in ischemia reperfusion injury. *The American journal of pathology*. 2003;162(2):363.

56. Ames 3rd A, Wright R, Kowada M, Thurston J, Majno G. Cerebral ischemia. II. The no-reflow phenomenon. *The American journal of pathology*. 1968;52(2):437.

57. Brooks B. Pathologic changes in muscle as a result of disturbances of circulation: an experimental study of Volkmann's ischemic paralysis. *Archives of Surgery*. 1922;5(1):188-216.

58. Menger MD, Rücker M, Vollmar B. Capillary dysfunction in striated muscle ischemia/reperfusion: on the mechanisms of capillary "no-reflow". *Shock*. 1997;8(1):2-7.

59. Türegün M, Güdemez E, Newman P, Zins J, Siemionow M. Blockade of platelet endothelial cell adhesion molecule-1 (PECAM-1) protects against ischemia-reperfusion injury in muscle flaps at microcirculatory level. *Plastic and reconstructive surgery*. 1999;104(4):1033-40.

60. de la Ossa JC, Malago M, Gewertz BL. Neutrophil-endothelial cell binding in neutrophil-mediated tissue injury. *Journal of Surgical Research*. 1992;53(1):103-7.
61. Eltzschig HK, Collard CD. Vascular ischaemia and reperfusion injury. *British medical bulletin*. 2004;70(1):71-86.
62. Wang WZ, Fang XH, Stephenson LL, Khiabani KT, Zamboni WA. Melatonin reduces ischemia/reperfusion-induced superoxide generation in arterial wall and cell death in skeletal muscle. *Journal of pineal research*. 2006;41(3):255- 60.
63. Arató E, Jancsó G, Sínay L, Kürthy M, Lantos J, Ferencz S, et al. Reperfusion injury and inflammatory responses following acute lower limb revascularization surgery. *Clinical hemorheology and microcirculation*. 2008;39(1):79-85.
64. Li C, Jackson RM. Reactive species mechanisms of cellular hypoxiareoxygenation injury. *American Journal of Physiology-Cell Physiolog*. 2002;282(2):C227-C41.
65. Berry CE, Hare JM. Xanthine oxidoreductase and cardiovascular disease: molecular mechanisms and pathophysiological implications. *The Journal of physiology*. 2004;555(3):589-606.
66. 23. Mathes SJ, Nahai F: *Reconstructive Surgery : Principles, Anatomy and Technique* . Volume 11997, 39-46
67. Kılınç K. , Kılınç A: Oksijen toksisitesinin aracı molekülleri olarak oksijen radikalleri. *Hacettepe Tıp Dergisi*, 2002; 33: 110-118.

68. Halliwell B: Free radicals, antioxidants, and human disease: curiosity, cause, or consequence? *Lancet*, 1994; 344: 721-724.

69. Toyokuni S. Reactive oxygen species-induced molecular damage and its application in pathology. *Pathology international*. 1999;49(2):91-102.

70. Collard C, Lekowski R, Jordan J, Agah A, Stahl G. Complement activation following oxidative stress. *Molecular immunology*. 1999;36(13):941-8.

71. Belkin M, Brown RD, Wright JG, LaMorte WW, Hobson II RW. A new quantitative spectrophotometric assay of ischemia-reperfusion injury in skeletal muscle. *The American journal of surgery*. 1988;156(2):83-6.

72. Hayes G, Liauw S, Romaschin A, Walker P, editors. Separation of reperfusion injury from ischemia-induced necrosis. *Surg Forum*; 1988.

73. Grace PA. Ischaemia-reperfusion injury. *British J of Surgery* 1994; 81: 637- 647.

74. İskemi – reperfüzyon hasarında olan olaylar dizisi Sener G. Sakarcı A. Yegen BC. Role of garlic in the prevention of ischemia-reperfusion injury *Mol Nutr Foot Res* 2007;51:1345-1352.

75. Kühn H, Borchert A. Regulation of enzymatic lipid peroxidation: the interplay of peroxidizing and peroxide reducing enzymes. *Free Radical Biology and Medicine*. 2002;33(2):154-72.

