

**T.C.**

**NECMETTİN ERBAKAN ÜNİVERSİTESİ**

**MERAM TIP FAKÜLTESİ**

**KALP VE DAMAR CERRAHİSİ ANABİLİM DALI**

**FASUDİL' İN EKSTREMİTE VE BÖBREK İSKEMİ-REPERFÜZYON HASARINI  
ÖNLEMEDE ETKİSİ**

**DR. OKAN UĞURLU**

**UZMANLIK TEZİ**

**KONYA, 2016**



**T.C.**

**NECMETTİN ERBAKAN ÜNİVERSİTESİ**

**MERAM TIP FAKÜLTESİ**

**KALP VE DAMAR CERRAHİSİ ANABİLİM DALI**

**FASUDİL' İN EKSTREMİTE VE BÖBREK İSKEMİ-REPERFÜZYON HASARINI  
ÖNLEMEDE ETKİSİ**

**DR. OKAN UĞURLU**

**UZMANLIK TEZİ**

**TEZ DANIŞMANI**

**PROF. DR. KADİR DURGUT**

**KONYA, 2016**



T.C.  
NECMETTİN ERBAKAN ÜNİVERSİTESİ  
KONÜDAM Deneysel Tıp Uygulama ve  
Araştırma Merkezi Müdürlüğü



Karar Sayısı: 2016 – 004

Karar Tarihi: 26.02.2016

Necmettin Erbakan Üniversitesi Meram Tıp Fakültesi Kalp ve Damar Cerrahisi A.D.'den Prof.Dr.Kadir DURGUT, Arş.Gör.Dr.Okan UĞURLU, Yrd.Doç.Dr.Yüksel DERELİ, Tıbbi Biyokimya A.D.'den Yrd.Doç.Dr.İbrahim KILINÇ ve Tıbbi Patoloji A.D.'den Yrd.Doç.Dr.Sıdıka FİNDİK tarafından sunulan **"Fasudil'in Ekstremitte ve Böbrek İskemi-Reperfüzyon Hasarını Önlemede Etkisi"** başlıklı tez projesi 10 üyenin katılımı ile değerlendirildi.


Projede 4 grupta toplam 32 adet sıçan kullanılacağı ve sıçanların anestezi altında intrakardiyak kan aspirasyonu ile sakrifiye edileceği bildirilmiştir.

Projenin deney hayvanlarına ilişkin yönlerinin, Necmettin Erbakan Üniversitesi KONÜDAM Deneysel Tıp Uygulama ve Araştırma Merkezi Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu Yönergesi'ndeki ilgili maddeler gereğince "Etik Kurallara Uygunluk Esası" dikkate alınarak hazırlandığı belirlenmiştir.

Necmettin Erbakan Üniversitesi KONÜDAM Deneysel Tıp Uygulama ve Araştırma Merkezi Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu Yönergesi'ndeki ilgili maddelerde belirtilen başvuru sahibinin sorumlulukları ve hayvan deneyleri ile ilgili etik ilkeler saklı kalmak koşulu ile projenin hazırlanmasında yönerge ilkelerine uyulduğu ve çalışmanın deneysel kısmını gerçekleştirecek araştırmacıların deney hayvanları kullanım sertifikasına sahip olduğu dikkate alınarak projenin hayvan kullanım etiği açısından **"Uygun"** olduğuna oybirliği ile karar verilmiştir.

  
Prof.Dr.Selim KUTLU  
Başkan

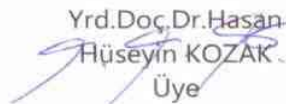
  
Prof.Dr.Lema TAVLI  
Üye

  
Prof.Dr.Ayşe Saide  
ŞAHİN  
Üye

  
Prof.Dr.Mehmet GÜL  
Üye


  
Doç.Dr.Ercan KURAR  
Üye

  
Doç.Dr.Tevfik  
KÜÇÜKKARTALLAR  
Üye

  
Yrd.Doç.Dr.Hasan  
Hüseyin KOZAK  
Üye

  
Yrd.Doç.Dr.Omer  
TANYELİ  
Üye

Vet.Hek.Halil Aydın  
ŞİMŞEK  
Üye-Katılmadı

  
Vet.Hek.Alpaslan ÖZKÜRKCÜLER  
Üye

  
Mustafa SİRİN  
Üye

## TEŞEKKÜR

Selçuk Üniversitesi Meram Tıp Fakültesi olarak girdiğim daha sonra yeni kurulan Necmettin Erbakan Üniversitesi Meram Tıp Fakültesi olarak gururla eğitimime devam ettiğim, hekimliğimi pekiştirdiğim ve kalp ve damar cerrahisi nosyonunu kazandığım kurumuma ve yöneticilerine;

Her daim sevgisini ve desteğini veren, yetişmemde büyük katkıları olan ve tez döneminde desteğini benden esirgemeyen çok sevdiğim tez hocam Prof. Dr. Kadir Durgut hocama;

Prof. Dr. Tahir Yüksek' e, Prof. Dr. Ali Sarıgül' e, Prof. Dr. Erdal Ege' ye, Prof. Dr. Niyazi Görmüş' e, Yrd. Doç. Dr. Yüksel Dereli' ye, Yrd. Doç. Dr. Ömer Tanyeli' ye, Yrd. Doç. Dr. Mehmet Işık'a;

Kliniğimizden mezun olmuş uzman büyüklerime, şu an görevde olan asistan kardeşlerime, hemşire ve personel arkadaşlarıma;

Beni bu günlere getiren canım annem ve babama;

Sevgili eşim, hayat arkadaşım, hayatıma anlam katan biricik eşim Uzm. Dr. Işın Uğurlu' ya;

Sevgili oğlum Demir Çağan Uğurlu ve doğacak olan oğlum Çınar' a;

Ve Rabbime sonsuz teşekkür ederim.

**DR. OKAN UĞURLU**

## ÖZET

İskelet kasındaki akut ve kronik iskemi, başda alt ekstremitede olmak üzere sıklıkla travma, kanama, damar tıkanıklığı (periferik arter hastalığı, leirch sendromu, buerger hastalığı vs) ve tromboembolik olaylar ile beraber görülür. İskemi ve reperfüzyon döneminde dokulardan vücuda çok miktarda zararlı madde salınımı gerçekleşir. İskemi ve reperfüzyona göre hücrelerden salınan maddelerin yerel ve sistemik sonuçları olur. Sıçanlara orta hat laparotomi yapılarak infrarenal abdominal aortya kross-klemp konuldu. 120 dakika iskemi ve 120 dakika reperfüzyon yapıldı. Fasudil intravenöz 30 dk'lık infüzyonu ile 100µg/kg/dk dozdan uygulandı. Biyokimyasal olarak inos, no, tos, tas ve rock bakıldı. Patolojik olarak da histopatolojik skorlaması yapıldı ve apopitoza bakılmak üzere tunnel çalışıldı. Hedef organ kasta ve uzak organ olarak böbrekte oluşan iskemi reperfüzyon hasarına bakıldı. Tüm gruplarda fasudilin reperfüzyon hasarından koruyucu etkilerine rastlanıldı. Bu etkilerini esas olarak ROCK yolu inhibiyonu ile yapar. Toplam antioksidan miktarını ve inos ile indüklenbilir nos artırdığını, toplam oksidan durum miktarının azaltılmasında ve iskemi reperfüzyon hasarının önlenmesinde faydalı olduğunu düşünmekteyiz. Kardiyoasküler hastalıklarının tedavisinde gelecek vaad ettiği birçok yazar tarafında ifade edilen Fasudil' in, deneysel ve klinik çalışmalarla da desteklenerek ülkemizde de ilaç olarak kullanımı noktasında da olumlu düşünmekteyiz.

## ABSTRACT

Acute and chronic ischemia in the skeletal muscle, especially in the lower extremities frequently including trauma, hemorrhage, atherosclerosis (peripheral artery disease, leirch syndrome, Buerger's disease etc.) be associated with thromboembolic events. Body ischemia and reperfusion period a large amount of harmful substance release from tissues occurs. Ischemia and the results will be local and systemic release of substances from the cells according to reperfusion. Rats made a midline laparotomy was diagnosed with infrarenal abdominal aortic cross-clamping. 120 minutes of ischemia and 120 minutes of reperfusion was performed. Fasudil intravenously 30 min infusion of 100 $\mu$ g/ kg/ min dose was administered. Biochemical as iNOS, NO, TOS, TAS and ROCK views. Histopathological scoring was pathologically tunnel and tried to look apoptosis. Target organ blood and kidneys were evaluated in remote organs resulting in ischemia reperfusion injury. Fasudil was observed in all groups of the protective effects of reperfusion injury. This effect is mainly done by inhibition of ROCK way. That the amount of total antioxidant and iNOS, inducible NOS increases, reducing the total amount of oxidant status and its ability to be useful, we believe that the prevention of ischemia reperfusion damage. Promising in the treatment of diseases that have been expressed by many writers that fasudil 's, our country also supported by experimental and clinical studies, we believe the positive point of use as a drug.

## SİMGELER VE KISALTMALAR

- AA: Araşidonik asit  
ATP: Adenozin trifosfat  
BHA: Butylated hydroxyanisole  
BHT: Butylated hydroxytoluene  
C5a: Kompleman faktor 5a  
CAT: Katalaz  
GAPs: GTPaz aktive edici proteinler  
GDIs: GTPaz ayırıcı inhibitörler  
GEF: Guanin nükleotid değiştirici faktör  
GR: Glutatyon redüktaz  
GSH: Glutatyon  
GSH-Px: Glutatyon peroksidaz  
H&E: Hematoksilen-Eosin  
HBP: Heparin binding protein  
HIF-1: Hipoksi ile uyarılabilir faktör-1  
HOCL: Hipoklorik asit  
HSPs: HSPs  
IL: İnterlökin  
IR: İskemi reperfüzyon  
IRH: İskemi reperfüzyon hasarı  
İAA: İnfarenal abdominal aorta  
İCAM-1: İnterselüler adhezyon molekülü -1  
LOO-: Lipid peroksit radikali  
LT: Lökotrien  
MBS: miyozin bağlayıcı altünitesi  
MDA: Malondialdehit  
MLC: miyozin fosfatazın  
MLCK: miyozin hafif zinci kinaz  
MODS: Multiple organ disfonksiyon sendromu  
NADPH: nikotinamit adenin dinükleotit fosfat

NF- $\kappa$ b: Nükleer faktör-kappa B  
NO: Nitrik oksit  
NOS: İndüklenebilir nitrik oksit sentaz  
O<sub>2</sub><sup>-</sup> : Süperoksit radikali  
OH<sup>-</sup> : Hidroksil radikali  
PAF: Platelet activeting factor  
PAI: tip I plazminojen aktivatör inhibitörü  
PECAM-1: Trombosit endotel hücre adhezyon molekülü-1  
PG: Prostaglandin  
PMNL: Polimorf nüveli lökositler  
PPI: preniltransferaz inhibitörü  
PSGL-1: P-selektin glikoprotein 1  
ROCK: Rho associated protein kinase  
ROOH: Hidroperoksit  
ROT: Reaktif oksijen türevleri  
SIRS: Sistemik inflamatuvar yanıt sendromu  
SOD: Süperoksit dismutaz  
SOR: Serbest oksijen radikalleri  
SRT: Serbest radikal toplama  
TAS: Total antioksidan set  
TNF- $\alpha$ : Tümör Nekrozis Faktör-alfa  
TOS: Total oksidan set  
TUNNEL: Transferase-mediated DNA nick-end labeling staining  
TXA<sub>2</sub>: Tromboksan a<sub>1</sub>  
VCAM-1: Vasküler adhezyon molekülü-1  
VEGF: Vasküler endoteliyal  
XO: Ksantin oksidaz

## İÇİNDEKİLER DİZİNİ

1. GİRİŞ VE AMAÇ.....	1
2. GENEL BİLGİLER.....	4
2.1. İSKEMİ.....	4
2.2. REPERFÜZYON.....	8
2.3. REPERFÜZYON HASARI MEKANİZMALRI.....	9
2.3.1. Oksidanlar .....	9
2.3.2. Antioksidanlar.....	14
2.3.3. Enflamatuar Sistemler.....	17
2.3.4. Kompleman Sistemi.....	19
2.3.5. Endotel Hücresinin Rolü.....	20
2.3.5.1. Mikrodolaşım.....	22
2.3.5.2. Trombositler.....	23
2.4. HASARLANMA MEKANİZMALARI.....	23
2.4.1. Lipid Peroksidasyonu.....	23
2.4.2. Protein Oksidasyonu.....	24
2.4.3. Dna Hasarı.....	25
2.4.4. Kovalen Bağlanma.....	25
2.4.5. Kalsiyum.....	26
2.5. İSKEMİ REPERFÜZYON HASARI MEKANİZMALARINDA ÖNEMLİ BAZI MADDELER.....	27
2.5.1. Ksantin Oksidaz.....	27
2.5.2. Nötrofiller.....	28
2.5.3. Endotelyal Faktörler.....	29
2.5.3.1. Araşidonik Asit Metabolitleri.....	29
2.5.3.1.1. Prostaglandin.....	30
2.5.3.1.2. Tromboxan A2.....	30
2.5.3.1.3. Lökotrien B4.....	30
2.5.3.2. Nitrik Oksit.....	30
2.5.3.2.1. Nos' Lar.....	31
2.5.3.2.2. Fizyolojik Olaylardaki Rolü.....	37
2.5.3.3. Endotelin.....	38
2.5.4. Komplemanlar.....	38
2.5.5. Sitokinler.....	39
2.5.6. Platelet Aktive Edici Faktör.....	39
2.5.7. Süperoksit Dismutaz.....	40
2.5.8. Katalaz.....	40
2.5.9. Glutasyon Peroksidaz Ve Reduktaz.....	40
2.5.10. Glutasyon S-Transferaz.....	41
2.5.11. Glutasyon.....	41
2.5.12. Total Sülfidril.....	42
2.6. İSKEMİ REPERFÜZYON HASARI SONUCU OLUŞAN VASKÜLER DİSFONKSİYON.....	42
2.6.1. IR'un Arteriol Üzerine Etkisi.....	43
2.6.2. IR'un Arteriyel Kılcallar Üzerine Etkisi.....	44
2.6.3. IR'un Venöz Kılcallar Üzerine Etkisi.....	45
2.7. HEDEF ORGAN OLARAK İSKELET KASI İSKEMİ- REPERFÜZYON HASARININ ETKİLERİ .....	46

2.7.1. Kas Değişiklikleri.....	46
2.7.2. Mikrodolaşım Değişiklikleri.....	46
2.7.3. “No Reflow” Fenomeni.....	48
2.7.4. Lokal Enflamatuar Cevap.....	48
2.8. ALT EKSTREMİTE IRH’ A BAĞLI GELİŞEN UZAK ORGAN HASARI.....	49
2.9. IRH’ NI ÖNLEMEK İÇİN TEDAVİ STRATEJİLERİ.....	51
2.9.1. Lökosit Tedavisi.....	51
2.9.2. Antioksidan Tedavi.....	52
2.9.3. İskemik Önkoşullanma.....	53
2.9.4. Antitrombotik Ve Fibrinolitik Tedavi.....	53
2.9.5. Nitrik Oksit Tedavisi.....	54
2.9.6. Hipotermi Ve İntraarteryel İnfüzyon.....	54
2.9.7. Kompleman Tedavisi.....	55
2.10. IRH’ NDA APOPİTOZİS.....	55
2.10.1. APOPİTOZUN BAŞLATILMASI.....	57
2.10.2. Hücre İçi Proteazların Aktivasyonu.....	57
2.10.3. Hücrede Oluşan Biyokimyasal Değişiklikler.....	58
2.10.4. Apoptozsizin Tespitinde Kullanılan Yöntemler.....	58
2.11. RHO KİNAZ AİLESİ.....	58
2.11.1. Rho Proteinleri.....	58
2.11.2. Rho Kinaz ( Serin-Treonin Protein Kinaz).....	60
2.11.3. Rho Aktivitesinin Düzenlenmesi.....	61
2.11.4. Rho-Kinaz İnhibitörleri.....	65
2.11.5. Rho Kinazın Fizyolojik Olaylardaki Rolü.....	66
2.11.5.1. Vasküler Kas Tonusu.....	67
2.11.5.2. Solunum Sistemi.....	70
2.11.5.3. Ürojenital Sistem.....	70
2.11.5.4. Göz.....	70
2.11.5.5. Tümör Hücreleri.....	70
2.11.5.6. Patolojik Olaylardaki Rolü.....	72
2.12. FASUDİL (HA1077).....	74
3. MATERYAL VE METOD.....	75
3.1. MATERYAL.....	75
3.2. IR MODELİ VE İLAÇ UYGULAMASI.....	76
3.3. ÇALIŞMA GRUPLARI.....	77
3.4. BİYOKİMYASAL İŞLEMLER.....	78
3.5. PATOLOJİK İŞLEMLER.....	79
3.6. İSTATİSTİK.....	80
4. BULGULAR.....	81
4.1. BÖBREK H&E BOYAMA.....	87
4.2. KASDA H&E BOYAMA.....	87
4.3. TUNNEL ÖLÇÜMÜ.....	93
4.3.1. Böbrekte Tunnel Ölçümü.....	93
4.3.2. Kasda Tunnel Ölçümü.....	95
4.4. SERUMDA NO, İNOS, TOS, TAS VE ROCK ÖLÇÜMLERİ.....	97
4.4.1. Serum No Ölçümleri.....	97
4.4.2. Serum İnos Enzim Miktarı Ölçümleri.....	99
4.4.3. Serum Rock İnhibisyonu Ölçümleri.....	100
4.4.4. Serum Tos Ölçümü.....	102

4.4.5. Serum Tas Ölçümü.....	103
4.5. BÖBREKDE NO, İNOS, TOS, TAS VE ROCK ÖLÇÜMLERİ.....	105
4.5.1. Böbrek No Ölçümü.....	105
4.5.2. Böbrek İnos Ölçümü.....	107
4.5.3. Böbrek Rock İnhibisyonu Ölçümleri.....	108
4.5.4. Böbrek Tos Ölçümü.....	109
4.5.5. Böbrekde Tas Ölçümü.....	111
4.6. KASDA NO, İNOS, TOS, TAS VE ROCK ÖLÇÜMLERİ.....	113
4.6.1. Kasma No Ölçümü.....	113
4.6.2. Kasma İnos Ölçümü.....	115
4.6.3. Kas Rock İnhibisyonu Ölçümleri.....	116
4.6.4. Kas Tos Ölçümleri.....	117
4.6.5. Kas Tas Ölçümleri.....	119
4.7. GRUPLARA GÖRE SONUÇLAR.....	120
4.7.1. Gruplara Göre Serum, Böbrek Ve Kasa Ait No Ölçümleri	
4.7.2. Gruplara Göre Serum, Böbrek Ve Kasa Ait İnos Ölçümleri	
4.7.3. Gruplara Göre Serum, Böbrek Ve Kasa Ait Rock Ölçümleri	
4.7.4. Gruplara Göre Serum, Böbrek Ve Kasa Ait Tas Ölçümleri	
4.7.5. Gruplara Göre Serum, Böbrek Ve Kasa Ait Tos Ölçümleri	
4.7.6. Gruplara Göre Serum, Böbrek Ve Kasa Ait Tunnel Ölçümleri	
5. TARTIŞMA.....	125
6. SONUÇLAR.....	134
7. KAYNAKLAR.....	135

## GRAFİKLER DİZİNİ

Grafik 1 Serum No Seviyeleri İle Gruplar Arası İlişki.....	97
Grafik 2 Serum İnos Seviyeleri İle Gruplar Arası İlişki.....	99
Grafik 3 Gruplara Göre Serumda Rock Ölçümleri.....	100
Grafik 4 Gruplara Göre Serumda Tos Ölçüm Değerleri.....	102
Grafik 5 Gruplara Göre Serumda Tas Ölçüm Değerleri.....	103
Grafik 6 Gruplara Göre Böbrek No Ölçüm Değerleri.....	105
Grafik 7 Gruplara Göre Böbrek İnos Ölçüm Değerleri.....	107
Grafik 8 Gruplara Göre Böbrek Rock Ölçüm Değerleri .....	108
Grafik 9 Gruplara Göre Böbrek Tos Ölçüm Değerleri.....	109
Grafik 10 Gruplara Göre Böbrek Tas Ölçüm Değerleri.....	111
Grafik 11 Gruplara Göre Kas No Ölçüm Değerleri.....	113
Grafik 12 Gruplara Göre Kas İnos Ölçüm Değerleri.....	115
Grafik 13 Gruplara Göre Kas Rock Ölçüm Değerleri.....	116
Grafik 14 Gruplara Göre Kas Tos Ölçüm Değerleri.....	117
Grafik 15 Gruplara Göre Kas Tas Ölçüm Değerleri.....	120
Grafik 16 Gruplara Göre Serum, Böbrek Ve Kasa Ait No Ölçümleri.....	121
Grafik 17 Gruplara Göre Serum, Böbrek Ve Kasa Ait Inos Ölçümleri.....	122
Grafik 18 Gruplara Göre Serum, Böbrek Ve Kasa Ait Rock Ölçümleri.....	123
Grafik 19 Gruplara Göre Serum, Böbrek Ve Kasa Ait Tas Ölçümleri.....	124
Grafik 20 Gruplara Göre Serum, Böbrek Ve Kasa Ait Tos Ölçümleri.....	125
Grafik 21 Gruplara Göre Serum, Böbrek Ve Kasa Ait Tunnel Ölçümleri.....	126

## TABLolar DİZİNİ

Tablo 1 İskeminin Hücresel Etkileri.....	6
Tablo 2 Membran Hasarının Birçok Potansiyel Nedeni.....	6
Tablo 3 Vegf Etkileşimi.....	8
Tablo 4 Serbest Oksijen Radikalleri Oluşum Yolları.....	10
Tablo 5 Sor Hasarı.....	14
Tablo 6 Antioksidanlar.....	15
Tablo 7 Aktive Lökosit Cevabı Mekanizmaları.....	22
Tablo 8 Irh' Na Etkili Olan Yolakların Özeti .....	27
Tablo 9 Dokuda Aktive Lökositlerin Başlattığı Yanıtı Başlatan Mekanizmalar.....	29
Tablo 10 Nos Enzimleri.....	32
Tablo 11 No'nun S-Nitrozasyon Tepkimeleri Aracılığı İle Ortaya Çıkan İndirekt Etkileri İle Çeşitli Bulunur.....	35
Tablo 12 No'nun Steroitlerin İnflamasyonu Önleyici Etkileri.....	36
Tablo 13 PoliADP-riboz polimeraz (PARP)'nin etkinleşmesi.....	36
Tablo 14 No.....	38
Tablo 15 Apoptoz Ve Nekroz Ayrımı.....	56
Tablo 16 Apoptozsizin Tespitinde Kullanılan Yöntemler.....	58
Tablo 17 Rock' Un Substratları Ve İlişkileri.....	63
Tablo 18 Rho Kinaz Enzimini İnhibe Eden Ajanlar.....	65
Tablo 19 Rho Kinaz İnhibisyonu İle Tedavi Edilen Durumlar.....	66
Tablo 20 Histopatolojik Skorumla.....	80
Tablo 21 Böbrek H-E Kategori Oranları.....	81
Tablo 22 Böbrek H-E Boyama Sonuçları.....	85
Tablo 23 Hematoksilen-Eozin Boyama Preparatlarına Göre Böbrek Grupları.....	86
Tablo 24 Hematoksilen-Eozin Boyama Preparatlarına Göre Böbrek Ve Kas Grupları.....	86
Tablo 25 Kas H-E kategori oranları .....	87
Tablo 26 Hematoksilen-Eozin Boyama Preparatlarına Göre Kas Grupları.....	91
Tablo 27 Kas H-E boyama sonuçları.....	92
Tablo 28 Gruplara Göre Böbrek TUNNEL Ölçüm Değerlendirmesi.....	93
Tablo 29 Gruplara Göre Böbrek Tunnel Ölçümleri Karşılaştırmaları.....	93
Tablo 30 Gruplara Göre Kas Tunnel Ölçüm Değerleri.....	95
Tablo 31 Gruplara Göre Kas Ölçümleri Karşılaştırmaları.....	95
Tablo 32 Gruplara Göre Serum Ölçümleri Karşılaştırmaları.....	98
Tablo 33 Gruplara Göre Böbrek Ölçümleri Karşılaştırmaları.....	112
Tablo 34 Gruplara Göre Kas Ölçümleri Karşılaştırmaları.....	114

## ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 1 Hücre zedelenmesinde sitoplazmik kalsiyum artışının kaynakları ve sonuçları.....	4
Şekil 2 Vegf ve endotel etkileşimi.....	8
Şekil 3 Lökositlerin damar endoteli ile etkileşim mekanizması.....	21
Şekil 4 Irh' da hasarında yer alan olaylar dizisi.....	26
Şekil 5 No' nun çeşitli fizyolojik olaylardaki rolü.....	37
Şekil 6 Rock 1 Ve 2 molekül yapısı.....	61
Şekil 7 Rho'nun aktivasyonu.....	62
Şekil 8 Rho'nun aşırı ekspresyonu olduğunda rock sitoplazmadan membrana göçü.....	65
Şekil 9 Rhoa/rock yolağı aynı trombusun şekillenmesi ve vasküler inflamasyon mekanizması ile ilişkisi.....	69
Şekil 10 Düz kas kasılmasının düzenlenmesinde rho/rho kinaz sinyal ileti yolu.....	72
Şekil 11 Rock' un kardiyovasküler sistem hedefleri rock'lerin çeşitli kardiyovasküler hastalıklardaki rolü.....	73
Şekil 12 Rho-kinazın çeşitli kardiyovasküler hastalıkların patojenezindeki rolü.....	74
Şekil 13 Fasudil' in kimyasal şeması.....	74

## RESİMLER DİZİNİ

Resim 1 .....	83
Resim 2 .....	83
Resim 3 .....	84
Resim 4 .....	84
Resim 5 .....	85
Resim 6 .....	85
Resim 7 .....	87
Resim 8: .....	89
Resim 9.....	90
Resim 10 .....	90
Resim 11 .....	91
Resim 12 .....	91
Resim 13: .....	95
Resim 14 .....	95
Resim 15.....	97
Resim 16 .....	97

## 1. GİRİŞ VE AMAÇ

İskelet kasındaki akut ve kronik iskemi, başda alt ekstremitede olmak üzere sıklıkla travma, kanama, damar tıkanıklığı (periferik arter hastalığı, leirche sendromu, buerger hastalığı vs) ve tromboembolik olaylar ile beraber görülür. İskemide, daha çok reperfüzyon döneminde dokulardan vücuda çok miktarda zararlı madde salınımı gerçekleşir. İskemi ve reperfüzyona göre hücrelerden salınan maddelerin yerel ve sistemik sonuçları olur. Bu etkiler sonucunda doku ve organ yetmezlikleri, organ kayıpları hatta mortalite görülebilir. Alt ekstremitede iskemi ve reperfüzyon hasarı (IRH) sık karşılaşılan ve klinik açıdan önem taşıyan bir olaydır. IRH sonucunda altta yatan majör patojenik mekanizmalar; oksidanlar ve antioksidanlar arasındaki imbalans, enflamatuar sistemler, kompleman yolaklar ve endotelyal faktörler sonucu gelişen lipid metabolizmasının bozulması, protein metabolizmasındaki bozulmalar, DNA-RNA metabolizmasındaki hasarlanmalardır. Tüm bunların neticesinde hücreye, dokuya ve sistemik sonuçlara sebep olarak morbidite ve mortaliteye etli ederler.

Ateroskleroz ve hipertansiyon gibi arteryel hastalıklarda düz kas hücre çoğalması ve hipertrofisi belirgindir. Bu tip hastalıkların ortak özelliği olarak damar düz kas hücre gerilimini ve büyümesini düzenleyen endotelin işlev bozukluğudur. Yangı sonrası çıkan mediatörlerin ve adezyon moleküllerinin up-regüle olarak monositlerin damar duvarına yapışmasına, birikmesine, damar düz kas hücre göçüne, çoğalmasına ve damar tıkanmasına yol açar. Düz kas kasılmasında etkileri olan rho-kinaz enzim yolağının inhibisyonu ile oluşan etkiler giderilebilir. Hücre iskeletinde bulununan küçük G proteinlerinin ailesinde Rho proteinleri bulunur. Rho proteinleri protein kinazdır ve memelilerde tanımlanmış en az 10 formu varken insanda sık bilinen 3 formu vardır. Rho A hücre iskeleti kontrolü, stres liflerinin yapılanması, aktin hücre iskeleti oluşumundan, fibroblast yapışmasından, hücre yapış-

ması hareketliği sitokinez ve genetik bilginin genden proteine aktarılmasında, düz kas kasılmasında kalsiyum düzenlenmesinden, endotelden salınan NO'nun eNOS sentezi, fosforilasyonu, endotelial aroşinidaz salınımından sorumludur. Rho B nin hücre büyümesini önlediği ve apoptozu indüklediği görülmüştür. Rho C ise çeşitli kanser hücrelerinde varlığı gösterilmiş ve yayılmasında rolü olduğu bildirilmiştir. Rho proteinleri bu etkilerini alt efektörü olan ROCK aracılığı ile oluşturur. ROCK' lar 160 kDa'luk serin/tireonin kinazlardır, omurgalılarda ve omurgasızlarda eksprese edilir. ROCK' un iki isoformu iki farklı gen tarafından kodlanır. İnsan ROCK genleri 18. ve 2. kromozom üzerinde bulunur. Bu amaçla spesifik ROCK inhibitörleri ile hipertansiyon tedavisinde, koroner spazm tedavisinde, anjina, ateroskleroz, miyokardiyal iskemi reperfüzyonun neden olduğu zedelenme, restenoz gibi düz kas hücrelerinin aşırı kasılması ve yangı ile belirgin kardiyovasküler hastalıkların tedavisinde etkili bulunmuştur. Bu amaçla miyokardiyal iskemi reperfüzyonda etkisi, aterosklerozun akut ve kronik dönemlerinde faydası olduğu ispatlanmış, restenozda faydasının görüldüğu rho kinaz inhibisyonu, rock inhibitörü olan Fasudil'in alt ekstremitte iskemi reperfüzyon hasarı modelindeki etkilerine bakılması amaçlanmıştır. Deneysel IRH' nın önlenbilmesinde intravenöz fasudil infüzyonu uygulamasının faydalı olabileceği kanaatindeyiz. Bu bakış açısıyla buerger hastalığı, periferik arter hastalığı, akut travmalar, tromboembolik vb. olaylar sonucunda gelişen IRH' nda, intravenöz Fasudil infüzyon tedavisi kullanılabilir.

Bu amaçla deney hayvanları ile çalışma planlandı. Denek olarak sıçan seçildi. Alt ekstremitte iskemi reperfüzyon modeli olarak daha önceden de araştırmacıların kullandığı infrarenal abdominal aortaya klemp kanularak oluşturulan iki saat iskemi iki saat reperfüzyon ile oluşturulan alt ekstremitte IRH modeli seçildi. Deney grupları süre sonunda intrakardiyak kan aspirasyonu ile sakrifiye edildi. Serum, sağ böbrek ve sağ gastrokinemius kası alındı. Alınan kanlardan hazırlanan serum örnekleri -20 °C'de dondurularak işlemin yapılacağı güne

kadar saklandı. Böbrek ve gastrokinemius kasının birer parçası biyokimyasal analizler ve histopatolojik incelemelerde kullanılmak üzere hazırlandı.

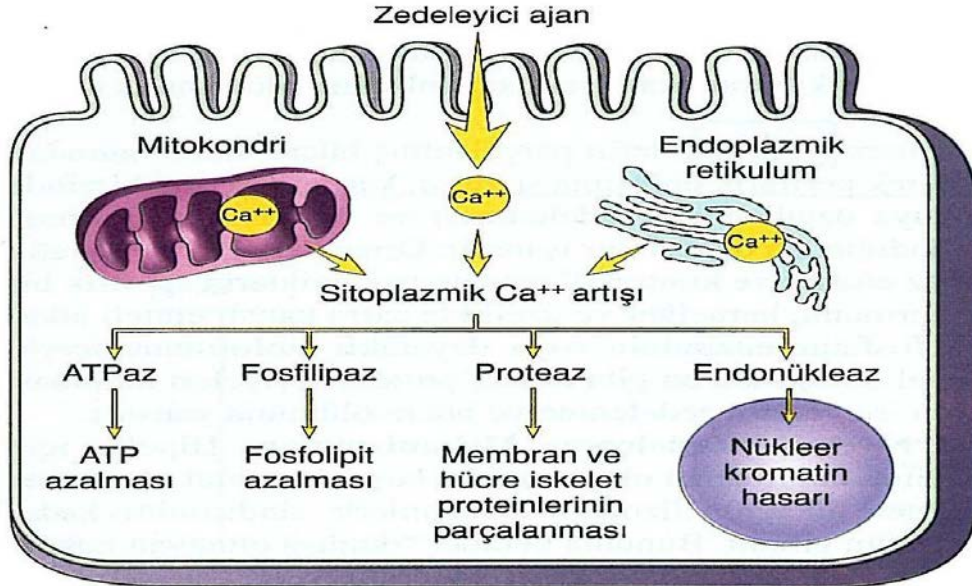
Deneyle sonunda anestezi altındaki sıçanların kalbinden alınan kanlar oda sıcaklığında otuz dakika bekletildikten sonra cam bir baget ile defibrinize edilip, 10.000 x g'de on beş dakika santrifüj edildi. Ayrılan serum örnekleri kullanılıncaya kadar -20° C'de dondurularak saklandı. Süpernatantlar Nitrik Oksit (NO), Total Oksidan Durum (TOS), Total Anti Oksidan Durum (TAS) test kitleri düzeyleri spektrofotometrik yöntem ile ölçüldü. İnkülenebilir Nitrik Oksit Sentetaz (iNOS), Rho-associated kinase (ROCK) enzim miktarı ölçümleri enzyme-linked immunosorbent assay ( ELISA ) yöntemi yapılıncaya kadar dondurularak saklandı. Anestezi altındaki sıçanlardan izole edilen böbrek ve gastroknemius kası dokuları %10 luk formaldehit çözeltisinde tespit edildikten sonra kesitler alınarak hematoksilin eozin (H&E) ile boyanmasının ardından ışık mikroskobu ile incelendi. Doku örneklerinden histopatolojik skorlama yapılırken preparatlarda; interstisiyel ödem, miyokardial hücrelerde şişme, nötrofil enfiltrasyonu ve nekroz değerlendirilerek skorlama yapıldı. Apoptotik hücrelerin başlıca morfolojik özellikleri; kromatin yoğunlaşması, hücre büzüşmesi, nükleus fragmantasyonu ve makrofajlardaki apoptotik cisimlerdir. DNA fragmantasyonu içeren hücreler transferase-mediated DNA nick-end labeling staining (TUNNEL) ile tanınabilir. Bu yüzden bu teknik yaygın olarak kullanılır. Bunun yanısıra apoptozisin mekanizmasını ortaya koymak için apoptozis ile ilişkili proteinlerin varlığı da gösterilebilir. Bu proteinlerin en popüler olanları Bcl-2, Bax ve Kaspaz 3 ailesidir. Bunlardan kaspaz 3 ve Bcl-2 mitokondriyal apoptozise aracılık eder ve antiapoptotik olarak kabul edilir; Bax ise proapoptotik proteindir.

## 2. GENEL BİLGİLER

### 2.1. İSKEMİ

Dokuya giden kan akımı azaldığı zaman, doku hücrel fonksiyonlarını sürdürebilmesi için gerekli olan maddelerden yoksun kalır. Oluşan artık metabolitleri de dokudan uzaklaştırılmaz. İskeminin erken fazında hücre içinde metabolik ve yapısal değişiklikler başlar. Hücrel oksidatif fosforilasyon azalır. Anaerobik metabolizma başlar. Hızla birçok kimyasal mediyatör ve hücre hasarını içeren patofizyolojik olaylar kaskadı ortaya oluşur (1). Kısa sürede glikojen depoları boşalır. Adenozin trifosfat (ATP) tüketimi artar. Laktat ve diğer toksik metabolitler birikmeye başlar. Hücre membran potansiyeli değişir. Hücre içi kalsiyum/sodyum ( $Ca^{+2}/Na^{+2}$ ) oranı artar. Hücre organizasyonu bozularak şişmeye başlar (2) (Şekil 1).

Şekil 1 Hücre zedelenmesinde sitoplazmik kalsiyum artışının kaynakları ve sonuçları (1).



Hücre içinde hipoksantin ve  $Ca^{+2}$  seviyesi artarken; ATP, fosfokreatin ve glutatyon seviyesi hızla düşer. Bu durum fosfolipaz  $A_2$ , proteazlar, serbest yağ asitleri, lizozimleri de

içeren kimyasal mediyatörlerin ve enzimlerin oluşmasını tetikler. Hücre içi  $Ca^{+2}$  artışı ile aktive olan fosfolipaz  $A_2$ , membran fosfolipitlerini lökotrien ve prostaglandin gibi enflamatuvar mediatörlerin prekürsörü olan araşidonik asite dönüştürür (2). Araşidonik asitten lipoksijenaz yollarıyla oluşan metabolitlerden özellikle lökotrienler, lökositlerin vasküler endotele yapışmasını hızlandırır.

Aerobik metabolizma için gerekli olan oksijenin dokulara ulaştırılmamasına iskemi denir. Kan akımı kesildiğinde seri kimyasal reaksiyonlar sonucu hücre fonksiyonlarında bozulma, hücre içi ve dışı ödem son olarak da hücre ölümü gelişir (3). Oksijen eksikliğinde anaerob metabolizma sonucu çok az enerji açığa çıkmakta, hücre içi enerji depoları eksilmekte, bunun sonucu hücre içi ve dışı iyon gradiyentlerinin korunamaması sonucu iyonik homeostazi bozulur (4). İskemik hücre zedelenmesinin patogeneğinde, oksijen yetersizliğinin önemi belirtilmekle birlikte, reaktif oksijen türevleri de hücre ölümünde önemli derecede sorumludur. Bunlara serbest oksijen radikali (SOR) denir. SOR türevleri hücre üzerinde lipid peroksidasyonu, DNA-RNA hasarı, protein denatürasyonu, kovelen bağlanma, kalsiyum çökmesi gibi zararlı etkilere neden olur (1). İskeminin erken fazında hücre içinde anaerobik metabolizma başlar, hızla birçok kimyasal mediyatör ve hücre hasarını içeren patofizyolojik olaylar kaskadı ortaya çıkar (5). Hücre membran potansiyeli değişir. Hücre içi kalsiyum/sodyum ( $Ca^{+2}/Na^{+}$ ) oranı artar. Hücre organizasyonu bozularak şişmeye başlar. Hücre içinde hipoksantin ve  $Ca^{+2}$  seviyesi artarken ATP, fosfokreatin ve glutatyon seviyesi hızla düşer. Bu durum fosfolipaz  $A_2$ , proteazlar, serbest yağ asitleri, lizozimleri de içeren kimyasal mediyatörlerin ve enzimlerin oluşmasını tetikler. Hücre içi  $Ca^{+2}$  artışı ile aktive olan fosfolipaz  $A_2$ , membran fosfolipitlerini lökotrien ve prostaglandin gibi inflamatuvar mediatörlerin prekürsörü olan araşidonik asite dönüştürür (6). Araşidonik asitten lipoksijenaz yollarıyla oluşan metabolitlerden özellikle lökotrienler, lökositlerin vasküler endotele yapışmasını hızlandırır ve reperfüzyon hasarının derecesini belirleyen

postkapiller permeabiliteyi artırır. İskemi devam ederse lizozimler aracılığı ile hücre nekrozu ortaya çıkar (5, 6).

İskeminin hücrel etkileri aşağıdaki özetlenmiştir (Tablo 1), (7).

Tablo 1 İskeminin hücrel etkileri aşağıdaki özetlenmiştir.

1. Membran potansiyelinin değişmesi
2. Artmış hipoksantin
3. Azalmış ATP
4. Azalmış fosfokreatin
5. Hücrel şişme
6. Hücre iskeletinin disorganizasyonu
7. İyon dağılımının değişmesi (intrasellüler $Ca^{+2}$ / $Na^{+2}$ )
8. Azalmış glutatyon
9. Hücrel asidoz

Membran hasarının birçok potansiyel nedeni vardır (Tablo 2), (1).

Tablo 2 Membran hasarının birçok potansiyel nedeni vardır.

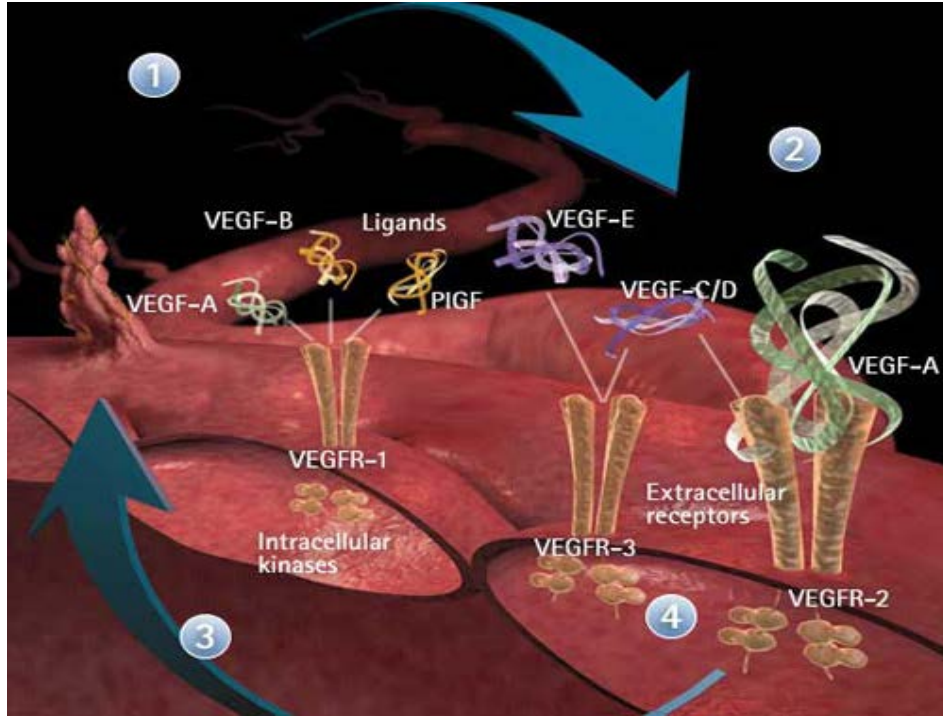
1. Membran fosfolipitlerinin ilerleyici kaybı: İskemiye bağlı stoplazmik $Ca^{+2}$ artışı ile endojen fosfolipazların aktivasyonu artan parçalanmaya yol açabilir.
2. Hücre iskelet anormallikleri: Hücre içi $Ca^{+2}$ artması ile aktive olan proteazlar hücre çatısına zarar verebilirler.
3. Toksik oksijen radikalleri: İndirgenmiş oksijen türevleri hücre membranına ve elemanlarına zarar verirler. Bu gibi oksijen radikalleri, iskemik dokularda, özellikle kan akımının düzelmesinden sonra artar. Toksik oksijen türevlerinin büyük ölçüde, reperfüzyon sırasında zedelenme alanına gelen polimorfonükleer lökosit (PMNL)'ler tarafından oluşturulduğu düşünülmektedir (1).
4. Lipit yıkım ürünleri: Fosfolipit parçalanması sonucu iskemik hücrelerde biriken bu katabolik ürünler, membranlar üzerinde deterjan etkisi yapar.

İskemi karşısında oksijensiz kalan dokuyu koruma mekanizması olarak yeni kollateral oluşumunu arttırmaya yönelik *Vasküler Endotelyal Growth Faktör* (VEGF) adı verilen bir büyüme hormonu salgılanır. VEGF (VEGF-A olarak da isimlendirilebilmektedir), 38-46 kDa ağırlığında, bazik yapıda, heparine bağlanma özelliği olan homodimerik bir glikoproteindir. VEGF'nin 121, 145, 165, 189 ve 206 aminoasitten oluşan beş izoformu tanımlanmıştır; 165 aminoasitten oluşan VEGF165 majör izoformdur.

Bu izoformların aktif formları disülfid bağlarıyla bağlı homodimerler şeklindedir. VEGF 121 heparine bağlanmayan tek izoformudur (8). İlk defa 1983'te Senger ve arkadaşları tarafından kobay tümörlerinden identifiye edildi. Kobay derisinde vasküler sızıntı oluşturduğu için de vasküler permeabilite faktörü olarak isimlendirildi (9). VEGF ekspresyonu hipoksi, pH, büyüme faktörleri, hücrel transformasyon, hormonlar ve onkojenler dahil çeşitli faktörlerce düzenlenmektedir (10). Bu faktör 1989'da sığır hipofizinden elde edilmiş, kuvvetli endotelial mitojen olduğu anlaşılmıştır ve VEGF olarak adlandırılmıştır (11).

Hipokside, yeterli doku perfüzyonu sağlanabilmesi için, hem VEGF sentezi (transkripsiyonel mekanizma) artar hem de VEGF yıkımı (mRNA stabilizasyonu) azalarak doku VEGF mRNA düzeyi artar. Hipoksi ile artan VEGF'nin endotel hücreleri üzerine biyolojik aktiviteleri sonucunda anjiogenez indüksiyonu artar (12). Hipoksik doku hasarında diğer tüm protein sentezleri azalırken, VEGF mRNA translokasyonu devam etmektedir (13). VEGF üç esas spesifik reseptöre bağlanır. VEGFR-1 (Flt-1), VEGFR-2 (KDR) ve VEGFR-3 olarak isimlendirilir. VEGF-A, yeni kan damarı gelişimi (anjiyogenezis) ve immatür kan damarlarının devamlılığını, tirozin kinaz aktivitesine sahip VEGF reseptör-1 ve VEGF reseptör-2'e bağlanarak sağlamaktadır. Her iki reseptör de damar duvarındaki endotel hücrelerinde eksprese edilmektedirler. VEGF bu reseptörlere bağlandığı zaman sinyal kaskadını başlatarak vasküler endotel hücrelerinin büyümesini ve proliferasyonunu başlatmış olur. Tüm bunların sonucunda hedef transkripsiyonu etkilenir. VEGF ve endotel etkileşimi Şekil 2'de görülmektedir (Tablo 3), (14).

Şekil 2 VEGF ve endotel etkileşimi.



Tablo 3 VEGF etkileşimi

1. Dış uyarılarla VEGF üretimi tetiklenir
2. VEGF endotel hücreindeki reseptörüne bağlanır.
3. VEGF A ile VEGFR-2 etkileşimi sonucunda anjiogenez tetiklenir.
4. VEGF ligand ve reseptörünün diğer varyantları bu süreçte ikincil rol oynarlar.

## 2.2. REPERFÜZYON

İskemik alanın tekrar kanlanması reperfüzyon olarak tanımlanabilir. Bunun sonucunda hem hücrenin rejenerasyonu, hem de toksik metabolitlerin temizlenmesi gerçekleşir. İskemik faza göre reperfüzyon fazında; iskemi ile oluşan hasara göre daha ciddi bir hasar oluşur (15). İskemi sonucu artmış ATP yıkımı dokuda ksantin ve hipoksantin gibi pürin metabolitlerini artırır. Ksantin dehidrogenaz ksantin oksidaza dönüşür. Normal şartlarda hipoksantin ürik asite metabolize olur. İskemi sonrasında ise reperfüzyon ile dokuya gelen O<sub>2</sub> molekülü bu reaksiyonlar ile SOR' u oluşturur. Superoksit ve hidrojen peroksit (O<sub>2</sub>, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) oluşur. Reperfüzyon döneminde gözlenen hasarda; hızla oluşan serbest oksijen radikal türevleri, polimorf nüveli lökositler (PMNL), kompleman sistemi ve endotel

hücreleri rol oynar. Reperfüzyon hasarına en fazla duyarlı olan hücresel yapılar; membran lipitleri, proteinler, nükleik asitler ve deoksiribonükleik asit molekülleridir (16).

İskemik dokudaki sınırlı kan ve hasarlı doku arasındaki etkileşim sonucu oluşan hasar, reperfüzyonun etkisi ile daha da şiddetlenir (17). Reperfüzyon hasarı serbest oksijen radikalleri, endotelial faktörler ve nötrofillerin eşlik ettiği hemoastazı olan bir dengedir. Hasarı asıl tetikleyen endotel hücrelerindeki zedelenme olduğu düşünülmektedir (18, 19). Reperfüzyon döneminde gözlenen hasarda, hücre içine moleküler oksijen girer ve hızla SOR türevleri oluşur.

### 2.3. REPERFÜZYON HASARI MEKANİZMALRI

OKSİDAN SİSTEMLER	ANTIOKSİDAN SİSTEMLER	İNFLAMATUAR SİSTEMLER	KOMPLEMAN SİSTEMİ	ENDOTELYAL SİSTEMLER
KSANTİN	SOD	PMNL	C3a	PGI <sub>2</sub>
HİPOKSANTİN	GSH-Px	NADPH Oksidaz	C3b	TxA <sub>2</sub>
O <sub>2</sub>	GST	MPO	C5a	Lökotrien B <sub>4</sub>
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	CAT	İL 1	C5b-9	NO
PMNL	FERRİTİN	İL 6	C3a-5b	Endotelin
PEROKSİNİTRİT	VİT C	TNF alfa		PAF

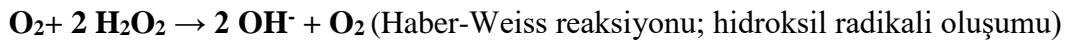
#### 2.3.1. OKSİDANLAR

Serbest oksijen radikalleridir. En dış yörüngesinde tek sayıda elektron içerir. İleri derecede reaktif, kısa ömürlü, ve anstabil moleküllerdir. Moleküler oksijenin indirgenmesi ve eksitasyonu ile çok değişik oksijen serbest radikalleri üretilebilir (3, 20, 21). Serbest oksijen radikalleri oluşum yolları aşağıda gösterilmektedir (Tablo 4), (22).

Tablo 4 Serbest oksijen radikalleri oluşum yolları

1- Radyan enerji absorpsiyonu (ultraviyole, X ışını).
2- Hücrenin normal metabolizması sırasında gerçekleşen oksidasyon- redüksiyon reaksiyonları (örneğin: solunum, ksantin oksidaz, fenton reaksiyonu). Özellikle demir ve bakır metabolizması hücre için büyük bir oksidatif hasardır.
3- Dış kaynaklı kimyasal maddelerin ve ilaçların enzimatik metabolizasyonu.
4- Nitrik oksid (NO); endotel, makrofaj ve nöronlarda önemli bir kimyasal mediyatördür ve serbest radikale dönüşebilir.
5- İskemik hasarlı bölgenin reperfüzyonu ve oksijen tedavisi sırasında.
6- Enflamasyonda polimorf lökositler ve makrofajlar yolu ile.

Solunan oksijenin % 95'inden fazlası mitokondrilerde ATP şeklinde enerji oluşumunda kullanılırken, yaklaşık %5'i de son yörüngelerinde ortaklanmamış elektron içerir. Bu özellikleri nedeniyle de toksik serbest radikallere dönüşür. Oksijenin redüksiyonu ve aerobik hücrelerin enzimatik oksidasyonu sırasında negatif yüklü bir ara ürün olan süperoksit radikali oluşur. Süperoksit radikalinden enzimatik yolla veya spontan dismutasyonla ikinci bir ara ürün olan hidrojen peroksit radikali (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) oluşur. Daha sonra özellikle mitokondride diğer bir ürün olan hidroksil radikali oluşur.



$H_2O_2 + Fe^{2+} \rightarrow 2OH^\cdot + Fe^{3+}$  (Fenton reaksiyonu; ferröz demirin oksidasyonu ile hidroksil radikali oluşumu)

Organizmada bu serbest radikaller dışında hidrojen peroksit, hipoklorik asit gibi radikal olmayan, bununla birlikte serbest radikal oluşturma potansiyelinde olan zararlı oksijen türleri de oluşabilmektedir. Diğerleriyle karşılaştırılığında süperoksit radikali yüksek elektron aktivitesine sahiptir ve çok reaktiftir. Ancak oksijen radikallerinden en aktif olanı Hidroksil radikalidir (3, 21).

Hücreler, serbest oksijen radikallerinin hasarına bağışık değildir. Ancak genellikle glutasyon ve katalaz ile oksijen hasarına karşı korunmuşlardır. İskemik dokularda, serbest oksijen radikali üreten intraselüler mekanizmalar tam aktive edilmiş durumdadır. Ancak oksijen sağlanmasındaki eksiklikten dolayı fonksiyon görmezler. Kan akımı ve oksijen sağlanmasının restorasyonu ile büyük miktarlardaki serbest oksijen radikali üretilerek reperfüzyon hasarı indüklenir (20).

Serbest radikal, eşlenmemiş elektron içeren atom veya moleküldür. Genelde elektronlar atom veya molekülde eşlenik olarak bulunmaları nedeniyle molekül stabildir ve reaktif değildir. Moleküle bir elektron ilavesi ya da bir elektron kaybı onu reaktif hale getirir (23). Organizma sürekli olarak serbest radikal ataklarıyla karşı karşıyadır. Atmosferin %21' ini teşkil eden oksijenin aerobik organizmanın yaşamı için gerekliliği kaçınılmazdır.

Serbest radikaller fizyolojik şartlarda ve dış etkenlere karşı organizmanın savunmasında da belirli oranda oluşur ve içsel mekanizmalarla organizmaya olabilecek zararlı etkileri önlenir. Biyolojik sistemlerde oluşan serbest radikallerin endojen kaynakları oksijen, NO, aktive nötrofil, mitokondriyal elektron transport sistemi, endoplazmik retikulum, peroksizom ve plazma membranı olarak sayılabilir. Solunan oksijenin % 95'inden fazlası mitokondrilerde ATP şeklinde enerji oluşumunda kullanılırken, yaklaşık %5 'i de son yörüngelerinde ortaklanmamış elektron içeren ve bu özellikleri nedeniyle de toksik serbest radikallere dönüşmektedir (24). Süperoksit radikali, oksijen molekülüne bir elektron ilavesi ile oluşur. Serbest radikal hasarına karşı koruyucu antioksidan bir enzim olan ve oksidan hasar oluşumu ile birlikte artan SOD aracılığı ile hidrojen peroksit (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>)' e indirgenir. H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> eşlenmemiş elektron içermediği için tek başına radikal değildir (25).

H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>' in hücre içinde metabolizması birkaç şekilde olabilir. H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, CAT veya GSH-Px tarafından toksik olmayan ürünlere dönüşür, geçiş metallerinin varlığında toksik

hidroksil radikali ( $\text{OH}^\cdot$ ) radikaline dönüşür. Fenton reaksiyonu ile oluşan  $\text{OH}^\cdot$  oldukça reaktif ve toksik bir radikaldir. İlk karşılaştığı molekül ile 10-16 s içinde, 14 Å mesafesinde reaksiyona girer. Hidroksil radikali büyük molekül yapısı ve elektronegativitesi nedeni ile DNA, protein, karbonhidrat ve lipitler gibi makro moleküllerle reaksiyona girerek bu yapılarda oksidatif hasara neden olur. Makro moleküller hücrelerde kısıtlı miktarlarda bulduklarından bu yapılarda oluşan hasar oldukça önemlidir. İn vivo herhangi bir  $\text{OH}^\cdot$  radikal süpürücüsünün etkili olabilmesi için mevcut hedef moleküllerin önemli bir bölümünü kapsayacak kadar yüksek konsantrasyonda bulunması gerekir. Bu nedenle  $\text{OH}^\cdot$  radikalinin oluşumunun önlenmesi, bu radikalın süpürülmesinden daha etkilidir (26).

İskemik dokularda, serbest oksijen radikali üreten intraselüler mekanizmalar tam aktive edilmiş durumdadır. Ancak oksijen sağlanmasındaki eksiklikten dolayı fonksiyon görmezler. Kan akımı ve oksijen sağlanmasının restorasyonu ile büyük miktarlardaki serbest oksijen radikali üretilerek reperfüzyon hasarı indüklenir (3). Organizmada serbest oksijen radikalleri ortaya çıktıktan sonra radikal reaksiyon dizileri başlar. Eğer bir serbest radikal, radikal olmayan bir molekülle reaksiyona girerse, binlerce reaksiyondan oluşan reaksiyon zincirlerini başlatır. Serbest oksijen radikalleri paylaşılmamış elektronlarından dolayı lipid, protein, karbonhidrat, nükleik asit gibi çeşitli makromoleküllerin oksidatif hasarına neden olurlar (21, 27). Bu hasarlanma özetle şu mekanizmalarla olur.

**a-) Lipid Peroksidasyonu:** Serbest radikallerin hücrede başlattığı en önemli ve zararlı etki lipid peroksidasyonudur. Çoklu doymamış yağ asitlerinin serbest radikaller ile oksidasyonu lipid peroksidasyonu olarak tanımlanır. Lipid peroksidasyonu biyolojik membranlarda akıcılığın kaybına, membran potansiyelinde azalmaya, hidrojen ve diğer iyonlara karşı geçirgenliğin artışı neticesinde hücrenin hasarına ve ek olarak lipid peroksidasyonunun içeriğinin serbestleşmesine neden olur. Ürünlerinden biri olan malondialdehit (MDA) membran bileşenlerinin polimerizasyonuna ve çapraz bağ

yapmalarına yol açar. Bu da, hücre yüzeyinin durumunu, enzim aktivitesini, iyon transportunu etkileyebilir. MDA, poliansatüre yağ asitlerinin peroksidasyonu sonucu oluşan stabil bir son üründür. IR hasarındaki lipid peroksidasyonun derecesinin belirlenmesinde doku MDA düzeyleri ölçülmektedir (28, 29).

**b-) Protein oksidasyonu:** Serbest radikaller ile oluşan protein oksidasyonunun kimyasal sonucu olarak metiyonin sülfokside, histidin oksihistidin ve aspargin, tirozin ditirozin ve sistein disülfidlere dönüşür. Bu değişiklikler proteinlerin bağlanma özelliklerinde ve enzim aktivitelerinde farklılaşmaya neden olarak hücre fonksiyonlarında bozulmalara yol açabilir (28, 29).

**c-) DNA hasarı:** Serbest oksijen radikalleri adenin ve piridin nükleotid durumlarının sürdürülebilmesi için gerekli yollara engel olabilirler. Serbest oksijen radikalleri DNA ile tepkimeye girerek mutajenik olan 8-Hidroksiguanin'in ortaya çıkmasına neden olurlar (27).

**d-) Kovalen bağlanma:** Serbest radikaller polisiklik hidrokarbonlar, gibi ksenobiyotiklerin çeşitli biyomoleküllere aromatik aminler ve nitrozaminler kovalen bağlanmasına neden olabilir. Bu da doğrudan hücre hasarına yol açabilir (27).

**e-) Kalsiyum salınımı:** Hücre yaralanması ile ilgili olduğu düşünülen bir engelleyen herhangi gruplarına sahiptir ve serbest oksijen radikalleri bir durum etkiler. Kalsiyum ATPaz enzimleri önemli SOR tarafından hücre sülfidril inaktive edilebilir. Sitokinler, hipoksi, endotoksin gibi faktörler SOR aracılı yol kullanarak, hücre enerjisini azaltabilirler (30).

Özetle SOR hasarı, IR hasarının temel mekanizması olup, hemen hemen tüm hasar mekanizmalarında etkin rol oynamaktadır (Tablo 5).

Tablo 5 SOR hasarı

1. Sarkoplazmik retikulum kalsiyum ATP'az sistemini ve hücre zarı sodyum potasyum ATP'az sistemini inhibe ederek hücre kalsiyum yükünü artırır.
2. Lökositler için kemotaktik olup lökosit birikimi ve aktivasyonunu sağlar.
3. No reflow fenomeninde aracı olarak görev yapar.
4. NO ile reaksiyon sonucu oluşan peroksinitrit aracılığıyla doku hasarını artırır.
5. Genetik yapıda hasarlanma oluşturur.
6. Hücre zarı fosfolipid yapısında peroksidasyon oluşturarak hücre zarı bütünlüğünün bozulması ve hücrenin şişmesine neden olur.
7. Protein ve enzimlerde, yapısal bozulmaya ve parçalanmaya neden olur.

### 2.3.2. ANTIOKSİDANLAR

Organizmanın pro-oksidan/anti-oksidan dengesi sağlıklı bir yaşam sürdürebilmek için çok önemlidir. SOR'ların oluşumunu ve meydana getirdikleri hasarları önlemek ve detoksifikasyonu sağlamak üzere organizmayı koruyan “*antioksidan savunma sistemi*” dört yolla etki göstermektedir.

A. Serbest oksijen radikallerini etkileyerek onları tutma, yok etme, “süpürücü etki”. Antioksidan enzimler, küçük moleküller bu yolla etki gösterirler.

B. Serbest oksijen radikalleriyle etkileşip onlara bir hidrojen aktararak aktivitelerini azaltma veya “inaktif şekle dönüştürücü etki”. Vitaminler, flavanoidler bu tarz bir etkiye sahiptirler.

C. Serbest oksijen radikallerini bağlayarak zincirlerini kırıp fonksiyonlarını engelleyici etki zincir kırıcı etkidir. Hemoglobin, seruloplazmin ve mineraller “zincir kırıcı etki” gösterirler (31).

D. Serbest radikallerin oluşturdukları hasarın onarılması şeklinde “onarıcı etki” gösterirler (32).

Endojen kaynaklı veya eksojen kaynaklı olan antioksidanların tanımlanmasında ve etkinliklerinin ortaya konmasında IRH modelleri önemli katkı sağlamıştır. Antioksidan özelliği öne sürülmüş pek çok madde çeşitli IR modellerinde test edilerek değerlendirilmiştir. Antioksidanlar aşağıdaki gibi sınıflandırılmıştır (33-35). Endojen antioksidanlar, enzim ve enzim olmayanlar olmak üzere iki sınıfa ayrılırlar (Tablo 9) (21, 29, 36).

Tablo 6 Antioksidanlar

<b>Endojen antioksidanlar</b>
<b>A.Enzim olan endojen antioksidanlar</b>
1) Süperoksit dismutaz (SOD)
2) Glutasyon peroksidaz (GSH-Px)
3) Glutasyon S-Transferazlar (GST)
4) Katalaz (CAT)
5) Mitokondriyal sitokrom oksidaz sistemi
6) Hidroperoksidaz
<b>B. Enzim olmayan endojen antioksidanlar</b>
1) Laktoferrin
2) Transferin
3) Hemoglobin
4) Miyoglobin
5) Ürat
6) Albümin
7) Glutasyon
8) Bilirubin
9) Seruloplazmin
11) Ferritin
12) Sistein
13) Metiyonin
14) Melatonin

<b>Eksojen antioksidanlar</b>
<b>A-Vitamin olan eksojen antioksidanlar</b>
1. $\alpha$ -tokoferol (vitamin E)
2. Karoten (vitamin A)
3. Askorbik asit (vitamin C)
4. Folik asit (folat)
<b>B-İlaç olarak kullanılan eksojen antioksidanlar</b>
1. Ksantin oksidaz inhibitörleri
2. NADPH oksidaz inhibitörleri
3. Rekombinant süperoksit dismutaz
4. Vitamin E analogu
5. Endojen antioksidan aktiviteyi artırıcılar
6. Nonenzimatik serbest radikal toplayıcılar (mannitol, albümin)
7. Demir redoks döngüsü inhibitörleri (desferroksamin)
9. Sitokinler (TNF ve IL-1)
8. Nötrofil adhezyon inhibitörleri
10. Barbitüratlar
11. Demir şelatörleri
<b>C-Gıdalardaki eksojen antioksidanlar</b>
1) Butylated hidroksitoluen (BHT)
2) Butylated hidroksianisol (BHA)
3) Sodyum benzoat
4) Ethoxyquin
5) Fe-süperoksit dismutaz
6) Propilgalate

Serbest radikallerin zararlı etkilerine karşı organizmada koruyucu mekanizmalar vardır. Bu mekanizmaların bir kısmı serbest radikal oluşumunu, bir kısmı ise oluşmuş serbest radikallerin zararlı etkilerini önlemektedir. Bu işlevi yapan maddelerin tümüne birden genel olarak “antioksidanlar” denir. Etkilerini lokal oksijen konsantrasyonunu azaltarak yaparlar. Hidroksil radikallerini temizleyip lipid peroksidasyonunun başlamasını önlerler. Geçiş metal iyonlarını bağlayıp etkisizleştirirler. Peroksitlerin alkol gibi nonradikal

ürünlere dönüşümünde etkin rol oynayarak zincir reaksiyonlarına neden olurlar. Tüm radikallerle reaksiyona girip zinciri kırarak gösteren antioksidanlar intraselüler ve ekstraselüler olmak üzere iki grupta incelenir. En belirgin özellikleri okside olan substratlara oranla çok daha az konsantrasyonlarda bile, substratın oksidasyonunu geciktirmeleri ve inhibe etmeleridir.

Oksidan moleküller belirli düzeyde kaldıkları sürece, organizmanın yabancı maddelere ve enfeksiyon ajanlarına karşı önemli savunma molekülleridir. Ancak belirli düzeyin üzerinde oluştuklarında veya antioksidan sistemin yetersizliğinde serbest radikal molekülleri, organizmanın yapı elemanları olan protein, lipid, karbonhidrat, nükleik asitler ve enzimleri bozarak zararlı etkilere yol açarlar (37).

Yukarıda bahsedildiği gibi IRH oluşumunda serbest oksijen radikalleri önemli bir yer tutmaktadır. İskemik dokuların reperfüzyonu toksik reaktif oksijen türleri oluşumuna yol açar. Bunlar süperoksit anyonlar, hidroksil radikalleri, hipoklorik asit, hidrojen peroksit ve nitrik oksitten derivate peroksinitrittir (38). Serbest radikal temizleyicileri, reaktif oksijen parçaları ile reaksiyona girerek, bunları zararsız maddeler haline dönüştüren antioksidan ajanlardır.

### **2.3.3. ENFLAMATUAR SİSTEMLER**

Lökositler (Polimorf nüveli lökositler (PMNL)) dir. İskemi-reperfüzyon ile lökositlerin aktivasyonu gerçekleşir, kemotaksis oluşur ve endotel düzeyindeki patolojik değişiklikler ile membran permeabilitesi artar, bu da nötrofillerin enfiltrasyonuna yol açar. Nötrofil enfiltrasyonu IRH' nın patofizyolojisinde önemli bir rol oynar (39). Nötrofiller, serbest radikallerin oluşumunda ve IRH' da önemli bir kaynaktır. Azurofilik granüllerinde oksidan etkili NADPH oksidaz, elastaz ve '*miyeloperoksidaz*' enzimlerini içerir. Bu enzimler oksidan doku hasarında önemli roller üstlenir. Aktive nötrofillerde ksantin-

oksidaz'ın artması ile SOR'un salınması "solunum patlaması" olayını meydana getirir. İskemi sonrası reperfüzyonun başlaması ile birlikte, dokuya sunulan oksijenin yaklaşık %70'i NADPH-bağımlı oksidaz ile süperoksit iyonlarına oksitlenir. Süperoksit iyonu, çoğu kez spontan dismutasyonla hidrojen peroksit'e dönüşür. Hidrojen peroksit ise klorür iyonlarının varlığında *miyeloperoksidaz* enzimi aracılığı ile hipoklorik aside indirgenir. Hipoklorik asit (HOCL) güçlü bir oksidandır ve birçok biyolojik molekülle kolayca reaksiyona girebilir (40).  $H_2O_2 + Cl^- \rightarrow OH^- + HOCL$  Miyeloperoksidaz dokudaki nötrofil birikimi, dokunun miyeloperoksidaz (MPO) aktivitesi ölçülerek saptanabilmektedir. MPO enzimi, nötrofillerin sitozolik granüllerinden salınmaktadır ve indirekt olarak nötrofil birikimini yansıtmaktadır (41). Nötrofillerin aktivasyonu ile nötrofil sekonder granüllerden salınan apolaktoferrin, plazminojen aktivatörü, komplemanı aktive eden enzim ve elastaz, kolajenaz, ve jelatinaz gibi proteolitik enzimler damar endotelinde hasara neden olmaktadır. Proteinazların etkisi ile damar duvarında yapının değişimi ve duvar yapısının gevşemesi ile nötrofillerin dokuya göçü kolaylaşır (40).

IR'a bağlı kompleman aktivasyonu, damarsal hemostazı etkileyen enflamatuvar aracı maddelerin oluşumuyla sonuçlanır. Bu aracı maddelerden en önemlileri; Kompleman 3a ve kompleman 5a gibi anafilotoksinler ile inaktif kompleman 3b ve kompleman 5b-9 gibi kompleman sistem unsurlarıdır (42). Kompleman 5a; kompleman 3a'ya oranla 20 kat daha güçlü olup, hem lökosit aktivasyon ve kemotaksisini hem de IL-1, IL-6 ve TNF $\alpha$  gibi inflamatuvar aracılardan sentezini artırır. Kompleman 5b-9 ve inaktif kompleman 3b, endotel fonksiyon değişikliklerine neden olurlar. IR'a bağlı kompleman sistem aktivasyonu, vasküler hemostaz değişiklikleri ve lökosit-endotel adhezyon eğilimi oluşturarak doku iskemisini derinleştirir (43). Sitokinler, doğal ve spesifik immunitenin bir protein mediyatör grubudur. Genelde sitokinler bir enflamatuvar veya antijenik etkileşime yanıt olarak sentezlenir. Sitokinler lenfositlerin olgunlaşımını diferansiyasyon olmalarını sağlarlar. Dokuya zarar

verebilirler, hatta dokunun ölümüne kadar götürebilirler. Travma veya enflamasyonlu bölgede makrofaj ve monositlerden salınan bir sitokin olan IL-1 isimli polipeptid cerrahiden sonra gelişen birçok değişiklikten sorumlu bulunmuştur. Bu maddenin başta immün yanıt ve doku tamiri üzerinde etkili olduğu düşünülmektedir. IL-1 ve tümör nekrozis faktör-alfa (TNF- $\alpha$ ), akut ve kronik enflamasyonun birçok lokal ve sistemik özelliklerinin oluşumunda rol oynamaktadır. Düşük dozlarda lokal inflamasyonun mediatörleri iken, yüksek miktarlarda salgılandıklarında dolaşıma geçerek endokrin etkiler oluştururlar. IR, kompleman sistemini aktive eder. Kompleman sisteminin aktivasyonu ile da sitokin salınımının düzenlendiği düşünülmekle birlikte bu konu halen tam olarak açıklığa kavuşmamıştır. Kompleman aktivasyonu sonucu oluşan, proenflamatuar komponentler bir yandan lökositleri aktive ederken, diğer yandan TNF- $\alpha$ , IL-1 ve IL-6 oluşumunu uyararak enflamatuar cevabı güçlendirir (44).

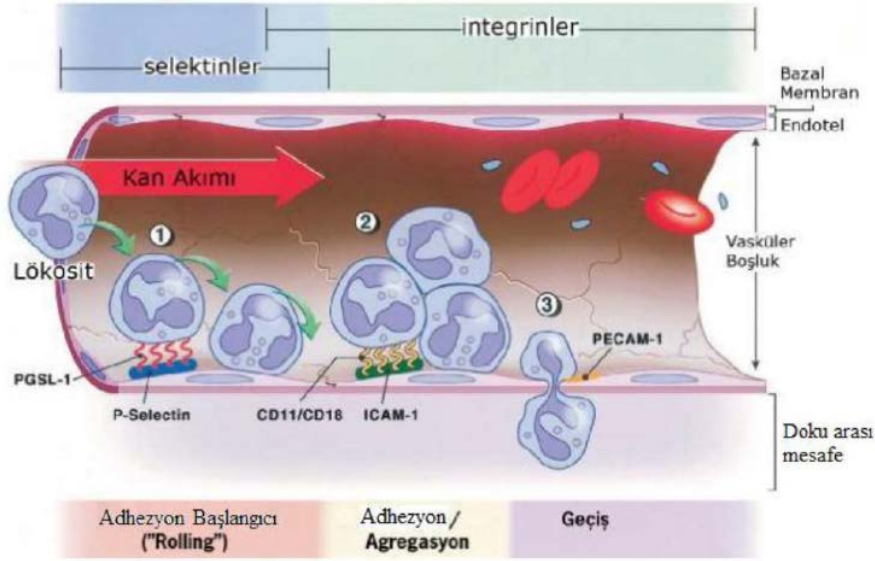
#### **2.3.4. KOMPLEMAN SİSTEMİ**

İskemi reperfüzyon hasarında kompleman sisteminin rolü tam olarak açıklığa kavuşmamıştır. Reperfüzyon döneminde açığa çıkan SOR, kompleman sisteminin aktivasyonuna neden olur. Bu aktivasyon klasik yol, alternatif yol veya lektin yolu üzerinden olabilir (45). Kompleman sisteminin aktivasyonu sonunda proenflamatuar komponentler oluşur. Bunlar C3a, C5a, C3b ve C5b-9'dur. C3a ve C5a anaflatoksinlerdir. Lökositleri aktive ederler. Kompleman komponentleri içinde özellikle anaflatoksinler (C3a ve C5a) ve membran atak kompleksi (C5b-9) reperfüzyon hasarında önemli rol oynar. Anaflatoksinler, sitokin sentezini uyararak enflamatuar yanıtı daha da arttırırlar. C5b-9 ve C3b vasküler tonusu düzenleyerek iskemik dokuya kan akımını ve bu sayede lökosit-endotel adezyonunu arttırır (45, 46).

### 2.3.5. ENDOTEL HÜCRESİNİN ROLÜ

IRH' nın oluşmasında endotel hücreleri önemli role sahiptir. Oksidatif stres endotel hücrelerinin aktivasyonuna ve işlevlerinin bozulmasına neden olur. Endotel hücreleri SOR için potansiyel hedef konumundayken, diğer taraftan da SOR üretim kaynağıdır (47). Endotel hücrelerinin oksidatif stresi sonucu kompleman aktive edilir. Lökosit adhezyon moleküllerinin üretimi artar. SOR etkisi ile endotel hücreleri hasara yanıt olarak İL-1, PAF, prostaglandinler (PG I<sub>2</sub>, PG E<sub>2</sub>), GM-CSF, büyüme faktörleri, endotelin, NO ve tromboksan A<sub>2</sub> (Tx A<sub>2</sub>) salgırlar. Aktive olan endotel hücreleri ek olarak kendi bazal membranlarını sindiren kollajenazlar salgılama yeteneğindedir (48). İyon ve organik moleküllere geçirgenlikte bariyer oluşturması, prostoglandinlerin dolaşımdan kısmen uzaklaştırılması ve koagülasyondaki rolü, endotel hücrelerinin bilinen klasik görevlerindedir. Endotel hücrelerinin yukarıda sayılan işlevlerine ek olarak, vazomotor etkinlikleri düzenlemesi ve hasara cevap olarak salgıladığı mediyatörler nedeniyle giderek daha fazla ilgi çekmeye başlamıştır. Endotel hücrelerinin oksidatif stresi sonucu kompleman aktive edilir. Lökosit adhezyon moleküllerinin üretimi artar. ROT etkisi ile endotelden salınan trombosit aktive edici faktör lökositleri aktive eder. Lökosit endotel hücre etkileşimi sonucu lökositler endotele yapışır ve göç gerçekleşir (49). Lökositlerin damar endoteli ile etkileşim mekanizması Şekil 3 'de sunulmuştur (50).

Şekil 3 Lökositlerin damar endotelini ile etkileşim mekanizması



IR; lökosit aktivasyonu, kemotaksis ve lökosit endotel hücre adhezyonuna yol açar. PMNL' de, endotel hücreleri gibi ROR üretme kapasitesine sahiptir. IRH' nda PMNL'in rolü ile ilgili bazı mekanizmalar ileri sürülmüştür. Bu mekanizmalar şöyle sıralanmaktadır.

1. Mikrovasküler oklüzyon
2. SOR salınması
3. Sitotoksik enzim salınması
4. Vasküler permeablite artışı
5. Sitokin salınımında artış

Polimorf nüveli lökositlerin başlangıçtaki biokimyasal reaksiyonları endotel hücreleri ve ksantin oksidaz aracılığı ile olur. Aktivasyon ve migrasyonları ise endotel hücrelerde ve lökositlerde bulunan adhezyon molekülleri aracılığı ile olur. Lökosit adhezyon molekülleri, lökositlerde ve diğer başka hücrelerde de bulunan ve gelişme, haberleşme, enflamasyon ve apoptozis gibi pek çok biyolojik olaylarda rol alır. Selektin grubu adhezyon molekülleri; doku hasarı olan bölgede aktive olmuş endotele ve PMNL'lerin başlangıçtaki adhezyonunda rol alırlar. L, P ve E selektin olmak üzere bilinen üç üyesi vardır. IR, endotelde P- selektin ekspresyonunu artırır. Bu molekül, PMNL' lerde bulunan P-selektin glikoprotein 1(PSGL-1) adlı reseptörü ile etkileşerek düşük afiniteli lökosit endotel

bağlantısını oluşturur. İkinci aşamada lökosit Beta-2 integrinler ile endotelial ICAM- 1 arasında etkileşim ile lökosit adhezyon ve agregasyonu gelişir. Üçüncü aşamada trombosit endotelial hücre adhezyon molekülü-1 ile endotel hücre bağlantıları arasındaki etkileşim ile lökosit transmigasyonu gelişir. Aktive lökositler ekstrasvasküler kompartmana ulaşınca, hasar bölgesine doğru göç etmeye başlarlar. Burada aktive lökosit cevabı şu mekanizmalarca gerçekleştirilir.

Tablo 7 aktive lökosit cevabı mekanizmaları

1. Fosfolipaz A <sub>2</sub> aktivasyonu sonucu arasıdonik asit metabolitleri (prostoglandinler ve lökotrienler) üretilir
2. Degranülasyon sonucu lizozomal enzimler salınır
3. ROR üretimi gerçekleşir (49, 51)

Bu ürünler, endotel hasarı ve doku hasarının güçlü mediyatörleridir. Başlangıçtaki enflamatuar uyarının etkisini güçlendirir. Bazı durumlarda lizozomal enzimler hücre dışına salınabilir. Hasar yapıcı etkeni ortadan kaldırmaya veya dilue etmeye yönelik bu enflamatuar cevap sonucu mikrovasküler permabilite artışı, ödem, tromboz ve parankim hücre ölümü de gerçekleşir. Görevini tamamlayan lökositler apoptotik hücre ölümüne uğrarlar. Lenfatik dolaşım ile ortamdan uzaklaştırılırlar (49, 51).

### 2.3.5.1. MİKRODOLAŞIM

Mikrodolaşım, en uç kan dolaşımı sistemidir. Arteriol, venül, arteryel ve venöz kılcalların boyutu 7-100 µm arasında değişir. İskemi sonrası reperfüzyon sağlandığında lökosit aktivasyonu ve iltihabi cevap gelişir. Aktive olmuş lökositler mikrodolaşımında birikerek kollaps ve tıkanıklığa neden olurlar. Dolayısıyla lökosit ile trombosit ve lökosit ile endotel arasındaki hücre etkileşimleri ana mekanizmadır. İnterstisyel sıvı birikimi ve azalmış endotel bağımlı vazodilatasyon bu duruma katkıda bulunur. Bu durum ilk kez 1967 yılında Majno tarafından “no reflow” fenomeni olarak tanımlanmıştır (52). Lökosit-endotel

adhezyonu, endotelde şişme ve daha fazla lökosit adhezyonuyla sonuçlanır. Lökosit-trombosit adhezyonu ise trombositlerin subendotel alanda birikerek, endotel ayrılmasına neden olur. Bu yapışmış trombositler, selektin ve integrinler yoluyla, daha fazla lökositin trombositlere yapışmasını sağlarlar (53). Nötropeni ve trombositopeni modellerinde “no reflow” oluşumunun azaldığı gözlenmiştir (54). Sonuç olarak endotel lökosit-trombosit etkileşimleriyle, fibrin birikimini takiben, trombüs oluşumu gözlenir.

### **2.3.5.2. TROMBOSİTLER**

Trombositler, trombotik etkileri dışında kemotaktik fonksiyonlarıyla da enflamatuar cevapta kritik rol oynarlar. Adhezyon sonrası aktive olmuş trombositler, hem salgıladıkları kemotaktik faktörlerle direkt olarak etki ederler, hem de bağlandıkları hücrelerin (endotel/lökosit) kemotaktik özelliklerini değiştirerek etki ederler (55). Hücre zarı fosfolipidlerinin peroksidasyonu sonucu; hücre zarı bütünlüğü, geçirgenliği ve hücre yüzey reseptör fonksiyonları etkilenir. Reperfüzyon periyoduyla birlikte şiddetli trombosit aktivasyonu oluşur. Artmış bu aktivite, reperfüzyon döneminde artmış trombojenite ve yeniden tıkanıklık risklerini de beraberinde getirir. Trombosit aktivasyonun primer etkeni tam olarak bilinmemekle birlikte, reperfüzyonla birlikte oluşan SOR patlaması suçlanmaktadır (56).

## **2.4. HASARLANMA MEKANİZMALARI**

### **2.4.1. LİPİD PEROKSİDASYONU**

Serbest radikallerin hücrede başlattığı en önemli ve zararlı etki lipid peroksidasyonudur. Çoklu doymamış yağ asitlerinin serbest radikaller ile oksidasyonu lipid peroksidasyonu olarak tanımlanır. Lipid peroksidasyonu, organizmada oluşan kuvvetli yükseltgen bir radikalın etkisiyle membran yapısındaki çoklu doymamış yağ asidi zincirindeki alfa metilen gruplarından bir hidrojen atomunun uzaklaştırılması ile

başlamaktadır. Biyolojik sistemlerde bu radikalın süperoksit ile hidroksil radikalının olduğu kabul edilmektedir. Yağ asidi, zincirinden bir hidrojen atomunun uzaklaştırılması sonucu zincir radikal niteliğini kazanır. Bunun sonucunda oluşan radikal alkil radikali olup dayanıksız bir türevidir. Bir dizi değişikliğe uğrar. Özellikle molekül içi çift bağ aktarılması ile dien konjugatları ve daha sonra lipid radikalının moleküler oksijenle etkileşimi sonucunda lipid peroksi radikali (LOO-) oluşur. LOO- zar yapısındaki diğer çoklu doymamış yağ asitlerini etkileyerek 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 (3, 21, 29). Lipid peroksidasyonu biyolojik membranlarda akıcılığın kaybına, membran potansiyelinde azalmaya, hidrojen ve diğer iyonlara karşı geçirgenliğin artışı neticesinde hücrenin hasarı içeriğinin serbestleşmesine neden olur. MDA, poliansatüre yağ asitlerinin peroksidasyonu sonucu oluşan stabil bir son üründür. IRH' da hücre içi MDA düzeyi artar. Ek olarak lipid peroksidasyonunun son ürünlerinden biri olan MDA, membran bileşenlerinin polimerizasyonuna ve çapraz bağ yapmalarına yol açar. Bu da, hücre yüzeyinin durumunu, enzim aktivitesini, iyon transportunu etkileyebilir (21, 29). Lipid peroksidasyonu sonucu oluşan malondialdehid gibi stabil ürünlerin ölçümü, serbest oksijen radikali öncülerinin aktiviteleri konusunda fikir verir. Dolayısıyla lipid peroksidasyonu, IRH' nın hem tanısında hemde patofizyolojisinde önemli rol oynar (36).

#### **2.4.2. PROTEİN OKSİDASYONU**

Protein oksidasyonu, proteinlerin direkt olarak reaktif oksijen türleriyle veya indirekt olarak oksidatif stresin ikincil ürünleriyle indüklenmesi ile meydana gelen kovalent modifikasyon olarak tanımlanır. Serbest radikaller ile oluşan protein oksidasyonunun kimyasal sonucu olarak metionin; sülfokside, histidin; oksihistidine veya asparagine, tirozin; ditirozine ve sistein disüflitlere dönüşür. Bu değişiklikler proteinlerin bağlanma

özelliklerinde ve enzim aktivitelerinde farklılaşmaya neden olarak hücre fonksiyonlarında bozulmalara yol açabilir (21, 29). Hipoksida iskelet kasında protein sentez hızındaki olası azalmanın yanısıra protein yıkım hızında da bir artış beklenir. İskelet kası protein yıkımı ile ilgili olarak en iyi bilinen mekanizmalar; lizozomal proteazlar,  $Ca^{+2}$  bağımlı kalpain proteazlar ve ATP bağımlı ubiquitin proteozom sistemidir (31, 57). Ubiquitin proteozom sisteminin, sarkomer yapısındaki aktin ve miyozin yıkımını gerçekleştirebilmesi için bu yapısal proteinlerin monomerlerine ayrılması, başka bir deyişle serbest bırakılmaları gerekir. İşte bu aşamada  $Ca^{+2}$  bağımlı kalpain proteazları ve kaspaz-3 proteazı devreye girerek kontraktıl proteinlerin sarkomerden serbest bırakılmasını sağlar. Dolayısıyla, kas atrofisi sırasında iki veya daha fazla protein yıkım mekanizması rol oynar (58, 59).

#### **2.4.3. DNA HASARI**

Serbest oksijen radikalleri adenin ve piridin nükleotid durumlarının sürdürülebilmesi için gerekli yollara engel olabilirler. Serbest oksijen radikalleri DNA ile tepkimeye girerek mutajenik olan 8-Hidroksiguanin'in ortaya çıkmasına neden olurlar (27, 36). Isı şok proteinleri (HSPs), hücrelerin enfeksiyon, radyasyon, ağır metaller, etanol ve hipoksi gibi streslere veya yükselmiş ısıya maruz kaldıklarında üretimleri artan bir grup proteindir. Isı şoku proteinleri intraselüler proteinler olup, stress altında diğer hücre içi proteinlerin parçalanması ile ortaya çıkan artıkların temizlenmesinde çöpçü (şaperon) rolleri mevcuttur. HSP60 moleküler ağırlığı 60 kD olan ve özellikle mitokondride eksprese edilen bir ısı şok proteindir.

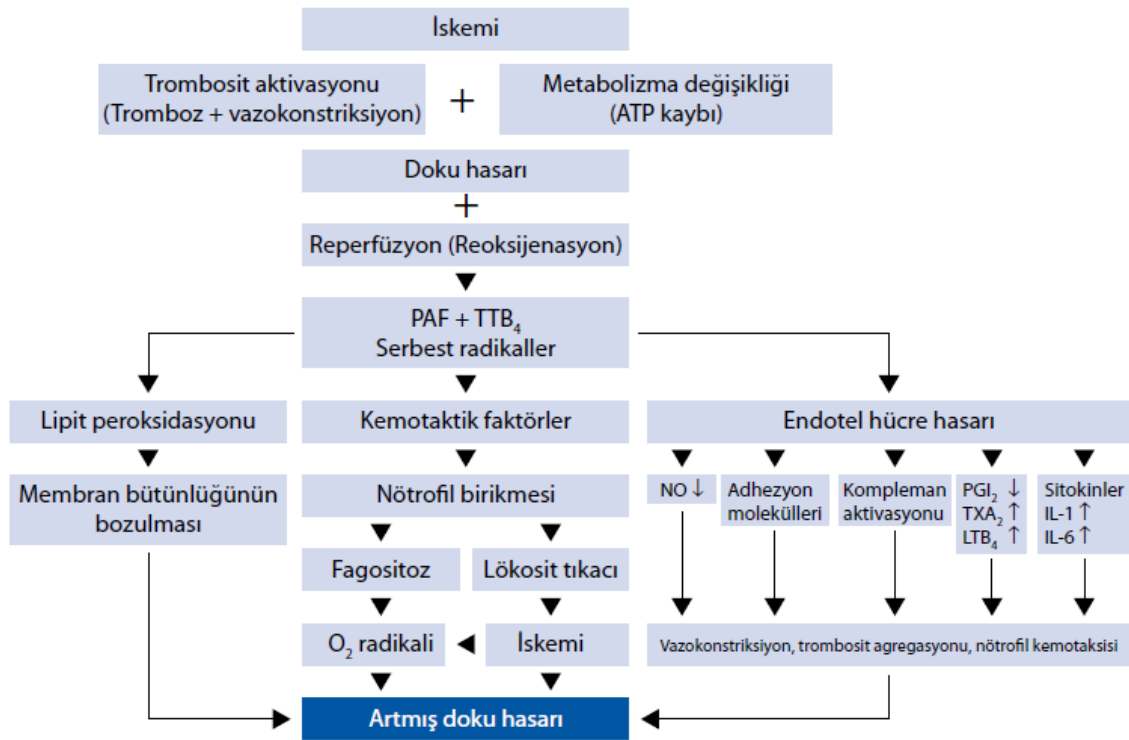
#### **2.4.4. KOVALEN BAĞLANMA**

Serbest radikaller polisiklik hidrokarbonlar, aromatik aminler, ve nitrozaminler gibi ksenobiyotiklerin çeşitli biyomoleküllere kovalen bağlanmasına neden olabilir. Bu da doğrudan hücre hasarına yol açabilir (27).

## 2.5.5. KALSİYUM

Hücre yaralanması ile ilgili olduğu düşünülen bir elementtir. Kalsiyumun transportunu engelleyen herhangi bir durum hücre fonksiyonlarını olumsuz etkiler. Kalsiyum ATPaz enzimleri önemli sülfidril gruplarına sahiptir ve serbest oksijen radikalleri (SOR) tarafından inaktive edilebilir. Sitokinler, hipoksi, endotoksin gibi faktörler SOR aracılı yol kullanarak, hücre enerjisini azaltabilirler (60).

Şekil 4 IRH' da hasarında yer alan olaylar dizisi (61, 62).



IRH' ın fizyopatolojisi ile ilgili çeşitli faktörler ileri sürülmüştür (20). Özellikle aşağıda sıralanmış 5 faktör üzerinde durulmaktadır (Tablo 8).

Tablo 8 IRH' na etkili olan yolakların özeti

OKSİDAN SİSTEMLER	ANTIOKSİDAN SİSTEMLER	İNFLAMATUAR SİSTEMLER	KOMPLEMAN SİSTEMİ	ENDOTELYAL SİSTEMLER
KSANTİN	SOD	PMNL	C3a	PGI <sub>2</sub>
HİPOKSANTİN	GSH-Px	NADPH Oksidaz	C3b	TxA <sub>2</sub>
O <sub>2</sub>	GST	MPO	C5a	Lökotrien B <sub>4</sub>
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	CAT	İL 1	C5b-9	NO
PMNL	FERRİTİN	İL 6	C3a-5b	Endotelin
PEROKSİNİTRİT	VİT C	TNF alfa		PAF

## 2.5. İSKEMİ REPERFÜZYON HASARI MEKANİZMALARINDA ÖNEMLİ BAZI MADDELER

### 2.5.1. KSANTİN OKSİDAZ (XO)

Oksijen kökenli serbest radikal aracılığı ile oluşan hasarda ilk basamak, ksantin oksidaz kökenli O<sub>2</sub> anyonlarının üretilmesidir (21). Normal koşullarda hipoksantin, ksantin dehidrogenaz yardımıyla ksantine oksidize edilir. Ancak iskemi sırasında ksantin dehidrogenaz, ksantin oksidaza dönüştürülür. Postiskemik dönemde, iskemik dokudaki SOR' un en belirgin kaynağı ksantin oksidaz enzimidir. Substrat olarak nikotinamid adenin dinükleotid kullanan ksantin dehidrogenazın tersine, ksantin oksidaz oksijeni kullanır ve bundan dolayı iskemi sırasında hipoksantin'in ksantine dönüşümünü katalize edemez. Hipoksantin'in dokuda aşırı seviyelere çıkmasına yol açar. Hipoksantin ve ksantin oksidasyonu serbest radikallerin oluşumuna yol açar (3, 19, 21). Yapılan çalışmalarda iskemi sırasında ksantin dehidrogenaz enziminin kalsiyum aracılı bir proteaz katalizörlüğünde ksantin oksidaza dönüşmesinin, farklı dokularda farklı sürelerde gerçekleştiği görülmüştür. Bu da değişik dokuların IRH' na neden farklı oranlarda cevap verdiği konusunda açıklayıcı olmaktadır. Reperfüzyonla oksijen tekrar sunulduğunda, fazla miktardaki hipoksantin'in ksantin oksidaz ile dönüştürülmesi toksik SOR oluşumu ile sonuçlanır (38).

## 2.6.2. NÖTROFİLLER (POLİMORF NÜKLEER LÖKOSİTLER) (PMNL)

İskemik dokuda, serbest radikaller de olmak üzere diğer bazı kemoatraktanların etkisi ile göç eden nötrofiller, reperfüzyonda doku hasarının ilerlemesine yol açar. Salgıladığı proteazlar (elastaz, jeletinaz vb.) ile endotel hücrelerinin parçalanmasına neden olur. Aktive olmuş nötrofillerin yol açtığı ve nötrofillerin kapillerlerdeki agregasyonları ile kan akımının geri dönmesine engel olan kapiller tıkaçlarına neden olduğu bildirilmiştir (63). Reperfüzyon döneminin en önemli mikrovasküler patolojisi olan kan akışının geri dönmemesi fenomenine (no reflow phenomen) denir. Aktive nötrofiller salgıladıkları vazokonstrüktör ajanlar ve trombosit aktive edici faktör (PAF) ile daha büyük damarlarda da (arteriyol, prekapiller damarlar) daralmaya neden olmaktadır. Bir araşidonik asid metaboliti olarak salgılanan lökötien B<sub>4</sub> (LTB<sub>4</sub>), süperoksid anyon radikali üretimine ve nötrofillerin kemotaksisine neden olmaktadır. Böylece bir geri beslenme mekanizması ile toplanmış olan nötrofillerden salgılanan kemotaktik faktörler yeniden serbest radikal üretimine ve nötrofil infiltrasyonuna neden olmaktadır (58). Hartmann ve arkadaşları nötrofillerce üretilen süperoksid anyon radikalininin, eritrositlerin agregasyonunu da hızlandırdığını, bu etkinin nötrofil agregasyonu ile birlikte kapiller tıkanmayı daha arttırıcı olabileceğini savunmuşlar (64). IR' nin yol açtığı mikrovasküler hasar için PMNL ve endotelial ilişki gerekmektedir. İskemi sırasında ve reperfüzyon döneminde postkapiller venüllerde endotele artmış nötrofil adhezyonu görülür ki bunun iskemi reperfüzyona bağlı uzak organ hasarında önemli rolü vardır. PAF, LTB<sub>4</sub> ve SOR bu durumun en muhtemel kimyasal mediatörleridir (3, 65). Reperfüzyon hasarını önlemeye yönelik antinötrofil serumlarla ya da lökosit adhezyon moleküllerine karşı monoklonal antikolarla yapılan çalışmalar, reperfüzyonda mikrovasküler permeabilededeki artıştan başlıca nötrofillerin sorumlu olduğunu göstermiştir (66). IR ile lökosit aktivasyonu, kemotaksis ve lökosit endotel hücre adhezyonu meydana gelir (39). Dokuda aktive lökositlerin başlattığı yanıt,

aşağıdaki tablodaki mekanizmalar ile gerçekleştirilir (Tablo 9), (67).

Tablo 9 Dokuda aktive lökositlerin başlattığı yanıtı başlatan mekanizmalar.

1. Fosfolipaz A <sub>2</sub> aktivasyonu
2. Degranelasyon sonucu lizozomal enzimler salınması
3. SOR üretimi

### 2.5.3. ENDOTELYAL FAKTÖRLER

Vasküler endotelial çeper pek çok lokal hormon ve otakoid salgılayarak vasküler düz kas tonusunu düzenler (3). IR kaskadında endotel hem hedef hem de reperfüzyon hasarından sorumlu mediatorlerin üretim kaynağıdır. Endotelden hem vazokonstriktör olan endotelin hem de vazodilatator olan nitrikoksit (NO) normal şartlarda dengeli olarak salınır. IRH' da endotelin/NO oranı endotelin lehine bozular. Sonuçta arterlerde vazokonstriksiyon, venlerde vazodilatasyon olur (59).

#### 2.5.3.1. ARAŞİDONİK ASİT METABOLİTLERİ

Reperfüzyon, prostaglandin üretiminin en potent uyarandır.

**2.5.3.1.1. Prostatiklin (PGI<sub>2</sub>):** PGI<sub>2</sub>, endojen olarak üretilen ve esas olarak vasküler sistemin endotel hücrelerinde araşidonik asitten prostatiklin sentetaz aracılığı ile sentezlenen bir maddedir. PGI<sub>2</sub>, vasküler düz kas hücrelerinde adenilsiklaz enzimini aktive ederek hücre içi c-AMP artışına, bu da vazodilatasyona neden olur. PGI<sub>2</sub> aynı zamanda mikrovasküler kan akışının düzenlenmesinde, trombosit agregasyonunun inhibe edilmesinde önemli rol oynar. Endotelial doku üzerinde sitoprotektif etkisi de olabilir. Mikrovasküler sistemde vazokonstriktif etkisi olan tromboksan A<sub>2</sub> ile vazodilatasyon etkisi olan PGI<sub>2</sub> arasında bir denge vardır (68). Esas olarak, endotel hücrelerinde yüzey stresi, hipoksi ve NO salınımında rol oynayan bazı mediyatörlere yanıt olarak yapılır. PGI<sub>2</sub> hedef hücrede NO ile birlikte ortak etkilerinin yanı sıra, endotel hücrelerinden NO salınımını da artırır.

**2.5.3.1.2. Tromboxan A<sub>2</sub> (TXA<sub>2</sub>):** Araşidonik asitten siklooksijenaz yardımı ile oluşan TXA<sub>2</sub> güçlü bir vazokonstrüktör ve agregandır.

**2.5.3.1.3. Lökotrien B<sub>4</sub>:** Lipooksijenaz yolu ile oluşan lökotrienler, iskemide ve daha çok da reperfüzyon boyunca endotelial disfonksiyonda önemli rol oynarlar. LTB<sub>4</sub> nötrofil yüzeyindeki spesifik reseptörlere bağlanırlar reperfüzyon hasarında önemli rol oynar. 3 saatlik iskemik periyod mukozal LTB<sub>4</sub> seviyelerini değiştirmezken, reperfüzyonun izlediği aynı süreli iskemi, mukozal LTB<sub>4</sub> seviyelerinde %200-600 oranında artışa yol açmaktadır (15).