76. Arnhold J. Properties, functions, and secretion of human myeloperoxidase. *Biochemistry (Moscow)* 2004; 69: 4–9.
77. Hampton MB, Kettle AJ, Winterbourn CC. Inside the neutrophil phagosome: oxidants, myeloperoxidase, and bacterial killing. *Blood* 1998; 92: 3007–17.
78. Klebanoff SJ. Myeloperoxidase: friend and foe. *J Leukoc Biol* 2005; 77: 598–625.
79. Cobelens PM, van Putte BP, Kavelaars A, Heijnen CJ, Kesecioglu J. Inflammatory consequences of lung ischemia-reperfusion injury and low-pressure ventilation. *J Surg Res.* 2009;153:295–301.
80. Andriole GL, Sandlund JT, Miser JS, Arasi V, Linehan M, Magrath IT. The efficacy of mesna (2-mercaptoethane sodium sulfonate) as a uroprotectant in patients with hemorrhagic cystitis receiving further oxazaphosphorine chemotherapy. *J Clin Oncol.* 1987 May;5(5):799–803.
81. Casale M, Di Martino A, Salvinelli F, Trombetta M, Denaro V. MESNA for chemically assisted tissue dissection. *Expert Opin Investig Drugs.* 2010 Jun;19(6):699–707.
82. Yilmaz M, Goksu N, Bayramoglu I, Bayazit YA. Practical use of MESNA in atelectatic ears and adhesive otitis media. *ORL J Otorhinolaryngol Relat Spec.* 2006;68(4):195–8.
83. Halder S, Dru C, Bhowmick NA. Mechanisms of hemorrhagic cystitis. *Am J Clin Exp Urol.* 2014 Oct 2;2(3):199–208.

84. Vieira MM, Brito GA, Belarmino-Filho JN, Macedo FY, Nery EA, Cunha FQ, Ribeiro RA. Use of dexamethasone with mesna for the prevention of ifosfamide-induced hemorrhagic cystitis. *Int J Urol*. 2003 Nov;10(11):595-602.

85. Ormstad K, Orrenius S, Lastbom T, Uehara N, Pohl J, Satekar J, Brock N. Pharmacokinetics and metabolism of sodium 2-mercaptoethanesulfonate in the rat. *Cancer Res* 1983;43:333.

86. Aluise CD, Miriyala S, Noel T, Sultana R, Jungsuwadee P, Taylor TJ, Cai J, Pierce WM, Vore M, Moscow JA, St Clair DK, Butterfield DA. 2-Mercaptoethane sulfonate prevents doxorubicin-induced plasma protein oxidation and TNF- α release: implications for the reactive oxygen species-mediated mechanisms of chemobrain. *Free Radic Biol Med*. 2011 Jun 1;50(11):1630-8.

87. Ypsilantis P, Lambropoulou M, Tentes I, Kortsaris A, Papadopoulos N, Simopoulos C. Mesna protects intestinal mucosa from ischemia/reperfusion injury. *J Surg Res*. 2006 Aug;134(2):278-84.

88. Triantafyllidis I, Poutahidis T, Taitzoglou I, Kesisoglou I, Lazaridis C, Botsios D. Treatment with Mesna and n-3 polyunsaturated fatty acids ameliorates experimental ulcerative colitis in rats. *Int J Exp Pathol*. 2015 Dec;96(6):433-43.

89. Yeh J, Kim BS, Peresie J. Reproductive toxic effects of cisplatin and its modulation by the antioxidant sodium 2-mercaptoethanesulfonate (mesna) in female rats. *Reprod. Biol. Insights*. 2011;4(1):17-27.

90. Hagar HH, Almubrik SA, Attia NM, Aljasser SN. Mesna Alleviates Cerulein-Induced Acute Pancreatitis by Inhibiting the Inflammatory Response and Oxidative Stress in Experimental Rats. *Dig Dis Sci*. 2020 Dec;65(12):3583-3591.