### **2.5.3.2. NİTRİK OKSİT (NO)**

Endotel türevli nitrik oksit veya relaxing faktör (ENDO, EDRF) olarak da bilinir. NO; asetilkolin uyarısı, endotoksin, hipoksi, hücrel zedelenme veya mekanik kesilme stresine yanıt olarak dolaşıma salınabilmektedir. Yarı ömrü bir kaç saniye olan, diffüze olabilen bir maddedir ve horman olarak kabul edilir. NO kendiliğinden nitrat ve nitrite ayrışır. Septik şok ve travmada, nitrit ve nitrat metabolitleri ile ölçülen NO düzeyleri yüksekliğinin, düşük sistemik vasküler direnç ve yükselmiş endotoksin düzeyleri ile ilişkili olduğu kanıtlanmıştır (20). Endotel hücresi, NO'yu sadece damar düz kaslarına doğru salgılamaz, aynı zamanda damar lümenine doğru da salgılar. Endotel kaynaklı NO, aynı zamanda siklik guanozin monofosfat (cGMP) bağımlı mekanizmayla trombositlerin adezyonunu, aktivasyonunu, sekresyon ve agregasyonlarını inhibe eder. Bu özellik, endotelin NO üretiminin azaldığı ateroskleroz gibi durumlarda klinik önem kazanır (69). Bu etkilerine ilaveten, endotelyuma lökosit adezyonunu, düz kas hücresi migrasyon ve proliferasyonunu da inhibe eder (70-72). Nitrik oksit düz kas hücresinde solubl guanilat siklazı aktive ederek, cGMP' yi artırır (73). Damar düz kas hücrelerinde artan cGMP, cGMP'ye bağılı protein kinazları aktive etmekte ve membranda bulunan *Ca/Mg ATPaz*

*pompası* ile hücre içi kalsiyumun hücre dışına atılmasını sağlamaktadır. Bu şekilde cGMP hücre içi kalsiyum seviyelerini azaltarak vazodilatasyona neden olmaktadır (74).

Bir serbest radikal olan NO, L-arginine guanidinium grubundan olan nitrik oksit sentaz (NOS) aktivitesiyle endotel mitokondrisinde sentezlenir. NO'in doku koruyucu özellikleri; vasküler tonus kontrolü, trombosit agregasyonunun engellenmesi, lökosit ile endotel etkileşiminin azaltılması, dolaşımdan serbest radikallerin temizlenmesi, seçici damarsal geçirgenliğin düzenlenmesi, düz kas hücre proliferasyonunun engellenmesi, bağışıklık sisteminin aktivasyonu ve endotel hücre rejenerasyonunun uyarılmasıdır. Aynı zamanda iskemik dokularda SOD aktivitesini etkileyerek hidrojen peroksit birikimini azaltır (50). IRH' ye bağlı gelişen endotel hücre disfonksiyonunda, NO sentezinde azalma oluşarak IRH derinleşir. Endotel disfonksiyonuna bağlı NO azalma mekanizması hala tam olarak gösterilememiştir (75). Doku reperfüzyonuyla birlikte; SOR oluşumunda patlama, NO seviyesinde azalma gerçekleşir. Böylelikle, süperoksit ve NO arasındaki denge süperoksit lehine kayar. Bu denge kaybı; NO bağımlı vazodilatasyonda azalma ve nötrofil-endotel adhezyonu ile trombosit agregasyonunda artışa ikincil "no reflow" fenomenine eğilim oluşturur. Sonuç olarak NO azalması endotel disfonksiyonu ve nötrofil aracılı doku hasarıyla birliktelik gösterir (75).

#### **2.5.3.2.1. NOS' LAR**

NO, suda çözünebilen ve dayanıklı olmayan renksiz bir gazdır. NO moleküler oksijen, süperoksit anyonları ve hem proteinleri etkileşebildiğinde dolayı biyolojik sistemlerdeki yarılanma ömrü oldukça kısadır; örneğin kan gibi fizyolojik sıvılardaki yarılanma ömrü 10-20 saniye kadardır. NO yaklaşık 140 kDa molekül ağırlığında, sitokrom P450 redüktaz enzimine benzerlik gösteren karmaşık bir enzim olan NOS tarafından sentezlenmektedir. NOS enziminin nöronal NOS (nNOS, NOS I), endotelial NOS (eNOS,

NOS III) ve indüklenebilir NOS (iNOS, NOS II) olmak üzere üç değişik izoformu bulunmaktadır. nNOS ve eNOS'un ikisi de yapısal NOS (yNOS)'yi oluşturan yapısal enzimlerdir; iNOS ise çeşitli uyarılar ile indüklenebilmektedir. NOS substrat olarak yarı esansiyel bir amino asit olan L-arjinini kullanır ve ürün olarak NO ile L- sitrülün oluşur. Bu olayda moleküler oksijen ve nikotinamid adenin dinükleotit fosfat (NADPH) ise yardımcı faktörlerdir. Flavin adenin dinükleotit (FAD) ve flavin mononükleotit (FMN), NO sentezi için yardımcı faktörlerdendir. NOS enzimlerinin hücre içi dağılımları değişkenlik göstermektedir; yNOS'un hücre membranında bulunmasına karşın, iNOS sitozolde yerleşmiştir (Tablo 10) (55-74).

Tablo 10 NOS enzimleri

<b>ÖZELLİKLER</b>	<b>nNOS</b>	<b>eNOS</b>	<b>iNOS</b>
1. Yerleşim	Sinir ve iskelet kası Hücreleri	Trombositler ile endotel ve endokart/miyokart hücreleri	Makrofaj, lökosit, kondrosit, epatosit, astrosit, fibroblast, nötrofil, eozinofil, lenfosit ve keratinositler ile damar düz kası, endotel, endokart/miyokart, mast, mikroglia, lenfoit/miyeloit dendritik, Langerhans, Kupffer, bronkiyal epitel, mezangiyal, Schwann ve sinir hücreleri
2. Hücre içi yerleşim	Membrana bağımlı	Membrana bağımlı (etkisiz)veya sitozolik (etkin)	Sitozolik
3. Molekül ağırlığı Gen yapısı ve büyüklüğü	161 kDa <sup>a</sup> 29 exon, 28 intron, > 200 kbpa <sup>a</sup>	133 kDa <sup>a</sup> 26 exon, 25 intron, 21-22 kbpa <sup>a</sup>	131 kDa <sup>a</sup> 26 exon, 25 intron, 37 kbpa <sup>a</sup>
4. Kromozomal yerleşim	12 numaralı kromozom üzerinde 12q24.2-12q24.3a	7 numaralı kromozom üzerinde 7q35-7q36a	7 numaralı kromozom üzerinde 17cen-q11.2a

5. Predominant durumda amino asit sayısı	1434a	1203a	1153a
6. İndüklenebilirlik	Yapısal	Yapısal	İndüklenebilir
7. Yardımcı faktörler	BH4, FAD, FMN, hem, çinko	BH4, FAD, FMN, hem, çinko	BH4, FAD, FMN, hem, çinko
8. Substratlar	L-Arjinin, NADPH, oksijen	L-Arjinin, NADPH, oksijen	L-Arjinin, NADPH, oksijen
9. Kalsiyuma bağımlılık	Bağımlı	Bağımlı	Bağımsız gibi görünmekte, ancak bazı hücrelerde < %20 veya %50-70 oranında bağımlı
10. Kalmoduline bağımlılık	Bağımlı	Bağımlı	Bağımsız gibi görünmekte, ancak bazı hücrelerde %50 oranında bağımlı
11. Protein varyasyonu	$\mu$ , $\alpha$ , $\beta$ ve $\gamma$ izoformları Dokuya özgü	---	---
12. Süperoksit oluşturma kaynakları	Hem domain, redüktaz domain	Genellikle hem domain	Genellikle redüktaz domain
13. Uyarıcıları	Eksitator amino asitler (glutamat, NMDA vd.)	Asetilkolin, ATP, ADP, bradikinin, trombin, shear stress	Endotoksin ve sitokinler
14. Salıverilme	Dakikalar içinde, geçici, pM düzeyde	Dakikalar içinde, geçici, pM düzeyde	Uzun süreli, sürekli, büyük miktarlarda ( $\mu$ M)
15. Başlıca fizyolojik işlevi	Sinirsel aşırım	Vazodilatasyon	Sitotoksiste
16. Patofizyolojik olaylardaki rolü	Müsküler distrofi, iskemi-reperfüzyon	Endotelial işlevsizlik, hiperkolesterolemi, hipertansiyon	İnflamatuvar hastalıklar

NOS' un etkinliği hücre içine kalsiyum girişine bağlı olmasına karşın, iNOS'un etkinliğinin artması için dinlenme durumundaki hücrelerde hücre içi kalsiyum düzeyleri yeterlidir. yNOS etkinliği hücre içinde kalsiyum derişimindeki artış ile tetiklendiğinden dolayı etkinliği geçicidir ve düşük miktarlarda (pM düzeyde) NO oluşumuna neden olur.

Tersine, iNOS etkinliği birkaç gün boyunca sürer ve daha büyük miktarlarda (nM düzeyde) NO oluşumuna neden olur. Kalsiyuma bağımlı yNOS ile oluşan az miktardaki NO, sinirsel aşırım ve vazodilatasyon gibi çeşitli fizyolojik olaylarda rol alır. Bazal düzeylerde NO oluşumu arterlerde venlere oranla ve kk damarlarda büyük damarlara oranla daha çoktur. Asetilkolin, bradikinin, histamin, adenin nükleotitler ve serotonin gibi reseptöre bağımlı ve serbest yağ asitleri gibi reseptörden bağımsız agonistler ile eNOS aracılığı ile oluşan NO saliverilmesi uyarılabilir. iNOS ise akciğerde epitel hücreleri, trombositler ve ince bağırsak hücreleri gibi bazı hücre türlerinde eksprese edilmesine karşın normalde etkin değildir. Ancak, bazı hücreler endotoksin, TNF- $\alpha$ , IFN- $\gamma$ , IL-1 $\beta$ , IL-2 ve IL-6 gibi özgül maddeler tarafından uyarıldıklarında iNOS etkinliği artar (76-86).

Kanda NO hızlı bir biçimde nitrit ve nitrata dnmektedir. Kandaki NO'nun asıl dayanıklı olan metaboliti nitrattır. Ayrıca, NO amino asit ve proteinlerdeki tiyol grupları ile de etkileşmekte ve nitrozotiyol bileşikleri biçiminde depolanabilmektedir. NO bir serbest radikal olmasından dolayı oldukça reaktiftir. Çeşitli yapılar ile etkileşmektedir. NO'nun serbest oksijen radikalleri ile de etkileşebilme özelliğinden dolayı, serbest radikal yakalayıcısı ve dolayısı ile hücre koruyucusu olduğu düşünülmektedir. Öte yandan, süperoksit anyonu ile NO' nun etkileşmesi sonucunda nükleik asitler, lipitler ve proteinler üzerinde toksik etki gösteren güçlü bir oksidan molekül olan peroksinitrit oluşur. Perokinitrit ve onun parçalanma ürünleri ise lipit peroksidasyonu, değişik moleküllerin nitrosilasyonu veya sodyum kanallarının etkisizleşmesine neden olarak hücre hasarına neden olabilir (76-86).

NO' nun doğrudan ve doğrudan olmayan etkileri bulunur. NO' nun doğrudan olan etkileri; biyolojik bir molekül veya hedef ile etkileşmesi sonucunda ortaya çıkar. Bu etkiler ise NO oluşumunun düşük olduğu fizyolojik koşullarda hızla oluşmaktadır. NO' nun bu etkileri hem demiri içeren veya içermeyen hedefler (guanilil siklaz, CYP, COX, katalaz,

sitokrom oksidaz, NOS, tromboksan sentaz ve hemoglobin) hipervalan metallere, mitokondriyal ve sitoplazmik akonitazlara ve lipid hidroperoksitler ile olan etkileşmelerini içerir. Bu etkileşmeler ise NO' nun; vazodilatasyon, trombosit ve lökositlerin yapışmasında azalma, sinir sisteminde sinyal iletimi, steroid ve eikozanoid metabolizmasının düzenlenmesi, ilaç metabolizmasının değişmesi, enflamatuvar yanıtın değiştirilmesi, hidrojen peroksit aracılıklı toksisitenin artırılması, hücre solunumunun fizyolojik kontrolü, NO oluşumunun otoregülasyonu, iNOS veya nNOS aracılıklı endotelial işlev bozukluğu, hemoglobin tarafından oksijen salıverilmesinin allosterik düzenlenmesi, enflamasyon gelişmesinde rolü olan lökotrienlerin oluşumunda azalma, methemoglobin oluşumu, NO katabolizması, oksidatif stres, mitokondriyal solunum ile ferritin sentezinin azalması ve transferrin reseptör sentezinin artması gibi etkilerinin ortaya çıkması ile sonuçlanır (76).

NO' nun doğrudan olmayan etkileri, doğrudan etkilerini oluşturduğu derişimlerden daha yüksek derişimlerde olduğunda ortaya çıkar; NO' nun bu kadar yüksek derişimleri ise ekspresyonu artan iNOS aracılığı ile sürekli NO oluşumu ile sağlanır. NO'nun S-nitrozasyon tepkimeleri aracılığı ile ortaya çıkan çeşitli indirekt etkileri bulunur (Tablo 11).

Tablo 11 NO'nun S-nitrozasyon tepkimeleri aracılığı ile ortaya çıkan çeşitli indirekt etkileri bulunur.

NO'nun süperoksit radikali, reseptörler	(glukokortikoid reseptörü gibi)
İyon kanalları	(riyanodin reseptörleri, kardiyak L türü kalsiyum kanalları ve kalsiyuma bağımlı potasyum kanalları gibi)
Metabolik proteinler	(gliseraldehit-3-fosfataz dehidrojenaz, kreatin kinaz, alkol dehidrojenaz, ornitin dekarboksilaz ve indirgenmiş glutatyon metabolizmasında rol oynayan enzimler gibi)
Protein kinaz C (PKC) ve protein kinaz G (PKG)	sinyal artırıcı sistemler
Transkripsiyon faktörleri	(NF-κB, etkinleştirici protein-1 [AP-1], c-jun ve cMyb gibi)
Kanda bulunan proteinler	(hemoglobin ve faktör XIII gibi)

Bu etkileşmeler sonucunda ise NO' nun steroidlerin enflamasyonu önleyici etkilerinin azalması sonucu çok çeşitli etkiler ortaya çıkar (Tablo 12).

Tablo 12 NO'nun steroidlerin inflamasyonu önleyici etkileri

1. Kardiyomiyosidlerin elektriksel özelliklerinin değişmesi
2. Kalp ve iskelet kasında sarkoplazmik retikulumdan kalsiyum salıverilmesinin uyarılması
3. Glikolizin önlenmesi
4. Vazodilatasyon
5. ATP'nin anaerobik koşullarda oluşumunun azalması
6. İnotropik ilaçlara karşı miyokardın kasılabilirliğinin azalması
7. Etanol metabolizması
8. Poliamin ve indirgenmiş glutatyon oluşumunun azalması
9. Kalp hızının düzenlenmesi
10. Sinaptik modülasyon
11. PKC'ye bağımlı sinyalleme yolunun inhibisyonu
12. İnflamasyona neden olan olayların düzenlenmesi
13. Transkripsiyonel etkinliğin azalması
14. Hemoglobin tarafından oksijen salıverilmesinin alosterik modülasyon
15. cGMP'ye bağlı biçimde olan trombosit kümelenmesinin inhibisyonu
16. Pıhtılaşmanın önlenmesi

NO'nun peroksinitritin aracılık ettiği olaylar ile ortaya çıkan doğrudan olmayan etkileri DNA, tiyoller, lipitler ve mitokondriyel enzimlerin oksidasyonu ve çeşitli proteinlerin (mangan SOD, prostasiklin (PGI<sub>2</sub>) sentaz, tirozin hidroksilaz, hücre iskeleti proteinleri ve kinaz substratları gibi) tirozin kalıntılarının nitrasyonu ile ilişkilidir. Peroksinitrit aracılığı ile oluşan bu etkiler ise *poliADP-riboz polimeraz* (PARP)'nin etkinleşmesi, tablo 13 deki değişikliklere neden olur (76).

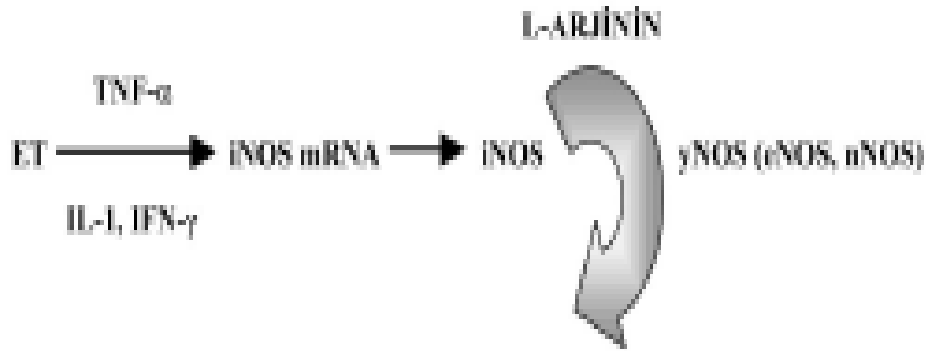
Tablo 13 poliADP-riboz polimeraz (PARP)'nin etkinleşmesi

1. Mutajenez
2. Antioksidan savunma sistemlerinin etkinliğinin azalması
3. Transkripsiyon faktörlerinin ve DNA onarımının baskılanması
4. Hücre membranı hasarı, sitokrom c salıverilmesi
5. Demiyelinizasyon
6. Düşük yoğunluklu proteinlerin oksidasyonu
7. Hücre solunumunun baskılanması
8. PGI <sub>2</sub> 'nin trombosit kümelenmesini önleyici ve vazodilatör etkisinin engellenmesi
9. Dopamin yetersizliği
10. Hücre yapısının değişmesi
11. Sinyalleme yollarının baskılanması

### 2.5.3.2.2. FİZYOLOJİK OLAYLARDAKİ ROLÜ

Değişik hücre türleri tarafından sentezlenen NO' nun otokrin ya da parakrin hücre sel mediyatör olarak işlevi bulunmaktadır. NO' nun çeşitli fizyolojik olaylardaki rolü tablo 14 de özetlenmiştir (76-86). NO birçok etkisini cGMP oluşumuna neden olan ve çözünebilir hem grubu taşıyan bir enzim olan guanilil siklaz enzimi aracılığı ile oluşturmaktadır. cGMP oluşumundaki artma ise, hücre içi kalsiyum düzeyinin azalmasına neden olan olaylar zincirinin tetiklenmesine neden olmaktadır. CGMP'nin aracılık ettiği olaylar arasında vazodilatasyon, miyokard kasının gevşemesi ve trombosit kümelenmesinin vardır. NO' nun neden olduğu vazodilatasyonda; PKG çeşitli mekanizmalar aracılığı ile hücre içi kalsiyum derişiminin azalmasına neden olmaktadır. Bu mekanizmalar; fosfolipaz C (FLC)'nin inhibisyonu (87), hücre içi kalsiyum depolarından inozitol-1, 4, 5-trifosfat (IP<sub>3</sub>) reseptör aracılıklı kalsiyum çıkışının önlenmesi (88), iyon kanallarından kalsiyumun hücre içine girişinin engellenmesi (89) veya çıkışının artırılması (90), sarkoplazmik retikuluma Ca<sup>+2</sup>-ATPaz aracılığı ile girişinin artırılması (91) ve RhoA' ya bağımlı yolun inhibisyonu üzerinden miyozin hafif zincirin fosfataz etkinliğinin artırılması (92) bulunmaktadır (Şekil 5, Tablo 14).

Şekil 5 NO' nun çeşitli fizyolojik olaylardaki rolü



Tablo 14 NO

NO		
KORUYUCU	DÜZENLEYİCİ	ZARARLI
1. Konakçı savunması	Damar gerimi ve geçirgenliğini düzenlenmesi	Doku oksijen kullanımında yetersizlik
2. Oksidan hasara karşı koruyucu	SSS işlevlerinin düzenlenmesi	Hücrel enzimlerin inhibisyonu
3. Lökosit dezyonunun önlenmesi	GİS işlevlerinin düzenlenmesi	Aşırı vazodilatasyon
4. Antioksidan	Trombosit kümelenmesinin önlenmesi	Lipit peroksidasyonunun uyarılması
5.	Endokrin sistem işlevlerinin düzenlenmesi	Antioksidan Depoların tükenmesi
6.		DNA hasarı
7.		Vasküler hiporeaktivite
8.		Organlarda işlev bozukluğu

Şekil 2.8. NO'nun fizyolojik ve patofizyolojik olaylardaki rolü. DNA, deoksiribonükleik asit; eNOS, endotelial nitrik oksit sentaz; ET, endotoksin; GİS, gastrointestinal sistem; IL, interlökin; iNOS, indüklenebilir nitrik oksit sentaz; mRNA, haberci ribonükleik asit; nNOS, nöronal nitrik oksit sentaz; NO, nitrik oksit; SSS, santral sinir sistemi; TNF, tümör nekroze edici faktör; yNOS, yapısal nitrik oksit sentaz

### 2.5.3.3. ENDOTELİN

Endotelin 1, Yanagisava tarafından 1988 yılında aort endotel hücrelerinden izole edildi. Kuvvetli bir vazokonstrüktör peptid olduğu gösterdi. 1995 yılında Schiffrin endotelin 1' in hipertansiyon, vazospazm, ateroskleroz ve IRH' ye kolaylaştırdığını gösterdi (93). IRH' de endotelin 1' in böbrekte arttığı gösterildi (94). Arter ve venlerde kontraksiyona neden olan en güçlü vazokonstrüktördür. İskemik kalmış bir bağırsağın ürettiği endotelinin, intestinal iskemi reperfüzyon hasarının sistemik bir hasara dönüşmesinden sorumlu olabilecek güçlü bir aday olduğu ileri sürülmektedir (20).

### 2.5.4. KOMPLEMANLAR

Komplemanların arka arkaya aktivasyonu, anaflatoksin C3a ve C5a'nın üretimine yol açar. Nötrofiller üzerindeki etkileri ise kemotaksis, endotele adhezyonun artışı, serbest oksijen radikallerinin üretim ve salınmasını sağlamaktır (3, 20). C5a; C3a'ya oranla 20 kat daha güçlü olup, hem lökosit aktivasyon ve kemotaksisini hem de IL-1, IL-6, MCP1 ve

Tümör Nekrozis Faktör (TNF $\alpha$ ) gibi inflamatuvar araçların sentezini artırır. C5b-9 ve iC3b, endotel fonksiyon değişikliklerine neden olurlar. C3b'nin parçalanması sonucu oluşan iC3b, lökosit CD11b/CD18 (MAC-1) yüzey molekülü için endotel üzerinde bir adezyon alanı oluşturur. C5b-9 ise; transkripsiyonel faktör NF- $\kappa$ B'nin aktivasyonu aracılığıyla VCAM-1, ICAM-1, E selektin ve P selektin adezyon moleküllerinde artış, endotel hücre kaynaklı IL-8 ve MCP-1 salınım artışı ile lökosit aktivasyonu ve endotel hücre sıklık guanozinmonofosfat düzeyinde düşüş ile endotel bağımlı vazodilatasyonda inhibisyon oluşturur (43).

### **2.5.5. SİTOKİNLER**

Reperfüzyon sonrası, dolaşımda IL-1, IL-6 ve TNF- $\alpha$  gibi sitokinler gözlenir. Bu ajanlara karşı antagonistler kullanılarak, hem IL-1'in hem de TNF- $\alpha$  nın vasküler yaralanmaya katkıda buldukları ve endotel adhezyon moleküllerini arttırdıkları gösterilmiştir (3, 20). IR' de sitokin salınımının bilinmesine rağmen bu sitokinlerin permeabilite üzerine olan etkilerinin direk mi yoksa hücre adhezyon molekülleri ekspresyonu ve nötrofil adhezyon aktivasyonu yoluyla mı olduğu bilinmemektedir (65). Sitokinlerin sekresyonu; endotoksinler, immun kompleksler, toksinler, fiziksel travma ve bazı enflamasyon mediatörleri tarafından stimüle edilir.

### **2.5.6. PLATELET AKTİVE EDİCİ FAKTÖR (PAF)**

Fosfolipaz A<sub>2</sub>' nin etkisiyle endotel hücreleri tarafından membran fosfolipidlerinden üretilir. Çok çeşitli inflamatuvar reaksiyonda (ARDS, akut pankreatit, inflamatuvar bağırsak hastalığı, glomeruler hasar vs.) etkin olduğu gözlenen bir substrattır (3, 15, 95). Trombositlerin şekil değişikliğine, agregasyonuna ve granül içeriğinin salınmasına yol açan oldukça kuvvetli bir ajandır. Ek olarak PAF kuvvetli bir nötrofil kemoatraktan ve aktivatör bir maddedir ve TNF- $\alpha$  üretiminde önemli bir rol oynar. Dokuların reperfüzyonu sonucu lökositlerin aktivasyonuna, adhezyon ve diapedezine ve aynı zamanda vasküler

permeabilitede artışa yol açar. Pek çok çalışma PAF' ın in vitro ve in vivo ortamda lökositlerin mikrovasküler endotele adhezyonunu arttırdığını göstermiştir. PAF' ın, reperfüzyon sonucu gerçekleşen kemotaksisin bir düzenleyicisi olduğu düşünülmektedir (3, 20, 96).

### 2.6.7. SÜPEROKSİT DİSMUTAZ (SOD)

Süperoksit dismutaz (SOD) süperoksit serbest radikalının ( $O_2^-$ ) hidrojen peroksit ( $H_2O_2$ ) ve moleküler oksijene ( $O_2$ ) dönüşümünü katalizleyen antioksidan enzimdir. SOD  $2O_2^- + 2H^+ \xrightarrow{SOD} H_2O_2 + O_2$  formülü ile de gösterilir.

Normal metabolizma sırasında hücreler tarafından yüksek oranda  $O_2$  üretilmesine rağmen hücre içi düzeyi SOD tarafında düşük tutulur. Ancak,  $H_2O_2$  geçiş metalleri varlığında *Fenton* ve *Haber Weiss reaksiyonu* ile son derece aktif OH radikaline dönüşmektedir. Bu durumda katalaz (CAT) ve glutatyon peroksidaz (GSH-Px) enzimlerinin aktivitesi artarak  $H_2O_2$  düzeylerini kontrol altına almaktadır (97).

### 2.5.8. KATALAZ (CAT)

Katalaz esas olarak peroksizomlarda, daha az olarak sitozolde ve mikrozomal fraksiyonda bulunur.  $H_2O_2$ ' yi oksijen ve suya parçalar. Böylece  $H_2O_2$ ' nin OH oluşumunu önlemek için ortadan kalkmasını sağlar (97).  $H_2O_2 \xrightarrow{CAT} 2 H_2O + O_2$

### 2.5.9. GLUTATYON PEROKSİDAZ (GSH-PX) VE GLUTATYON REDUKTAZ (GSH-R)

Gerek  $H_2O_2$  ve gerekse LOOH' leri metabolize etmektedir. Selenyum bağımlı ve selenyum bağımsız iki farklı tipi vardır. Selenyum bağımlı tipi  $H_2O_2$  ve LOOH' leri, selenyum bağımsız tipi sadece LOOH' leri metabolize eder. Bu reaksiyonlar esnasında GSH hidrojen verici olarak görev yaptığından  $H_2O_2$  ve LOOH indirgenirken GSH ise okside

şekline (GSSG) dönüşür. Okside glutatyon ise NADPH bağımlı GSH-R tarafından tekrar GSH'a indirgenir. GSH-Px' ın fagositik hücrelerde de önemli fonksiyonları vardır. Diğer antioksidanlarla birlikte GSH-Px, solunum patlaması sırasında serbest radikal etkisi ile fagositik hücrelerin zarar görmesini önler. GSH-Px eritrositlerde oksidatif strese karşı en etkili antioksidandır (33). Eritrosit GSH-Px aktivitesi yaşlılarda ve down sendromlu hastalarda yüksek, prematürelere düşük bulunmuştur. Lökosit GSH-Px aktivitesi ise yaşlılarda ve hipertansiyonlu hastalarda yüksek bulunmuştur (98).

#### **2.5.10. GLUTATYON S-TRANSFERAZ (GST)**

Glutatyon S-transferaz dimerik yapıda olup sitozolde bulunmaktadır. Yabancı maddelerin biyotransformasyonunda rolleri olan GST'ler çeşitli endojen ve eksojen bileşiklerin GSH ile konjugasyonunu katalize eder (98).

#### **2.5.11. GLUTATYON (GSH)**

GSH, hücreleri oksidan hasara karşı koruyan hücre içindeki de en önemli antioksidan bileşiktir. Karaciğer başta olmak üzere pek çok dokuda glutatyon, sistein ve glisinden sentezlenir. Sentezde  $\gamma$  –glutamil sistein sentaz ve GSH sentaz enzimleri katalizördür. Hemoglobinin oksitlenerek methemoglobine dönüşümünün engellenmesinde rol alır. Ayrıca proteinlerdeki sülfhidril (-SH) gruplarını redükte halde tutar ve bu grupları oksidasyona karşı korur, böylece fonksiyonel proteinlerin ve enzimlerin inaktivasyonunu engeller. GSH yabancı bileşiklerin detoksifikasyonu ve amino asitlerin membranlardan transportunu sağlar. GSH eritrositleri, lökositleri ve göz merceğini oksidatif strese karşı korumada hayati öneme sahiptir (97). GSH homeostazı için diyetle yeterli protein alınmasının gerekli olduğu ve enteral veya parenteral alınan sistin, metiyonin ve N-asetilsistein'in GSH biyosentezinde sisteinin prekürsörü olarak önemli rol oynadığı çeşitli deneysel çalışmalarda gösterilmiştir. Yaşamsal fonksiyonlarda öneme sahip GSH'nın hayvan çalışmalarında yeterli

konsantrasyonlarda lenfositlerin ve ince barsak epitel hücrelerinin proliferasyonu için gerekli olduğu belirtilmiştir. Spermatojenez ve sperm olgunlaşmasında önemli rol oynadığı, enfluenza enfeksiyonunu inhibe ettiği, T-lenfositlerin, PMNL'lerin ve sitokinlerin aktivasyonu için gerekli olduğu ve immün sistemin önemli bir elemanı olarak fonksiyon gösterdiği ortaya konmuştur. Yapılan araştırmalar GSH eksikliğinin oksidatif strese yol açtığını ve alzheimer, parkinson, epilepsi, karaciğer hastalıkları, kistik fibrozis, orak hücreli anemi, AIDS, kanser, koroner kalp hastalığı, inme, diyabet gibi pek çok hastalığın nedeni olabileceğini ortaya koymaktadır (99).

### **2.5.12. TOTAL SÜLFİDRİL**

Sülfidril grupları, Glutasyon ve serbest sistein gibi protein olmayan ve thioeredoksin, glutaredoksin ve albumin gibi protein grubu olmak üzere ikiye ayrılırlar. Bu sülfidril grupları vücudu oksidatif stresten korumaya çalışan doğal antioksidanlardır ve oksidanların etkisi ile kolayca disülfidlere okside olurlar. Bu yüzden oksidatif stresin önemli bir göstergesidir (100, 101).

### **2.6. İSKEMİ REPERÜZYON HASARI SONUCU OLUŞAN VASKÜLER DİSFONKSİYON**

Endotel hücreleri, damarsal hemostazın sağlanmasında hayati ve dinamik bir görev üstlenir. Bu hücreler hem iskemi hem de reperfüzyona çok hassastırlar. Uzun süreli hipoksi; hücre zarı potansiyel değişiklikleri, iyon dağılımı bozuklukları ve akışkanlıkta azalma ile hücre içi hacim artışı ve hücre iskeleti organizasyon bozuklukları oluşturur (102). Hipoksi, endotel hücresi bazı genlerinde aktivasyon, bazılarında ise baskılanmaya neden olur. Doku reperfüzyonu ile birlikte, iskemik endotel değişiklikleri belirginleşerek, IR alanına lokalize endotel disfonksiyonu gelişir (103). Uzun süren iskemi ve sonrasındaki reperfüzyonu takiben oluşan morfolojik değişimler; hücresel şişme, membran depolarizasyonu, pinositotik

vezikül kaybı, endotel hücre bazal membran ayrılması ve aktive olmuş lökositlerin endotel hücre yüzeyine yapışmalarıdır (102). Hücresel şişme, etkenden bağımsız tüm hücresel hasar modellerinin ortak patolojik görüntüsü olup, IR sonrası tüm endotel hücrelerinde gelişir. Fizyopatolojisinde; oksidatif hücre zarı hasarı, iyon hemostaz bozukluğu ve osmotik stres suçlanmaktadır. IRH' ye bağlı gözlenen bir diğer öncelikli değişiklik hücre zarı depolarizasyonu olup, etiolojisinde ATP bağımlı sodyum-potasyum kanal inaktivasyonu sorumlu tutulmaktadır (104). Dolayısıyla, hücre zarı ve iskeleti değişikliklerinde ROT'un ATP yetersizliğine göre daha etkin rol oynadığı düşünülmektedir (105). ROT ile oluşan IR hasarı; etkilenen dokuya, antioksidan mekanizmaların etkinliğine ve IR'un süre ve şiddetine göre farklılık gösterir.

### **2.6.1. IR'UN ARTERİOL ÜZERİNE ETKİSİ**

IR hasarının arteriollerdeki primer göstergesi endotel bağımlı vazodilatasyonda bozulma ve hiperreaktivitedir. Endotel bağımlı vazodilatasyon NO aracılığıyla oluşur. IR hasarında NO sentezinde azalma meydana gelir. IR erken döneminde, direkt düz kas üzerinden etki eden endotelden bağımsız vazodilatasyon sistemleri etkilenmez. Endotel bağımlı vazodilatasyon azalmasının en çok reperfüzyon döneminde gerçekleşmesi, ROT'un önemli bir faktör olduğunu gösterir. Dolayısıyla antioksidan tedavi, arteriol vazodilatasyon cevabın korunmasında önemli rol oynar. Lökositler, arteriol fonksiyon bozukluğunda, venöz kapiller hasarında olduğu kadar önemli rol oynamaz. Ancak sürekli lökosit aktivasyon ve birikimi, ROT oluşumuna katkıda bulunarak, arteriol hasarı artışına neden olur. IR' a olan arteriol cevabı aynı zamanda dokudan dokuya da değişiklik gösterir. Sinir sistemi çok hassas iken böbrek dokusu arteriollerini oldukça dirençli olması gibi örnek verilebilir (105).

## 2.6.2. IR'UN ARTERYEL KILCALLAR ÜZERİNE ETKİSİ

Arteryel kılcal endotelinde IR hasarının klinik yansıması; interstisyel dokuya artmış sıvı filtrasyonu ve doku perfüzyonunu sağlayan kılcal damar sayısında azalma şeklinde olur (105). Doku reperfüzyonu sonrası, tıkanmaya bağlı, arteryel kılcallardaki azalma, doku perfüzyonunu daha da bozarak IRH artışına neden olur. Bu arteryel kılcal tıkanıklıklar; karaciğer IRH' nde olduğu gibi, *lökosit-endotel etkileşimi* sonrası gelişen hücresel şişme, iskelet değişiklikleri, bazal membran ayrılması ve lökosit rijiditesi ile karakterize intraluminal konjesyon sonucu oluşur. Diğer dokulardaki arteryel kılcal tıkanıklıklarından ise; venöz kılcallardaki geçirgenlik artışına ikincil gelişmiş interstisyel ödem ve hidrostatik basınç artışı ile oluşmuş arteryel kılcal mekanik basısı (intersitisyel ödem ve vasküler kompresyon) sorumludur. Her iki mikrovasküler disfonksiyon mekanizması lökosit-endotel adhezyonu temelinde gerçekleşir. Aynı zamanda lökosit kaynaklı ROT da bu disfonksiyona katkıda bulunur. Dolayısıyla lökosit-endotel adhezyonunun engellenmesi ve antioksidan tedaviyle mikrovasküler disfonksiyonda azalma sağlanabilir (104). IRH' ye bağlı artmış kapiller endotel geçirgenliği, moleküler seviyede, kavşak adhezyon molekülleri disfonksiyonu ve hücre iskelet değişikliklerine bağlıdır. Reperfüzyon periyoduyla birlikte belirginleşen lökosit-endotel etkileşimi ve sonrasında gerçekleşen lökosit diapedezi, kavşak adhezyon moleküllerinde çözülme ve endotel bariyer disfonksiyonu oluşturur (6). Akciğer IRH' de, endotel bariyer disfonksiyonuna bağlı pulmoner ödem gelişir. PGE<sub>2</sub>, PGI<sub>2</sub> ve antikompleman tedaviyle IR' ye bağlı endotel bariyer disfonksiyonu azaltılabilmektedir (106). Doku iskemisi sırasında birçok endojen koruyucu mekanizma endotel bariyerini onarmaya çalışır. Aktive olmuş nötrofillerden salgılanan glutamat ve adenin nükleotidler damarsal geçirgenliği kontrol eder. Adenozin endotel hücreleri arasındaki bağı kuvvetlendirip geçirgenliği azaltır. Dolayısıyla nötrofil kaynaklı koruyucu adenozin salınımı ve hipoksiyle indüklenmiş ekstraselüler ATP metabolizma ve transkripsiyonu ekstraselüler adenozin

miktarını arttırarak, hipoksik hasara karşı hücre geçirgenliğinde kontrollü bir koruma sağlar (42).

### **2.6.3. IR' UN VENÖZ KILCALLAR ÜZERİNE ETKİSİ**

IRH' ye bağlı venöz kapiller değişiklikleri; genel olarak, lökosit lokalizasyon, adhezyon, diapedez ve ROT salınımıyla ilgilidir. Venöz kılcalların iskemiye olan cevabında nötrofiller baskın lökosit sınıfı olup, hasarı direkt etkileri ve diğer hücrelerle olan etkileşimlerine ikincil indirekt etkileri aracılığıyla oluştururlar. Bu etkiler sonucunda hücre zarı makromolekül geçirgenliği artar. Artmış endotel geçirgenliği ve azalmış intravasküler hacim, yaygın doku ödemi ve hemodinamik instabilite gibi *lokal/sistemik* sonuçlar doğurur (105). Dokuda biriken lökositler aynı zamanda trombosit adhezyonu oluşturarak, mikrodolaşımda trombosit birikimi ve konjesyona neden olurlar. Bu sırada oluşan trombüs de IRH' de katkıda bulunur dolayısıyla antitrombotik ajanlar terapötik etkinliğe sahiptirler (107). IR' de NO oluşumundaki azalma, lökosit adhezyon ve hücre zarı makromolekül geçirgenliğini arttırır. Venöz kılcallar, eklenmiş nötrofil ROT oluşumu nedeniyle, oksidan stresin en yoğun görüldüğü vasküler kompartmandır. Venöz kılcallardaki endotel, lökosit ve trombositlere bağlı oksidan hasar hücre zarı geçirgenliğini maksimum hale çıkartır (105).

### **2.7. HEDEF ORGAN OLARAK İSKELET KASI İSKEMİ-REPERFÜZYON HASARININ ETKİLERİ**

Organizmanın iskemiye verdiği yanıt, hücre ve doku tipi ile süreye bağlı olarak ve kollateral dolaşım varlığına göre değişir. Örneğin insan kas dokusunda normal sıcaklıkta histolojik değişikliklerin başladığı iskemi süresi 2 saatten fazla iken, jejunumda bu değişiklikler yaklaşık 30 dakikalık iskeminin ardından başlar (5, 6, 108, 109). Normotermik doku iskemisinde geri dönüşümsüz hasar; kasta 4 saatte, sinirde 8 saatte, yağ dokusunda 24 saatte ve kemikte yaklaşık 4 günde oluşur. İskemik hasarın derecesini belirleyen iki önemli

faktör iskeminin genişliği ve süresidir.

### **2.7.1. KAS DEĞİŞİKLİKLERİ**

İskelet kası, ekstremitayı oluşturan primer kütle olup aynı zamanda iskemik hasara en hassas dokudur. Dolayısıyla iskelet kası hasarı ekstremita reperfüzyon hasarının en önemli bölümünü oluşturur (108). Kas ölümü sonrası makroskopik ve mikroskopik değişiklikler minimal olduğundan kas ölüm zamanını belirtmek zordur. İskemiye takiben yaklaşık üçüncü saatte ciddi kas hasarı ve altıncı saatte yaklaşık %97'lik fonksiyonel doku kaybı olduğu spektrofotometrik (triphenyltetrazolium chloride) yöntemlerle gösterilmiştir. Dolayısıyla geri dönüşümsüz hasar zamanının tayininde spektrofotometre önemlidir (110). Kas nekrozu ve ATP deposu azalması arasında yakın ilişki saptanmıştır. İskemik kas dokusunda öncelikle glikojen ve kreatin fosfat azalırken bu safhada çok fazla myonekroz oluşmaz. Sonrasında, ATP azalmasıyla birlikte, kas nekrozu hızla artar. 6 saatlik kas iskemisi sonucu, normal kas dokusu ATP deposunda %80 azalma ve kas dokusunun tümünde nekroz oluşur (111, 112). Kas fiberleri, içerdikleri myogloblin miktarına bağlı olarak, kırmızı (tip 1) ve beyaz (tip 2) olarak sınıflandırılır. Çoğu kas her iki türü de içermekteyse de bir tip daha baskın bulunur. Örneğin bacağın ön kompartmanında daha çok tip 1 veya yavaş kasılan fiberler baskın olup, enerji üretiminde aerobik metabolizmayı kullanmaları bu kas grubunu iskemiye daha hassas kılar. Bacağın arka kompartmanında ise tip 2 veya hızlı kasılan fiberler baskın olup, enerji üretiminde anaerobik metabolizma ön plandadır (108). İskeminin süresi ve etkilenen fiber tipi iskemik hasarda önemli olmakla birlikte dokunun vücuttaki konumu da önemlidir. Örneğin, çabuk soğuma nedeniyle, distal ekstremita kas dokusu proksimal kas dokusuna göre iskemiye daha dirençlidir (108).

## 2.7.2. MİKRODOLAŞIM DEĞİŞİKLİKLERİ

Mikrodolaşım değişiklikleri, iskemik dönemde gerçekleşir ve iskemi süresi ile uyum gösterir. İskemi, ilk olarak kapiller endotel hücreleri etkileyerek, hem lümen hem de sitoplazmaya doğru uzanan parmaksı çıkıntılar oluşturur. İskeminin devamıyla birlikte endotel veziküllerinde artış oluşur. Bu arada, hücreler arası bağlar zayıflar ve geçit genişler. Heterojen dağılımlı endotel hücre ödemi oluşarak kırmızı küre sıkışmasını arttırır. İskeminin dördüncü saatinden sonra mikrosirkülasyonda hücresele etkileşimler (eritrositik, trombositik ve lökositik) başlar. Venöz ve arteryel kılcallar, reperfüzyon öncesinde, sıkışmış eritrositlerle kapanmış görünümdeyler. Rulo halindeki eritrosit kümeleri, erken reperfüzyon döneminde, endotel yüzeyde hasarlanma oluştururlar. Endotel hücre sitoplazmasındaki parçalanma sonucu hücreler arası büyük geçitler oluşur. Reperfüzyonla birlikte, özellikle venöz kılcallarda, lümen içi trombosit ve fibrin kümeleri ile karakterize trombotik komplikasyonlar oluşur. Bu trombosit kümeleri, endotel yüzde olan geniş defektleri kapatır. Venlerde lökosit diapedezi oluşur. Venöz kılcallarda ise lökositlerin lenfosit ve monositlerle olan kümeleşmesi oluşur (108). İskemi süresi uzadıkça damarsal geçirgenlik artışı ve ilerleyici intersitisyel ödem oluşur. İskemi sonrası reperfüzyon sağlandığında lökosit aktivasyonu ve iltihabi cevap gelişir. Aktive olmuş lökositler mikrodolaşımında birikerek kollaps ve tıkanıklığa neden olurlar. Dolayısıyla lökosit-platelet ve lökositendotel hücre etkileşimleri ana mekanizma olup, interstisyel sıvı birikimi ve azalmış endotel bağımlı vazodilatasyon bu duruma katkıda bulunur (113). Reperfüzyon ile birlikte mikrosirkulatuar düzeyde bozukluklar gelişir ve buna bağılı doku ödemi oluşur. Oluşan bu ödem reperfüzyon geri sağlansa bile hücre beslenmesini daha da bozar (108). Antitrombotik, antienflamatuar tedavi ve etkilenen ekstremiteye fasyotomi uygulaması ile geri dönüşümlü mikrovasküler disfonksiyonun tedavisi amaçlanır (41, 114).

### 2.7.3. “NO REFLOW” FENOMENİ

İlk kez Brooks ve arkadaşları tarafından 1922’de, hayvan deneyinde, bu durum gözlenmiş ve patofizyolojik olarak tarif edilmiştir. Ancak, “no reflow” teriminin ilk kez kullanımı, ilk kez 1967 yılında Majno tarafından “*no reflow*” fenomeni olarak tanımlanmıştır (52). Kas iskemisi ilerlediğinde kası besleyen damarda kalıcı tıkanıklık oluşur. Dolayısıyla “no reflow” fenomeninin myonekroza ikincil mi olduğu, yoksa “no reflow” fenomeni sonucunda mı myonekroz olduğu çelişkili bir konu olup, ilk durumun geçerli olduğu düşünülmektedir. Çünkü miyosit ve endotel hücrelerin iskemiye karşı toleransları farklıdır. Dört saatlik iskemi ciddi kas hasarı oluşturabilirken, bu durum endotelde 6 saatte oluşur. Bu nedenle, dokunun iskemiye karşı olan toleransını endotel değil doku hücresi belirler (108). “No reflow” fenomeni patofizyolojisinde, hemokonsantrasyon ve tromboz, kapiller endotel hücrelerde şişme, kapillerlerde lökosit kümeleşmesi ve doku ödeme ikincil artmış ekstravasküler doku basıncı vardır. Kapiller endotel şişmesi enerji depolarındaki azalmaya bağlıdır. Bu şişme erken reperfüzyon döneminde maksimum düzeyde olup kapiller kan akımına karşı rezistansı artırır. Lökositler, kapiller endotelle adhezyon oluşturmadan lümen içerisinde kümeleşerek “no reflow” oluşumunda önemli rol oynarlar. Dolayısıyla kümeleşmiş lökosit hareketi endotel hasarını artırır (108).

### 2.7.4. LOKAL ENFLAMATUAR CEVAP

İskemik doku reperfüzyonu inflamatuvar bir cevap doğurur. Ancak doku nekrozundan reperfüzyon döneminden çok iskemik dönem sorumludur (108). Damar tıkanıklıklarında, hayvan turnike modellerinin aksine, tıkanıklığın bir miktar distaline kadar, kollateral dolaşıma bağlı, normal doku izlenir. Dolayısıyla reperfüzyonla amaç, distaldeki nekrotik alanın değil bu alanın kanlandırılmasıdır. Bu bölge; nekrotik ve ciddi hasarlanmış hücrelerin iç içe olduğu ve inflamatuvar aracılardan sentezlendiği yerdir. Dolayısıyla, reperfüzyon

sağlanmış hasarlı veya nekrotik alan miktarı morbiditeyi belirler. Enflamatuar cevabın tetikleyicileri; asit fosfataz, inorganik fosfat, laktik asit, myoglobin, nükleotidler, potasyum, proteolitik enzimler ve pürin bazları gibi kas yıkım ürünleridir. Bu yıkım ürünleri; prokoagulan özellikte olup, intrinsek pıhtılaşma sistemini aktive ederek venöz kılcal trombozu ve kollateral arteriollerde vazospasm oluştururlar. Enflamatuar cevabın en belirgin olduğu geçiş alanındaki bu tarz bir aktivite, nekrotik alanda genişlemeye neden olur. Dolayısıyla, antitrombotik ve antitrombosit tedaviyle geri dönüşümlü hasar bölgelerine olan kollateral akım ve mikrodolaşım korunarak nekrotik genişleme engellenebilir (108).

## **2.8. ALT EKSTREMİTE İSKEMİ-REPERFÜZYON HASARINA BAĞLI GELİŞEN UZAK ORGAN HASARI**

Ekstremitenin akut iskemisinde Haimovici H. '*Miyonefropatik –Metabolik Sendromu*' tanımlamıştır. 6- 8 saat arasında akut iskemik ekstremitte revaskülarize edildiğinde, hiperkalemi, artan kreatin fosfokinaz ve serum glutamik-oksaloasetik transaminaz seviyeleri, miyoglobinemi-miyoglobineri, böbrek yetmezliği, pulmoner yetmezlik gibi sistemik etkiler bulunmuştur (115). IRH sonucunda oluşan sistemik inflamasyon hemen her organda hasar oluştururken ilk gözlenen, genelde 24-72 saat içinde oluşan, akciğer yetmezliğidir. Sistemik enflamasyona bağlı oluşan akciğer hasarı, hafiften (akut akciğer hasarı) şiddetliye (akut respiratuar distress sendromu) doğru seyreden bir klinik spektruma sahip olup, oluşum mekanizması '*wash-out fenomeni*'; dolaşıma katılan mediyatörler sonucunda *mikrovasküler geçirgenlik artışı* ve *alveol sıvısı nötrofil birikimi* ile açıklanmaktadır (116). IR' nun önemli sonuçlarından biri uzak organ hasarı olup, yüksek mortaliteyle seyreden MODS'la sonuçlanabilir. Barsak, karaciğer, iskelet kası ve aortik iskemi reperfüzyon modellerinde MODS gelişimi gözlenmiştir (102). Böbrek hasarının ise miyoglobulin birikimine bağlı olarak gelişen endotel hasarı sonucunda, nötrofil birikimine yol açtığı ve sonucunda akut tübüler nekroz geliştiği düşünülmektedir (25, 117). MODS

oluşumunda, hayati organların kanlandırılması amaçlı, refleksif gelişen mezenterik vazokonstriksiyon ve relatif mezenterik iskemi rol oynar. Bu kısa dönemli mezenterik iskemi, barsak mukozal bütünlüğü ve bariyer fonksiyonunda bozulma ve bakteri/lipopolisakkarit translokasyonu ile sonuçlanır. Mezenterik lenf nodları ve karaciğer makrofajlarının bu etkenlerle aktivasyonu, inflamatuvar sitokinlerin dolaşımında artışına neden olur. Dolayısıyla, sistemik olarak, lökosit ve endotel aktivasyonu gerçekleşir (102). MODS' da oluşan sistemik inflamasyon hemen her organda hasar oluştururken ilk gözlenen, genelde 24-72 saat içinde oluşan, akciğer yetmezliğidir. MODS' a bağlı oluşan akciğer hasarı, hafiften (akut akciğer hasarı) şiddetliye (erişkin respiratuvar distres sendromu) doğru seyreden bir klinik spektruma sahip olup, patogenezinde mikrovasküler geçirgenlik artışı ve alveol sıvısı nötrofil birikimi suçlanmaktadır. Oluşan sistemik enflamasyona bağlı olarak karaciğer, santral sinir sistemi ve miyokard disfonksiyonunda içine alan multiple organ disfonksiyonu (MODS) gelişebilir (99, 102, 118). Alt ekstremitelerde IRH sonucunda vücutta lokal ve sistemik inflamatuvar yanıt oluşmaktadır. Sıçanlarda alt ekstremitelerinde uygulanan bir IRH çalışmasında ortaya çıkan tümör nekrozis faktör-  $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ), interlökin-1- $\beta$  (IL-1- $\beta$ ), IL-6, IL-8 ve trombosit aktive edici faktör (PAF) gibi mediyatörlerin serbest oksijen radikali ve lökositler aracılığı ile, hem lokal dokuda hem de uzak organlarda hasara neden olduğunu saptamışlardır (119). Ksantin oksidaz (XO), süperoksit ve hidrojen peroksit oluşumunda önemli rol oynar. Tüm IR modellerinde, plazma XO artışı ile uzak organ hasarı arasında korelasyon saptanmıştır. Artmış sistemik XO enzim aktivitesi ile vasküler sistemin tümünde ROT maruziyeti ve yaygın endotel aktivasyonu oluşur. Aynı zamanda XO, endotel hücre yüzeyi glikozaminoglikanlarına bağlanarak hücre yüzeyinde yoğunlaşır ve sitotoksik etkide bulunur. Dolayısıyla XO, hem direkt sitotoksik etki hem de ROT oluşumuna ikincil endotel ve lökosit aktivasyonu ile, uzak organ hasarına katkıda bulunur (102). Lökositlerden, ROT ve myeloperoksidaz enzim sentezi gerçekleşir. Aynı zamanda, aktif lökosit kaynaklı

proteazlar, endotel bazal membran ve kavşak proteinlerinin yıkımında rol oynarlar. İskemik dokuda biriken aktif lökositler ancak reperfüzyon periyoduyla birlikte sistemik dolaşıma geçip uzak organ hasarında rol oynarlar. Reperfüzyonla oluşmuş sistemik lökosit aktivasyonu ve uzak organ hasarı, endotel hücresi adhezyon molekülü (ECAMs) kontrolüyle azaltılabilir. Reperfüzyon aynı zamanda, iskemik doku kaynaklı enflamatuar sitokinler ve adhezyon moleküllerinin sistemik artışına da neden olur. Dolayısıyla reperfüzyon döneminde, aktif lökositlerde ve adhezyon molekülleri yüzey ifadelerinde sistemik bir artış söz konusudur (102). Septik şok ve MODS/SIRS klinikleri birbirlerine çok benzemekte olup, hepsi enflamatuar araçlar yoluyla gerçekleşir. Herhangi bir dokudaki IR, enflamatuar araçların sistemik düzeylerinde artış ve *lökosit-endotel-trombosit* etkileşimine neden olarak uzak organ vasküler disfonksiyonuyla sonuçlanır. Reperfüzyon, aynı zamanda kompleman sistem aktivasyonuna ikincil uzak organda artmış lökosit trafiği ve vasküler disfonksiyon oluşturur. NO biyoyararlanımındaki sistemik azalma ve PAF, IR' e bağlı uzak organ hasarının diğer araçlarıdır (102).

## **2.9. İSKEMİ REPERFÜZYON HASARINI ÖNLEMELİK İÇİN TEDAVİ STRATEJİLERİ**

### **2.9.1. LÖKOSİT TEDAVİSİ**

Lökosit aracılı IR hasarı azaltılmasında; inflammatuar aracı maddeler, adhezyon molekülleri ve lökosit-endotel adhezyonuna yönelik tedavi yaklaşımları kullanılmaktadır (42). PAF, histamin, LT-B<sub>4</sub> ve TNF- $\alpha$  gibi aracı inflammatuar maddelerin sentez veya reseptör etkileşimlerinin engellenmesi ile IR hasarında fayda sağlanmıştır (120). Ek olarak, aspirin kullanımıyla bir grup biyoaktif eikosanoid sentezinin indüklendiği gözlenmiştir. Lipoksinler; inflammatuar sistemlere karşı bir çeşit doğal koruyucu sistem olup, lökotrienler ve diğer inflammatuar aracı maddelerle oluşan lökosit kemotoksisi, adhezyon ve göçünü

engellerler (121).

## 2.9.2.ANTİOKSİDAN TEDAVİ

Koenzim Q10 (Ubiquinon) bir antioksidan molekül olup, etki mekanizması hala tam olarak anlaşılamamıştır. Ancak yapılan son çalışmalarda, reperfüzyon dönemi serbest oksijen radikali patlamasını direkt antioksidan etkiyle engellediği ve endotel bağımlı vazodilatasyon üzerinde olumlu etkilerde bulunduğu bildirilmiştir (122). L-2-oxothiazolidine-4-carboxylate (OTC); doku GSH seviyelerinde artış oluşturarak, asetaminofen ile oluşmuş karaciğer hasarı ve hidrojen peroksit bağı endotel hasarında azalma sağlar (123). Aynı şekilde, malik asit diethyl ester veya LButhionine-sulfoximine ile glutatyondan fakir hale getirilmiş dokuların IR hasarı etkilerine daha hassas oldukları gözlenmiştir. Dolayısıyla, doku GSH seviyelerinde artış oluşturan moleküller IRH için koruyucudurlar. Ancak glutasyon metabolizmasının bizzat kendisi de toksik moleküller oluşturabilmektedir (124). E vitamini, en önemli serbest oksijen radikali temizleyicilerindendir. Bu işlem sırasında kendi de bir serbest radikal haline gelir, ancak askorbik asit (vitamin C) gibi moleküllerin yardımıyla yeniden stabil hale dönüştürülür (124). IR sürecinde doku Vit E seviyesinin düştüğü, Vit E verilmesiyle ROT ve lipid peroksitlerin oluşumunun azaltılabildiği gözlenmiştir (125). A, C ve E vitaminlerinin birlikte veya diğer farmakolojik ajanlarla (mannitol) kullanımı ile elde edilen antioksidan etki, tekli tedavileri sırasında elde edilen antioksidan etkiye göre daha güçlüdür (126). Vitamin E ve ilopost' un birlikte kullanımı ile lipid peroksidasyonunda azalmaya bağlı, IRH' nda düzelme saptanmıştır (127). Allopurinol (XO inhibitörü), SOD, katalaz ve dimetil sulfoksit, IRH' de düzelme sağlar. Aynı zamanda, bu moleküllerin birlikte kullanımları tek tek kullanımlarına göre daha etkindir (128). Bunların dışında; nikaravan,  $\alpha$  lipoik asit, thioredoxin, N asetilsistenin, angiotensin converting enzyme inhibitor ve kalsiyum kanal blokörleri ile IRH' de azalma tespit edilmiştir (129).

### **2.9.3. İSKEMİK ÖNKOŞULLANMA**

İskemik önkoşullanma dokunun, ciddi IRH öncesi, kısa süreli IR periyodlarına maruz bırakılmasıdır. Böylelikle doku, uzun süreli IR' ye daha dirençli hale gelir. İskemik önkoşullanma sikluslarının sayısı ve süresi arttıkça koruyuculuğu da artar (130). İskemik önkoşullanmanın iki ögesi mevcuttur. Akut (erken) ön koşullanmada etki reperfüzyonun ilk dakikalarında başlayıp 2-3 saat sürerken, gecikmiş ön koşullanmada etki reperfüzyonun 12-24'ncü saatinde başlar ve 2-3 gün devam eder (131). Uzun süreli düşük, orta doz etanol maruziyetinin, iskemik ön koşullanma yoluyla, IRH' ye karşı kardiyoprotektif etki sağladığı belirtilmiştir. Etanolün her iki safhada inflamasyona karşı koruyucu olduğu, geç safha koruyuculuğunun adenozin A<sub>2</sub> reseptör bağımlı NOS aktivasyonu ile gerçekleştiği gözlenmiştir (132, 133).

### **2.9.4. ANTİTROMBOTİK VE FİBRİNOLİTİK TEDAVİ**

Heparin antitrombotik etkinliğinin yanısıra antiinflamatuvar etkinliğe de sahiptir. Anti-enflamatuvar etkileri; P ve L selektine bağlanarak lökosit-endotel etkileşiminin engellenmesi, NF-κB inhibisyonu sağlayarak enflamatuvar kaskadın bozulması ve lökositlerden ROT oluşumunun engellenmesidir. Venöz kılcallarda endotel-lökosit etkileşimi, trombosit kümeleşmesi ve mikrotrombüs oluşumunu engelleyerek "no reflow" fenomeni etkinliğini azaltır (134). Etkin bir fibrinolitik olan tissue plasminogen activator (tPA)'ün IR' de uygulanımı sonrası, lökosit adhezyon ve diapedezinde azalmaya bağlı, doku enflamasyon ve ödeminde azalma saptanmıştır (134). Trombosit-lökosit ve trombosit-endotel adhezyonu sağlayan moleküllerin monoklonal antikörlerle bloklanması reperfüzyon hasarına karşı bir diğer tedavi modalitesidir. Sonuç olarak, trombosit aktivasyonunun kontrolü; trombüs oluşumu, vasküler tonus kontrolü, anjiogenez ve enflamasyon patogeneğinde önemli rol oynar (55).

### 2.9.5. NİTRİK OKSİT TEDAVİSİ

İnhaler veya serum fizyolojikte çözülmüş olarak tatbik edilen NO gazın, hayvan deneylerinde, IRH' de ve lökosit adhezyonunu azalttığı saptanmıştır (135). Nitrik oksit donörleri olan organik nitratların; birçok IR modelinde, lökosit-endotel adhezyonu, lökosit-trombosit adhezyonu, mast hücresi degranülasyonu ve artmış vasküler geçirgenliği azalttığı gösterilmiştir (136). Aynı zamanda, hayvan IR modellerinde, doku hasarında azalma sağlamıştır (75). NOS inhibitörü kullanımı bir başka yaklaşım şeklidir. Ancak, selektif olmayan bir NOS inhibitör kullanımı veya eNOS geni yokluğunda reperfüzyon hasarı artarken, selektif iNOS inhibisyonu ile IRH' de azalma elde edilmiştir (137).

### 2.9.6. HİPOTERMİ VE İNTRAARTERYEL İNFÜZYON TEDAVİSİ

Hipotermi, reperfüzyon sürecine eşlik eden doku lökosit infiltrasyonu ve artmış ROT oluşumunu azaltır. Hızlı ve etkin hipotermiyle, ampute olmuş ekstremitelere korunması ve reimplantasyon sonrası canlılığı arttırılabilmektedir (138). Birçok hayvan modelinde, lokal hipotermi donör organ canlılığını arttırdığı gözlenmiştir. Bu tarz bir koruma sadece kas fleplerinde uygulanabilmekte olup deri dokusu içeren fleplerde, soğukta deri perfüzyonu bozulacağı için, kullanılamaz (134). Ampute ekstremiteler için 4<sup>0</sup> C' lik lokal hipotermi koruma amaçlı yeterlidir. Bununla birlikte, soğukta saklanmış iskelet kası soğuk IRH' de yatkındır ancak dokunun öncesinde *University of Wisconsin solüsyonu* ile reperfüzyonu bu durumu engeller. İntraarteryel infüzyon, IRH' yi azaltmada kullanılan bir diğer tedavi modalitesidir. Birçok solüsyon ve farmakolojik ajan tek tek veya birlikte uygulanmıştır. *University of Wisconsin* ve *Euro-collins* solüsyonları, en fazla incelemeye tabi tutulmuş olanlardır. *University of Wisconsin* solüsyonu; modifiye edilerek, reperfüzyon periyodunu da içine alacak şekilde, lipid peroksidasyon inhibitörleri, serbest oksijen radikali temizleyicileri, anti-enflamatuar düzenleyiciler ve nitrik oksit donörleri ile

zenginleştirilmiştir. Hayvan deneylerinden anlaşıldığı kadarıyla, soğuk solüsyonların intraarteryel infüzyonu dokuda daha muntazam bir soğuma sağlar. Bu amaçla modifiye University of Wisconsin solüsyon infüzyonu, organ transplantasyonları öncesi kullanılmaktadır (134).

### **2.9.7. KOMPLEMAN TEDAVİSİ**

Kompleman sistem aktivasyonu engellenmesi ile IRH' nin azaldığı birçok hayvan modelinde gösterilmiştir (43). Kompleman sistem blokajı; lektin yol inhibisyonu, lektin ve klasik yol inhibisyonu ve her üç yolun birlikte inhibisyonu ile sağlanabilir. Kompleman 1 inhibisyonu, Kompleman 3 inhibisyonu oluşturarak alternatif yolu kontrol eder (139). Kompleman 3 konvertaz inhibitörü olan rekombinan kompleman reseptör-1'in hayvan IR modellerinde doku hasarını ciddi düzeyde azalttığı saptanmıştır (140). Kompleman inhibisyonunun bir başka yolu Kompleman 1 esteraz inhibitörü olup, miyokard IRH' de hasarında endotel hücre adhezyon molekül ifadesini azalttığı gösterilmiştir. Kompleman 5a ve Kompleman 5'in antikor aracılı bloklanması ile nekroz, apoptoz ve nötrofil infiltrasyonunda belirgin azalma sağlanmıştır (141). Sonuç olarak, kompleman yollar birbirleriyle içiçe olup, sistemin herhangi bir bölgesindeki blokaj IRH' de fayda sağlar ancak tüm bu antikompleman sistemlerin insanlarda kullanımı konusunda yeterli klinik veri yoktur.

### **2.10. İSKEMİ REPERFÜZYON HASARININDA APOPTOZİS**

Apoptoz organizmanın ihtiyaç duymadığı, biyolojik görevini tamamlamış veya hasarlanmış hücrelerin, zararsız bir şekilde ortadan kaldırılmasını sağlayan ve genetik olarak kontrol edilen programlı hücre ölümüdür (142). Yaşamakta olan hücreler iki farklı mekanizma ile ölürler. Bu mekanizmalar nekroz ve apoptozdur. Nekroz; hipoksi, aşırı ısı değişiklikleri, toksinler gibi hücre dışından gelen çeşitli fiziksel ve kimyasal etkenler

sonucunda gelişen travmatik hücre ölümüdür. Apoptoz ise yaşlanmış, fonksiyonunu yitirmiş, fazla üretilmiş, düzensiz gelişmiş veya genetik olarak hasarlı hücrelerin, organizma için güvenli bir şekilde yok edilmelerini sağlayan ve genetik olarak kontrol edilen programlı hücre ölümüdür. Nekroz patolojik bir olaydır. Apoptoz ise fizyolojik veya patolojik olabilir. Aşağıdaki tabloda apoptozis ve nekroz ayrımı verilmiştir (Tablo 15).

Tablo 15 apoptoz ve nekroz ayrımı

<b>ÖZELLİKLER</b>	<b>APOPİTOZİS</b>	<b>NEKROZ</b>
<b>Plazma zarı</b>	Moleküler değişikliklerle birlikte parçalanmamış	Parçalanmış
<b>Enerji gereksinimi</b>	Enerji gereksinimi var, ATP'ye bağlı	Enerji gereksinimi yok
<b>Uyaran</b>	ATP tüketimi olmaksızın fizyolojik ve patolojik koşullar	Toksinler, ciddi hipoksi, ağır yara ve ATP tüketimi
<b>Histoloji</b>	Kromatin kondensasyonu, apoptotik cisimcikler, izole tek hücrenin ölümü	Hücresel şişme, organel bozukluğu, doku parçalarının ölümü
<b>DNA kırık modeli</b>	185 baz çiftlik kırıklar şeklinde "ip merdiven" görüntüsünde	Düzensiz rastgele kırık şeklinde
<b>Doku reaksiyonu</b>	İnflamasyon yok	İnflamasyon
<b>Hücrelerin fagositozu</b>	Komşu hücrelerle	Fagositlerin göçüyle

Aktif nötrofiller salıverdikleri maddelerle yol açtıkları hasarın yanı sıra, damar içinde oluşturdukları hücre toplulukları (agregatlar) ve aktif trombositlerle birlikte damar endoteline yapışarak mikrovasküler tıkanmaya da neden olurlar. Nötrofillerin aktivasyon ve dokuya infiltrasyon derecesi ile reperfüze dokudaki nekroz ve apoptozis derecesi arasında ilişki vardır. Programlı hücre ölümü olarak bilinen apoptozisin gelişmesi, normalde immün sistemin ve vücut homeostazının vazgeçilmez bir bileşenidir. Hücresel ölüm yolağındaki düzensizlikler, IRH' nin yanı sıra, kanser, otoimmün hastalıklar, immün sistem bozuklukları ve nörodejeneratif hastalıklara da yol açabilmektedir.

### **2.10.1. APOPTOZUN BAŞLATILMASI**

Hücrenin apoptoza gidebilmesi için ilk önce, ilgili genetik mekanizmayı harekete geçirecek bir sinyalle karşılaşması gerekir. Bu sinyal hücre içinden veya dışından gelebilir. Hücre dışından kaynaklanan sinyaller; çevresel yaşam sinyallerinin ve büyüme faktörlerinin yetersizliği, ölüm reseptörlerinin aktivasyonu (Reseptör- Ligand etkileşmesi), Fas-Fas ligandı, TNF, sitotoksik T lenfositleri, hücreleri etkileyen diğer dış etkenlerdir. Hücre içinden kaynaklanan sinyaller; DNA hasarı, hücre içi  $Ca^{+2}$  seviyesinde artış, hücre içi pH' da düşme, metabolik ve/veya hücre siklus bozuklukları hücreyi apoptoza götüren merkezi hücre ölüm sinyallerini başlatabilmektedir.

### **2.10.2. HÜCRE İÇİ PROTEAZLARIN AKTİVASYONU**

İç ve dış sinyallerle hücre içinde bulunan bir grup proteaz aktive olur. Bu proteazlara kaspaz adı verilir. Kaspazlar başlatıcı ve sonlandırıcı olarak ikiye ayrılır. Kaspaz ailesinin 14 üyesi tespit edilmiştir. Kaspaz 2, 3, 6, 7, 8, 9 ve 10 hücre ölümüyle ilişkilidir. Apoptozdan asıl sorumlu kaspaz 3'tür. Kaspaz aktivasyonunda iki önemli uyarı yolu vardır. Biri ölüm reseptörleri aracılı ekstrinsik yol, diğeri ise mitokondri aracılı intrinsik yoldur. Ölüm reseptörleri adaptör proteinler aracılığıyla; iç sinyaller ise mitokodri aracılığıyla kaspazları aktive etmektedir. Mitokondri dış zarının geçirgenliği bazı proteinler ile sağlanmaktadır. Bunların en önemlisi bcl-2 grubu proteinlerdir ve bu grup proteinlerin bir kısmı proapoptotik etkili iken diğeri kısmı ise antiapoptotik etkilidir. Antiapoptotik üyelerin aşırı ekspresyonlarının apoptoza baskıladığı oysa proapoptotik üyelerin aşırı ekspresyonunun ise hücreleri öldürdüğü görülmektedir (143). Hücrede iç veya dış nedenlerle DNA hasarı oluştuğunda aktive olan bazı genler, hücrenin apoptozuna neden olabilir. Bu genlerden en önemlisi p53 genidir. Hücre hasarının tamiri başarılı olmazsa p53 geni bax proteinini (bcl-2 grubu proteinlerden, proapoptotik) aktive ederek mitokondri aracılığı ile hücrenin apoptoza

giderek ölmesini sağlar. Böylece DNA hasarlı hücre ortadan kaldırılmış olur (144).

### 2.10.3. HÜCREDE OLUŞAN BİYOKİMYASAL DEĞİŞİKLİKLER

Sonlandırıcı kaspazlar aktive olunca sitoplazma ve çekirdek içindeki hedef proteinler yıkılır. Kaspazlar DNA endonükleazı serbestleştirerek DNA kırıklarına neden olurlar. Kaspazların aktifleştirdiği bir diğer protein olan aktin yıkan protein hücrenin normal şeklinin bozulmasına yol açar. Apoptotik cisimler çevredeki parankim hücreleri ve fagositler tarafından fagosite edilerek dokulardan temizlenirler. Apoptozisin en önemli özgün yönü (“hallmark”) DNA’ nın internükleozomal bölgelerden yaklaşık 180-200 baz çifti veya bunun katları boyutunda DNA parçaları oluşturacak şekilde parçalanmasıdır.

### 2.10.4. APOPTOZSİZİN TESPİTİNDE KULLANILAN YÖNTEMLER

Tablo 16 Apoptozsizin tespitinde kullanılan yöntemler

MORFOLOJİK YÖNTEMLER	HİSTOKİMYASAL YÖNTEMLER	BİYOKİMYASAL YÖNTEMLER	İMMİNOLOJİK YÖNTEMLER	MOLEKÜLER YÖNTEMLER
Işık Mikroskobu	Anneksin V Yöntemi	Agaroz Jel Elektrofrezisi	ELISA	DNA Mikroarrays
Floresan Mikroskobu	TUNEL Yöntemi	Western Blotting	Fluorimetrik	
Elektron Mikroskobu	M30 Yöntemi	Flow Sitometri		
Faz Kontrast Mikroskobu	Kaspaz-3 Yöntemi			

## 2.11. RHO KİNAZ AİLESİ

### 2.11.1. RHO PROTEİNLERİ

Küçük G proteinleri moleküler kütleleri 20-40 kilodalton olan monomerik G proteinleridir. Mayalardan insanlara kadar bütün ökaryot hücrelerde bulunan ve 100'den çok üyesi bulunan büyük bir aileyi oluşturmaktadırlar. Bu büyük aile yapısal olarak en az beş alt aileye ayrılır. Bunlar:

- 1.Ras ailesi
- 2.Rho ailesi (en az 14 üyesi tanımlanmıştır)
- 3.Rab ailesi
- 4.Sar1/Arf ailesi
- 5.Ran ailesi

Rho proteinleri monomerik GTP'azların Rho proteinleri monomerik GTP'azların Ras süperfamilyasının Rho subfamilyası üyeleridir. Rho, Ras, Rab, Sar1/Arf ve Ran gibi küçük G proteinleri hücre içi sinyallerini düzenler. Rho geni ilk olarak 1985'de bir deniz salyangozu olan *Aplysia*'dan bir Ras homoloğu olarak klonlanmıştır (145). Kısa süre sonra üç insan homoloğu RhoA, RhoB ve RhoC'nin bulunmuştur (145).

Memelilerde çeşitli izoformlarla birlikte on farklı Rho GTPaz tanımlanmıştır. Bunlar Rho (A, B, C izoformları), Rac (1, 2, 3 izoformları), Cdc42 (Cdc42Hs, G25K izoformları), Rnd1/Rho6, Rnd2/Rho7, Rnd3/RhoE, RhoD, RhoG, TC10 ve TTF olarak adlandırılmıştır. Rho, Rac ve Cdc42 özellikleri en iyi bilinen üyelerdir (146). RhoE'nin ise genotoksik stres sırasında ROCK'İ inhibe ettiği ve böylece apoptozu önlediği bildirilmiştir (147-159).

RhoA, RhoB ve RhoC (genel olarak Rho olarak ifade edilir) benzer amino asit dizilişi gösterirler ve hücre içi hedefleri aynıdır (160, 161). Rho'nun açıklanan birçok fonksiyonu RhoA ile yapılan çalışmalara dayanır. RhoA, vücutta en fazla bulunan ve en çok çalışılan bir Rho proteini alt tipidir (152, 162). Rho ailesinin üyeleri (Rap, RaI ve RhoA, RhoB, RacI ve Cdc42'yi içeren Rho alt birimi) aktin hücre iskeletinin farklı konformasyonel formlarının düzenlenmesinde önemlidirler. Rho ailesinin üyelerinin, aktinin yeniden şekillenmesinin, farklı yönlerinin düzenlenmesindeki rolü, ilk olarak fibroblast büyüme faktörü uyarısına yanıt çalışmaları ile açığa çıkarılmıştır (163, 164). Rho ailesinin üyeleri ile düzenlenen sinyal

ileti yolları kanser, enflamasyon, bakteriyel infeksiyon ve arteriyel hipertansiyonu içine alan birtakım patolojik durumlarda önemli roller almaktadırlar (165, 166).

Rho A hücre iskeleti kontrolü, stres liflerinin yapılanması, fibroblast yapışması, aktin hücre iskeleti oluşumundan, hücre yapışması hareketliği sitokinez ve genetik bilginin genden pro-teine aktarılmasında, düz kas kasılmasında kalsiyum düzenlenmesinden, endotelden salınan NO'nun eNOS sentezi, fosforilasyonu, endotelial aroşinidaz salınımından sorumludur.

Rho B nin hücre büyümesini önlediği ve apoptozu indüklediği görülmüştür.

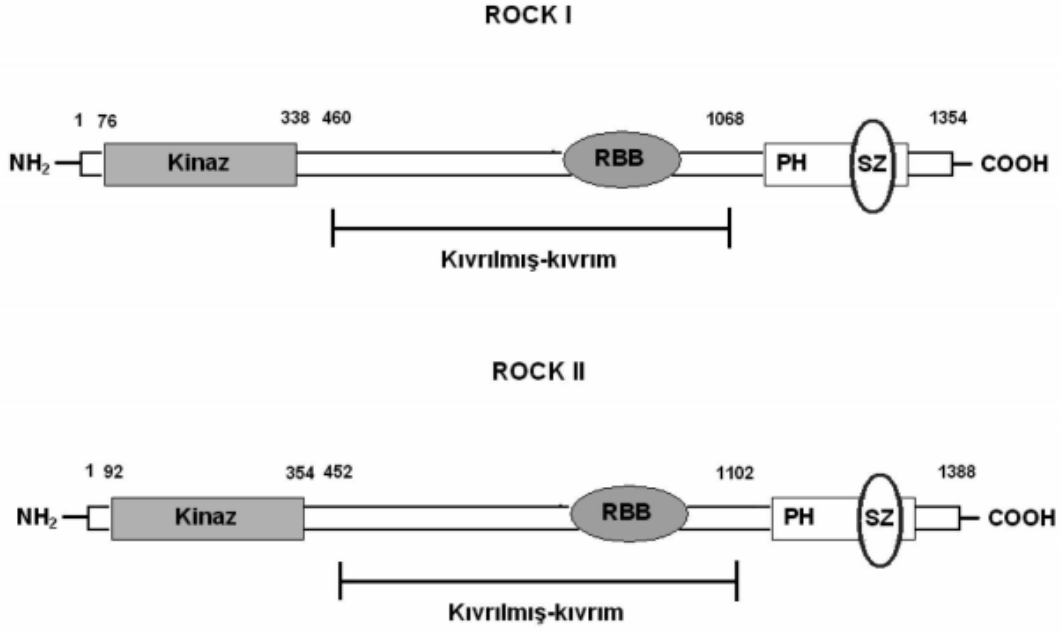
Rho C ise çeşitli kanser hücrelerinde varlığı gösterilmiş ve yayılmasında rolü olduğu bildirilmiştir.

### **2.11.2. RHO KİNAZ ( SERİN-TREONİN PROTEİN KİNAZ)**

Rho-kinaz bir serin-treonin protein kinazdır. Moleküler ağırlığı yaklaşık 160 kDa'dur. Rho-kinaz yaklaşık 1388 amino asit dizisinden oluşmuştur. Bu dizide, amino (N) ve karboksil (C) uçları bulunmaktadır. Rho-kinaz enziminin ROCK1 (ROCKI, p160ROCK, ROCK $\beta$ , ROK $\beta$ ) ve ROCK2 (ROCKII, ROCK $\alpha$ , ROK $\alpha$ ) olarak iki izoformu vardır (152, 167). ROCK1'in akciğer, karaciğer, dalak, böbrek ve testiste daha fazla eksprese edildiği bildirilmiştir. ROCK2'nin beyin ve kalpte bulunur. ROCK2'nin çekirdekte lokalize olduğu gösterilmiştir (168).

Rho-kinaz enziminin hemen hemen her dokuda varlığı gösterilmiştir (152, 168). Bu proteinler sitoplazmada dağılmış halde bulunur ve özellikle gelişmekte olan hücrelerde membran içerisinde lokalize olurlar (169). İnsan ROCK 1 geni 18. kromozomda (18q11.1) ve ROCK 2 geni 2. kromozomda (2p24) yerleşmiştir (170) (şekil 7).

Şekil 6 Rock 1 ve 2 molekül yapısı (171).



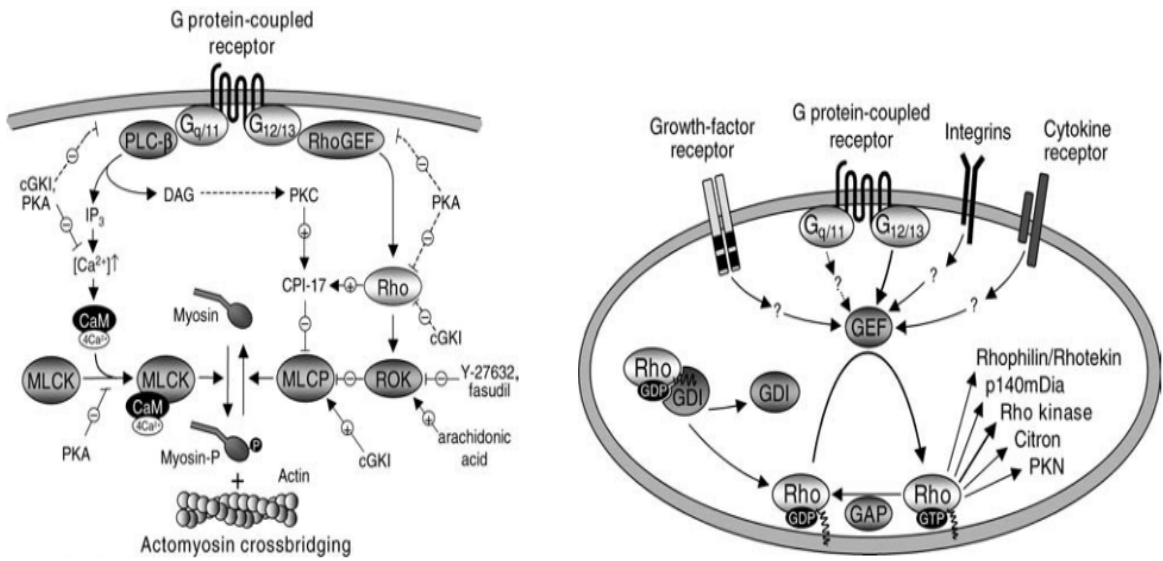
### 2.11.3. RHO KİNAZ AKTİVASYONUNUN DÜZENLENMESİ

Küçük G proteinleri olan Rho alt tipleri GDP, GTP, GTP'az aktivitesi ve efektörleri ile etkileşen amino asit dizilimine sahiptirler. Küçük G proteinlerinin GDP-bağlı inaktif ve GTP-bağlı aktif olmak üzere birbirine dönüşebilen iki şekli vardır. Bu dönüşüm üç grup protein tarafından düzenlenir. Bunlar:

- 1- *GTPaz aktive edici proteinler (GAPs)*: Rho' nun intrinsik GTPaz aktivitesini artırarak GTP bağlı Rho'nun inaktivasyonunu kolaylaştırır.
- 2- *GTPaz ayırıcı inhibitörler (GDIs)*: Bazı Rho ailesi GTPazlarının membrana bağlanmalarını inhibe eder. Nükleotid ayrılmasını ve böylece aktivasyonunu önler.
- 3- *Guanin nükleotid değiştirici faktör (GEF)*: İnaktif GDP-Rho'yu aktif GTP-Rho'ya dönüştürür.

Rho aktivitesi aynı zamanda çok sayıda G proteini ile kenetli reseptörler tarafından da düzenlenebilir (152). Rho'ya özgü GEF'ler, GDP ayrışmasını ve bunu izleyerek GTP bağlanmasını başlatarak Rho'nun aktivasyonunu arttırlar. Bundan sonra GTP-Rho, C-terminali kuyruğu aracılığıyla hücre membranına hedeflenir ve Rho-kinaz (ROCK), protein kinaz N (PKN), rhophilin/rhotekin, sitron, p140 mDia ve fosfolipaz D gibi alt efektörlerini aktive eder (Şekil 6) (172, 173).

Şekil 7 Rho'nun aktivasyonu



Rho aktivitesinin düzenlenmesi GAP: GTPaz aktive edici protein, GDI: GTPaz ayırıcı inhibitör, GEF: Guanin nükleotid değiştirici faktör. PKN: Protein kinaz N (166).

Rho-kinazın N-terminalinde kinaz bölgesi vardır. Orta bölgesinde kuramsal olarak kıvrılmış sarmal (coiled-coil) bölge ve C-terminal bölgesinde plekstrin homoloji bölgesi bulunur. Rho-kinaz üzerinde Rho'nun bağlandığı bölge (RBB), enzimin kıvrılmış sarmal bölgesinin C terminalinde lokalize olmuştur. GTP-bağlı Rho'nun bu bölgeye bağlanması ile Rho-kinazın etkinliği artmaktadır.

ROCK, PKN, rhofilin, rhotekin, p14mDia ve sitron kinaz *GTP-bağlayıcı küçük Rho proteininin efektörleridir* (169). Bu efektör proteinler içinde en fazla araştırılan ve etkisi

ortaya konan ROCK enzimidir. ROCK' un Rho dışında miyozin fosfatazın (MLCP) miyozin bağlayıcı alt ünitesi (MBS), ezrin- radiksin-moesin (ERM) ailesi, addusin, vimentin ve LİM kinaz-1 gibi birçok substratı daha tanımlanmıştır (Tablo 17).

Tablo 17 ROCK' un substratları ve ilişkileri

Substratlar	İşlevleri	Hücresel Yanıtlar
Miyozin fosfatazın miyozin bağlayıcı alt birimi	Miyozin fosfatazın inhibisyonu	Düz kas kasılmasında kalsiyum duyarlaşması
Miyozin hafif zinciri	Miyozinin F aktine bağlanmasında artma	Stres lifleri oluşumu, fokal adezyon oluşumu, nörit retraksiyonu, hücre kasılması, hücre motilitesi
CPI-17 proteini	Miyozin fosfatazın etkisizleştirici özelliğinin uyarılması	Düz kas kasılmasında kalsiyum duyarlaşması
Kalponin	F aktine bağlanmada azalma	Düz kas kasılmasında kalsiyum duyarlaşması
ERM	ERM'nin etkinleşmesi	Mikrovilüs oluşumu
LİM kinaz	Kinaz etkinliğinde artma	Kofilinin fosforilasyonu
ZIPK	Miyozin fosfatazın inhibisyonu	Düz kas kasılmasında kalsiyum duyarlaşması
Na <sup>+</sup> /H <sup>+</sup> değiştiricisi	Değiştirici etkinliğin uyarılması	Stres lifleri oluşumu
CRMP-2	---	Büyüme konisi kolapsı
Adusin	F aktine bağlanmada artma	Membran ile ilgili olaylar (ruffling), hücre motilitesi
İntermediyer filamentler (vimentin)	Filamentlerin dağılımı	Filamentlerin sitokinez için ayrılması

CPI-17, 17-kDa protein kinaz. C-potentiated inhibitory protein of protein phosphatase-1. CRMP-2, collapsin response mediator protein-2. ERM, ezrin-radiksin-moesin. ZIPK, zipper interacting-kinase. Bu olay sonucunda etkinleşen Rho-kinaz çizelge' de belirtilen substratlarını fosforile ederek çeşitli hücre içi olaylara katkıda bulunmaktadır (147-159, 167).

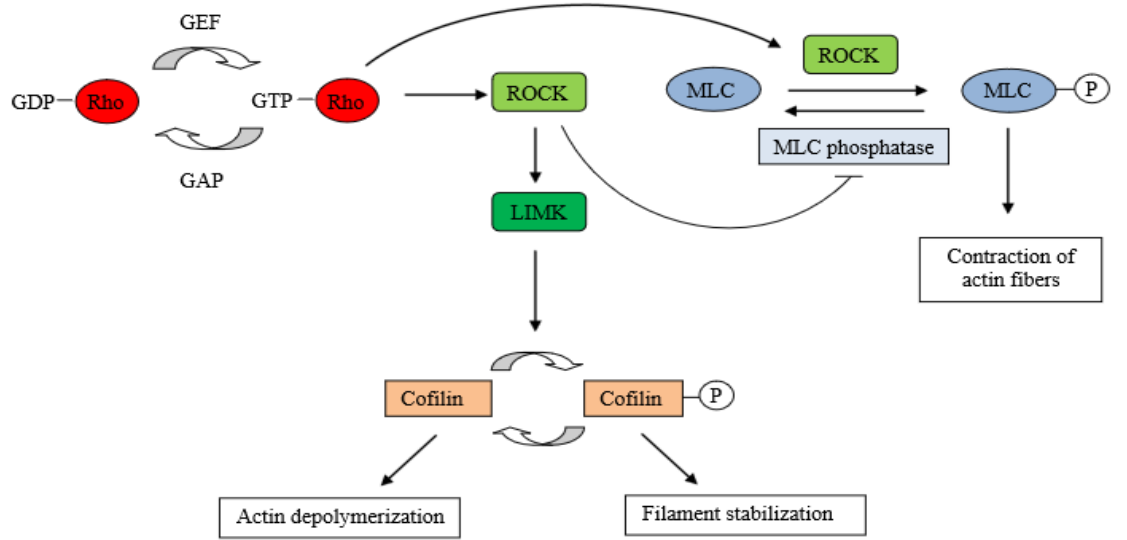
Memeli Rho proteinlerinin çok sayıda alt (downstream) efektörü tanımlanmıştır. Bu protein kinazın aktivitesi GTP-Rho proteinleri ile stimüle edilir. Rho proteinlerinin diğer alt efektörleri; protein kinaz N (PKN) (174), myozin fosfatazın miyozin bağlayıcı alt ünitesi (168), p140mDia (Drosophila gen Drophanous) , sitron (145), sitron kinaz (145), rhophilin, rhotekin, fosfolipaz D' dir (175).

ROCK' un, miyozin fosfataz inhibisyonu aracılığı ile miyozin hafif zincir fosforilasyonunu artırdığı gösterilmiştir (168). Fosforilasyon için ortak amino asit zinciri R/KXS/T ya da KXXS/T (R:arjinin, K:lösin, X:herhangi bir amino asit, S:serin, T:treonin)'dir (176). ROCK2 spesifik olarak miyozin hafif zincirinin (MLC), miyozin hafif zincir kinaz (MLCK) tarafından fosforile edilen Ser19 rezidüsünü fosforile eder. Ek olarak ROCK'lar MLCP aktivitesi inhibisyonu yolu ile indirekt olarak MLC fosforilasyonunu düzenlerler. MLCP'nin inhibisyonunun primer olarak  $Ca^{+2}$  sensitizasyonuna katıldığı için ROCK2 düz kas hücrelerinin  $Ca^{+2}$  ile kontraksiyonunu etkileyebilirler. MLCP haloenzimi üç alt üniteden oluşur:

1. Katalitik alt ünite (PPI)
2. Miyozin bağlayıcı alt ünite (MBS)
3. Küçük katalitik olmayan alt ünite (M21)

Türlere bağlı olarak ROCK, MBS'yi 697. treonin, 854. serin ve 855. Treonin amino asidinden fosforiller. Treoninin fosforilasyonu MLCP aktivitesini düşürür ve bazı örneklerde MLCP'nin miyozinden ayrılmasını inhibe eder. ROCK' lar aynı zamanda ezrinde 567., radiksinde 697. ve moesinde 558. treonin amino asitleri olmak üzere ERM proteinlerini fosforile eder. ROCK aracılı fosforilasyonu ERM proteinlerinin baş-kuyruk bağlantısının bozulmasına neden olur. ROCK 1, kofilini fosforile eden LİM kinazın etkinliğini artıran LİM kinaz-1'i 508. ve LİM kinaz-2'yi 505. Treonin amino asidinden fosforile eder. Kofilin aktin filamentlerinin turnover'ını düzenleyen aktin-bağlayıcı ve depolimerize edici bir proteindir (167, 176). ROCK, MLCP'yi fosforile etmek suretiyle inhibe ederek vasküler çizgili kas hücrelerinin kasılmasına, stres liflerinin oluşumuna ve hücre göçüne aracılık eder (176). ROCK, Rho proteinlerinin hücre iskeleti değişikliklerinin düzenlenmesindeki anahtar hedeflerinden biridir. Hücreye Rho'yu aktive eden uyarılar geldiğinde veya Rho'nun aşırı ekspresyonu olduğunda ROCK sitoplazmadan membrana göç eder (Şekil 8)(177).

Şekil 8 Rho'nun aşırı ekspresyonu olduğunda ROCK sitoplazmadan membrana göçü



ROCK, Rho proteinlerinin hücre iskeleti değişikliklerinin düzenlenmesindeki anahtar hedeflerinden biridir. Hücreye Rho'yu aktive eden uyarılar geldiğinde veya Rho'nun aşırı ekspresyonu olduğunda ROCK sitoplazmadan membrana göç eder.

#### 2.11.4. RHO-KİNAZ İNHİBİTÖRLERİ

Rho kinaz enzimini inhibe eden ajanlar aşağıda verildi (Tablo 18), (170).

Tablo 18 Rho kinaz enzimini inhibe eden ajanlar

A. Fasudil (HA-1077)
B. Y-27632
C. Hidroksifasudil
D. Y32885
E. Y-39983
F. H-1152P
H. SLx-2119
G. Azabenzimidazol- aminofurazanlar
K. Wf-536

Rho kinaz'ın spesifik inhibitörleri ve kullanımı (178).

A. Fasudil

B. Y-27632

C. H-1152P

Rho kinaz inhibitörleri ROCK1 ve ROCK2 enzimini nonselektif olarak inhibe ederler, fakat XD-400 gibi ROCK2 selektif inhibitörü de geliştirilme aşamasındadır.

### 2.11.5. FİZYOLOJİK OLAYLARDAKİ ROLÜ

ROCK enziminin damar fizyolojisi ve kardiyovasküler bozukluklar üzerinde önemli fonksiyonları olduğu gösterilmiştir. ROCK enzimi hücre kasılmasının majör düzenleyicisi olarak bilinmesine rağmen migrasyon, proliferasyon, hücre apoptozisi, gen transkripsiyonu ve diferensiyasyonun kontrolünü de sağladığı gösterilmiştir. Bundan dolayı ROCK aktivasyonu, endotelial geçirgenlik ve migrasyonun artırılması aracılığı ile anjiyojenik sürecin başlatılmasında anahtar bir olgu gibi görünmektedir (Tablo 19)(179).

Tablo 19 Rho kinaz inhibisyonu ile tedavi edilen durumlar.

Hipertansiyon (180).
Koroner arter spazmı (181).
Glokom (182).
Kanser invazyonu (183).
Akciğer harabiyeti (184).
Kalp iskemi-reperfüzyon hasarlanması (185)
Karaciğerde iskemi-reperfüzyon hasarlanması (186)
Beynin iskemik zedelenmesi (187).
Üreter (188).
Vas deferens fonksiyonlarında (189).
Gastrik fundus (190).
Safra kesesi (191)
Ağrı iletiminde ve/veya oluşumunda (192).
Hipertansif hastalarda periferik vasküler direncin artmasının patogeneğinde Rho- kinaz yolağının rolünün olabileceği öne sürülmüştür (193).
Rho- kinaz sinyal yolağının sadece hipertansif vaskülopatide değil, aynı zamanda vasküler hastalıkların diğer formlarında da yer aldığı ortaya konmuştur (194).
İnsan penil kavernoza düz kas hücrelerinde Rho-kinaz'ın varlığı ve aktivitesi (195).
Diyabetik korpus kavernoza Rho-kinaz protein ekspresyonunun arttığı (196).
Asetilkoline gevşeme cevaplarının kontrole göre azaldığı, Rho-kinaz inhibitörleri Y-27632 ve fasudil ile oluşan gevşemelerin değişmediği, diyabete bağlı erektil disfonksiyonda Rho-kinaz sinyal yolağının katkısının olduğu (189)
İnsan ve tavşan korpus kavernoza dokularında noradrenerjik sinir stimülasyonu ve fenilefrinle oluşturulan kontraksiyonların, Y-27632 ile konsantrasyon bağımlı olarak inhibe edildiği gösterilmiştir.
Rho-kinaz enzim inhibitörünün intrakavernoza uygulanmasının anestezide edilmiş sıçanlarda ereksiyona neden olduğu ve erektil disfonksiyonun tedavisinde Rho-kinaz antagonistlerinin tedavi edici ajan olarak kullanılabileceği öne sürülmüştür (197).
Fasudil, Japonya'da 1995 yılında subaraknoid hemoraji sonrasında serabral vazospazmı tedavi etmek için onaylanmıştır ve ilaç olarak kullanılmaktadır.

### 2.11.5.1. VASKÜLER KAS TONUSU

Rho kinazlar; trombus şekillenmesi, enflamasyon, oksidatif stres ve fibrozisi hızlandırmak suretiyle çeşitli molekülleri artan düzenlemeyle kontrol eder. Rho- kinaz aynı zamanda, damar düz kas hücrelerinde hiperkontraksiyon, proliferasyon ve migrasyonun uyarılması ve inflamatuvar hücre motilitesinin artırılmasına aracılık eder. Birçok çalışmada, Rho kinazın vazospazm, arteroskleroz, IRH, hipertansiyon, pulmoner hipertansiyon, inme ve kalp yetmezliği patojenezine ve sempatik sinir aktivitesinin artırılmasına önemli ölçüde katkı sağladığı gösterilmiştir (161, 198, 199). Rho-kinaz yolağının vasküler enflamasyondaki rolünün incelendiği çalışmalarda bu yolağın aterojeze katkıda bulunabileceği ileri sürülmüştür.

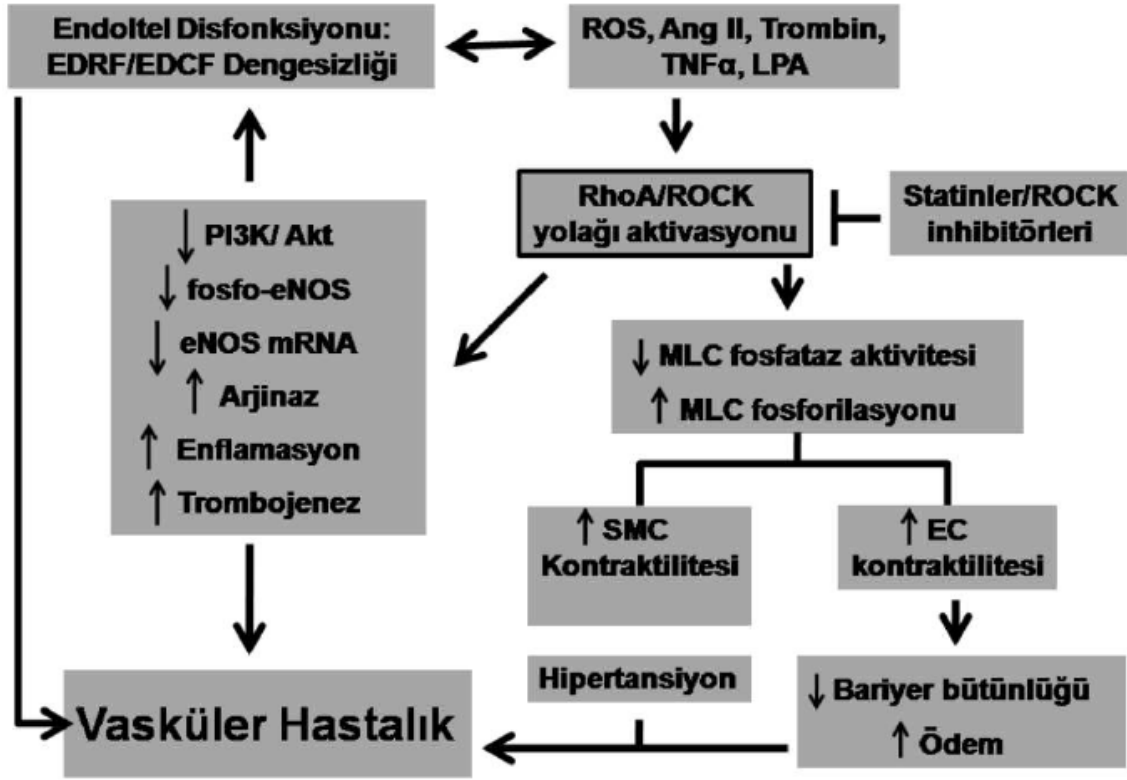
Monosit kemoatraktan protein-1 (MCP-1) monositlerin geçişini düzenlemekte ve aterojeze katılmaktadır. Rho-kinaz, hücre dışı sinyalle düzenlenen kinaz (ERK) aktivasyonuna bağımlı anjiyotensin-ilişkili MCP-1 üretimini düzenlemektedir (200). İntegrinler ERK ile aktive olurken p38-mitojenle aktive olmuş protein kinaz (MAPK) ve Rho MCP-1 aracılıklı kemotaksisi kontrol eder. Rho ve Rho-kinaz MCP-1 sinyallenmesinde p38-MAPK'nin akışını kontrol eder. Bundan dolayı ERK ve p-38 MAPK MCP-1 ile oluşan integrin aktivasyonu ve kemotaksise neden olan farklı sinyal kaskadlarını düzenler (201). ERK ve Rho-kinaz yolaklarının aktivasyonunun anjiyotensin II tarafından tip I plazminojen aktivatör inhibitörü (PAI-1) ekspresyonunun sağlanması için gerekli olduğunu gösteren bulgular kaydedilmiştir (202).