91. Mshimesh BAR. Antifibrotic activity of mesna against amiodarone-associated lung injury in Wistar rats. *Asian J. Pharm. Clin. Res*. 2019;12(1):491–496.

92. Kabasakal L, Sehirli AO, Cetinel S, Cikler E, Gedik N, Sener G. Mesna (2-mercaptoethane sulfonate) prevents ischemia/reperfusion induced renal oxidative damage in rats. *Life Sci*. 2004 Sep 24;75(19):2329-40.

93. Eckert P, Schnackerz K. Ischemic tolerance of human skeletal muscle. *Ann Plast Surg* 1991; 26(1):77-84.

94. Petrasek PF, Homer-Vanniasinkam S, Walker PM. Determinants of ischemic injury to skeletal muscle. *J Vasc Surg* 1994; 19(4):623-31.

95. Borisov AB, Carlson BM. Cell death in denervated skeletal muscle is distinct from classical apoptosis. *Anat Rec*. 2000 Mar 1;258(3):305-18.

96. Madeddu P, Emanuelli C, Spillman F, Meloni M, Bouby N, et al. Murine models of myocardial and limb ischemia: diagnostic endpoints and relevance to clinical problems. *Vascular Pharmacology* 2006; 45(5):281-301.

97. Lee RC, River LP, Pan FS, Ji L, Wollmann RL. Surfactant induced sealing of electropermeabilized skeletal muscle membranes in vivo. *Proc Natl Acad Sci USA* 1992; 15;89(10):4524-8.

98. Küçüker İ, Tuncer S, Şencan A, Bircan F, Caglar E, Elmas C, Ayhan S. The effect of surgical and chemical denervation on ischaemia/reperfusion injury of skeletal muscle. *J Plast Reconst Aesthet Surg* 2012; 65:240-248.

99. Strock PE, Majno G. Vascular responses to experimental tourniquet ischemia. *Surg Gynecol Obstet.* 1969 Aug;129(2):309-18.

100. Barie PS, Mullins RJ. Experimental methods in the pathogenesis of limb ischemia. *J Surg Res.* 1988 Mar;44(3):284-307.

101. Zimmerman BJ, Grisham MB, Granger DN. Role of oxidants in ischemia-reperfusion induced granulocyte infiltration. *Am J Physiol* 1990;258:G185–90.

102. Donnahoo KK, Meng X, Ayala A, Cain MP, Harken AH, Meldrum DR. Early kidney TNF- α expression mediates neutrophil infiltration and injury after renal ischemia-reperfusion. *Am J Physiol* 1999;277:R922–9.

103. Cuzzocrea S, Reiter RJ. Pharmacological action of melatonin in shock, inflammation and ischemia/reperfusion injury. *Eur J Pharmacol* 2001;426:1–10.

104. Grisham MB, Hernandez LA, Granger DN. Xanthine oxidase and neutrophil infiltration in intestinal ischemia. *Am J Physiol.* 1986 Oct;251(4 Pt 1):G567-74.
105. Laight DW, Lad N, Woodward B, Waterfall JF. Assessment of myeloperoxidase activity in renal tissue after ischemia/reperfusion. *Eur J Pharmacol.* 1994 Nov 1;292(1):81-8.
106. McCord JM. Oxygen-derived free radicals in postischemic tissue injury. *N Engl J Med.* 1985 Jan 17;312(3):159-63.
107. Thrane AS, Skehan JD, Thrane PS. A novel interpretation of immune redundancy and duality in reperfusion injury with important implications for intervention in ischaemic disease. *Med Hypotheses* 2007; 68: 1363-1370.
108. Suzuki M, Asako H, Kubes P, Jennings S, Grisham MB, Granger DN. Neutrophil-derived oxidants promote leukocyte adherence in postcapillary venules. *Microvasc Res* 1991; 42: 125-138.
109. Zhang W, Smith C, Shapiro A, Monette R, Hutchison J, Stanimirovic D. Increased expression of bioactive chemokines in human cerebromicrovascular endothelial cells and astrocytes subjected to simulated ischemia in vitro. *J Neuroimmunol* 1999; 101:148-160.
110. Fleming J, Miguel J, Econimos A: Is cell aging caused by respiration dependent injury to the mitochondrial genome. *Gerontol* 1982; 28-44