Rho sinyalinin arteriyel hipertansiyondaki rolü ilk olarak 1997'de bulunmuştur (203). Yapılan bir çalışmada NO ilişkili vazodilatasyonun Rho kinazın vazokonstriktör aktivitesinin inhibisyonu aracılığıyla olduğu hipotezi ileri sürülmüştür (204). Yakın zamanda yapılmış olan bir çalışmada Rho-kinaz inhibitörü olan fasudil hipertansif hastalarda

kullanılmış ve bu çalışmanın sonuçları Rho/Rho kinaz yolağının hipertansif hastalarda yükselmiş sistemik vasküler rezistansa katıldığını göstermiştir (193). Rho-kinaz inhibitörü olan Y-26732'nin sıçanlarda yapılan in vivo deneylerde, seçici olarak arteriyel basıncını düşürdüğünün tespit edilmesi Rho kinazın hipertansiyonun oluşumuna katılabileceği fikrini vermiştir (180). Mukai ve arkadaşları yapmış oldukları çalışmada hipertansif sıçanlarda Rho-kinaz aktivitesinin ve ekspresyonunun arttığını tespit etmiştir (205). NOS inhibitörü olan L-NAME ile hipertansiyon oluşturulan sıçanlarda Y-27632'nin kan basıncını düşürdüğü tespit edilmiştir (206). Rho kinazın hipertansiyonda hangi moleküler mekanizmayla aktive olduğu bilinmemektedir. Anjiyotensin II, endotelin-I, 5-HT, alfa adrenerjik uyarı ve reaktif oksijen radikallerinin hipertansiyonda rol alabileceği kaydedilmektedir (207).

Endotel kaynaklı gevşetici faktörler ve endotel kaynaklı kastırıcı faktörler arasında bir dengesizlik olarak tanımlanan sürekli vasküler endotel disfonksiyon, vasküler hastalıklara yol açan reaktif oksijen radikalleri, anjiyotensin II, trombin, TNF- $\alpha$ , lizofosfatidik asit gibi çeşitli faktörlerden kaynaklanmaktadır. Bu faktörler Rho/Rho-kinaz yolağı aktivasyonu ile vasküler kontraksiyonu değiştirerek diyabet ve diğer vasküler hastalıklarda endotel hücreler ve düz kas hücrelerinde anormal fonksiyonların görülmesine neden olur. Bu sonuçta endotel bariyer disfonksiyonuna ödem ve düz kas hücresi kontraktilite artışına ve hipertansiyona neden olur. Ek olarak RhoA/ROCK yolağının aktivasyonu arjinazın aktivite ve ekspresyonunda artışa yol açarak eNOS fonksiyonu için gerekli bir substrat olan L-arjinini sınırlar. RhoA/ROCK yolağı aynı zamanda trombusun şekillenmesi ve vasküler enflamasyon mekanizması ile de ilişkilidir (Şekil 9)(208).

Şekil 9 RhoA/ROCK yolağı aynı zamanda trombusun şekillenmesi ve vasküler inflamasyon mekanizması ile ilişkili



Şekil 9. Rho/Rho kinaz yolağının endotelial disfonksiyondaki rolü (208). EDRF: Endotel kaynaklı gevşetici faktör, EDCF: endotel kaynaklı kasıcı faktör, ROS: Reaktif oksijen radikaller, AngII: Anjiyotensin II, TNFα: Tümör nekrozis alfa, LPA: lizofosfatidik asit, MLC: Miyozin hafif zincir, SMC: Düz kas hücreleri, EC: Endotel hücreler eNOS: endotelial nitrik oksit.

ROCK birçok mekanizma aracılığı ile endotelial hücreler tarafından üretilen NO negatif yönde düzenler. RhoA/ROCK aktivasyonu endotelial NO sentaz (eNOS) ekspresyonunu azaltır (209). Sonuç olarak, ROCK inhibitörleri veya statinler eNOS ekspresyonunu kontrol ederler (210). ROCK enzimleri aynı zamanda, PI3-kinaz/ protein kinaz B (Akt) yolunu inhibe etmek ve arjinaz aktivitesini uyarmak suretiyle eNOS fonksiyonlarını negatif yönde düzenlerler (211, 212). ROCK bağımlı sinyal yolu, vasküler fonksiyonları düzenleyen temel düzenleyici olarak bilinmektedir ve hipertansiyon gibi arteriyal fonksiyon bozukluklarında önemli bir rol oynamaktadır.

### **2.11.5.2. SOLUNUM SİSTEMİ**

Asetilkolinle solunum yolları aşırı duyarlı hale getirilmiş sıçanlarda oluşan  $Ca^{+2}$  aracılıklı kontraksiyonda RhoA'nın etkili olduğu kaydedilmiştir (213). Rho kinaz inhibitörü olan Y-27632'nin beta-adenoreseptörlerden bağımsız olarak farklı bir mekanizmayla teofilinden daha güçlü bir bronkodilatör etki gösterdiği bildirilmiştir (214).

### **2.11.5.3. ÜROJENİTAL SİSTEM**

İnsan gebe miyometriyumunda RhoA, ROCK1 ve ROCK2 ekspresyonlarının olduğu ve Y-27632'nin oksitosinle oluşan miyometriyum kasılmasını azalttığı gösterilmiştir (215). Preeklampside ROCK2 ekspresyonunun artışı ve Rho/Rho-kinaz yolağının ve özellikle ROCK2'nin preeklampsinin etyoloji ve patojenezine katılabileceği öne sürülmüştür (216). Rho/Rho kinaz yolağının mesane kontraksiyonunun düzenlenmesine katılmaktadır (217). Rho-kinaz inhibitörlerinin erektil disfonksiyonunun tedavisinde yeni bir teröpatik ajan olabileceği üzerinde durulmaktadır (218).

### **2.11.5.4. GÖZ**

Rho and Rac GTPazların lens epitel hücrelerin proliferasyonu, migrasyonu ve yaşam süresi için kritik öneme sahip olabileceği bildirilmektedir (219). ROCK inhibitörlerinin glokom ve diğer oküler hastalıkların tedavisinde yeni bir potansiyel ajan olabileceği üzerinde durulmaktadır (220).

### **2.11.5.5. TÜMÖR HÜCRELERİ**

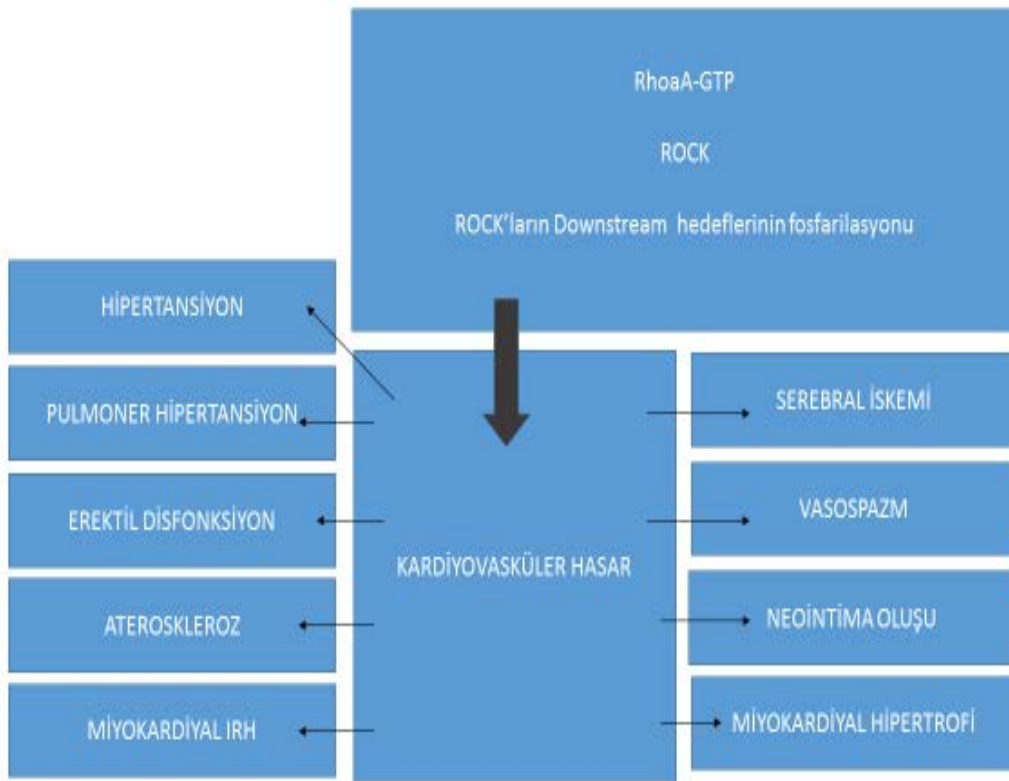
Rho-Rho kinaz yolağının aktivasyonunun, tümör hücre invazyonuna neden olmaktadır. Bu yolağı inhibe eden fasudil insan ve sıçan tümör modellerinde tümörün ilerlemesini azaltmaktadır (221). Yeni kanser tedavi rejimlerine ileride Rho proteinlerini inhibe eden ajanların girebileceği kaydedilmektedir (222).

Rho proteinleri, başlıca hücre iskeleti kontrolünden, stres liflerinin yapılanmasından, fibroblastların fokal adezyonundan ve düz kas kasılmasında kalsiyuma duyarlılığın düzenlenmesinden sorumludurlar. Ayrıca, aktin iskeletinin yapılanmasını sağlayarak hücrenin biçimi, motilitesi, adezyonu, göçü, kasılması ve sitokinez gibi birçok hücrel işlevde önemli rol oynamaktadırlar. Sitoplazmik serbest kalsiyum düzeyindeki artış düz kaslarda kasılmayı tetikleyen temel mekanizmadır. Bunun ile birlikte, düz kaslarda agonist ile indüklenen kontraksiyon, büyük oranda membran potansiyelinden bağımsız mekanizmalar ile düzenlenmektedir. Serotonin ve fenilefrin gibi agonistler, fosfotidil inozitol yolunu etkinleştirerek sarkoplazmik retikulumdan kalsiyum salıverilmesinde artışa neden olmaktadır. Hücre içi kalsiyum düzeyindeki artış kalsiyumun kalmoduline bağlanmasını artırmakta, oluşan kalsiyum/kalmodulin kompleksi ise, miyozin hafif zincir (MHZ)' yi fosforile etmek için, MHZ kinaz (MHZK)' nin etkinleşmesine neden olmaktadır. Düz kaslarda kasılmanın büyüklüğünü belirleyen etkenin, MHZ' nin fosforilasyonunun derecesi olduğu düşünülmektedir. MHZ fosforilasyonu düz kaslarda kasılmaya neden olurken, hücre içi kalsiyum düzeyindeki azalmanın ardından gerçekleşen MHZ defosforilasyonu sonucunda gevşeme ortaya çıkmaktadır. Rho-kinaz yolu, miyozin II' nin MHZ' nin fosforilasyon düzeyini başlıca miyozin fosfatazı inhibe ederek düzenlemekte, ayrıca düz kas kasılmasında agonist ile uyarılan kalsiyum duyarlılığına katkıda bulunmaktadır. Öte yandan, hücre içi kalsiyum derişiminin MHZ' nin fosforilasyonu ve düz kas kasılması ile her zaman paralel olmadığı görülmüştür. Sonuç olarak, yapılan çalışmalarda GTP bağlayıcı protein olan Rho'nun agonist aracılıklı kalsiyum duyarlığında yer aldığı gösterilmiştir. Daha da önemlisi, belirli bir kalsiyum derişiminde artmış olan kasılmaların, etkinleşen Rho ile MHZ fosforilasyonu oranındaki artıştan çok, defosforilasyon oranındaki azalmadan kaynaklandığı ileri sürülmüştür. Rho proteinleri bu etkiyi "downstream" efektörleri olan Rho kinaz aracılığı ile oluşturmaktadırlar. Rho- kinaz

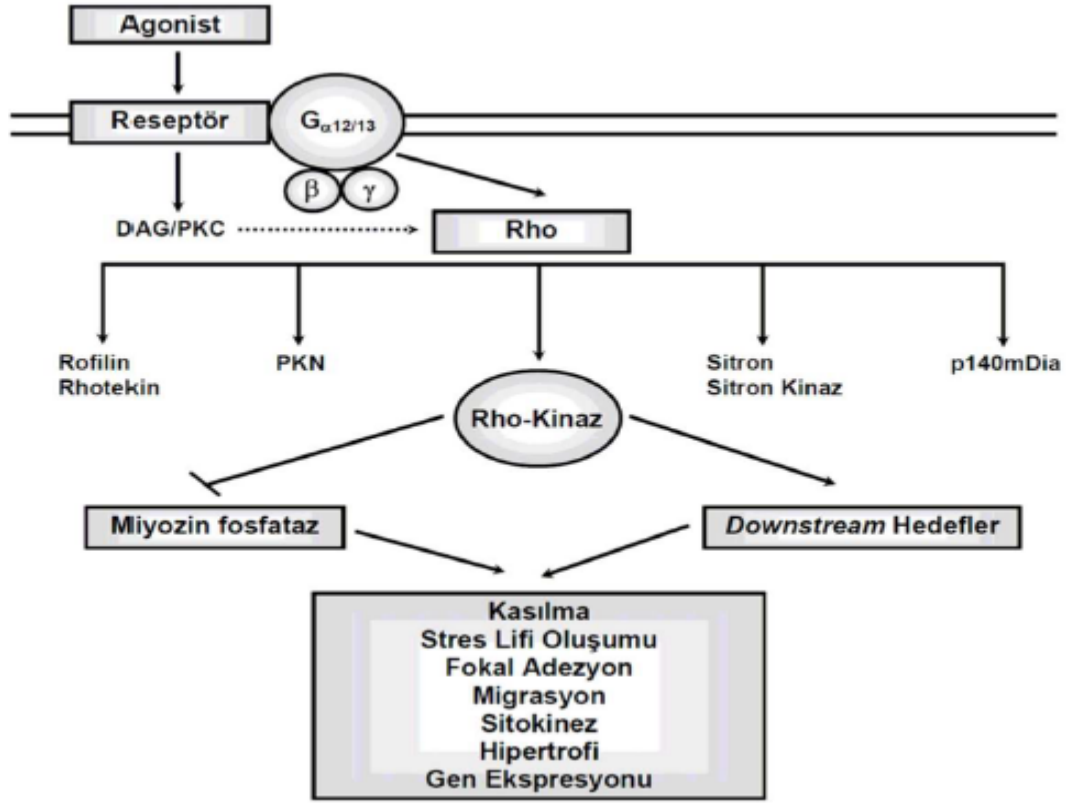


hipertansiyon ve ani ölüm, arteriyosklerotik hastalıklardan anjina, miyokard enfarktüsü, restenoz, inme (stroke), hipertansif vasküler hastalık, kalp yetersizliği, kardiyak allograft vaskülopatisi ve ven yama (greft) hastalığı ile ayrıca bronşial spazm, glokom, osteoporoz, erektil işlev bozukluğu ve bazı kanser türleri bulunmaktadır. ROCK'lerin çeşitli kardiyovasküler hastalıklardaki rolü şekil 11 ve 12' de özetlenmiştir (147-159).

Şekil 11 Rock' un kardiyovasküler sistem hedefleri ROCK'lerin çeşitli kardiyovasküler hastalıklardaki rolü. ROCK'lerin downstream efektörleri arasında miyozin hafif zincir kinaz, miyozin hafif zincir, ezrin-radiksin-moesin proteinleri, LIM kinazlar ve adusin gibi moleküller bulunmaktadır. GTP, guanozin 5'-trifosfat; I/R, iskemi/reperfüzyon; ROCK, Rho ile ilişkili kinaz.



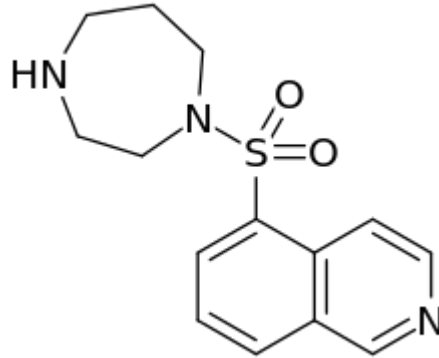
Şekil 12 Rho-kinazın çeşitli kardiyovasküler hastalıkların patojenezindeki rolü



Şekil 12: Rho-kinazın çeşitli kardiyovasküler hastalıkların patojenezindeki rolü. Anjiyotensin II, serotonin, trombin, endotelin-1, noradrenalin, trombosit kökenli büyüme faktörü ve ürotensin II gibi agonistler Rho-kinazın etkinleşmesine neden olmaktadır. Rho-kinazın downstream efektörleri arasında miyozin hafif zincir kinaz, miyozin hafif zincir, ezrin-radiksin-moesin proteinleri, LIM kinazlar ve adusin gibi moleküller bulunmaktadır. DAG, diaçilgliserol; GTP, guanozin 5'-trifofosfat; PKC, protein kinaz C; PKN, protein kinaz N.

## 2.12.FASUDİL (HA1077)

Şekil 13 Fasudil' in kimyasal şeması



Fasudil (Fasudil hydrochloride, C<sub>14</sub>H<sub>17</sub>N<sub>3</sub>O<sub>2</sub>S ) bir Rho kinaz inhibitörüdür.

Bulduğundan beri serebral vasospazm tedavisinde kullanılmıştır (223). Ayrıca pulmoner hipertansiyon tedavisinde (224) ve 2009'da yapılan çalışmalar sonucunda Alzheimer hastalarında prognozu iyileştirmek ve hafızayı güçlendirmek için kullanılmaya başlanmıştır (225, 226). Şu an Çin ve Japonya'da kullanımı yerel sağlık makamlarınca onaylanmış olup ABD ve Avrupa Birliği'nde henüz bu konuda bir onay bulunmamaktadır.

Fasudil (HA-1077), hidroksifasudil, H89 ve Y-27632 maddesi ROCK inhibitörleri olduğu, araştırmalarla tespit edilmişlerdir (227).

Fasudil ve Y27632 gibi ROCK inhibitörleri, statinler ve preniltransferaz inhibitörü (PPI) kardiyovasküler hastalıklarda yeni alternatif tedavi stratejileri olarak kabul edilmektedir (161).

### **3. MATERYAL ve METOD**

#### **3.1. MATERYAL**

Bu çalışmada, Konya Necmettin Erbakan Üniversitesi KONUDAM Laboratuvar Hayvanları Yetiştirme ve Deneysel Araştırmalar Merkezinden temin edilen ortalama 250-300 gram ağırlığında 32 adet yetişkin dişi Wistar Albino cinsi sıçan kullanılmıştır. Sıçanlar rast gele ve eşit sayıda (n = 8) olarak dört gruba ayrıldı. Tüm sıçanların bakımları; Tıbbi Araştırmalar Ulusal Derneği tarafından biçimlendirilen "Deney Hayvanlarının Bakım Prensipleri" ne ve Laboratuvar Hayvanı Kaynakları Enstitüsü tarafından hazırlanıp Ulusal Sağlık Enstitüsü tarafından yayınlanan (NIH basım no. 85 – 23, 1985 revize edildi) "Laboratuvar Hayvanlarının Bakım ve Kullanımı için Kılavuzu" na uygun olarak yapıldı. Çalışma protokolü ve deneysel metot Konya Necmettin Erbakan Üniversitesi Etik Kurulu tarafından onaylandı. (26.02.2016 tarih ve 2016-004 sayılı etik kurul kararı).

### 3.2. IR MODELİ VE İLAÇ UYGULAMASI

Yapılan deneyde; anestezi için, sıçanlara işlem öncesinde 90mg/kg dozda ketamin hidroklorür (Ketalar, Pfizer İlaç) ve 10mg/kg dozda xylazine hidraklorür (Rompun, Bayer İlaç) intramüsküler uygulandı. Gerektiğinde anestezi dozları tekrarlandı. Anestezi sonrasında kuyruk venlerinden mor renkli damar yolu açıldı ve heparinli sarı kapaklarla kapatıldı. İşlem, bir ısıtma lambası altında, sıçanlar supin pozisyonda iken gerçekleştirildi. Ciltleri asseptik olarak hazırlandı. Sıçanlara orta hat laparotomi yapıldı. Bağırsakların ıslak gazlı bez ile uzaklaştırılarak infrarenal abdominal aort (İAA), dikkatli bir şekilde eksplore edildi. İAA'ya travmatik olmayan mikrovasküler kross-klemp konuldu. 120 dakika sonra İAA'daki mikrovasküler klemp kaldırıldı ve 120 dakika süreyle reperfüzyon sağlandı (228-230). Aortik iskemi; klempleme işlemi sırasında distal aortada pulsasyonun kaybolması ile aortik reperfüzyon ise; klempin kaldırılması sonrası distal aortada pulsasyonun geri dönmesi ile onaylandı (231). İlacın intravenöz 30 dk'lık uygulaması için Braun marka perfüzör kullanıldı. İlaç infüzyon hızı 15 ml/h olarak ayarlanarak toplam volüm olan 7,5ml'lik sf 30 dk da hayvana iv infüzyon ile verildi. İlaç dozu 10ml de 1 mg, toplam doz 100µg/kg/dk doz hesabı ile hesaplandı.

IR dönemlerinde peritoneal boşluktan ısı ve sıvı kaybını en az miktara indirmek için; İAA'ya klemp konulması ve kaldırılması sonrası dönemlerinde, peritoneal boşluğa serum fizyolojik uygulanıp, batın insizyonu geçici olarak ıslak gazlı bez ile sarılarak kapatıldı. Reperfüzyon süresi sonunda; tüm sıçanlardan intrakardiyak 5 cc'lik enjektör yardımıyla kan alındı. Deneğin bilateral börekleri doku bütünlüğü korunarak çıkarıldı. Aynı şekilde, median laparotomi kesisi sağ inguinal alan distaline ilerletilip, her iki m. gastrokinemius kas doku örnekleri alındı.

Sıçanlarda alınan kanlar önce birer damlası lam üzerine damlatıldı. Sonrasında oda sıcaklığında yarım saat bekletildikten sonra, 5000 rpm'de 10 dakika santrifüj edildi. Sıçan serum örnekleri sf ile muamele edilerek -20 derecede saklandı. Kas ve böbrek dokusu örnekleri de sf ile muamele edilerek tüplere yerleştirilerek -20 derecede saklandı.

### **3.3. ÇALIŞMA GRUPLARI**

Sıçanlar aşağıda detayları belirtildiği şekilde 4 gruba ayrıldı.

Grup 1 (SHAM) grubu:

Bu gruptaki sıçanlara; laparotomi yapıldı, herhangi bir medikasyon veya girişim uygulanmadan diğer gruplara uygulanan 4 saatlik iskemi ve reperfüzyon süresi beklendi. Bu süre sonunda intrakardiyak kan aspirasyonu ile ötenazi uygulandı. Sonra sakrifiye edilerek kan ve doku örnekleri (gastrokinemius kası ve böbrek) alındı.

Grup 2 (FAS) grubu:

Bu gruptaki sıçanlara; laparotomi uygulandı ve 100µg/kg/dk dozunda fasudil 30'dk iv infüzyonu verildi (232-235). Laparotomiden 4 saat sonra intrakardiyak kan aspirasyonu ile ötenazi uygulandı. Sonra sakrifiye edilerek kan ve doku örnekleri (gastrokinemius kası ve böbrek) alındı.

Grup 3 (IR) grubu:

Bu gruptaki sıçanlara; laparotomi uygulandı. İnfrarenal abdominal aortaya vasküler klemp uygulanarak iskemi oluşturuldu. Kuyruk veninden 2000 ü/kg heparin puşesi yapılarak iki saatlik iskemi süresi beklendi. İkinci saatin sonunda klemp kaldırılarak reperfüzyonu sağlandı ve iki saatlik reperfüzyon süresi beklendi. Dördüncü saatin sonunda intrakardiyak kan aspirasyonu ile ötenazi uygulandıktan sonra sakrifiye edilerek kan ve doku örnekleri (gastrokinemius kası ve böbrek) alındı.

Grup 4 (IR+FAS) grubu:

Bu gruptaki sıçanlara; laparotomi uygulandı. İnfrarenal abdominal aortaya vasküler klemp uygulandı. İskemi oluşturularak ve kuyruk veninden 2000 ü/kg heparin puşesi sonrası iki saatlik iskemi süresi beklendi. İkinci saatin sonunda klemp kaldırıldı. Reperfüzyonu sağlandı. Reperfüzyon döneminde kuyruk veninden 100µg/kg/dk dozunda 30'dk süresince intravenöz fasudil infüzyonu uygulandı. Dördüncü saatin sonunda intrakardiyak kan aspirasyonu ile ötenazi uygulandıktan sonra sakrifiye edildi kan ve doku örnekleri (gastrokinemius kası ve böbrek) alındı.

### **3.4. BİYOKİMYASAL İŞLEMLER**

Deney hayvanlarından alınan venöz kan örnekleri biyokimya tüpüne alındı. Alınan kan örnekleri Hettich Rotina 46R (Hettich Zentrifugen, Tuttlingen, Almanya) marka soğutmalı santrifüj cihazında 4 °C ve 1.000 g hızda 10 dakika santrifüj edilerek serumlar ayrıldı. Serum örnekleri parametreler çalışılincaya kadar New Brunswick U570 (New Brunswick Scientific, New Jersey, USA) buzdolabında -80 °C' de saklandı.

Deney hayvanlarından alınan böbrek doku örnekleri parametrelerin analizine kadar New Brunswick U570 (New Brunswick Scientific, New Jersey, USA) buzdolabında -80 °C' de saklandı. Çözdürülen doku örnekleri tartılarak 10 kat (w/v) soğuk fosfat tamponu (50 mM, pH: 7,4) içerisinde mekanik homojenizatör (İka T10 basic ultra-turrax, Almanya) ve ultrasonik homojenizatör (Bandelin Sonopuls, Almanya) kullanılarak buz içerisinde homojenize edildi. Homojenatlar Hettich Rotina 46R (Hettich Zentrifugen, Tuttlingen, Almanya) marka soğutmalı santrifüj cihazında 4 °C ve 10.000 g hızda 10 dakika santrifüj edilerek süpernatantlar ayrıldı.

Deney hayvanlarından alınan kas doku örnekleri parametrelerin analizine kadar New Brunswick U570 (New Brunswick Scientific, New Jersey, USA) buzdolabında -80 °C' de

saklandı. Çözdürülen doku örnekleri tartılarak 10 kat (w/v) soğuk fosfat tamponu (50 mM, pH: 7,4) içerisinde mekanik homojenizatör (İka T10 basic ultra-turrax, Almanya) ve ultrasonik homojenizatör (Bandelin Sonopuls, Almanya) kullanılarak buz içerisinde homojenize edildi. Homojenatlar Hettich Rotina 46R (Hettich Zentrifugen, Tuttlingen, Almanya) marka soğutmalı santrifüj cihazında 4 °C ve 10.000 g hızda 10 dakika santrifüj edilerek süpernatantlar ayrıldı.

Serum örnekleri, böbrek ve kas dokusu süpernatantlarında; total oksidan status, total antioksidan status (Rel Assay Diagnostics, Gaziantep, Türkiye), nitrik oksid seviyeleri (Oxford Biomedical Research, Missouri, ABD) ve doku protein seviyeleri Pierce bicinchoninic acid-BCA (Thermo Scientific, Illinois, ABD) kitleri kullanılarak spektrofotometrik yöntem ile ölçüldü (236, 237).

Serum örnekleri, böbrek ve kas dokusu süpernatantlarında; rat inducible nitrik oksid sentaz (SunRed Biotechnology Company, Shanghai, Çin) ve rat ROCK seviyeleri (Rel Assay Diagnostics, Gaziantep, Türkiye) kitleri kullanılarak Enzyme Linked ImmunoSorbent Assay (ELISA) yöntemi ile ölçüldü.

ELISA kitlerinin yıkama sürecinde Biotek ELX 50 mikropate yıkayıcı (BioTek Instruments, Vermont, ABD) kullanıldı. Spektrofotometrik ölçümlerde Bio-rad Mikropate absorban okuyucu xMark (Bio-rad Laboratories, California, ABD) sistemi kullanılarak absorban konsantrasyon kalibrasyon grafiklerine göre sonuçlar hesaplandı.

### **3.5. PATOLOJİK İŞLEMLER**

Histopatolojik inceleme için ayrılan doku parçaları %10' luk formaldehit çözeltisi içerisinde fikse edilerek Necmetti Erbakan Üniversitesi Meram Tıp Fakültesi Patoloji Anabilim Dalına gönderildi. Tespit sonrası takip işlemleri yapılan örnekler parafinle bloklandı. Kalınlığı dört mikron olan standart kesitler Hematoksilen-Eosin (H&E) ile

boyanarak ışık mikroskopik inceleme yapılarak hitopatolojik skorlaması değerlendirildi (Tablo 20). Apoptozisin belirlenmesi amacı ile immünohistokimyasal boyama uygulandı ve TUNNEL (Terminal deoxynucleotidyl transferase mediated dUTP nick end labeling) tekniğinden yararlanıldı. Deneylede Oncogene Research Products, Cambridge MA firmasının Apoptag plus peroxidase DNA fragmantasyonu tespit kitleri kullanıldı.

Tablo 20 Histopatolojik skorlama

Histopatolojik skorlama (hps)
Hps 0: Değişiklik ve/veya hasar yok
Hps 1: İnterstisiyel ödem
Hps 2: Hücrelerde şişme
Hps 3: Nötrofil infiltrasyonu
Hps 4: Nekroz

### 3.6 İSTATİSTİK

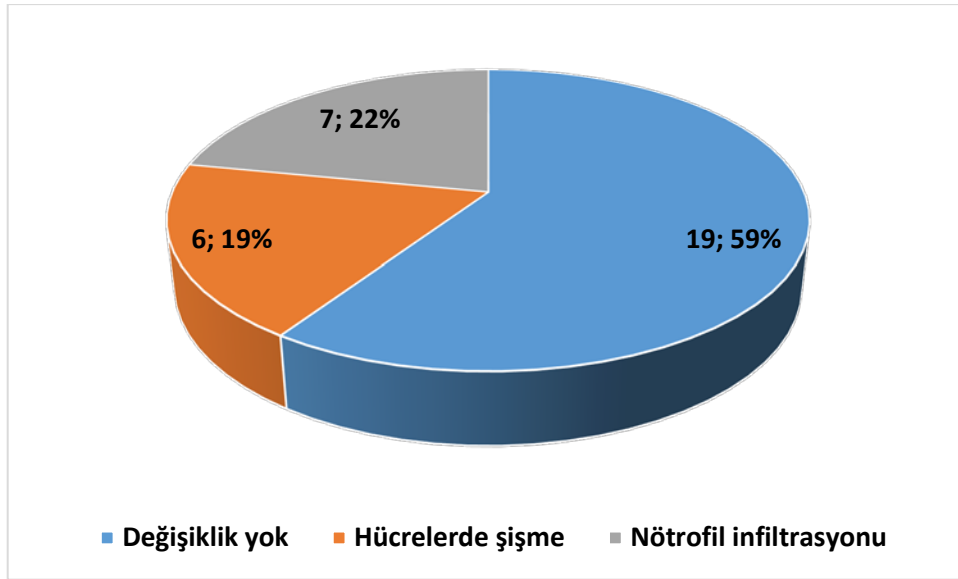
Çalışmamız prospektif düzende tasarlanmış olup hayvan deneyi sonucunda veriler elde edilmiştir. Çalışmanın istatistiksel analizi için Necmettin Erbakan Üniversitesi Tıp Eğitimi ve Bilişimi Anabilim Dalı bünyesindeki SPSS 19,0 paket programı kullanıldı. Elde edilen tüm değişkenlerin tanımlayıcı ölçüleri hesaplandı. Kategorik değişkenler frekans ve yüzde oranı; oransal ölçekli sayısal değişkenler ise ortalama±SS veya (medyan, min, maks) şeklinde tablolar yardımıyla sunuldu. Oransal ölçekli değişkenler içerisinde sürekli sayısal değerlere sahip olan değişkenlerin normal dağılıma uyup uymadığı Kolmogorov-Smirnov testi ile analiz edildi. Yalnızca ROCK ve TAS değerlerinin normal dağılıma uyduğu görüldü. Gruplarda sekiz gözlem değeri olduğundan ve diğer değişkenlerin normal dağılıma uymadığı için grup karşılaştırmaları için parametrik olmayan Kruskal-Wallis testi kullanıldı. Kategorik değişkenler arasındaki ilişkinin tespit edilmesi Monte Carlo düzeltmeli Ki-Kare analizi yöntemiyle gerçekleştirildi. İkili karşılaştırmalara ait anlamlı bulunan sonuçlar, tablo içerinde aynı üstel küçük harfler ile gösterildi. Anlamlı bulunan sonuçlar, ilgili grafikler ile

görselleştirildi. Çalışmanın tamamında tip-I hata değeri %5 alınarak  $p<0,05$  değeri istatistiksel olarak anlamlı kabul edildi.

## 4. BULGULAR

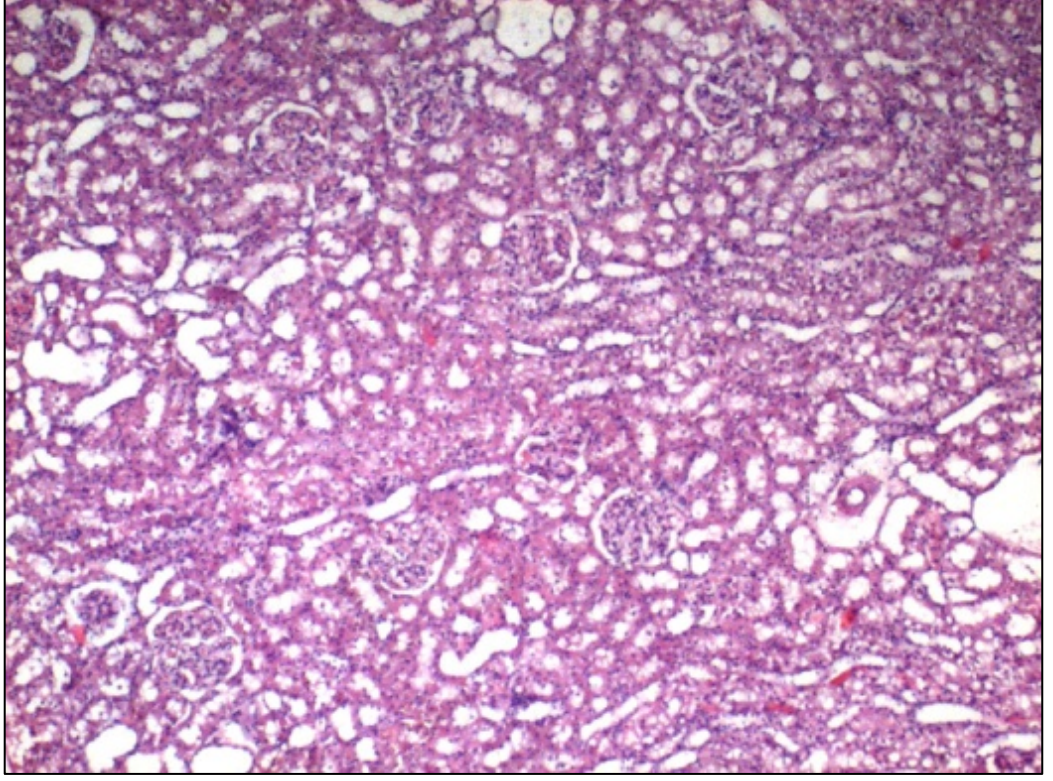
### 4.1.BÖBREK H&E BOYAMA

Çalışma, birbirine eşit dört farklı grupta tamamlandı. Her bir grupta sekiz hayvan vardı. H&E boyamalarda böbrek için üç grup ortaya çıktı. En yüksek oran %59 (n=19) ile değişiklik olmayan gruptu. %22 (n=7) oranında nötrofil infiltrasyonuydu. %19 (n=6) oranında hücrelerde şişme görüldü. Böbrek intersitisyel ödem ve nekroz hiç görülmedi %0 (n=0) (Tablo 21).

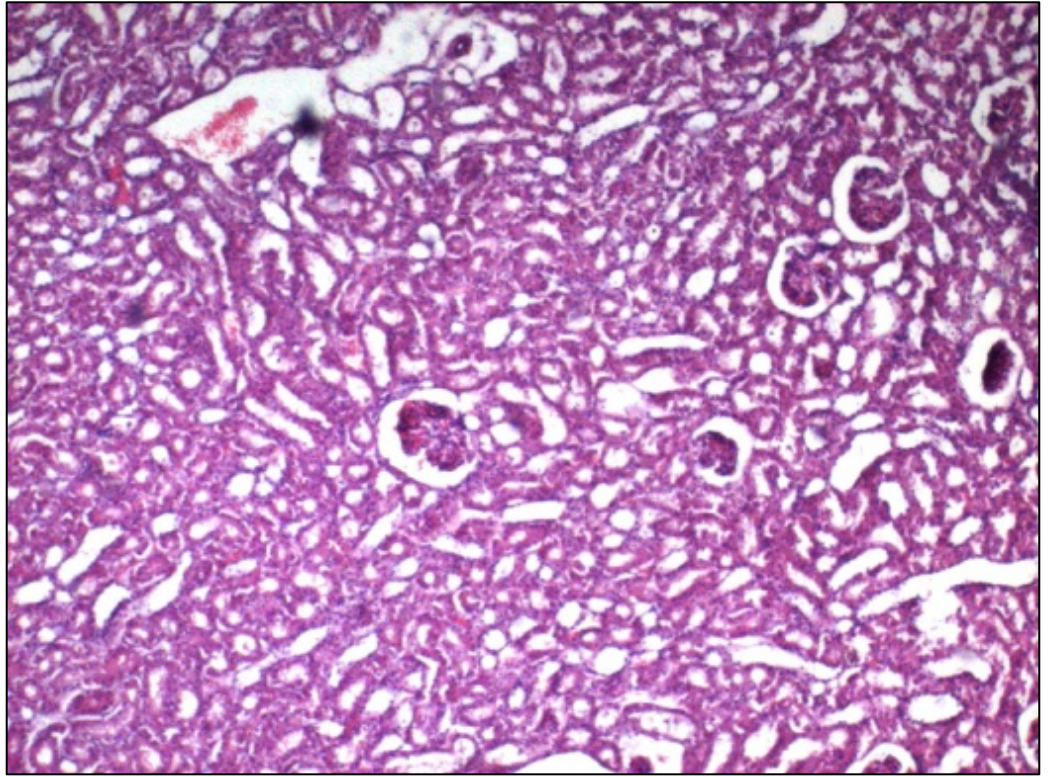


Tablo 21 Böbrek H-E kategori oranları

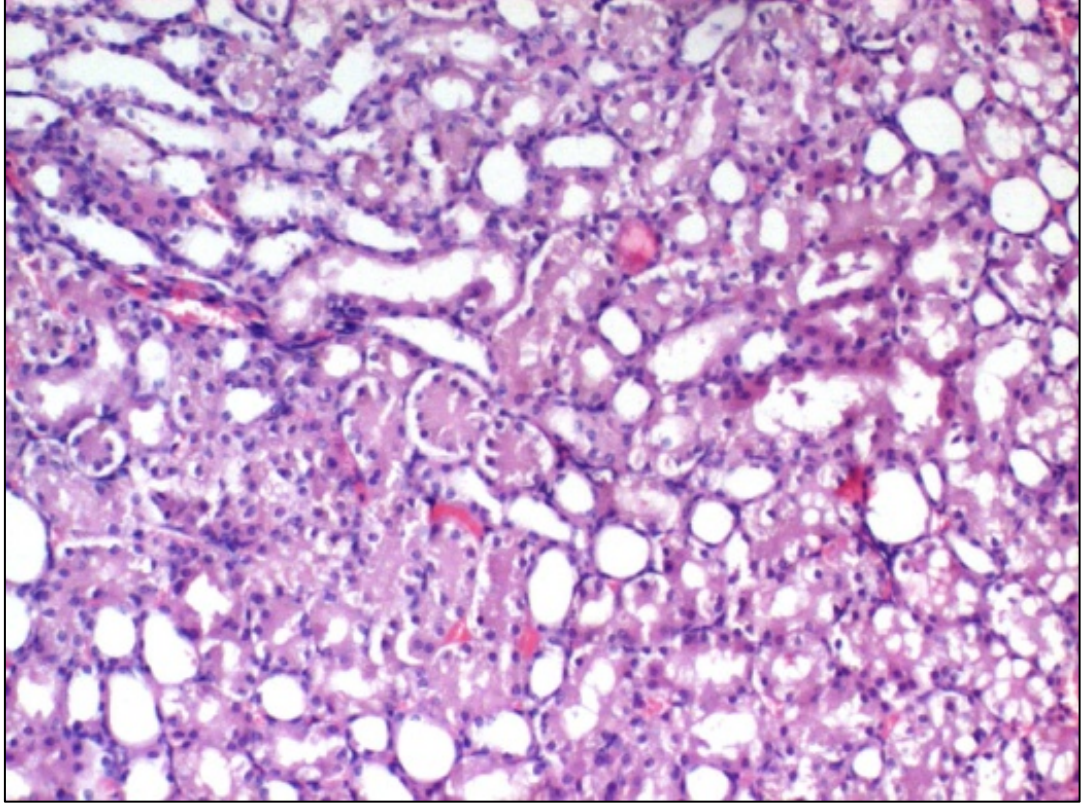
Böbrekte değişiklik olmayanların oranı (hps 0) %59 olarak bulundu. Böbrek dokusunda hasar olanların (hps 1-2-3-4) oranı ise %41 olarak bulunudu. Hafif hasar (hps1-2) oranı %19 iken ağır hasar oranı (hps 3-4) %22 olarak bulundu.



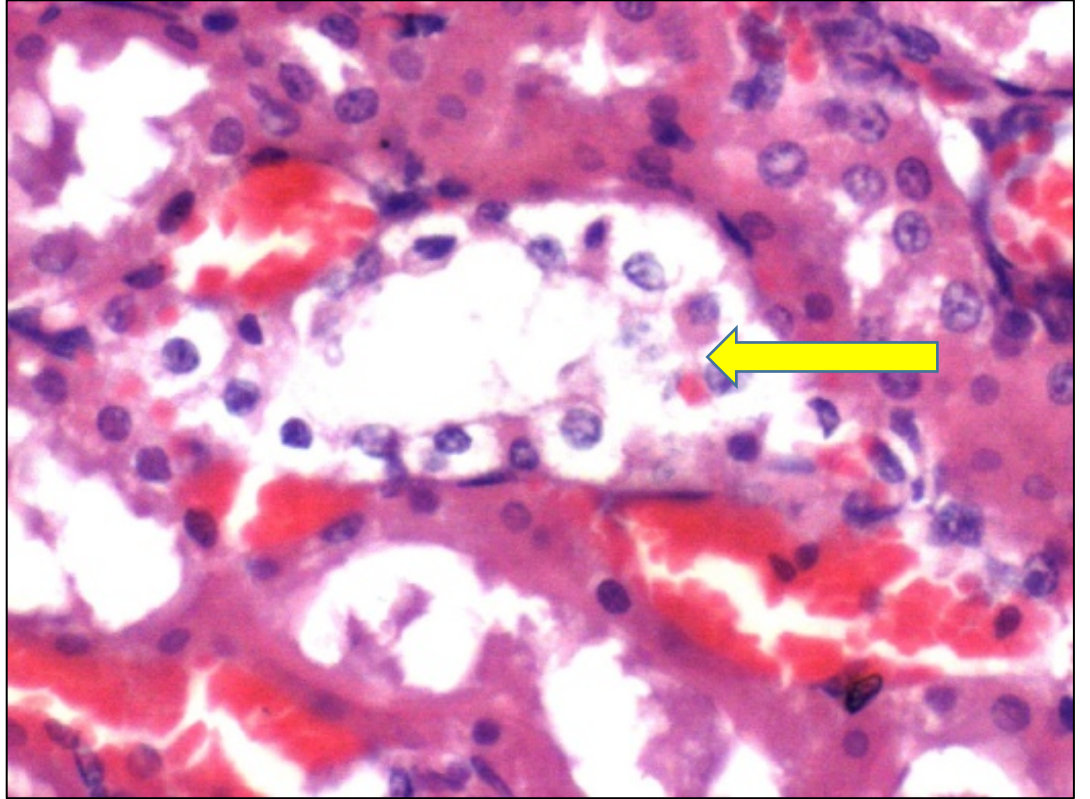
Resim 1 Grup Sham' daki H&E boyanmış, ışık mikroskopi x4 büyütmedeki normal böbrek dokusu. Hücresel hasar yok, değişiklik yok. HPS:0



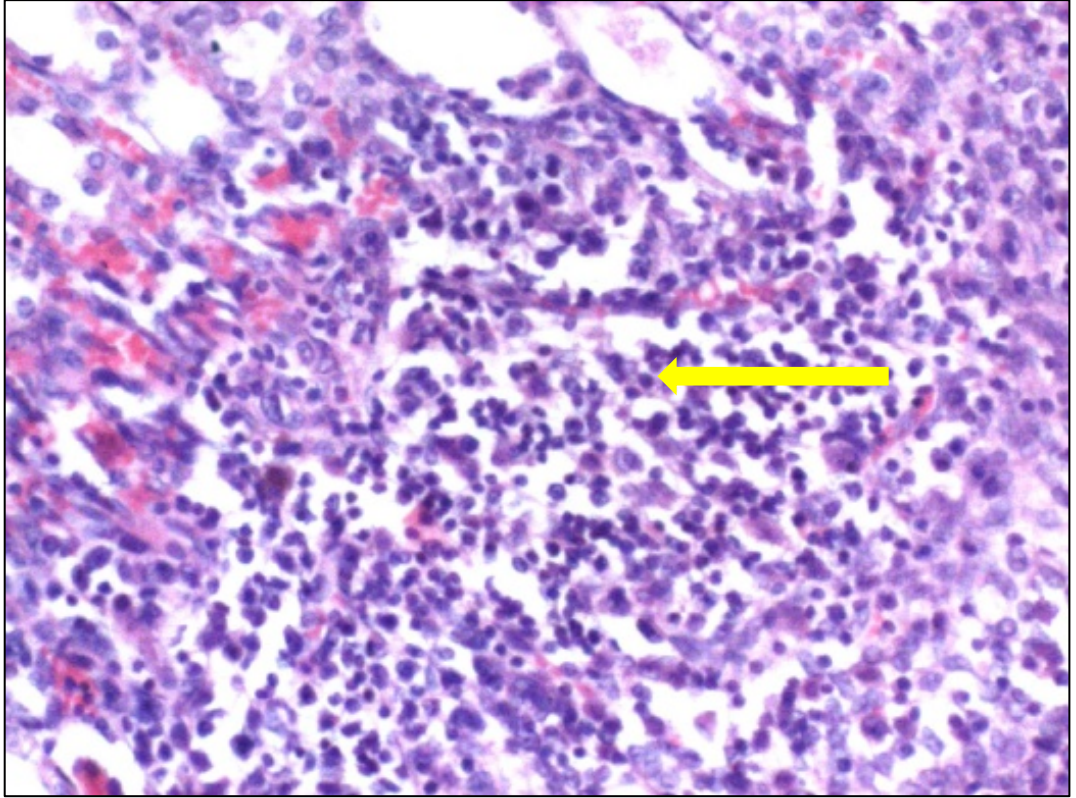
Resim 2 Grup Fasudil' deki H&E boyanmış, ışık mikroskopi x4 büyütmedeki normal böbrek dokusu. Hücresel hasar yok, değişiklik yok. HPS: 0



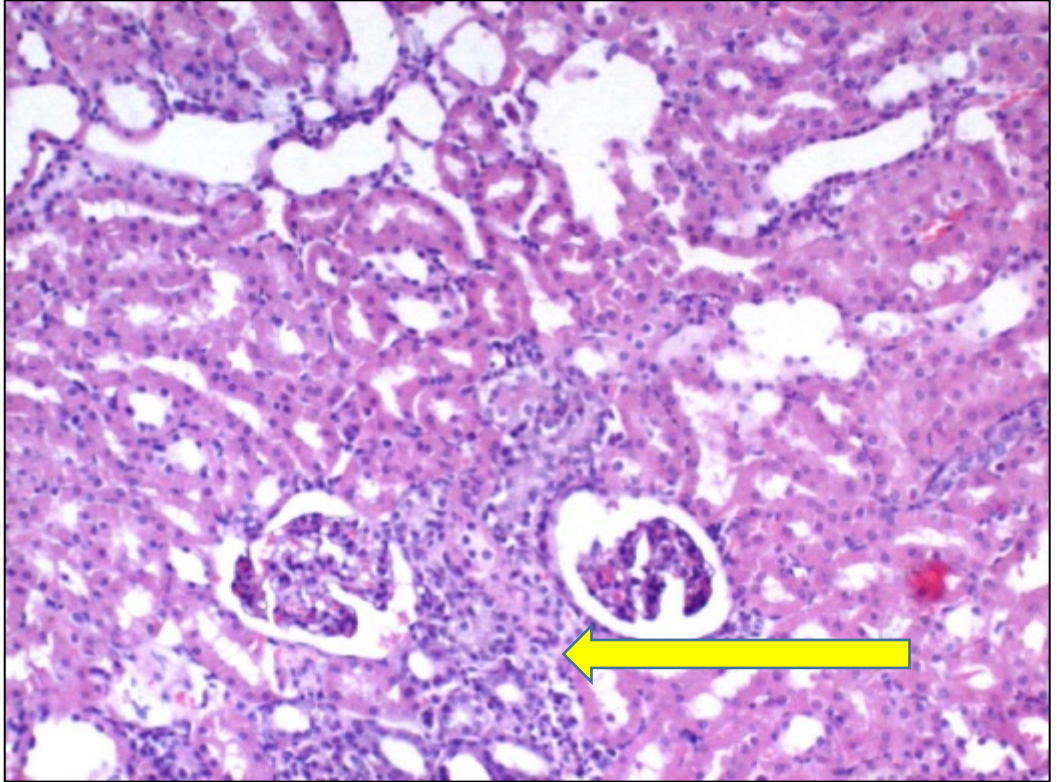
Resim 3 Grup IRH'daki H&E boyanmış, ışık mikroskobu x10 büyütmedeki interstisyel ödeme ait böbrek dokusu. Hüresel hasar var, değişiklik var. HPS: 1



Resim 4 Grup IRH'daki H&E boyanmış, ışık mikroskobu x40 büyütmedeki hücrelerde şişmeye ait böbrek dokusu. Hüresel hasar var, değişiklik var. HPS: 2

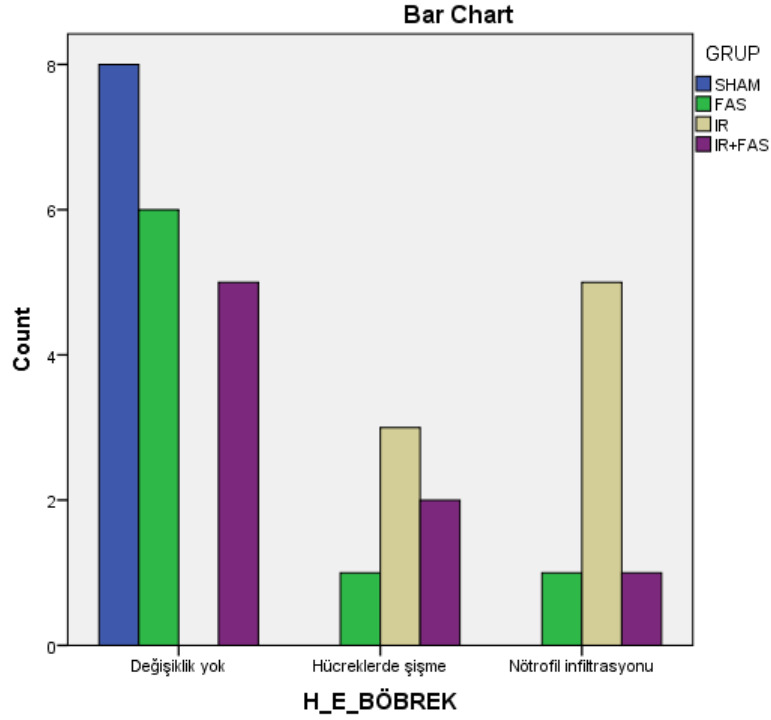


Resim 5 Grup IRH' daki H&E boyanmış, ışık mikroskobu x40 büyütmedeki nötrofil infiltrasyonuna ait böbrek dokusu. Hücresel hasar var, değişiklik var. HPS: 3



Resim 6 Grup IRH FASUDİL' deki H&E boyanmış, ışık mikroskobu x10 büyütmedeki hafif derecede nötrofil infiltrasyonu ve interstisyel ödeme ait böbrek dokusu. Hücresel hasar var, değişiklik var. HPS: 3

Tablo 22 Böbrek H-E boyama sonuçları



H&E ile boyanmış böbreğe ait preparatların tüm gruplarında nekroza ait herhangi bir bulgu rastlanmadı. Böbrek H&E boyama sonuçlarına göre değişiklik görülmeyen hücre oranları gruplar arasında anlamlı düzeyde farklıydı ( $p < 0,05$ ). SHAM grubunda hiçbir hücrede değişiklik gözlenmezken FAS ve IR+FAS gruplarında daha düşük oranda değişiklik olmayan hücre oranı vardı. IR grubunda ise mutlaka bir histopatolojik değişiklik olduğu görüldü. Hücrelerde şişme oranları en yüksek IR grubundaydı. Ancak gruplar arasında anlamlı fark bulunmadı. IR-FAS grubu takip etti. IR ve IR-FAS (%15) grupları birlikte bakıldığında ise anlamlı olarak IRH' nun SHAM ve FAS (%0,5) gruplarına göre anlamlı yüksek olduğu görüldü. Nötrofil infiltrasyonu durumunda en yüksek IR grubunda görüldü (%62,5). SHAM grubunda hiç nötrofil görülmezken FAS ve IR+FAS gruplarında yalnızca bir hayvanda nötrofil infiltrasyonuna rastlandı (Tablo 21, 22). IR-FAS grubunda nötrofil infiltrasyonun FAS grubunun seviyesine kadar gerilediği görüldü.

Tablo 23 Hematoksilen-eozin boyama preparatlarına göre böbrek grupları

BOYAMA		SHAM	FAS	IR	IR+FAS	
	Histopatolojik Skorlama	N (%)	N (%)	N (%)	N (%)	p
<b>Böbrek H-E</b>	<i>Değişiklik yok</i>	8 (100) <sup>a</sup>	6 (75,0) <sup>a</sup>	0 (0) <sup>b</sup>	5 (62,5) <sup>a</sup>	0,025*
	<i>Hücrelerde şişme</i>	0 (0)	1 (12,5)	3 (37,5)	2 (25,0)	
	<i>Nötrofil infiltrasyonu</i>	0 (0) <sup>a</sup>	1 (12,5) <sup>b</sup>	5 (62,5) <sup>a,b,c</sup>	1 (12,5) <sup>c</sup>	

(Aynı üstel harflere sahip olan kategoriler arasında oransal olarak anlamlı fark vardır)

SHAM, FAS ve IR-FAS grupları ile IR grubu arasında anlamlı bir fark bulunmuştur (p=0,025). IRH' nda mutlaka histopatolojik bir bulgu olur ve bu hasar Fasudil ile normal histopatolojisine kadar geriletebilir. SHAM, FAS, IR-FAS grupları ayrı ayrı olarak IR grubu ile nötrofil infiltrasyonu açısından anlamlı bir fark bulunmuştur (p=0,025) (Tablo 23, 24).

Tablo 24 Hematoksilen-eozin boyama preparatlarına göre böbrek ve kas grupları

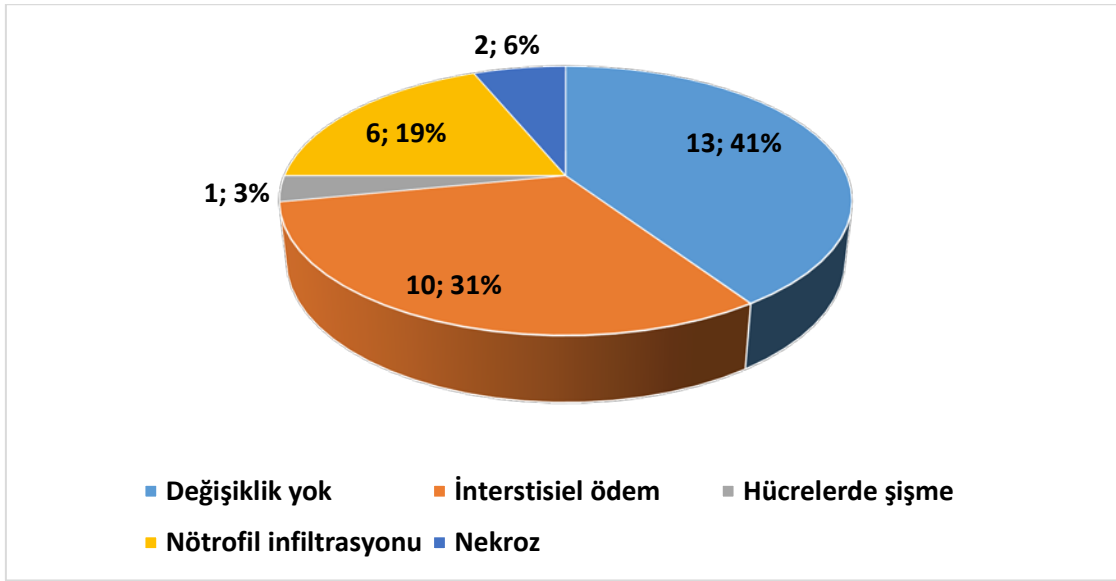
BOYAMA		SHAM	FAS	IR	IR+FAS	
	Histopatolojik Skorlama	N (%)	N (%)	N (%)	N (%)	p
<b>Böbrek H-E</b>	<i>Değişiklik yok</i>	8 (100) <sup>a</sup>	6 (75,0) <sup>a</sup>	0 (0) <sup>b</sup>	5 (62,5) <sup>a</sup>	0,025*
	<i>Hücrelerde şişme</i>	0 (0)	1 (12,5)	3 (37,5)	2 (25,0)	
	<i>Nötrofil infiltrasyonu</i>	0 (0) <sup>a</sup>	1 (12,5) <sup>b</sup>	5 (62,5) <sup>a,b,c</sup>	1 (12,5) <sup>c</sup>	
<b>Kas H-E</b>	<i>Değişiklik yok</i>	6 (75,0) <sup>a</sup>	5 (62,5) <sup>b</sup>	0 (0) <sup>a,b</sup>	2 (25,0)	0,047*
	<i>İnterstisiyel ödem</i>	1 (12,5)	3 (37,5)	1 (12,5)	5 (62,5)	
	<i>Hücrelerde şişme</i>	0 (0)	0 (0)	1 (12,5)	0 (0)	
	<i>Nötrofil infiltrasyonu</i>	1 (12,5)	0 (0)	4 (50,0)	1 (12,5)	
	<i>Nekroz</i>	0 (0)	0 (0)	2 (25,0)	0 (0)	

(Aynı üstel harflere sahip olan kategoriler arasında oransal olarak anlamlı fark vardır)

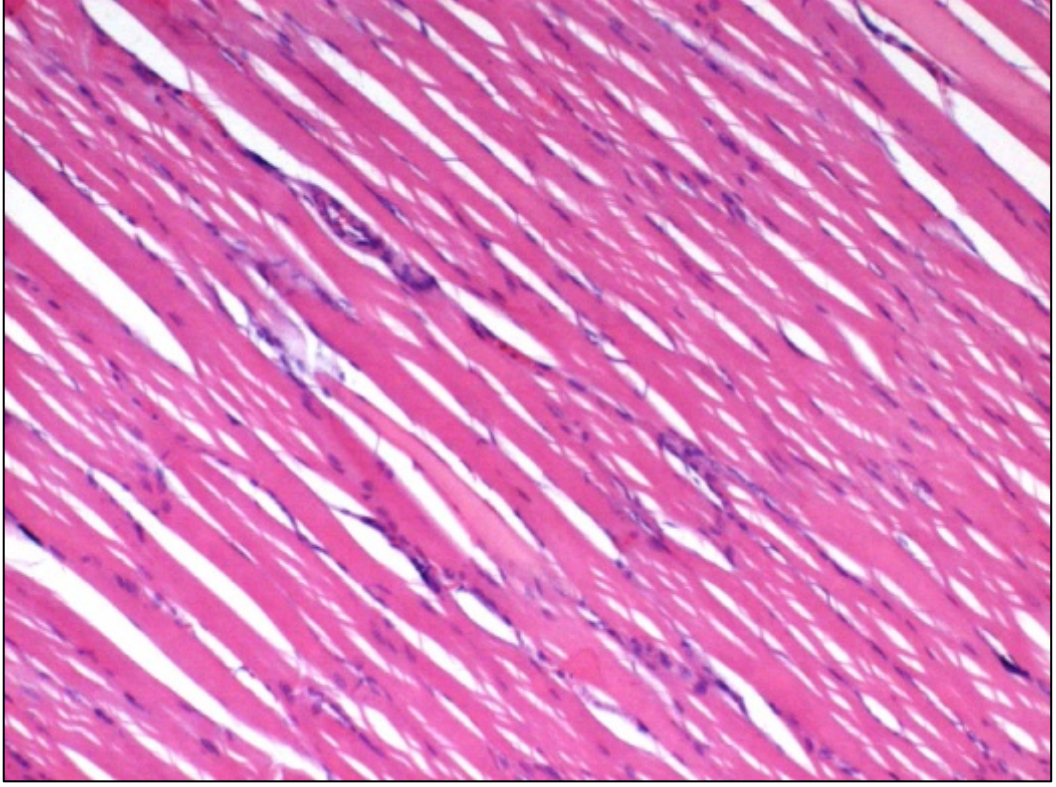
## 4.2. KAS H&E BOYAMA

Kas için yapılan boyama preparatında ise en yüksek oran (%41; n=13) değişiklik olmayan gruba aitti. Sonra sırasıyla interstisiel ödem (%31; n=10), nötrofil infiltrasyonu (%19; n=6), nekroz (%6; n=2) ve yalnızca bir hayvanda hücrelerde şişme görüldü (Tablo 25).

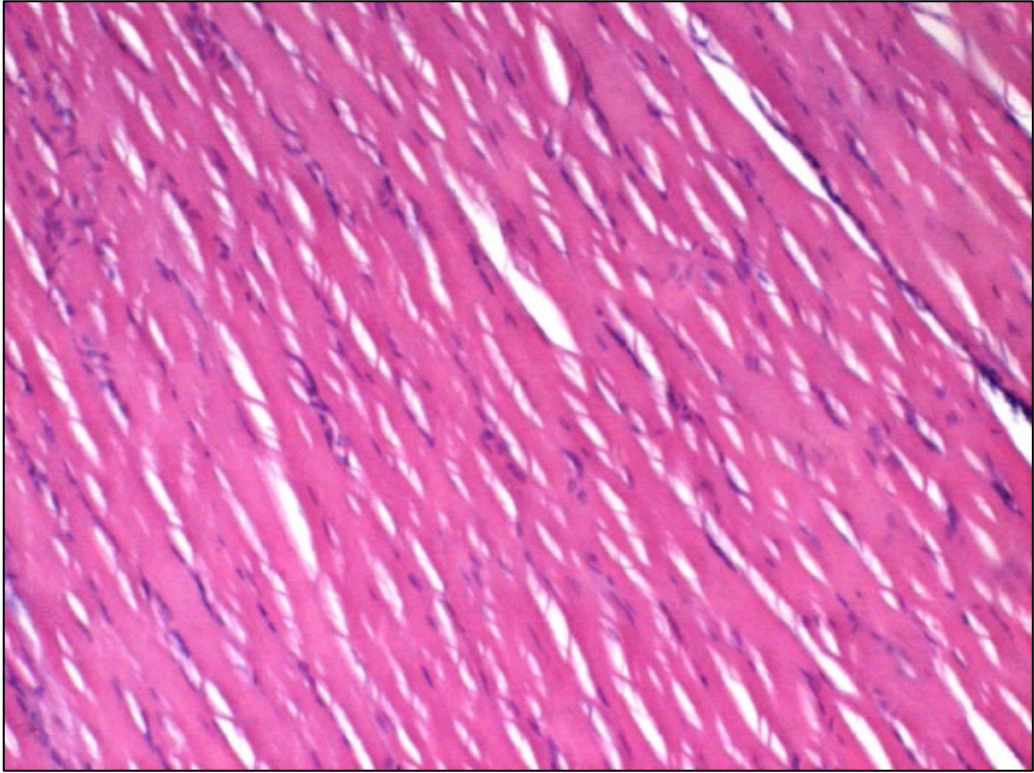
Tablo 25 Kas H-E kategori oranları



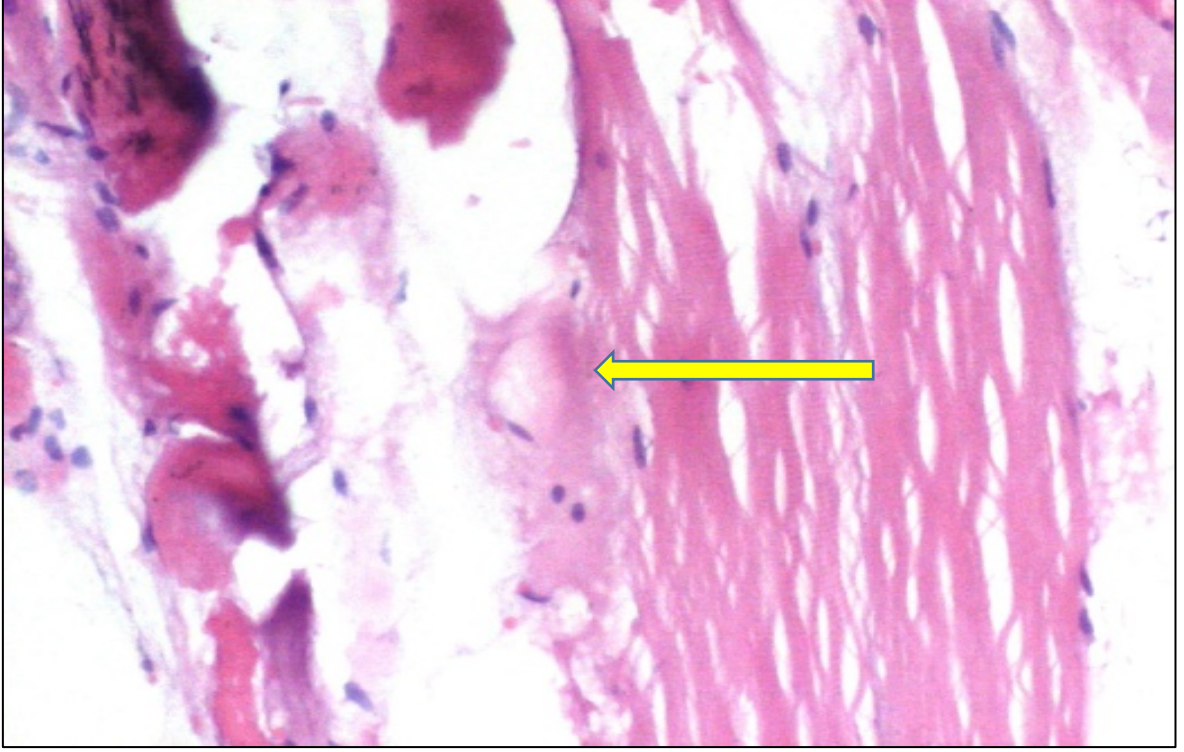
Kas dokusunda hafif hasar grubunda (hps 1-2) %34 olarak bulundu. Kas dokusu ağır hasar (hps3-4) ise %25 olarak bulundu. Toplamda hücrelerde değişikliğe neden olan (hps 1-2-3-4) histopatolojik değişiklik oranı ise %59 olarak bulundu. Değişiklik olmayan grup ise %41 olarak bulundu.



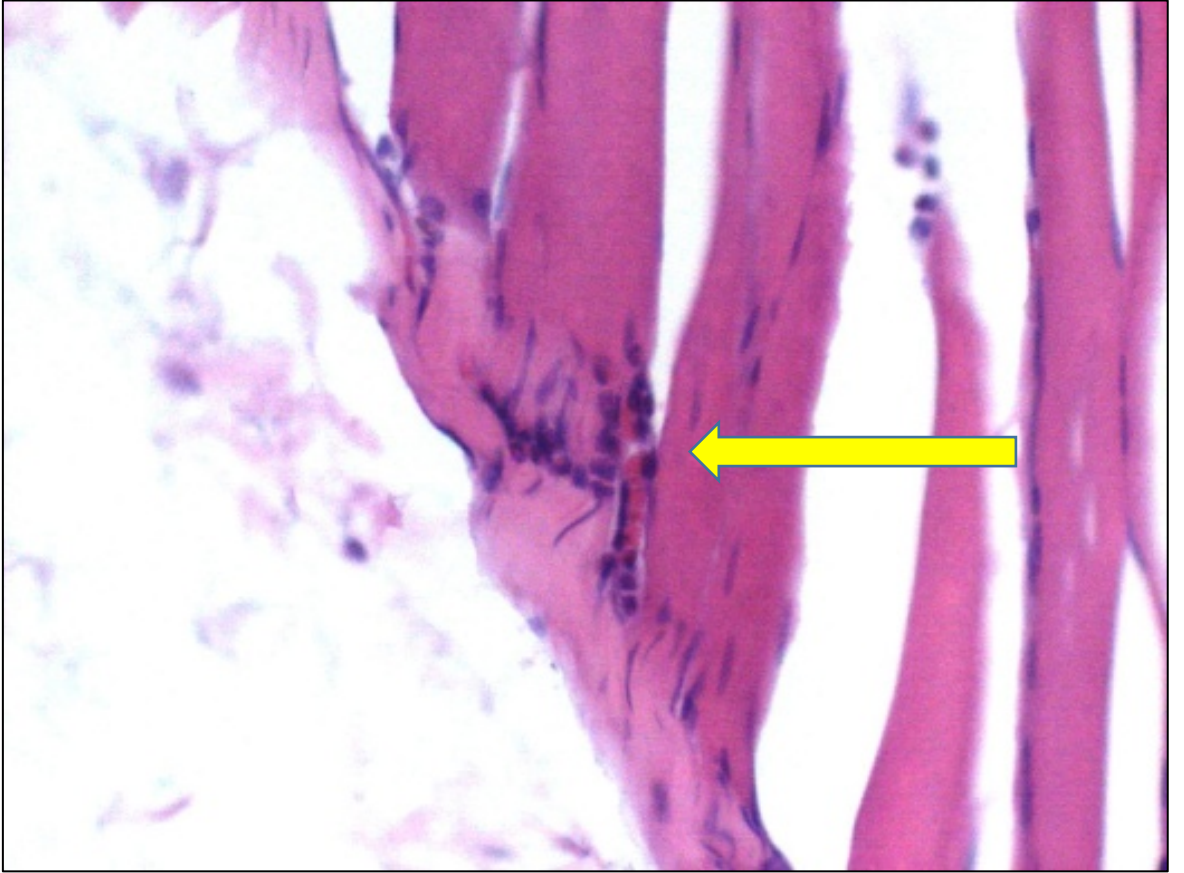
Resim 7 Grup Sham' daki H&E boyanmış, ışık mikroskobu x10 büyütmedeki normal kas dokusu. Hücresel hasar yok, değişiklik yok. HPS: 0



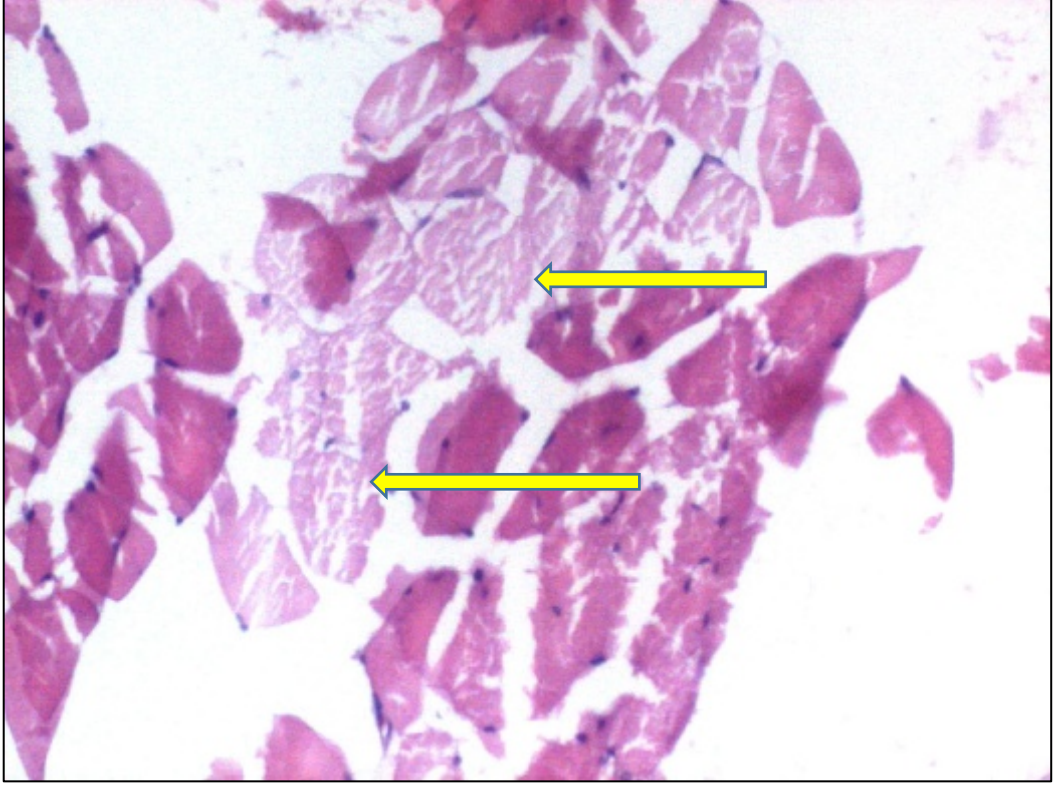
Resim 8: Grup Fasudil' deki H&E boyanmış, ışık mikroskobu x10 büyütmedeki normal kas dokusu. Hücresel hasar yok, değişiklik yok. HPS: 0



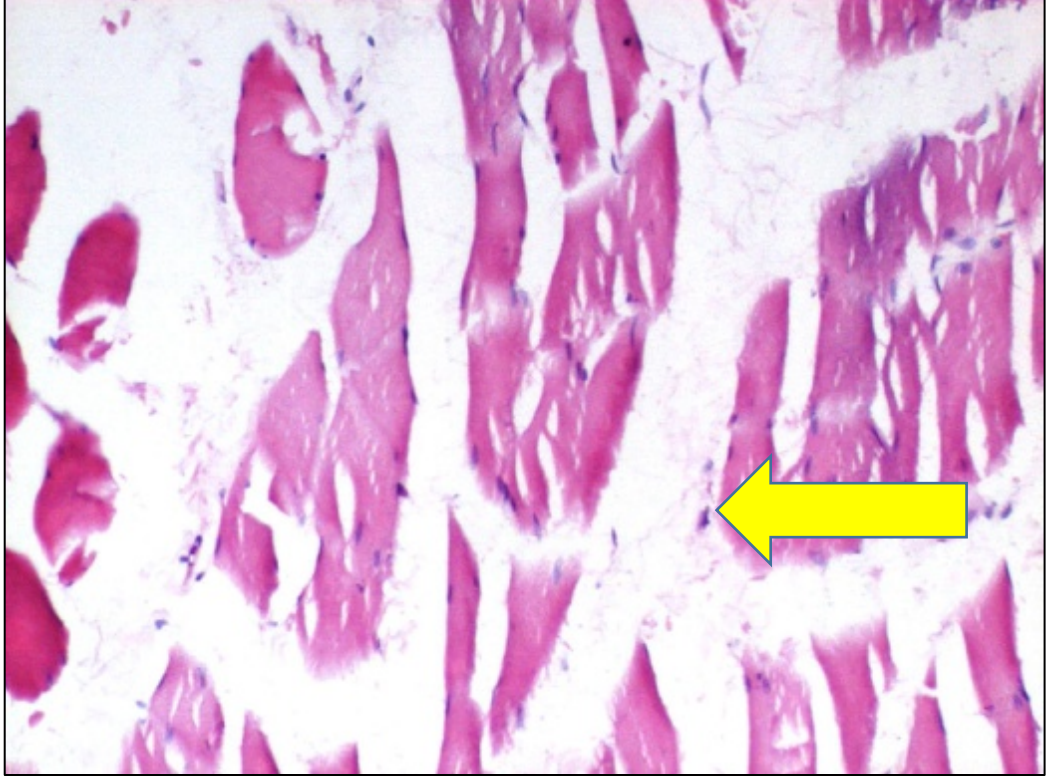
Resim 9: Grup IRH' deki H&E boyanmış, ışık mikroskobu x40 büyütmedeki hücrelerde şişmeye ait kas dokusu. Hücresel hasar var, değişiklik var. HPS: 2



Resim 10 Grup IRH' deki H&E boyanmış, ışık mikroskobu x40 büyütmedeki nötrofil



Resim 11 Grup IRH' deki H&E boyanmış, ışık mikroskobu x40 büyütmedeki nekroza ait kas dokusu. Hücresel hasar var, değişiklik var. HPS: 4



Resim 12 Grup IRH FASUDİL' deki H&E boyanmış, ışık mikroskobu x10 büyütmedeki interstisyel ödeme ait kas dokusu. Hücresel hasar var, değişiklik var. HPS: 1.

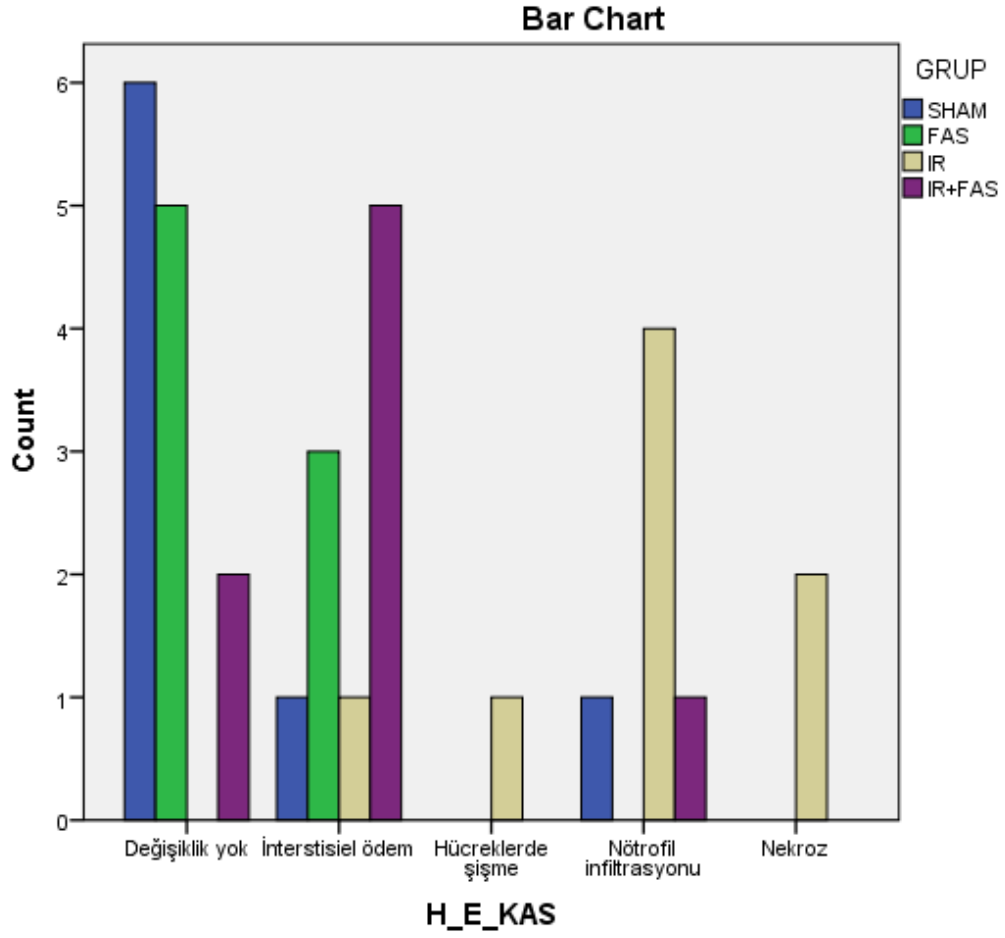
Kas H-E boyamalarında ise daha fazla sonuca rastlandı. Değişiklik olmama durumu gruplar arasında oransal olarak farklı bulunurken (p=0,047) yine SHAM grubunda en yüksek oranda (%75) değişiklik görülmedi. Aynı şekilde FAS grubunda da yüksek oranda (%62,5) değişikliğin görülmediği izlendi. Buna karşın IR grubunda ise %100 hücrel hasar görüldü. IR+FAS grubunda ise IR grubuna göre anlamlı bir fark ortaya çıktı (p=0,047). IR+FAS (%62,5) ve FAS (%37,5) gruplarında interstisiyel ödem durumu ortaya çıktı. Ancak gruplar arasında anlamlı fark tespit edilmedi. Hücrelerde şişme yalnızca tek hayvanda ve nekroz durumu iki hayvanda IR grubunda görüldü. Aynı şekilde nötrofil infiltrasyonuna en yüksek oranda (%50) IR grubunda rastlandı (Tablo 26, 27).

Tablo 26 Hematoksilen-eozin boyama preparatlarına göre kas grupları

<b>BOYAMA</b>		<b>SHAM</b>	<b>FAS</b>	<b>IR</b>	<b>IR+FAS</b>	
	<b>Histopatolojik Skorslama</b>	<b>N (%)</b>	<b>N (%)</b>	<b>N (%)</b>	<b>N (%)</b>	<b>p</b>
<b>Kas H-E</b>	<i>Değişiklik yok</i>	6 (75,0) <sup>a</sup>	5 (62,5) <sup>b</sup>	0 (0) <sup>a,b</sup>	2 (25,0)	0,047*
	<i>İnterstisiyel ödem</i>	1 (12,5)	3 (37,5)	1 (12,5)	5 (62,5)	
	<i>Hücrelerde şişme</i>	0 (0)	0 (0)	1 (12,5)	0 (0)	
	<i>Nötrofil infiltrasyonu</i>	1 (12,5)	0 (0)	4 (50,0)	1 (12,5)	
	<i>Nekroz</i>	0 (0)	0 (0)	2 (25,0)	0 (0)	

(Aynı üstel harflere sahip olan kategoriler arasında oransal olarak anlamlı fark vardır)

Tablo 27 Kas H-E boyama sonuçları



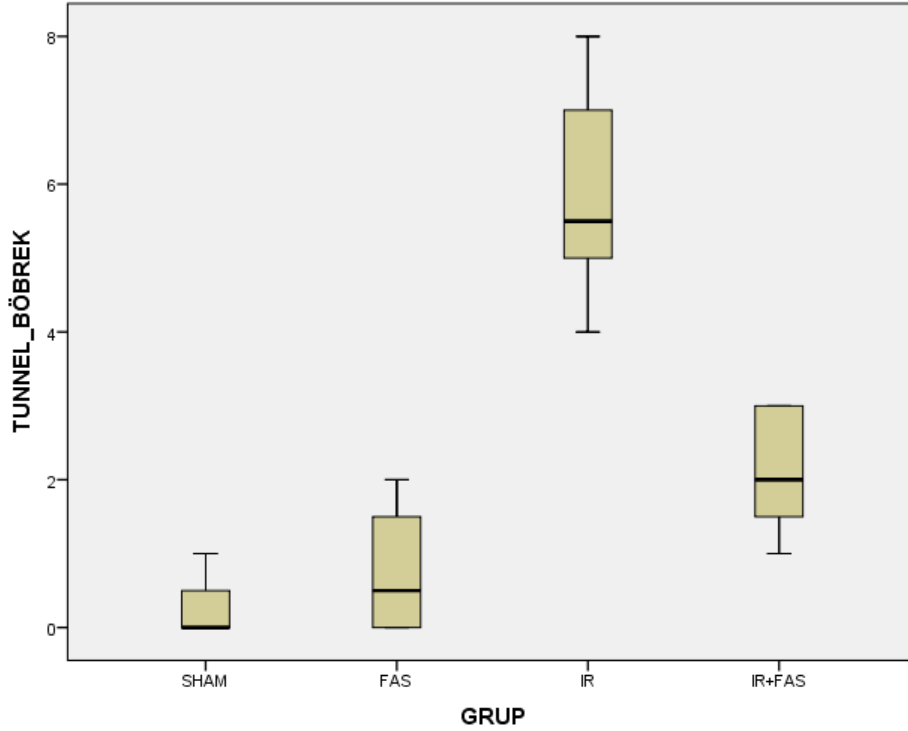
Hafif hasar (hps1-2) olan grup %62,5 ile en çok IR+FAS grubunda görüldü. Ağır hasar (hps3-4) %75 oranı ile en çok IR grubunda görüldü. Hücresel hasrın olmadığı grupların oranı % 40 dı. Kas IR grubunda mutlaka bir histopatolojik değişikliğin olduğu görüldü.

### 4.3. TUNNEL ÖLÇÜMÜ

#### 4.3.1. BÖBREKDE TUNNEL ÖLÇÜMÜ

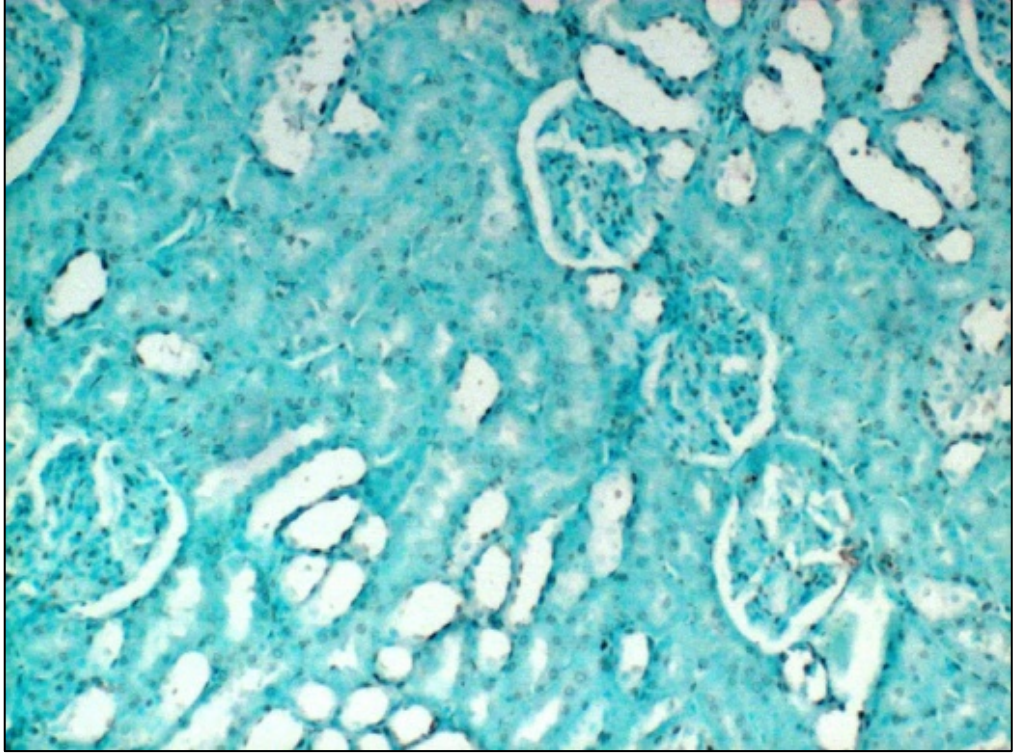
TUNNEL ölçümleri SHAM ve FAS gruplarında %1'in altında ortalama ve medyan değerlerine sahipken IR+FAS grubunda %2'nin üzerinde ve IR grubunda ise %6'ya yakın ölçümler hesaplandı. IR grubu SHAM ve FAS gruplarından anlamlı düzeyde farklı bulundu (Tablo 28, 29). SHAM ve FAS gruplarına göre IR grubunda göre anlamlı fark bulundu ( $p=0,001$ ). IR artan hasar yükü IR-FAS grubunda anlamlı şekilde azaldığı bulundu ( $p=0,001$ ).

Tablo 28 gruplara göre böbrek TUNNEL ölçüm değerlendirilmesi

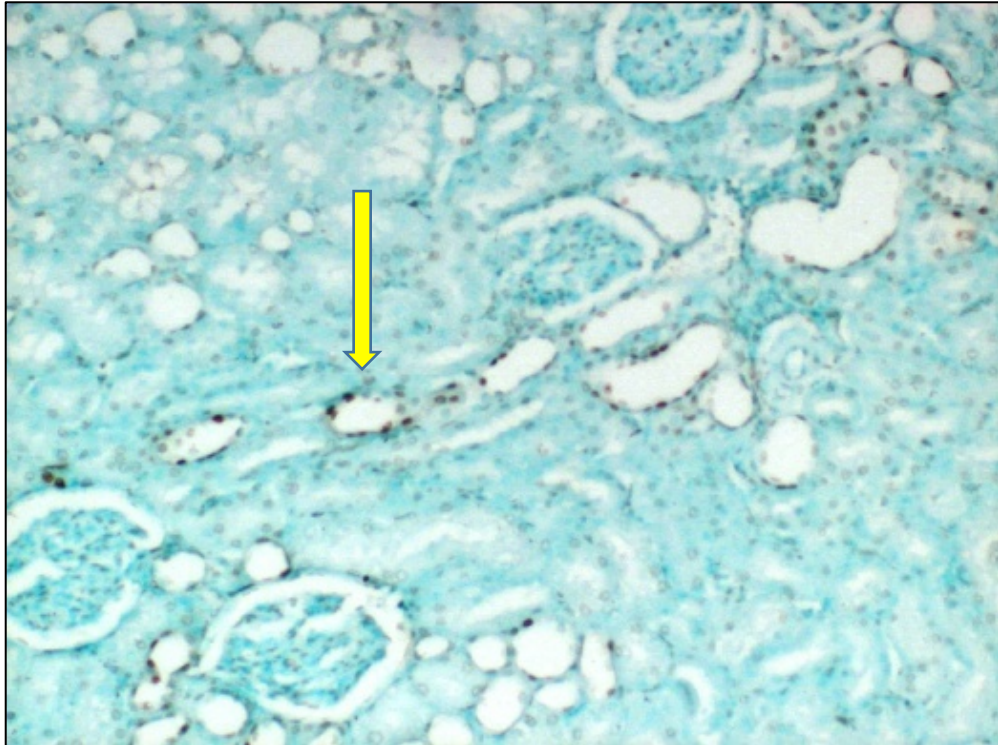


Tablo 29 Gruplara göre böbrek Tunnel ölçümleri karşılaştırmaları

BÖBREK	SHAM	FAS	IR	IR+FAS	<i>p</i>
	Ortalama±SS (Medyan, min, maks)				
TUNNEL (%)	0,25±0,46 (0;0;1) <sup>a</sup>	0,75±0,89 (0,5;0;2) <sup>b</sup>	5,88±1,36 (5,5;4;8) <sup>a,b</sup>	2,13±0,84 (2;1;3)	<0,001*



Resim 13: Grup Sham' daki Tunnel yöntemi ile hazırlanmış, ışık mikroskopi x4 büyütmedeki %0 boyanmış normal böbrek dokusu.

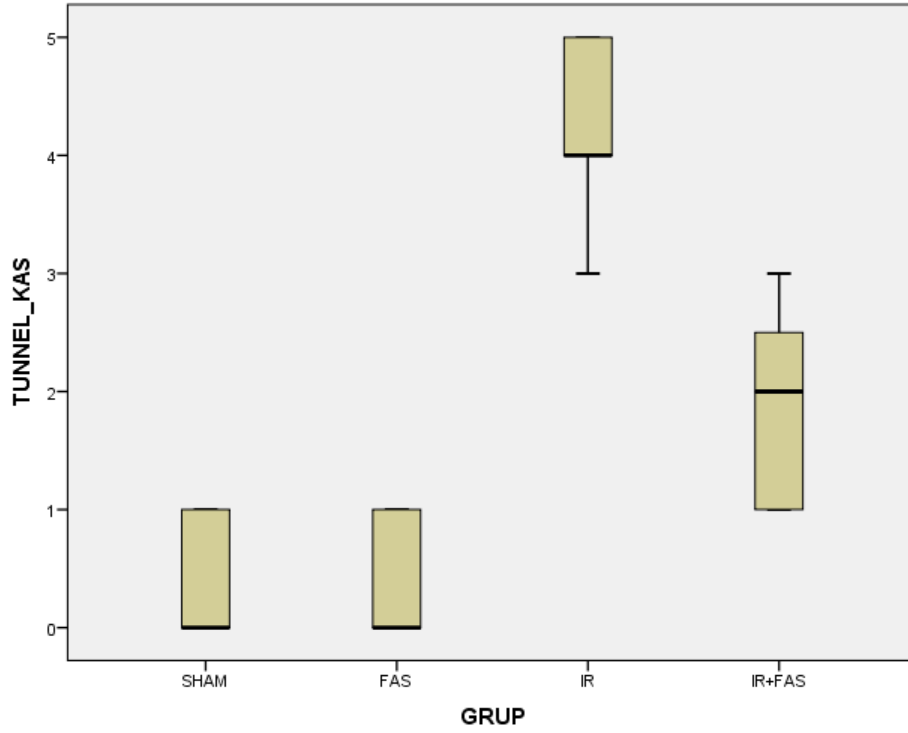


Resim 14 Grup IR' deki Tunnel yöntemi ile hazırlanmış, ışık mikroskopi x20 büyütmedeki boyanan DNA parçalanmaları böbrek dokusu hücreleridir.

### 4.3.2. KASDA TUNNEL ÖLÇÜMÜ

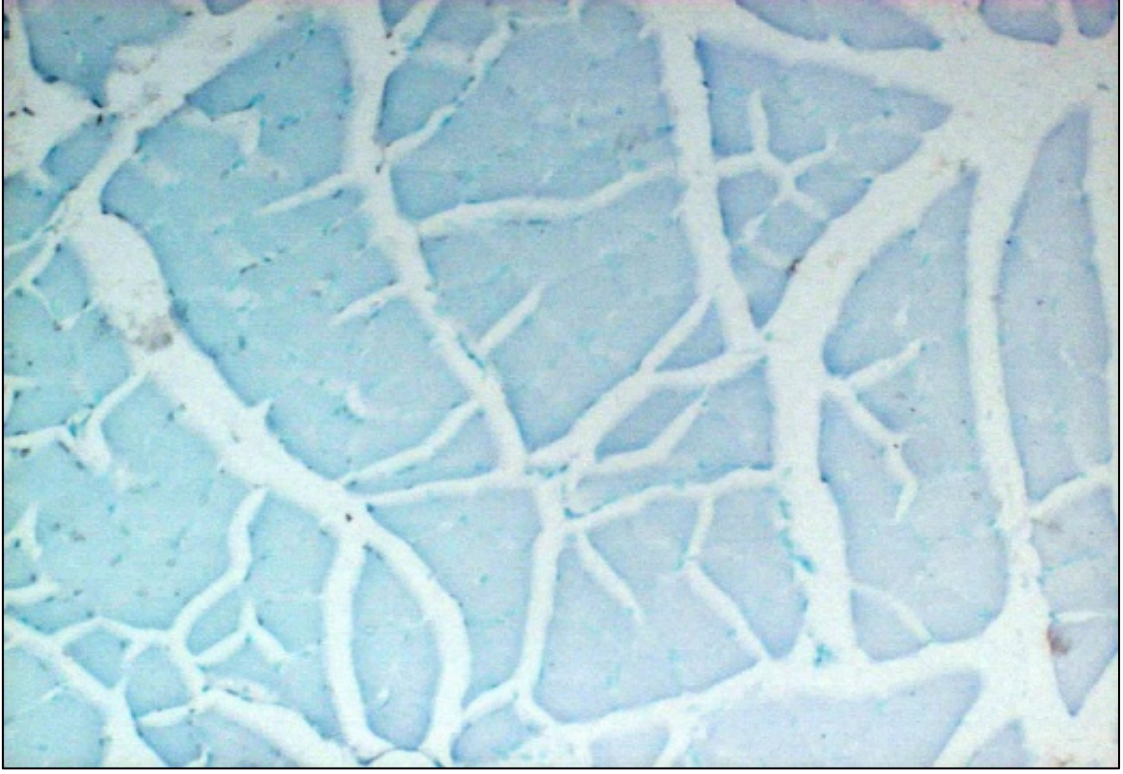
TUNNEL yüzde oranları en fazla IR grubunda görüldü. IR+FAS grubunda %1'in üzerinde bir orana sahipti. SHAM ve FAS gruplarında ise birbirine eşit ve %1'in oldukça altında bir değere sahipti (Tablo 30, 31). IR artan hasar yükünün IR-FAS grubu ile anlamlı bir şekilde azalttığı görüldü.