111. Zwart LL, Meerman JHN, Commandeur JNM, ve ark: Biomarkers of free radikal damage applications in experimental animals and humans. Free Radic Biol Med 1996; 26: 202-226

112. Gutteridge JMC: Lipid peroxidation and antioxidants as biomarkers of tissue damage. Clin Chem 1995; 41: 1819-1828

113. Johnson F, Giulivi C: Superoxide dismutases and their impact upon human health. Mol Aspects Med 2005; 26: 340-352

114. Beutler E: Red cell metabolism. A manuel of biocemical methods. New York: In Grune and stratton 1973;74 86

115. Kurokawa T, Kobayashi H, Nonami T, ve ark: Mitokondrial glutathione redox and energy producing function during liver ischemia and reperfusion. J Surg 1996; 66: 1-5

116. Faraji B, Kang HK, Valentine JL: Methods compared for determining glutathione peroxidase activity in blood. Clin chem 1987; 33: 539-543

117. Anderson ME: Glutathione an overview of biosynthesis and modulation. Chem Biol Interact 1998;111: 1-14.

118. Stein HJ, Oosthuizen MMJ, Hinder RA, ve ark: Oxygen free radicals and glutatyone in hepatic ischemia-reperfusion injury. J Surgery. 1991; 50: 398- 402.

119. Bergmayer J, Grabl M: Methods of enzymatic analysis. 1983;190-302

120. Abd El-Baset SA, Abd El-Haleem MR, Abdul-Maksoud RS, Kattaia AAA. Mesna ameliorates acute lung injury induced by intestinal ischemia-reperfusion in rats. *Sci Rep.* 2021 Jun 25;11(1):13356.

121. Umemura T, Hasegawa R, Sai-Kato K, Nishikawa A, Furukawa F, Toyokuni S, et al. Prevention by 2-mercaptoethane sulfonate and N-acetylcysteine of renal oxidative damage in rats treated with ferric nitrilotriacetate. *Jpn J Cancer Res.* 1996;87:882–6.

122. Gressier B, Lebegue N, Brunet C, Luyckx M, Dine T, Cazin M, et al. Scavenging of reactive oxygen species by letosteine, a molecule with two blocked -SH groups. Comparison with free -SH drugs. *Pharm World Sci* 1995;17:76–80.

123. Sener G, Sehirli O, Ercan F, Sirvanci S, Gedik N, Kacmaz A. Protective effect of MESNA (2-mercaptoethane sulfonate) against hepatic ischemia/reperfusion injury in rats. *Surg Today.* 2005;35(7):575-80.

124. Jeelani R, Jahanbakhsh S, Kohan-Ghadr HR, Thakur M, Khan S, Aldhaheeri SR, Yang Z, Andreana P, Morris R, Abu-Soud HM. Mesna (2-mercaptoethane sodium sulfonate) functions as a regulator of myeloperoxidase. *Free Radic Biol Med.* 2017 Sep;110:54-62.

125. Li X, Yang S, Lv X, Sun H, Weng J, Liang Y, Zhou D. The mechanism of mesna in protection from cisplatin-induced ovarian damage in female rats. *J Gynecol Oncol.* 2013 Apr;24(2):177-85.

126. Amirshahrokhi K, Khalili AR. Gastroprotective effect of 2-mercaptoethane sulfonate against acute gastric mucosal damage induced by ethanol. *Int Immunopharmacol*. 2016 May;34:183-188.

127. Shusterman T, Sela S, Cohen H, Kristal B, Sbeit W, Reshef R. Effect of the antioxidant Mesna (2-mercaptoethane sulfonate) on experimental colitis. *Dig Dis Sci*. 2003 Jun;48(6):1177-85.