Tablo 30 Gruplara göre kas TUNNEL ölçüm değerleri

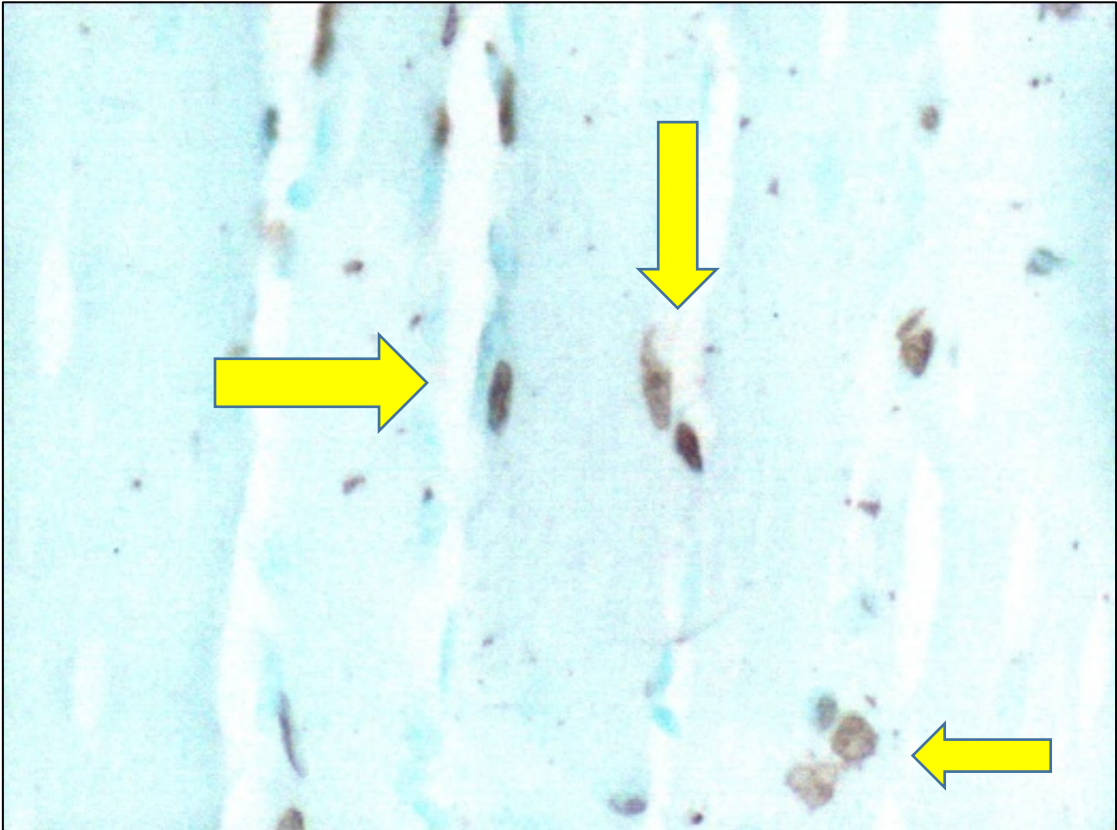


Tablo 31 Gruplara göre kas ölçümleri karşılaştırmaları

KAS	SHAM	FAS	IR	IR+FAS	<i>p</i>
	Ortalama±SS (Medyan, min, maks)				
TUNNEL (%)	0,38±0,52 (0;0;1) <sup>a</sup>	0,38±0,52 (0;0;1) <sup>b</sup>	4,25±0,71 (4;3;5) <sup>a,b</sup>	1,88±0,84 (2;1;3)	<0,001*



Resim 15 Grup Sham' da ki Tunnel yöntemi ile hazırlanmış, ışık mikroskopi x4 büyütmedeki %0 boyanmış normal kas dokusu.

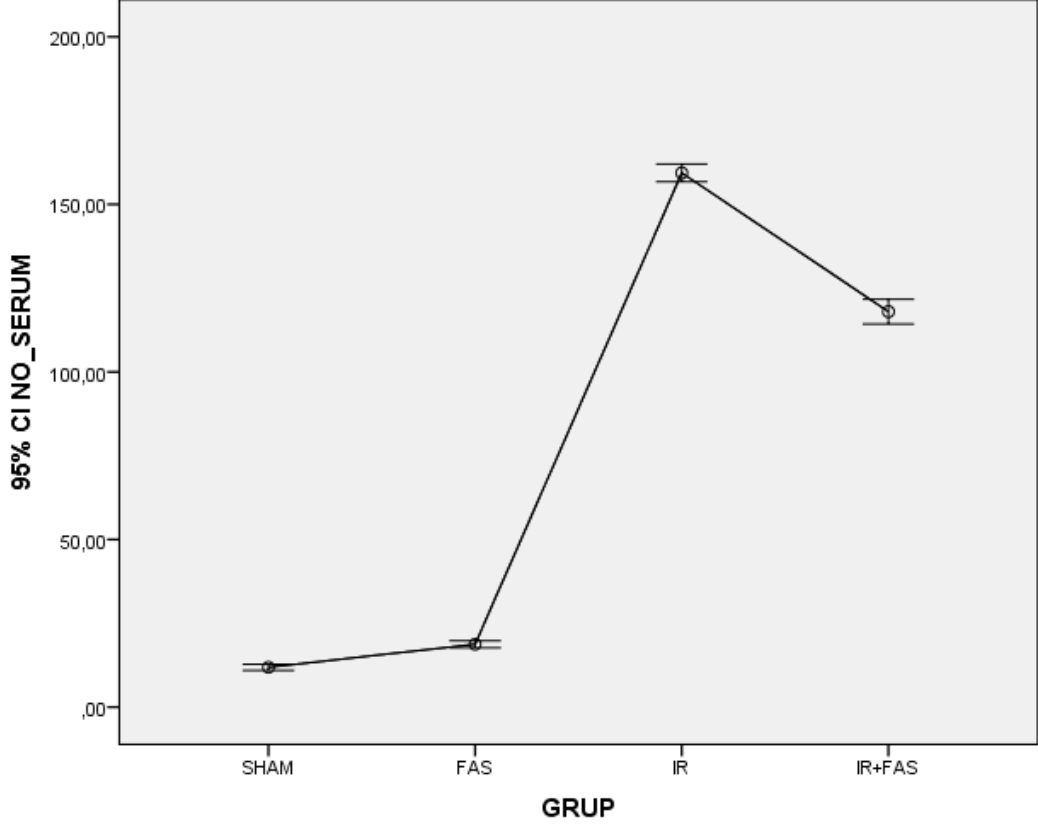


Resim 16 Grup IR' deki Tunnel yöntemi ile hazırlanmış, ışık mikroskopi x40 büyütmedeki boyanan DNA parçalanmaları içeren kas dokusu hücreleridir.

## 4.4. SERUMDA NO, İNOS, TOS, TAS VE ROCK ÖLÇÜMLERİ

### 4.4.1. SERUM NO ÖLÇÜMLERİ

Grafik 1 Serum NO seviyeleri ile gruplar arası ilişki



SHAM grubunda serum NO seviyeleri  $11,88 \pm 1,13$   $\mu\text{mol/L}$  olarak ölçüldü. Minimum değer  $10$   $\mu\text{mol/L}$  iken maksimum değer  $13$  olarak ölçüldü  $\mu\text{mol/L}$ . Ortalama değer  $10$   $\mu\text{mol/L}$  olarak hesaplandı (Grafik 1, tablo 32).

FAS grubunda serum NO seviyeleri  $18,75 \pm 1,28$   $\mu\text{mol/L}$  olarak ölçüldü. Minimal değer  $17$   $\mu\text{mol/L}$ , maksimum değer  $21$   $\mu\text{mol/L}$ , ortalama değer  $18,5$   $\mu\text{mol/L}$  olarak ölçüldü (Grafik 1, tablo 32).

IR grubunda serum NO seviyeleri  $159,38 \pm 3,16$   $\mu\text{mol/L}$  olarak ölçüldü. Minimal değer  $155$   $\mu\text{mol/L}$ , maksimum değer  $164$   $\mu\text{mol/L}$ , ortalama değer  $160$   $\mu\text{mol/L}$  olarak ölçüldü

(Grafik 1, tablo 32).

IRH+FAS grubunda serum NO seviyeleri  $118\pm4,41$   $\mu\text{mol/L}$  olarak ölçüldü. Minimal değer  $114$   $\mu\text{mol/L}$ , maksimum değer  $127$   $\mu\text{mol/L}$ , ortalama değer  $116,5$   $\mu\text{mol/L}$  olarak ölçüldü (Grafik 1, tablo 32).

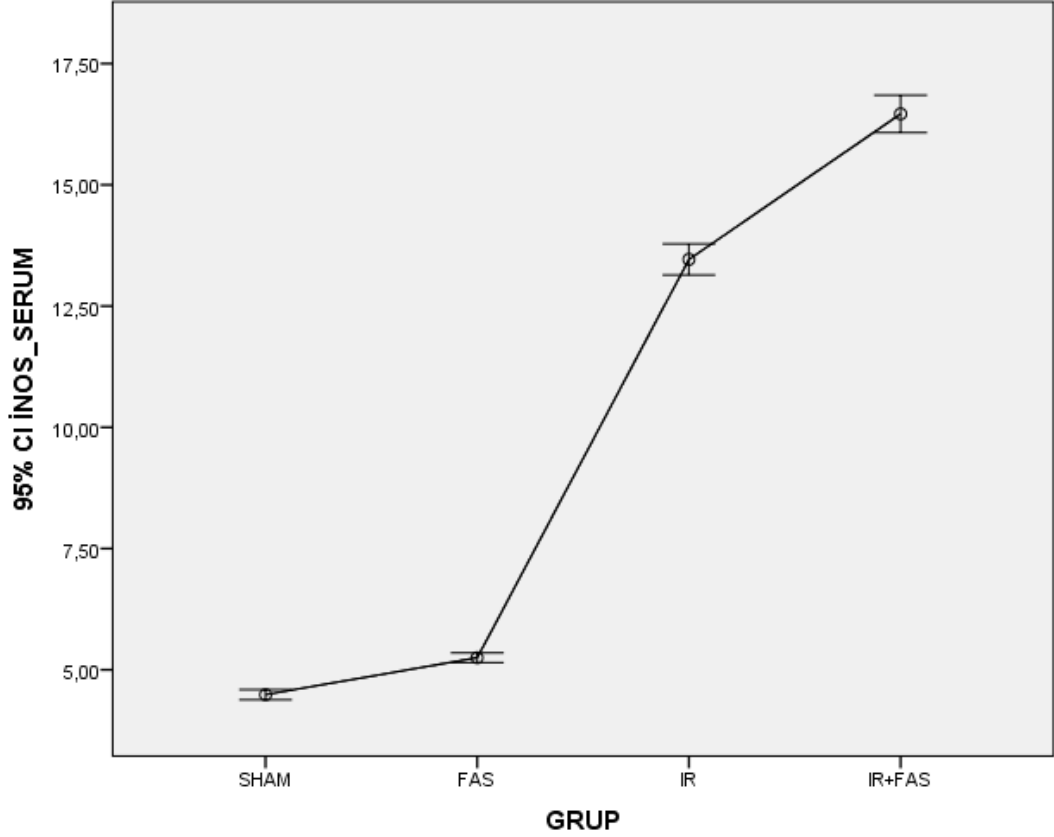
Ölçümlerin tamamının gruplar arasında önemli düzeyde anlamlı farklılık gösterdiği görüldü ( $p<0,001$ ). NO ölçümlerinde en yüksek ortalama IR grubunda görüldü ( $159,38\pm3,16$   $\mu\text{mol/L}$ ). IR grubu ortalaması ile SHAM ve FAS ortalamaları arasında anlamlı fark vardı ( $p<0,001$ ). IR+FAS grubunda da ortalamanın  $118,0\pm4,41$   $\mu\text{mol/L}$  olduğu görülürken SHAM ve FAS grubunda belirgin düzeyde düşük ortalama değerleri elde edildi (Grafik 1, Tablo 32).

Tablo 32 Gruplara göre serum ölçümleri karşılaştırmaları

SERUM	SHAM	FAS	IR	IR+FAS	
Ortalama $\pm$ SS (Medyan, min, maks)					<i>p</i>
NO ( $\mu\text{mol/L}$ )	$11,88\pm1,13$ (12;10;13) <sup>a,b</sup>	$18,75\pm1,28$ (18,5;17;21) <sup>c</sup>	$159,38\pm3,16$ (160;155;164) <sup>b,c</sup>	$118\pm4,41$ (116,5;114;127) <sup>a</sup>	$<0,001$ *
İNOS (ng/mL)	$4,49\pm0,12$ (4,5; 4,3; 4,7) <sup>a,b</sup>	$5,25\pm0,12$ (5,25; 5,1; 5,4) <sup>c</sup>	$13,46\pm0,38$ (13,45;12,9;14,2) <sup>a</sup>	$16,46\pm0,46$ (16,4;15,9;17,4) <sup>b,c</sup>	$<0,001$ *
ROCK (ng/mL)	$8,19\pm0,29$ (8,15;7,8;8,7) <sup>c</sup>	$20,23\pm0,72$ (20,2;18,9;21) <sup>a,c</sup>	$3,85\pm0,21$ (3,8;3,6;4,2) <sup>a,b</sup>	$12,23\pm0,4$ (12,25;11,4;12,7) <sup>b</sup>	$<0,001$ *
TAS (mmol/L)	$1,66\pm0,04$ (1,65;1,61;1,72) <sup>b</sup>	$2,03\pm0,08$ (2,04;1,87;2,15) <sup>a,c</sup>	$0,63\pm0,03$ (0,63;0,58;0,67) <sup>a,b</sup>	$0,95\pm0,03$ (0,95;0,91;0,99) <sup>c</sup>	$<0,001$ *
TOS ( $\mu\text{mol/L}$ )	$8,06\pm0,15$ (8,1;7,9;8,3) <sup>b</sup>	$4,18\pm0,09$ (4,15;4,1;4,3) <sup>a,c</sup>	$18,94\pm0,64$ (18,85;18,2;19,9) <sup>a,b</sup>	$12,83\pm0,34$ (12,85;12,4;13,3) <sup>c</sup>	$<0,001$ *

#### 4.4.2. SERUM iNOS ENZİM MİKTARI ÖLÇÜMLERİ

Grafik 2 Serum iNOS seviyeleri ile gruplar arası ilişki



SHAM grubunda serum iNOS seviyeleri  $4,49\pm 0,12$  ng/mL olarak ölçüldü. Minimum 4,3 değer iken maksimum değer 4,7 ng/mL olarak ölçüldü. Ortalama değer 4,5 olarak ölçüldü (Grafik 2, tablo 32).

FAS grubu serum iNOS seviyeri  $5,25\pm 0,12$  ng/mL olarak ölçüldü. Minimal değer 5,1 ng/mL, maksimum değer 5,4 ng/mL, ortalama değer 5,25 ng/mL olarak ölçüldü (Grafik 2, tablo 32).

IR grubunda serum iNOS seviyeri  $13,46\pm 0,38$  ng/mL olarak ölçüldü. Minimal değer 12,9 ng/mL, maksimum değer 14,2 ng/mL, ortalama değer 13,45 ng/mL olarak ölçüldü (Grafik 2, tablo 32).

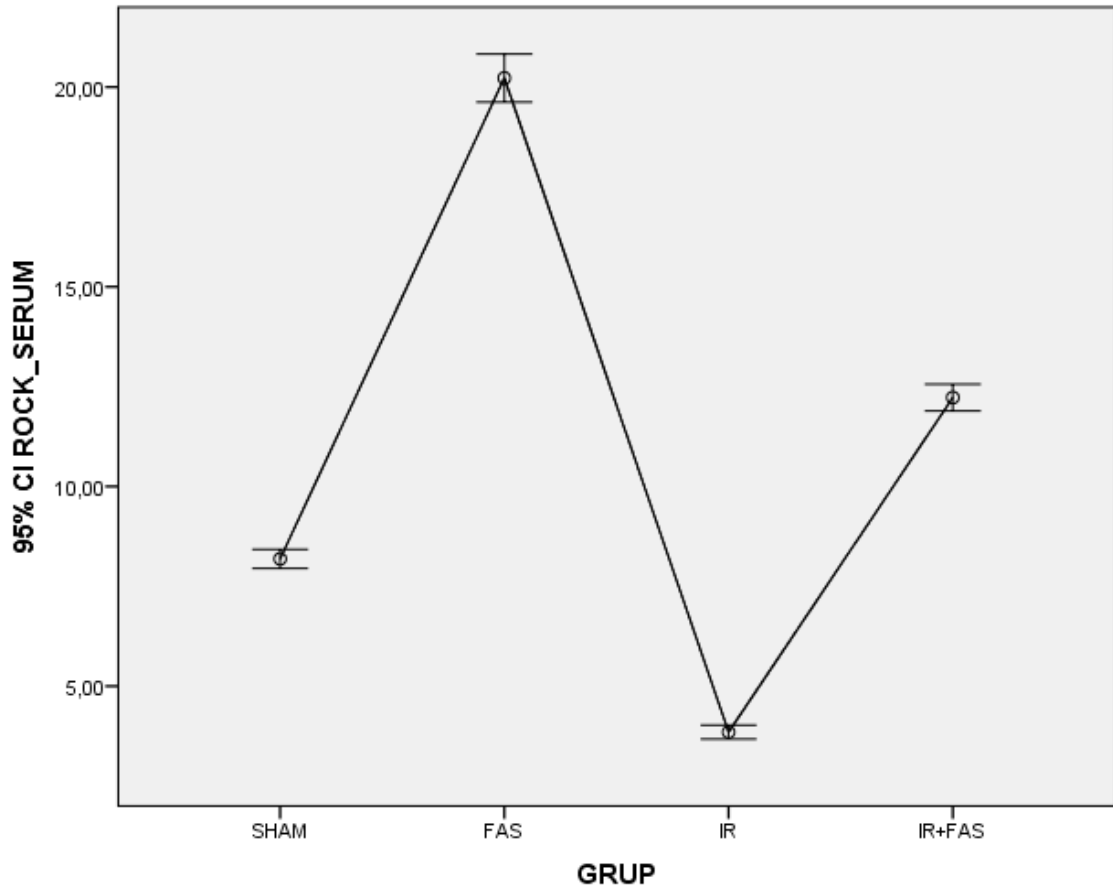
IR+FAS grubunda iNOS seviyeleri  $16,46\pm 0,46$  ng/mL olarak ölçüldü. Minimal

değer 15,9 ng/mL, maksimum değer 17,4 ng/mL, ortalama değer 16,4 ng/mL olarak ölçüldü (Grafik 2, tablo 32).

İNOS ölçümlerinde ise en yüksek ortalama değer IR+FAS grubuna ( $16,46 \pm 0,46$  ng/mL) aitti. IR grubunda ise buna yakın bir değer hesaplandı ( $13,46 \pm 0,38$  ng/mL). Enzim miktarındaki artışın IR+FAS grubunda IR grubuna göre %22,3 lük enzim miktarının artışı görüldü. IR ile SHAM grubu, FAS ile IR+FAS grubu arasındaki iNOS ortalamaları farkı anlamlıydı (tablo 32).

#### 4.4.3. SERUM ROCK İNHİBİSYONU ÖLÇÜMLERİ

Grafik 3 Gruplara göre serumda ROCK ölçümleri



SHAM grubunda ROCK inhibisyon seviyesi  $8,19 \pm 0,29$  ng/mL olarak ölçüldü. Minimum değer 7,8 ng/mL, maksimum değer 8,7 ng/mL, ortalama değer 8,15 ng/mL olarak ölçüldü (Grafik 3, tablo 32).

FAS grubunda ROCK inhibisyonu seviyesi  $20,23\pm 0,72$  olarak ölçüldü. Minimum değer  $18,9$  ng/mL, maksimum değer  $21$  ng/mL  $20,2$  ng/mL olarak ölçüldü (Grafik 3, tablo 32).

IR grubunda ROCK inhibisyonu seviyesi  $3,85\pm 0,21$  ng/mL olarak ölçüldü (Grafik 3, tablo 30). Minimum değer  $3,6$  ng/mL, maksimum değer  $4,2$  ng/mL, ortalama değer  $3,8$  ng/mL olarak ölçüldü.

IR+FAS grubunda ROCK inhibisyonu seviyesi  $12,23\pm 0,4$  ng/mL olarak ölçüldü. Minimum değer  $11,4$  ng/mL, maksimum değer  $12,7$  ng/mL, ortalama değer  $12,25$  ng/mL olarak ölçüldü (Grafik 3, tablo 32).

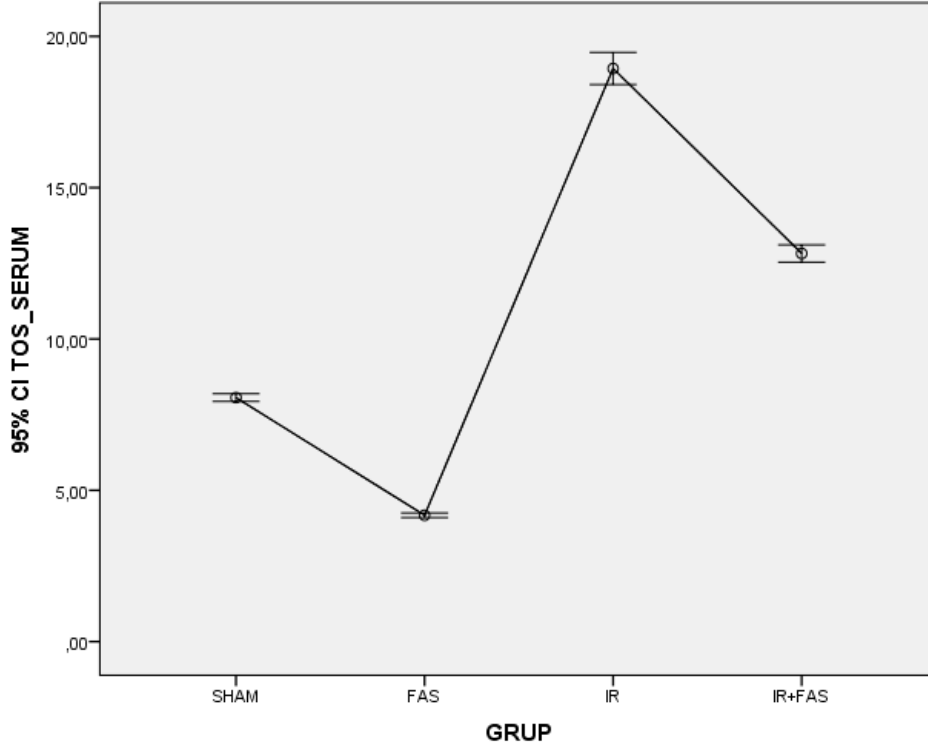
ROCK ölçümlerinde durum tam tersi idi. IR grubunda en düşük ortalama elde edilirken ( $3,85\pm 0,21$  ng/mL) en yüksek orta-lama FAS grubunda ortaya çıktı ( $20,23\pm 0,72$  ng/mL). SHAM grubunda ROCK değerleri biraz artış gösterirken IR+FAS grubunda FAS grubuna daha yakın bir ortalama elde edildi (Grafik 3, tablo 32).

Tablo 32 Gruplara göre serum ölçümleri karşılaştırmaları

SERUM	SHAM	FAS	IR	IR+FAS	<i>p</i>
Ortalama±SS (Medyan, min, maks)					
NO ( $\mu\text{mol/L}$ )	$11,88\pm 1,13$ (12;10;13) <sup>a,b</sup>	$18,75\pm 1,28$ (18,5;17;21) <sup>c</sup>	$159,38\pm 3,16$ (160;155;164) <sup>b,c</sup>	$118\pm 4,41$ (116,5;114;127) <sup>a</sup>	$<0,001^*$
İNOS (ng/mL)	$4,49\pm 0,12$ (4,5; 4,3; 4,7) <sup>a,b</sup>	$5,25\pm 0,12$ (5,25; 5,1; 5,4) <sup>c</sup>	$13,46\pm 0,38$ (13,45;12,9;14,2) <sup>a</sup>	$16,46\pm 0,46$ (16,4;15,9;17,4) <sup>b,c</sup>	$<0,001^*$
ROCK (ng/mL)	$8,19\pm 0,29$ (8,15;7,8;8,7) <sup>c</sup>	$20,23\pm 0,72$ (20,2;18,9;21) <sup>a,c</sup>	$3,85\pm 0,21$ (3,8;3,6;4,2) <sup>a,b</sup>	$12,23\pm 0,4$ (12,25;11,4;12,7) <sup>b</sup>	$<0,001^*$
TAS (mmol/L)	$1,66\pm 0,04$ (1,65;1,61;1,72) <sup>b</sup>	$2,03\pm 0,08$ (2,04;1,87;2,15) <sup>a,c</sup>	$0,63\pm 0,03$ (0,63;0,58;0,67) <sup>a,b</sup>	$0,95\pm 0,03$ (0,95;0,91;0,99) <sup>c</sup>	$<0,001^*$
TOS ( $\mu\text{mol/L}$ )	$8,06\pm 0,15$ (8,1;7,9;8,3) <sup>b</sup>	$4,18\pm 0,09$ (4,15;4,1;4,3) <sup>a,c</sup>	$18,94\pm 0,64$ (18,85;18,2;19,9) <sup>a,b</sup>	$12,83\pm 0,34$ (12,85;12,4;13,3) <sup>c</sup>	$<0,001^*$

#### 4.4.4. SERUM TOS ÖLÇÜMÜ

Grafik 4 Gruplara göre serumda TOS ölçüm değerleri



TOS ortalamaları incelendiğinde ise durum biraz farklıydı. En yüksek değerler IR grubuna aitken en düşük ortalama FAS grubunda gözlemlendi.

SHAM grubunda serum TOS seviyesi  $8,06 \pm 0,15$   $\mu\text{mol/L}$  olarak ölçüldü. Minimum değer  $7,9$   $\mu\text{mol/L}$ , maksimum değer  $8,3$   $\mu\text{mol/L}$ , ortalama değer  $8,1$   $\mu\text{mol/L}$  olarak ölçüldü (Grafik 4, tablo 32).

FAS grubunda serum TOS seviyesi  $4,18 \pm 0,09$   $\mu\text{mol/L}$  olarak ölçüldü. Minimal değer  $4,1$   $\mu\text{mol/L}$ , maksimum  $4,3$  değer  $\mu\text{mol/L}$ , ortalama değer  $4,15$   $\mu\text{mol/L}$  olarak ölçüldü (Grafik 4, tablo 32).

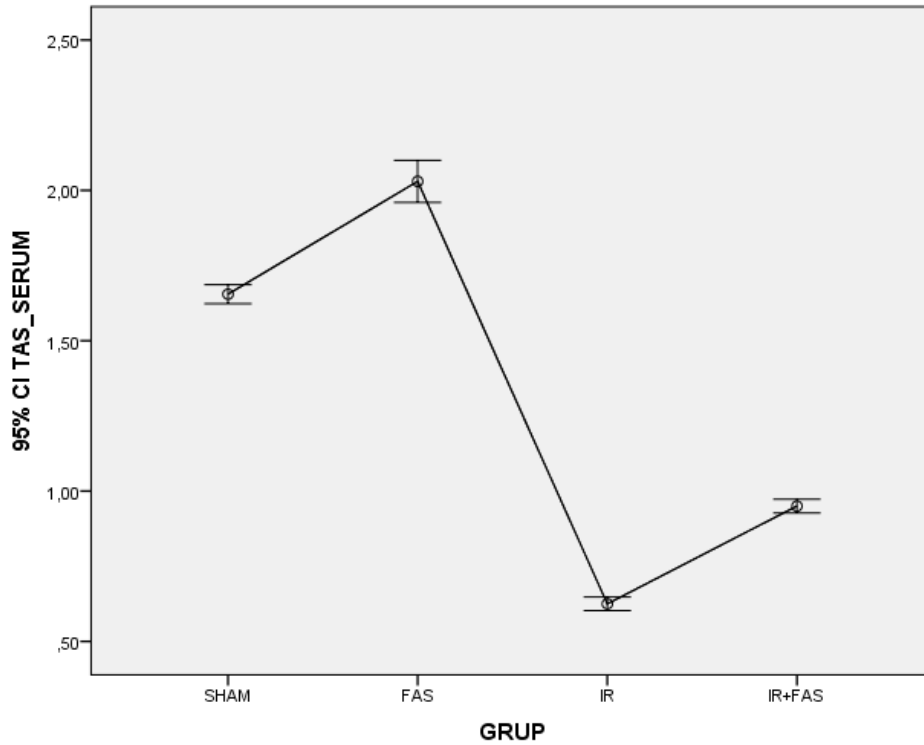
IR grubunda TOS seviyesi  $18,94 \pm 0,64$   $\mu\text{mol/L}$  olarak ölçüldü. Minimal değer  $18,2$   $\mu\text{mol/L}$ , maksimum  $19,9$  değer  $\mu\text{mol/L}$ , ortalama değer  $18,85$   $\mu\text{mol/L}$  olarak ölçüldü (Grafik 4, tablo 32).

IR+FAS grubunda TOS seviyesi  $12,83 \pm 0,34$   $\mu\text{mol/L}$  olarak ölçüldü. Minimal değer  $12,4$   $\mu\text{mol/L}$ , maksimum  $13,3$  değer  $\mu\text{mol/L}$ , ortalama değer  $12,85$   $\mu\text{mol/L}$  olarak ölçüldü (Grafik 4, tablo 32).

SHAM grubu ile IR grubu arasında, FAS grubu ile IR grubu arasında FAS grubu ile IR FAS grubu arasında anlamlı fark bulundu ( $p < 0,001$ ) (Grafik 4, tablo 32).

#### 4.4.5. SERUM TAS ÖLÇÜMÜ

Grafik 5 Gruplara göre serumda TAS ölçüm değerleri



TAS değerleri SHAM ve FAS grubunda daha yüksek ortalamaya sahipken IR ve IR+FAS gruplarında düşük değerlere sahip olduğu görüldü. SHAM ile IR, FAS ile IR ve FAS ile IR+FAS grupları arasındaki farklar anlamlıydı (Grafik 5).

SHAM grubunda serum TAS seviyesi  $1,66 \pm 0,04$   $\text{mmol/L}$  olarak ölçüldü. Minimum değer  $1,61$   $\text{mmol/L}$ , maksimum değer  $1,72$   $\text{mmol/L}$ , ortalama değer  $1,65$   $\text{mmol/L}$  olarak ölçüldü (Grafik 5, tablo 32).

FAS grubunda serum TAS seviyesi  $2,03\pm 0,08$  mmol/L olarak ölçüldü. Minimum değer 1,87 mmol/L, maksimum değer 2,15 mmol/L, ortalama değer 2,04 mmol/L olarak ölçüldü (Grafik 5, tablo 32).

IR grubunda serum TAS seviyesi  $0,63\pm 0,03$  mmol/L olarak ölçüldü. Minimum değer 0,58 mmol/L, maksimum değer 0,67 mmol/L, ortalama değer 0,63 mmol/L olarak ölçüldü (Grafik 5, tablo 32).

IR+FAS grubunda TAS seviyesi  $0,95\pm 0,03$  mmol/L olarak ölçüldü. Minimal değer 0,91 mmol/L, maksimum değer 0,99 mmol/L, ortalama değer 0,95 mmol/L olarak ölçüldü (Grafik 5, tablo 32).

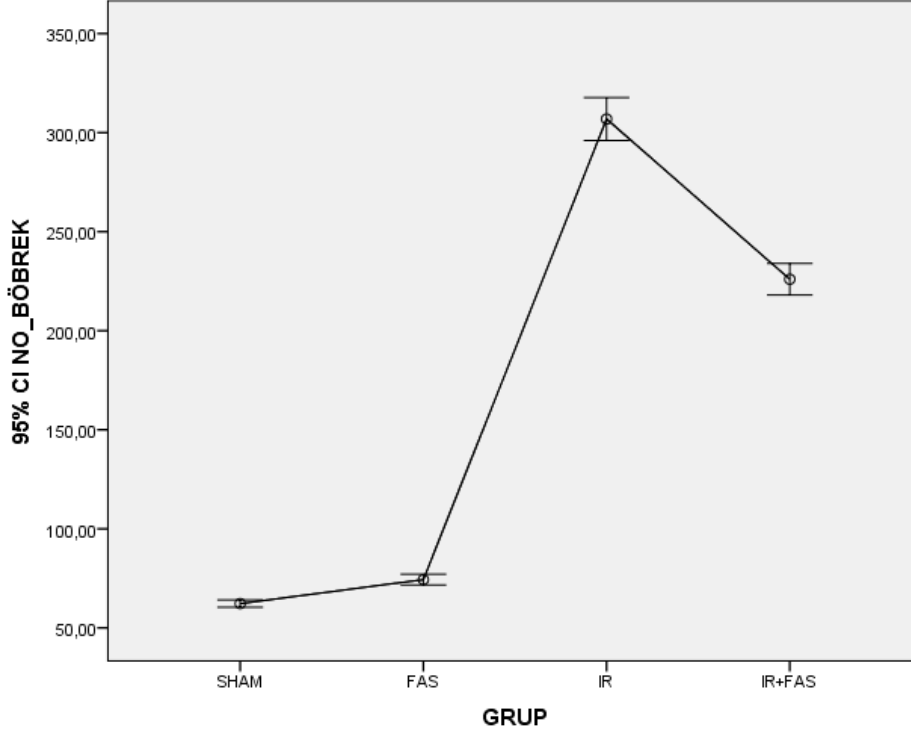
Tablo 32 Gruplara göre serum ölçümleri karşılaştırmaları

SERUM	SHAM	FAS	IR	IR+FAS	<i>p</i>
Ortalama±SS (Medyan, min, maks)					
NO ( $\mu\text{mol/L}$ )	11,88±1,13 (12;10;13) <sup>a,b</sup>	18,75±1,28 (18,5;17;21) <sup>c</sup>	159,38±3,16 (160;155;164) <sup>b,c</sup>	118±4,41 (116,5;114;127) <sup>a</sup>	<0,001*
İNOS (ng/mL)	4,49±0,12 (4,5; 4,3; 4,7) <sup>a,b</sup>	5,25±0,12 (5,25; 5,1; 5,4) <sup>c</sup>	13,46±0,38 (13,45;12,9;14,2) <sup>a</sup>	16,46±0,46 (16,4;15,9;17,4) <sup>b,c</sup>	<0,001*
ROCK (ng/mL)	8,19±0,29 (8,15;7,8;8,7) <sup>c</sup>	20,23±0,72 (20,2;18,9;21) <sup>a,c</sup>	3,85±0,21 (3,8;3,6;4,2) <sup>a,b</sup>	12,23±0,4 (12,25;11,4;12,7) <sup>b</sup>	<0,001*
TAS (mmol/L)	1,66±0,04 (1,65;1,61;1,72) <sup>b</sup>	2,03±0,08 (2,04;1,87;2,15) <sup>a,c</sup>	0,63±0,03 (0,63;0,58;0,67) <sup>a,b</sup>	0,95±0,03 (0,95;0,91;0,99) <sup>c</sup>	<0,001*
TOS ( $\mu\text{mol/L}$ )	8,06±0,15 (8,1;7,9;8,3) <sup>b</sup>	4,18±0,09 (4,15;4,1;4,3) <sup>a,c</sup>	18,94±0,64 (18,85;18,2;19,9) <sup>a,b</sup>	12,83±0,34 (12,85;12,4;13,3) <sup>c</sup>	<0,001*

## 4.5. BÖBREKDE NO, İNOS, TOS, TAS VE ROCK ÖLÇÜMLERİ

### 4.5.1. BÖBREK NO ÖLÇÜMÜ

Grafik 6 Gruplara göre böbrek NO ölçüm değerleri



SHAM grubunda böbrek NO seviyesi  $62,25 \pm 2,25$   $\mu\text{mol/L}$  olarak ölçüldü. Minimum değer  $59$   $\mu\text{mol/L}$ , maksimum değer  $66$   $\mu\text{mol/L}$ , ortalama değer  $62,5$   $\mu\text{mol/L}$  olarak ölçüldü (Grafik 6, tablo 33).

FAS grubunda böbrek NO seviyesi  $74,38 \pm 3,25$   $\mu\text{mol/L}$  olarak ölçüldü. Minimum değer  $70$   $\mu\text{mol/L}$ , maksimum değer  $79$   $\mu\text{mol/L}$ , ortalama değer  $74,5$   $\mu\text{mol/L}$  olarak ölçüldü (Grafik 6, tablo 33).

IR grubunda böbrek NO seviyesi  $306,88 \pm 12,98$   $\mu\text{mol/L}$  olarak ölçüldü. Minimum değer  $288$   $\mu\text{mol/L}$ , maksimum değer  $321$   $\mu\text{mol/L}$ , ortalama değer  $308,5$   $\mu\text{mol/L}$  olarak ölçüldü (Grafik 6, tablo 33).

IR+FAS grubunda böbrek NO seviyesi  $226,0 \pm 9,53$   $\mu\text{mol/L}$  olarak ölçüldü.

Minimum değer 213  $\mu\text{mol/L}$ , maksimum değer 243  $\mu\text{mol/L}$ , ortalama değer 228  $\mu\text{mol/L}$  olarak ölçüldü (Grafik 6, tablo 33).

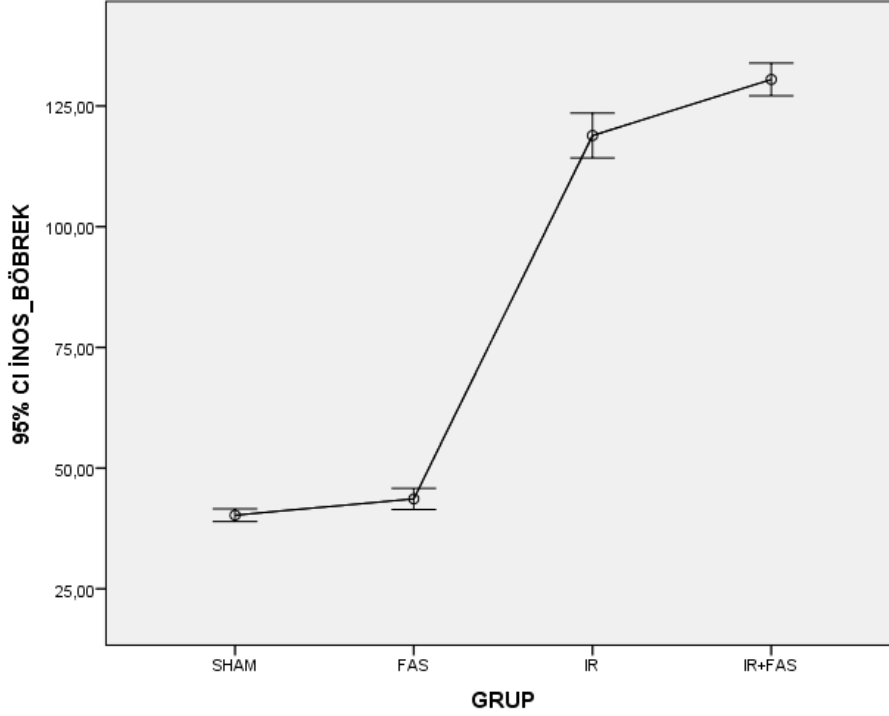
Tablo 33 Gruplara göre böbrek ölçümleri karşılaştırmaları

BÖBREK	SHAM	FAS	IR	IR+FAS	<i>p</i>
Ortalama $\pm$ SS (Medyan, min, maks)					
NO ( $\mu\text{mol/L}$ )	62,25 $\pm$ 2,25 (62,5;59;66) <sup>a,b</sup>	74,38 $\pm$ 3,25 (74,5;70;79) <sup>c</sup>	306,88 $\pm$ 12,98 (308,5;288;321) <sup>b,c</sup>	226,0 $\pm$ 9,53 (228;213;243) <sup>a</sup>	<0,001*
İNOS (ng/mL)	40,25 $\pm$ 1,58 (40,5;38;42) <sup>a,b</sup>	43,63 $\pm$ 2,62 (43,5;40;47) <sup>c</sup>	118,88 $\pm$ 5,54 (120;110;125) <sup>a</sup>	130,5 $\pm$ 4,04 (131;124;136) <sup>b,c</sup>	<0,001*
ROCK (ng/mL)	98,13 $\pm$ 5,91 (99;90;107) <sup>c</sup>	150,63 $\pm$ 4,27 (150,5;144;157) <sup>b,c</sup>	58,88 $\pm$ 2,42 (59;55;62) <sup>a,b</sup>	117,5 $\pm$ 6,3 (119,5;103;122) <sup>a</sup>	<0,001*
TAS (mmol/L)	0,98 $\pm$ 0,05 (0,99;0,92;1,04) <sup>a</sup>	1,21 $\pm$ 0,05 (1,22;1,14;1,29) <sup>b,c</sup>	0,47 $\pm$ 0,02 (0,47;0,43;0,49) <sup>a,b</sup>	0,62 $\pm$ 0,02 (0,62;0,58;0,64) <sup>c</sup>	<0,001*
TOS ( $\mu\text{mol/L}$ )	47,00 $\pm$ 2,33 (47;44;50) <sup>a,b</sup>	56,63 $\pm$ 2,20 (57;54;60) <sup>c</sup>	162,75 $\pm$ 8,40 (160,5;153;175) <sup>b,c</sup>	144,88 $\pm$ 6,27 (144;137;154) <sup>a</sup>	<0,001*
TUNNEL (%)	0,25 $\pm$ 0,46 (0;0;1) <sup>a</sup>	0,75 $\pm$ 0,89 (0,5;0;2) <sup>b</sup>	5,88 $\pm$ 1,36 (5,5;4;8) <sup>a,b</sup>	2,13 $\pm$ 0,84 (2;1;3)	<0,001*

Çalışmada, hayvanların böbreklerinde yapılan ölçümlerin gruplar bazında ortalama değerleri tablo 33' de verildi. Serum çalışmasında olduğu gibi tüm ölçüm yapılan değişkenler gruplar arasında önemli düzeyde farklılık gösterdi ( $p < 0,001$ ). NO ölçümlerine ilişkin ortalama değerleri en yüksek IR grubunda görüldü (306,88 $\pm$ 12,98  $\mu\text{mol/L}$ ). IR grubu ile SHAM ve FAS grupları arasında anlamlı farklılık vardı. IR+FAS grubunun ortalaması 226,0 $\pm$ 9,53  $\mu\text{mol/L}$  gibi yüksek bir değere sahipken FAS ve SHAM gruplarında oldukça düşük değerler hesaplandı (Tablo 33).

## 4.5.2. BÖBREK iNOS ÖLÇÜMÜ

Grafik 7 Gruplara göre böbrek iNOS ölçüm değerleri



SHAM grubunda böbrekde iNOS değeri  $40,25\pm 1,58$  ng/mL olarak ölçüldü. Minimum değer 38 ng/mL, maksimum değer 42 ng/mL, ortalama değer 40,5 ng/mL olarak ölçüldü (Grafik 7, tablo 33).

FAS grubunda böbrekde iNOS değeri  $43,63\pm 2,62$  ng/mL olarak ölçüldü. Minimum değeri 40 ng/mL, maksimum 47 ng/mL, ortalama  $43,5$  ng/mL olarak ölçüldü (Grafik 7, tablo 33).

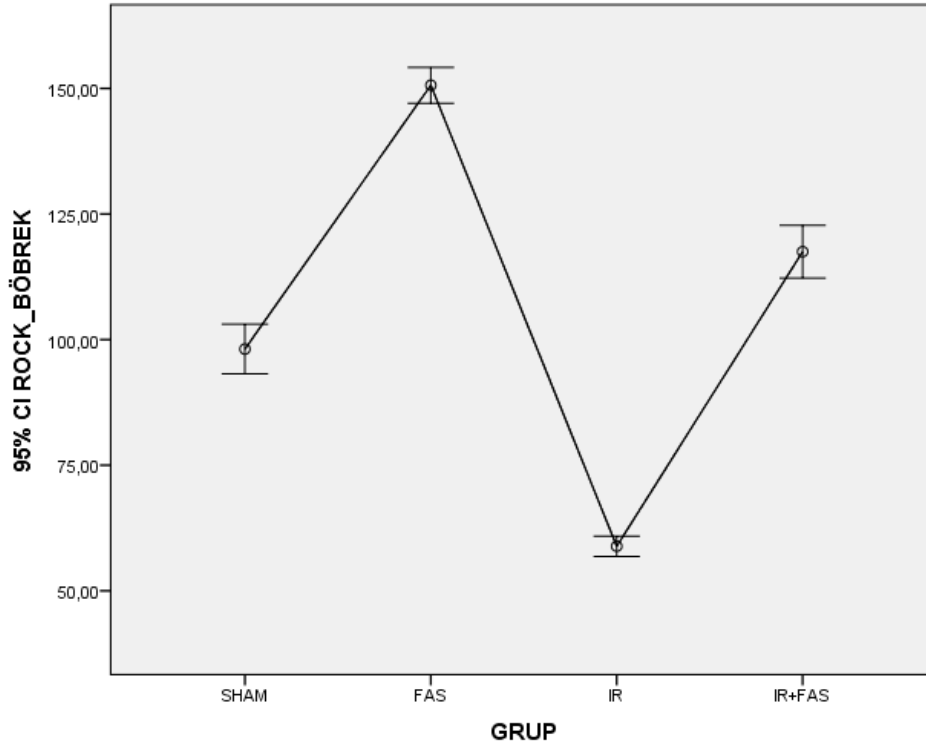
IR grubunda böbrek iNOS değeri  $118,88\pm 5,54$  ng/mL olarak ölçüldü. Minimum değeri 110 ng/mL, maksimum değer 125 ng/mL, ortalama 120 ng/mL olarak ölçüldü (Grafik 7, tablo 33).

IR+FAS grubunda böbrek iNOS değeri  $130,5\pm 4,04$  ng/mL olarak ölçüldü. Minimum değer 124 ng/mL, maksimum değer 136 ng/mL, ortalama değer 131 ng/mL olarak ölçüldü (Grafik 7, tablo 33).

En yüksek ortalama İNOS değeri IR+FAS grubunda ( $130,5 \pm 4,04$  ng/mL) görüldü. Sonra sırasıyla IR, FAS ve SHAM grubu değerleri geliyordu. SHAM grubu IR ve IR+FAS gruplarından farklı, IR+FAS ve FAS grupları birbirinden farklı ortalama sonuçlarına sahiptirler (Grafik 7, tablo 33).

#### 4.5.3. BÖBREK ROCK İNHİBİSYONU ÖLÇÜMLERİ

Grafik 8 Gruplara göre böbrek ROCK ölçüm değerleri



SHAM grubunda böbrek ROCK inhibisyon değeri  $98,13 \pm 5,91$  ng/mL olarak ölçüldü. Minimum değer 90 ng/mL, maksimum değer 107 ng/mL, ortalama değer 99 ng/mL olarak ölçüldü (Grafik 8, tablo 33).

FAS grubunda böbrek ROCK inhibisyon değeri  $150,63 \pm 4,27$  ng/mL olarak ölçüldü. Minimum değer 144 ng/mL, maksimum değer 157 ng/mL ng/mL, ortalama  $150,5$  ng/mL olarak ölçüldü (Grafik 8, tablo 33).

IR grubunda böbrek ROCK inhibisyon değeri  $58,88 \pm 2,42$  ng/mL olarak ölçüldü. Minimum değer 55 ng/mL, maksimum değer 62 ng/mL, ortalama değer 59 ng/mL olarak

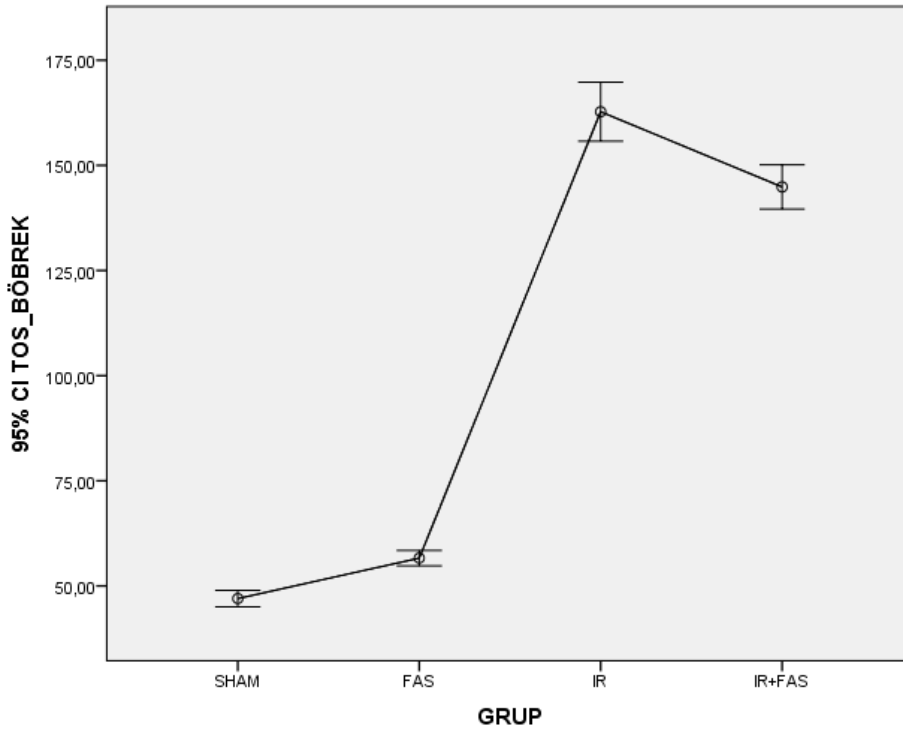
ölçüldü (Grafik 8, tablo 33).

IR+FAS grubunda böbrek ROCK inhibisyon değeri  $117,5 \pm 6,3$  ng/mL olarak ölçüldü. Minimum değer 103 ng/mL, maksimum değer 122 ng/mL, ortalama değer 119,5 ng/mL olarak ölçüldü (Grafik 8, tablo 33).

ROCK ölçümleri incelendiğinde en yüksek değerlerin FAS ( $150,63 \pm 4,27$  ng/mL) ve IR+FAS ( $117,5 \pm 6,3$  ng/mL) gruplarında olduğu görüldü. SHAM grubunda 100 ng/mL, IR grubunda ise bu değer yarısı civarında bir ortalama karşımıza çıktı (Grafik 8, tablo 33).

#### 4.5.4. BÖBREK TOS ÖLÇÜMÜ

*Grafik 9 Gruplara göre böbrek TOS ölçüm değerleri*



SHAM grubunda böbrek TOS değeri  $47,00 \pm 2,33$   $\mu\text{mol/L}$  olarak ölçüldü. Minimum değer 44  $\mu\text{mol/L}$ , maksimum değer 50  $\mu\text{mol/L}$ , ortalama değer 47  $\mu\text{mol/L}$  olarak ölçüldü (Grafik 9, tablo 32).

FAS grubunda böbrek TOS değeri  $56,63 \pm 2,20$   $\mu\text{mol/L}$  olarak ölçüldü. Minimum

değer 54 µmol/L, maksimum değer 60, ortalama değer 57 µmol/L olarak ölçüldü (Grafik 9, tablo 32).

IR grubunda böbrek TOS değeri 162,75±8,40 µmol/L olarak ölçüldü. Minimum değer 153 µmol/L, maksimum değer 175 µmol/L, ortalama değer 160,5 µmol/L olarak ölçüldü (Grafik 9, tablo 32).

IR+FAS grubunda böbrek TOS değeri 144,88±6,27 µmol/L olarak ölçüldü. Minimum değer 137 µmol/L, maksimum değer 154 µmol/L, ortalama değer 144 µmol/L olarak ölçüldü (Grafik 9, tablo 32).

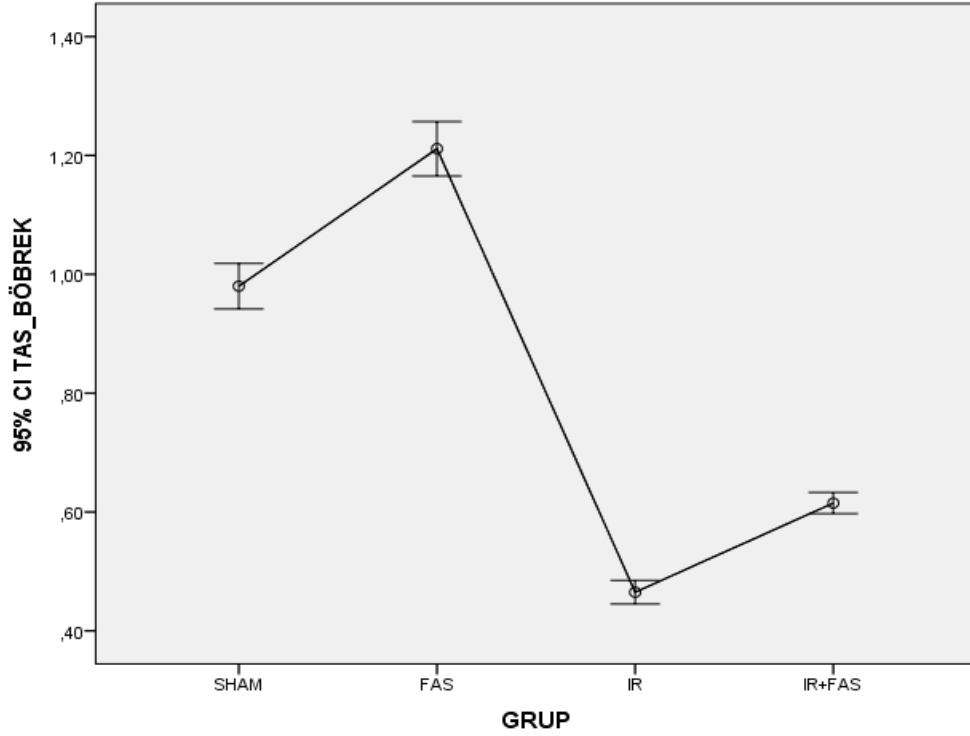
IR ve IR+FAS gruplarında yüksek TOS değerleri görülürken FAS ve SHAM grubunda daha düşük TOS değerleri izlendi (Grafik 9, tablo 32).

Tablo 32 Gruplara göre böbrek ölçümleri karşılaştırmaları

BÖBREK	SHAM	FAS	IR	IR+FAS	<i>p</i>
	<b>Ortalama±SS (Medyan, min, maks)</b>				
NO (µmol/L)	62,25±2,25 (62,5;59;66) <sup>a,b</sup>	74,38±3,25 (74,5;70;79) <sup>c</sup>	306,88±12,98 (308,5;288;321) <sup>b,c</sup>	226,0±9,53 (228;213;243) <sup>a</sup>	<0,001*
İNOS (ng/mL)	40,25±1,58 (40,5;38;42) <sup>a,b</sup>	43,63±2,62 (43,5;40;47) <sup>c</sup>	118,88±5,54 (120;110;125) <sup>a</sup>	130,5±4,04 (131;124;136) <sup>b,c</sup>	<0,001*
ROCK (ng/mL)	98,13±5,91 (99;90;107) <sup>c</sup>	150,63±4,27 (150,5;144;157) <sup>b,c</sup>	58,88±2,42 (59;55;62) <sup>a,b</sup>	117,5±6,3 (119,5;103;122) <sup>a</sup>	<0,001*
TAS (mmol/L)	0,98±0,05 (0,99;0,92;1,04) <sup>a</sup>	1,21±0,05 (1,22;1,14;1,29) <sup>b,c</sup>	0,47±0,02 (0,47;0,43;0,49) <sup>a,b</sup>	0,62±0,02 (0,62;0,58;0,64) <sup>c</sup>	<0,001*
TOS (µmol/L)	47,00±2,33 (47;44;50) <sup>a,b</sup>	56,63±2,20 (57;54;60) <sup>c</sup>	162,75±8,40 (160,5;153;175) <sup>b,c</sup>	144,88±6,27 (144;137;154) <sup>a</sup>	<0,001*
TUNNEL (%)	0,25±0,46 (0;0;1) <sup>a</sup>	0,75±0,89 (0,5;0;2) <sup>b</sup>	5,88±1,36 (5,5;4;8) <sup>a,b</sup>	2,13±0,84 (2;1;3)	<0,001*

#### 4.5.5. BÖBREKDE TAS ÖLÇÜMÜ

Grafik 10 Gruplara göre böbrek TAS ölçüm değerleri



SHAM grubunda böbrek TAS değeri  $0,98\pm 0,05$  mmol/L olarak ölçüldü. Minimum değer 0,92 mmol/L, maksimum değer 1,04 mmol/L, ortalama değer 0,99 mmol/L olarak ölçüldü (Grafik 10, tablo 33).

FAS grubunda böbrek TAS değeri  $1,21\pm 0,05$  mmol/L olarak ölçüldü. Minimum değer 1,14 mmol/L, maksimum değer 1,29 mmol/L, ortalama değer 1,22 mmol/L olarak ölçüldü (Grafik 10, tablo 33).

IR grubunda böbrek TAS değeri  $0,47\pm 0,02$  mmol/L olarak ölçüldü. Minimum değer 0,43 mmol/L, maksimum değer 0,49 mmol/L, ortalama değer 0,47 mmol/L olarak ölçüldü (Grafik 10, tablo 33).

IR+FAS grubunda TAS değeri  $0,62\pm 0,02$  mmol/L olarak ölçüldü. Minimum değer 0,58 mmol/L, maksimum değer 0,64 mmol/L, ortalama değer 0,62 mmol/L olarak ölçüldü

(Grafik 10, tablo 33).

En yüksek TAS ortalamaları FAS ve SHAM gruplarında izlendi. Sonra sırasıyla IR+FAS ve IR gruplarında 0,50 mmol/L civarında TAS ölçümü hesaplandı (Grafik 10, tablo 33).

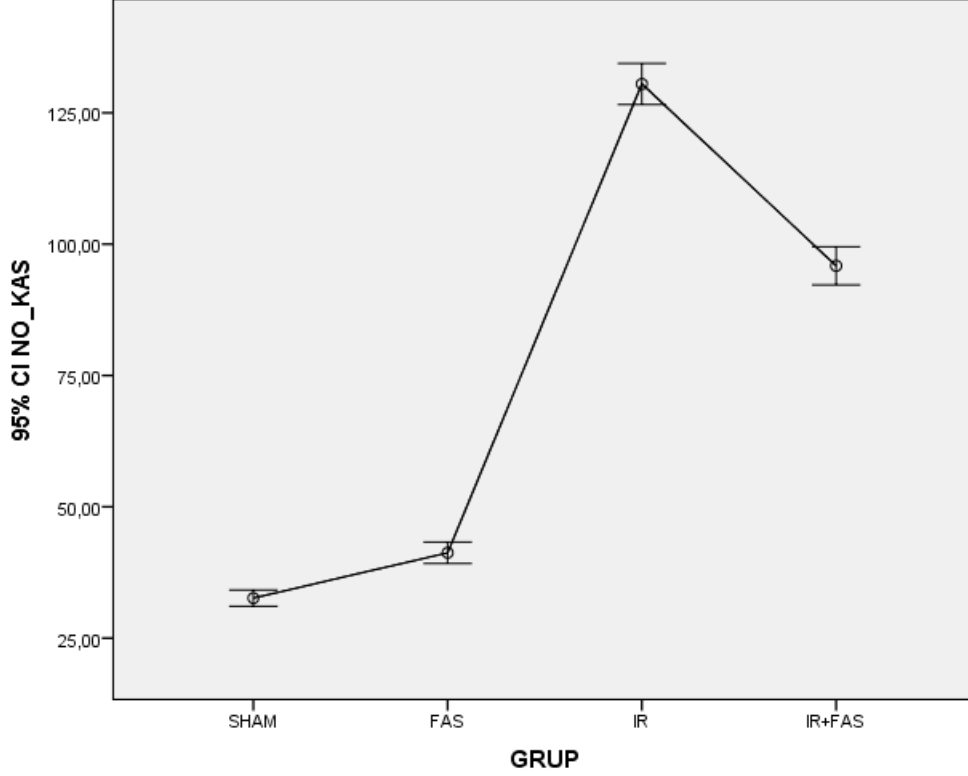
Tablo 33 Gruplara göre böbrek ölçümleri karşılaştırmaları

<b>BÖBREK</b>	<b>SHAM</b>	<b>FAS</b>	<b>IR</b>	<b>IR+FAS</b>	<b>p</b>
	<b>Ortalama±SS (Medyan, min, maks)</b>				
NO ( $\mu\text{mol/L}$ )	62,25±2,25 (62,5;59;66) <sup>a,b</sup>	74,38±3,25 (74,5;70;79) <sup>c</sup>	306,88±12,98 (308,5;288;321) <sup>b,c</sup>	226,0±9,53 (228;213;243) <sup>a</sup>	<0,001*
İNOS (ng/mL)	40,25±1,58 (40,5;38;42) <sup>a,b</sup>	43,63±2,62 (43,5;40;47) <sup>c</sup>	118,88±5,54 (120;110;125) <sup>a</sup>	130,5±4,04 (131;124;136) <sup>b,c</sup>	<0,001*
ROCK (ng/mL)	98,13±5,91 (99;90;107) <sup>c</sup>	150,63±4,27 (150,5;144;157) <sup>b,c</sup>	58,88±2,42 (59;55;62) <sup>a,b</sup>	117,5±6,3 (119,5;103;122) <sup>a</sup>	<0,001*
TAS (mmol/L)	0,98±0,05 (0,99;0,92;1,04) <sup>a</sup>	1,21±0,05 (1,22;1,14;1,29) <sup>b,c</sup>	0,47±0,02 (0,47;0,43;0,49) <sup>a,b</sup>	0,62±0,02 (0,62;0,58;0,64) <sup>c</sup>	<0,001*
TOS ( $\mu\text{mol/L}$ )	47,00±2,33 (47;44;50) <sup>a,b</sup>	56,63±2,20 (57;54;60) <sup>c</sup>	162,75±8,40 (160,5;153;175) <sup>b,c</sup>	144,88±6,27 (144;137;154) <sup>a</sup>	<0,001*
TUNNEL (%)	0,25±0,46 (0;0;1) <sup>a</sup>	0,75±0,89 (0,5;0;2) <sup>b</sup>	5,88±1,36 (5,5;4;8) <sup>a,b</sup>	2,13±0,84 (2;1;3)	<0,001*

## 4.6. KASDA NO, İNOS, TOS, TAS VE ROCK ÖLÇÜMLERİ

### 4.6.1. KASDA NO ÖLÇÜMÜ

Grafik 11 Gruplara göre kas NO ölçüm değerleri



SHAM grubunda kasda NO değeri  $32,63 \pm 1,85$  µmol/L olarak ölçüldü. Minimum değer 29 µmol/L, maksimum değer 35 µmol/L, ortalama değer 32,5 µmol/L olarak ölçüldü (Grafik 11, tablo 34).

FAS grubunda kasda NO değeri  $41,25 \pm 2,43$  µmol/L olarak ölçüldü. Minimum değer 39 µmol/L, maksimum değer 46 µmol/L, ortalama değer 41 µmol/L olarak ölçüldü (Grafik 11, tablo 34).

IR grubunda kasda NO değeri  $130,5 \pm 4,69$  µmol/L olarak ölçüldü. Minimum değer 123 µmol/L, maksimum değer 135 µmol/L, ortalama değer 132,5 olarak ölçüldü (Grafik 11, tablo 34).

IR+FAS grubunda kasda NO değeri  $95,88 \pm 4,36$  µmol/L olarak ölçüldü. Minimum

değer 90 µmol/L, maksimum değer 101 µmol/L, ortalama 96,5 µmol/L olarak ölçüldü (Grafik 11, tablo 34).

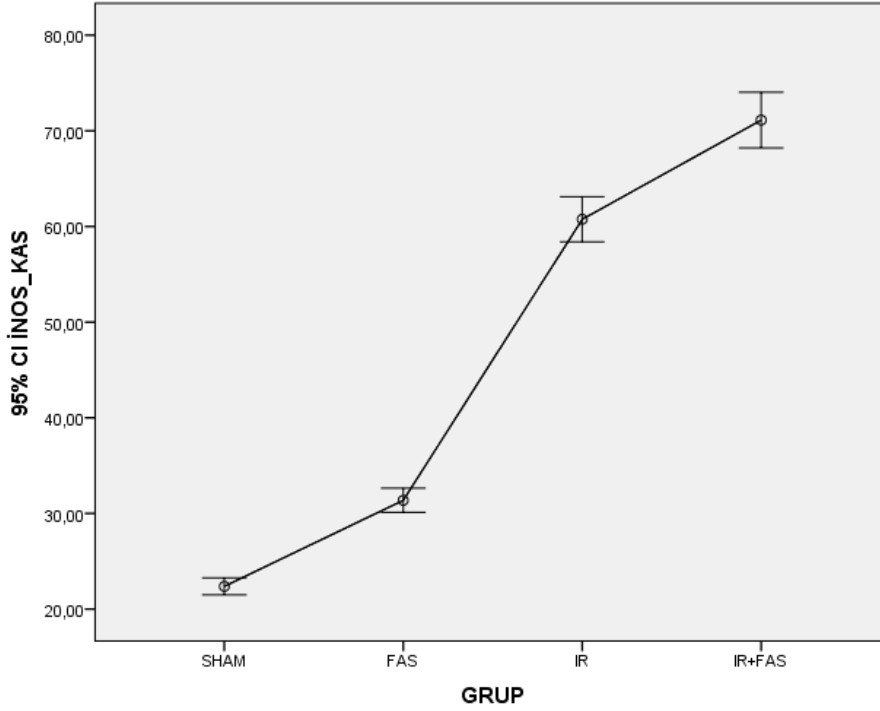
Tüm ölçümler gruplar arasında önemli düzeyde farklıydı ( $p < 0,001$ ). NO ölçümleri IR ve IR+FAS gruplarında yüksekti. FAS grubunda daha düşük ( $41,25 \pm 2,43$  µmol/L) ve SHAM grubunda en düşük değere ( $32,63 \pm 1,85$  µmol/L) sahipti (Grafik 11, tablo 34).

Tablo 34 Gruplara göre kas ölçümleri karşılaştırmaları

KAS	SHAM	FAS	IR	IR+FAS	<i>p</i>
Ortalama±SS (Medyan, min, maks)					
NO (µmol/L)	32,63±1,85 (32,5;29;35) <sup>a,b</sup>	41,25±2,43 (41;39;46) <sup>c</sup>	130,5±4,69 (132,5;123;135) <sup>b,c</sup>	95,88±4,36 (96,5;90;101) <sup>a</sup>	<0,001*
İNOS (ng/mL)	22,38±1,06 (22,5;21;24) <sup>a,b</sup>	31,38±1,51 (32;29;33) <sup>c</sup>	60,75±2,82 (60,5;57;65) <sup>a</sup>	71,13±3,48 (71,5;66;77) <sup>b,c</sup>	<0,001*
ROCK (ng/mL)	51,25±2,31 (51;48;54) <sup>c</sup>	84,63±4,27 (85;79;91) <sup>b,c</sup>	38,13±1,36 (38,5;36;40) <sup>a,b</sup>	64,25±3,2 (64;60;70) <sup>a</sup>	<0,001*
TAS (mmol/L)	0,74±0,03 (0,75;0,69;0,77) <sup>a</sup>	1,04±0,04 (1,04;0,98;1,11) <sup>b,c</sup>	0,39±0,01 (0,39;0,37;0,41) <sup>a,b</sup>	0,57±0,03 (0,57;0,52;0,62) <sup>c</sup>	<0,001*
TOS (µmol/L)	38,88±1,73 (39;37;41) <sup>a,b</sup>	44,13±1,89 (44;41;46) <sup>c</sup>	121±3,89 (121;116;127) <sup>b,c</sup>	96,38±3,29 (95,5;93;101) <sup>a</sup>	<0,001*
TUNNEL (%)	0,38±0,52 (0;0;1) <sup>a</sup>	0,38±0,52 (0;0;1) <sup>b</sup>	4,25±0,71 (4;3;5) <sup>a,b</sup>	1,88±0,84 (2;1;3)	<0,001*

#### 4.6.2. KASDA iNOS ÖLÇÜMÜ

Grafik 12 gruplara göre kas İNOS ölçüm değerleri



SHAM grubunda kasda iNOS değeri  $22,38 \pm 1,06$  ng/mL olarak ölçüldü. Minimum değer 21 ng/mL, maksimum değer 24 ng/mL, ortalama değer 22,5 ng/mL olarak ölçüldü (Grafik 11, tablo 34).

FAS grubunda kasda iNOS değeri  $31,38 \pm 1,51$  ng/mL olarak ölçüldü. Minimum değer 29 ng/mL, maksimum değer 33 ng/mL, ortalama değer 32 ng/mL olarak ölçüldü (Grafik 11, tablo 34).

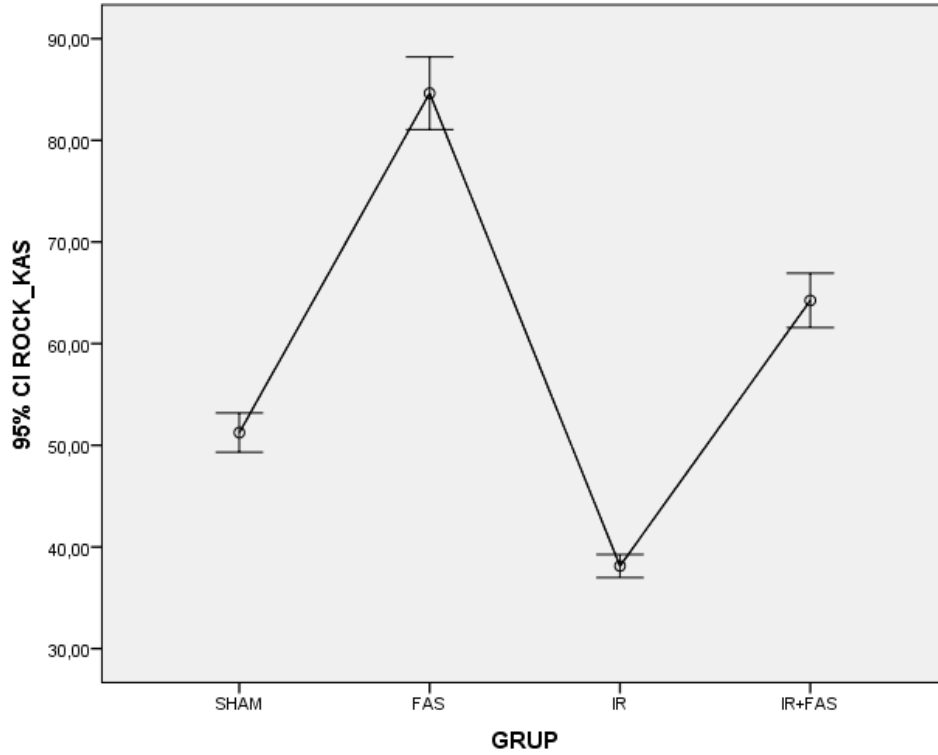
IR grubunda kasda iNOS değeri  $60,75 \pm 2,82$  ng/mL olarak ölçüldü. Minimum değer 57 ng/mL, maksimum değer 65 ng/mL, ortalama değer 60,5 ng/mL olarak ölçüldü (Grafik 11, tablo 34).

IR+FAS grubunda kasda iNOS değeri  $71,13 \pm 3,48$  ng/mL olarak ölçüldü. Minimum değer 66 ng/mL, maksimum değer 77 ng/mL, ortalama değer 71,5 ng/mL olarak ölçüldü (Grafik 11, tablo 34).

INOS ölçümleri incelendiğinde en yüksek değerin IR+FAS grubunda olduğu görüldü. Sonra sırayla IR, FAS ve SHAM grubu değerleri geldi. IR ve SHAM, IR ve FAS ile SHAM ile IR+FAS grupları arasındaki farklar anlamlıydı ( $p<0,001$ ), (Grafik 11, tablo 34).

#### 4.6.3. KAS ROCK İNHİBİSYONU ÖLÇÜMLERİ

Grafik 13 Gruplara göre kas ROCK ölçüm değerleri



ROCK ölçümlerinde ise yine FAS grubunun etkisi görüldü. En yüksek ortalama FAS ve sonrasında IR+FAS grubunda hesaplandı. SHAM grubundaki ortalama değer daha düşük iken en düşük ortalama IR grubuna aitti. FAS ile IR arasında, SHAM ile FAS arasında, IR ile FAS, IR+FAS arasında anlamlı farklılıklar bulundu ( $P<0,001$ ), (Grafik 13, tablo 34).

SHAM grubunda kas ROCK inhibisyon ölçüm değeri  $51,25\pm 2,31$  ng/mL olarak ölçüldü. Minimum değer 48 ng/mL, maksimum değer 54 ng/mL, ortalama değer 51 ng/mL olarak ölçüldü (Grafik 13, tablo 34).

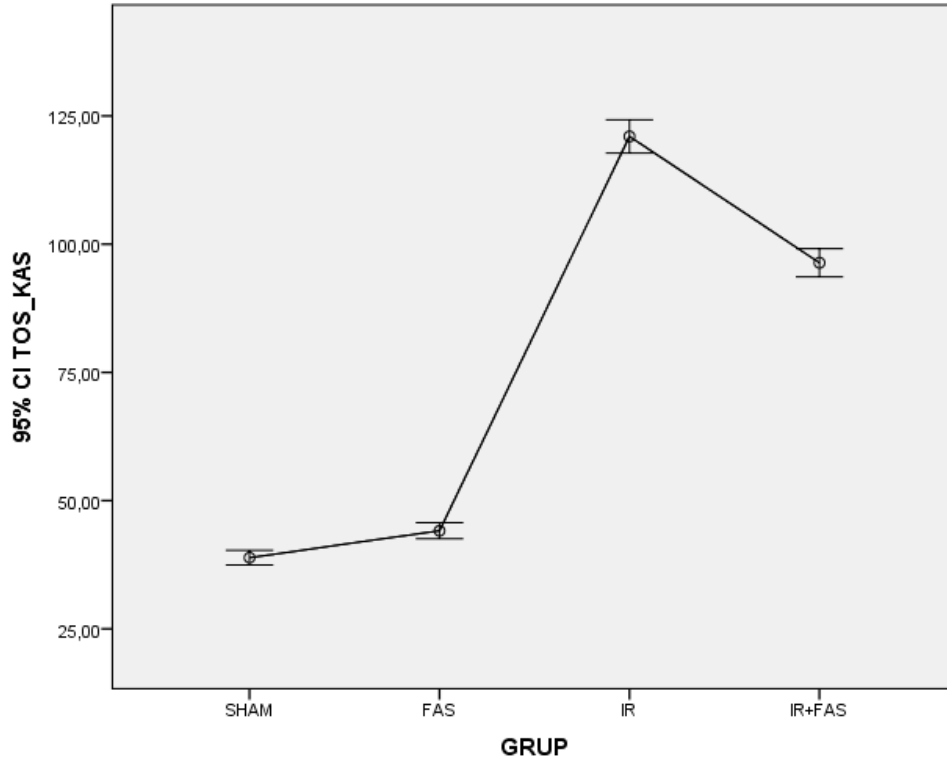
FAS grubunda kas ROCK inhibisyon ölçüm değeri  $84,63 \pm 4,27$  ng/mL olarak ölçüldü. Minimum değer 79 ng/mL, maksimum değer 91 ng/mL, ortalama 85 ng/mL olarak ölçüldü (Grafik 13, tablo 34).

IR grubunda kas ROCK inhibisyon ölçüm değeri  $38,13 \pm 1,36$  ng/mL olarak ölçüldü. Minimum değer 36 ng/mL, maksimum değer 40 ng/mL, ortalama 38,5 ng/mL olarak ölçüldü (Grafik 13, tablo 34).

IR+FAS grubunda kas ROCK inhibisyon ölçüm değeri  $64,25 \pm 3,2$  ng/mL olarak ölçüldü. Minimum değer 60 ng/mL, maksimum değer 70 ng/mL, ortalama değer 64 ng/mL olarak ölçüldü (Grafik 13, tablo 34).

#### 4.6.4. KAS TOS ÖLÇÜMLERİ

Grafik 14 Gruplara göre kas TOS ölçüm değerleri



SHAM grubu kas TOS ölçüm değeri  $38,88 \pm 1,73$   $\mu\text{mol/L}$  olarak ölçüldü. Minimum değer 37  $\mu\text{mol/L}$ , maksimum değer 41  $\mu\text{mol/L}$ , ortalama değer 39  $\mu\text{mol/L}$  olarak ölçüldü

(Grafik 14, tablo 34).

FAS gurbu kas TOS ölçüm değeri  $44,13 \pm 1,89$   $\mu\text{mol/L}$  olarak ölçüldü. Minimum değeri 41  $\mu\text{mol/L}$ , maksimum değeri 46  $\mu\text{mol/L}$ , ortalama değeri 44  $\mu\text{mol/L}$  olarak ölçüldü (Grafik 14, tablo 34).

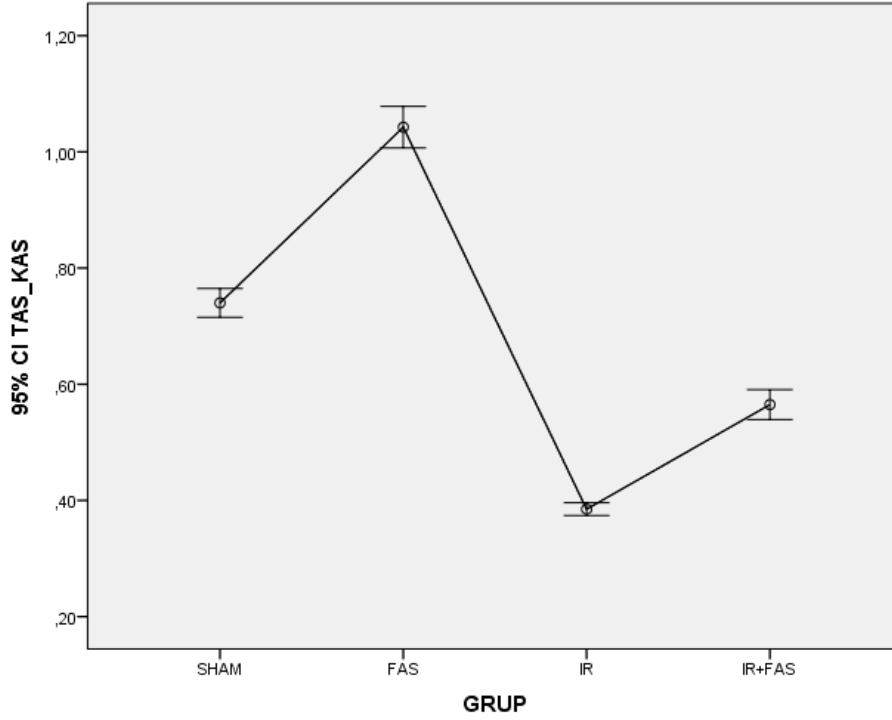
IR gurbu kas TOS ölçüm değeri  $121 \pm 3,89$   $\mu\text{mol/L}$  olarak ölçüldü. Minimum değeri 116  $\mu\text{mol/L}$ , maksimum değeri 127  $\mu\text{mol/L}$ , ortalama değeri 121  $\mu\text{mol/L}$  olarak ölçüldü (Grafik 14, tablo 34).

IR+FAS gurbu kas TOS ölçüm değeri  $96,38 \pm 3,29$   $\mu\text{mol/L}$  olarak ölçüldü. Minimum değeri 93  $\mu\text{mol/L}$ , maksimum değeri 101  $\mu\text{mol/L}$ , ortalama değeri 95,5  $\mu\text{mol/L}$  olarak ölçüldü (Grafik 14, tablo 34).

TAS ve TOS ölçümlerinin serum ve böbrek çalışmalarına benzer şekilde birbirleri ile ters orantılı olarak gruplara dağıldığı izlendi. En yüksek TAS değeri FAS grubunda görülürken en düşük ortalama IR grubundaydı. TOS ortalaması ise tam tersine IR grubunda en yüksek ortalama değere sahipti. FAS ve özellikle SHAM grubunda oldukça düşük düzeyde seyretti (Grafik 14, tablo 34).

#### 4.6.5. KAS TAS ÖLÇÜMLERİ

Grafik 15 Gruplara göre kas TAS ölçüm değerleri



SHAM grubu kas TAS ölçüm değeri  $0,74\pm 0,03$  mmol/L olarak ölçüldü. Minimum değer  $0,69$  mmol/L, maksimum  $0,77$  mmol/L, ortalama değer  $0,75$  mmol/L olarak ölçüldü (Grafik 15, tablo 34).

FAS grubu kas TAS ölçüm değeri  $1,04\pm 0,04$  mmol/L olarak ölçüldü. Minimum değer  $0,98$  mmol/L, maksimum  $1,11$  mmol/L, ortalama değer  $1,04$  mmol/L olarak ölçüldü (Grafik 15, tablo 34).

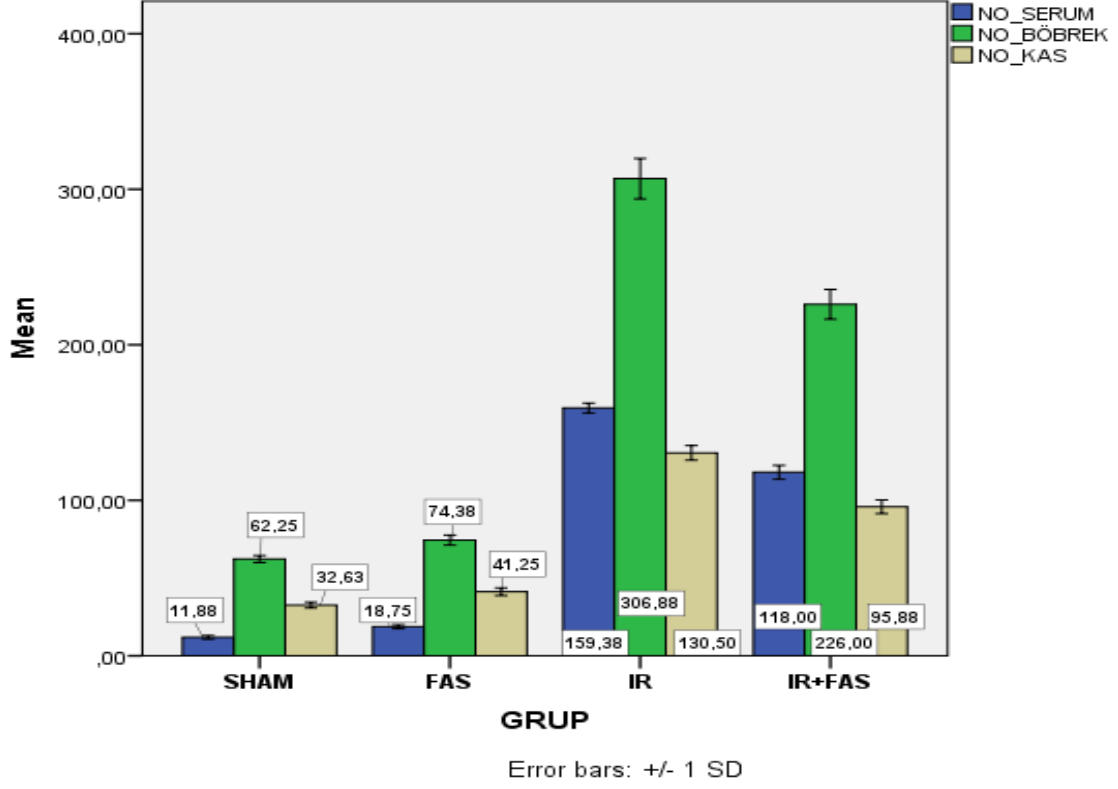
IR grubu kas TAS ölçüm değeri  $0,39\pm 0,01$  mmol/L olarak ölçüldü. Minimum değer  $0,37$  mmol/L, maksimum  $0,41$  mmol/L, ortalama değer  $0,39$  mmol/L olarak ölçüldü (Grafik 15, tablo 34).

IR+FAS grubu kas TAS ölçüm değeri  $0,57\pm 0,03$  mmol/L olarak ölçüldü. Minimum değer  $0,52$  mmol/L, maksimum  $0,62$  mmol/L, ortalama değer  $0,57$  mmol/L olarak ölçüldü (Grafik 15, tablo 34).

## 4.7. GRUPLARA GÖRE SONUÇLAR

### 4.7.1. Gruplara Göre Serum, Böbrek Ve Kasa Ait No Ölçümleri

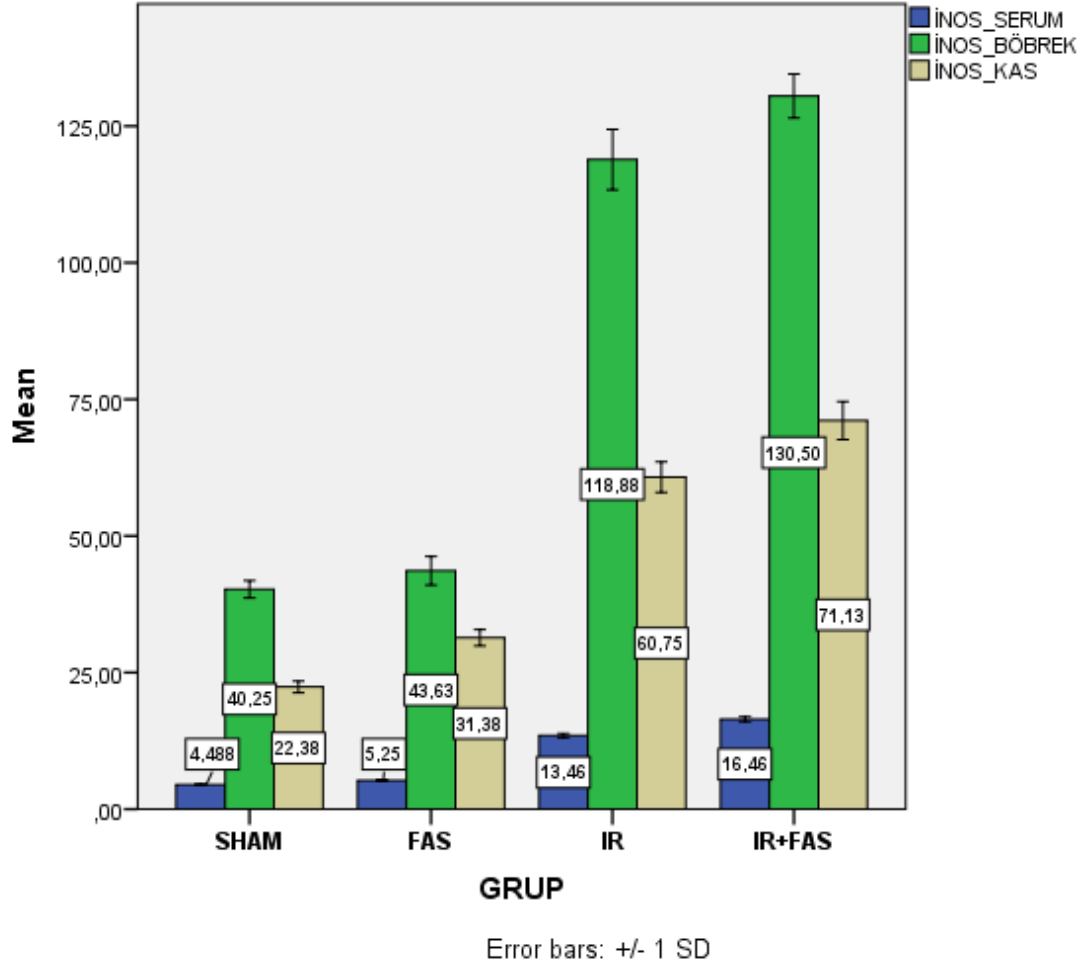
Grafik 16 Gruplara göre serum, böbrek ve kasa ait NO ölçümleri



NO ölçümleri serum, böbrek, kas karşılaştırıldı. En yüksek NO değeri IR grubu böbrekte görüldü. SHAM ve FAS gruplarında benzer sonuçlar alındı. IR ve IR FAS grupları SHAM ve FAS gruplarına göre tüm ortamlarda daha yüksek değerler elde edildi. (B>S>K)

#### 4.7.2. Gruplara Göre Serum, Böbrek Ve Kasa Ait iNOS Ölçümleri

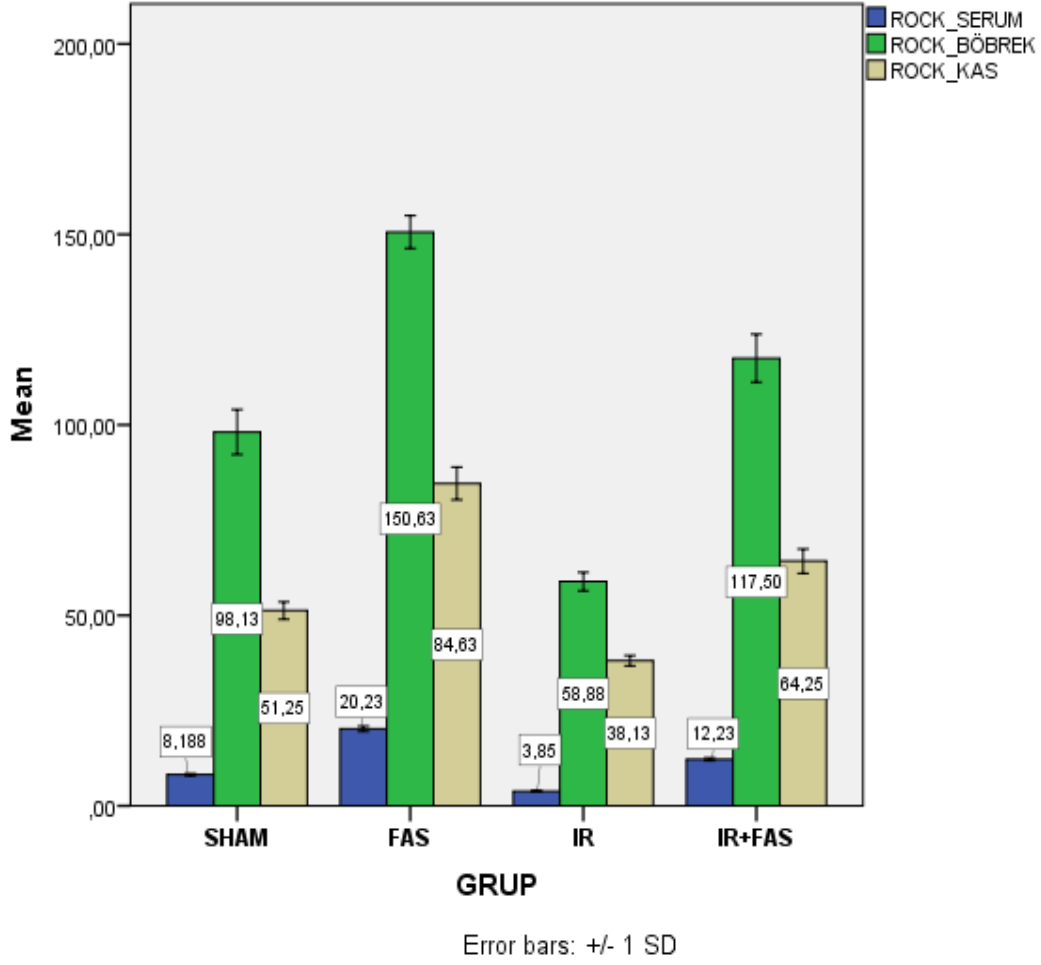
Grafik 17 Gruplara göre serum, böbrek ve kasa ait iNOS ölçümleri



İNOS ölçümleri serum, böbrek, kas karşılaştırıldı. En yüksek iNOS değeri IR+FAS grubu böbrekte görüldü. SHAM ve FAS gruplarında benzer sonuçlar alındı. IR ve IR+FAS grupları SHAM ve FAS gruplarına göre serumda daha az olmak üzere tüm ortamlarda daha yüksek değerler elde edildi. (B>K>S)

### 4.7.3. Gruplara Göre Serum, Böbrek Ve Kasa Ait ROCK Ölçümleri

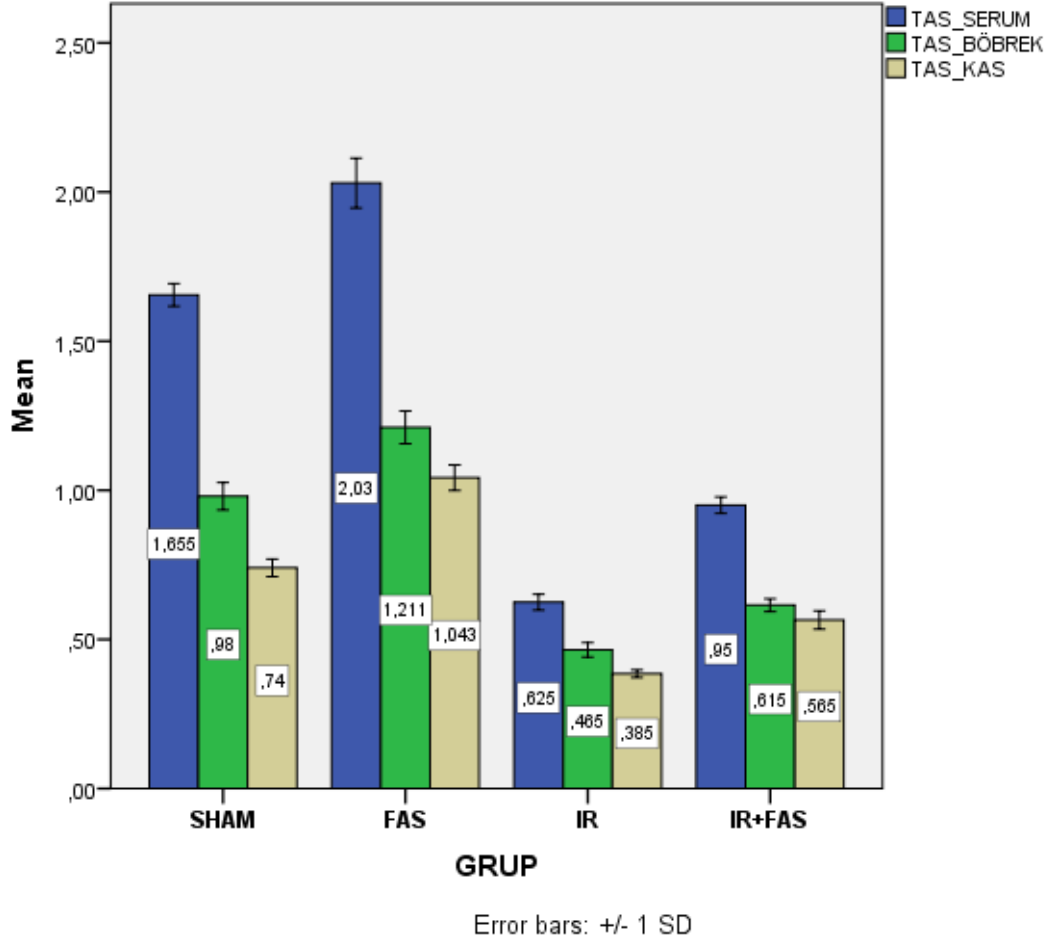
Grafik 18 Gruplara göre serum, böbrek ve kasa ait ROCK ölçümleri



Rho kinaz inhibisyonu ölçümleri serum, böbrek, kasda karşılaştırıldı. En yüksek ROCK inhibisyonu değeri FAS grubu böbrekte görüldü. IR ve IR+FAS grupları arasında anlamlı fark tüm gruplarda bulundu ( $p < 0,005$ ). (B>K>S)

#### 4.7.4. Gruplara Göre Serum, Böbrek Ve Kasa Ait TAS Ölçümleri

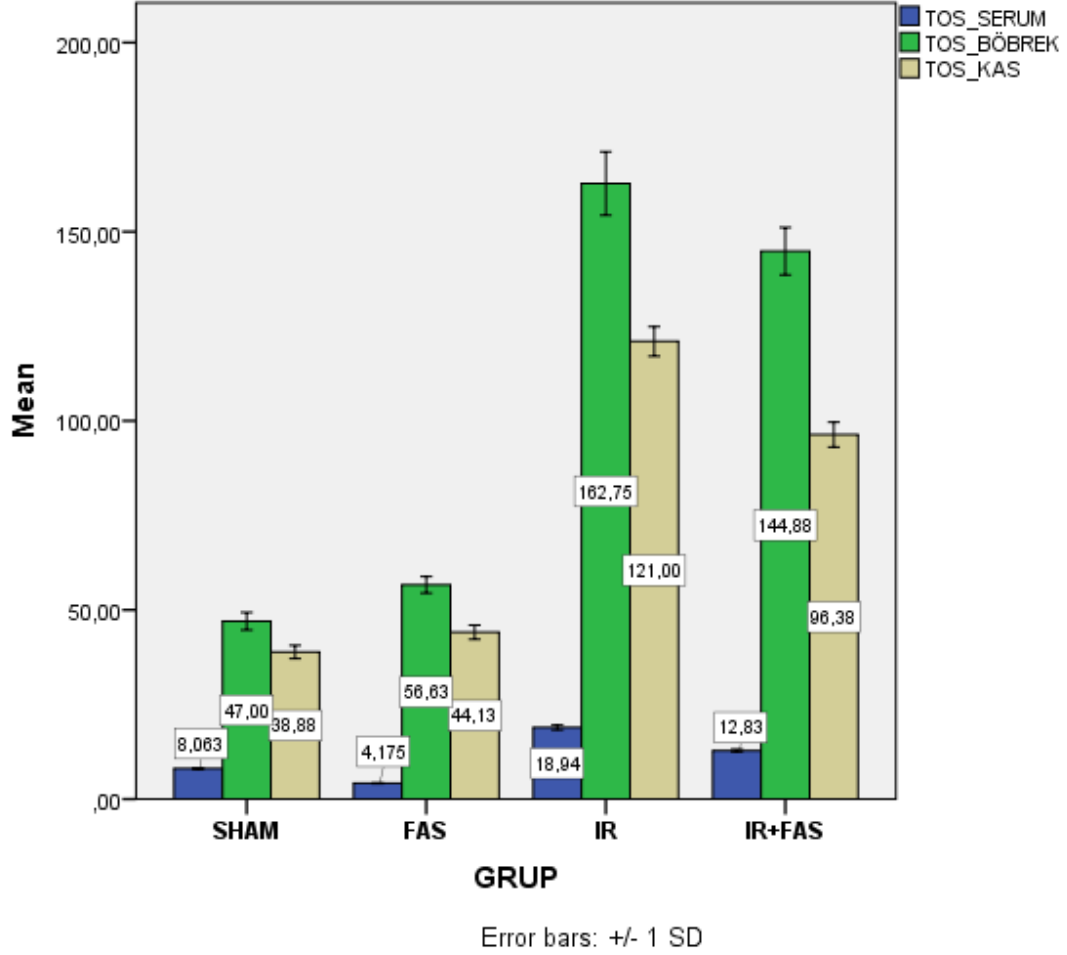
Grafik 19 Gruplara göre serum, böbrek ve kasa ait TAS ölçümleri



TAS ölçümleri serum, böbrek, kasta karşılaştırıldı. En yüksek TAS değeri FAS grubu serumunda görüldü. IR ve IR+FAS grupları arasında anlamlı fark bulunmadı ancak önemli oranda TAS seviyelerini artırdığı görüldü. (S>B>K)

#### 4.7.5. Gruplara Göre Serum, Böbrek Ve Kasa Ait TOS Ölçümleri

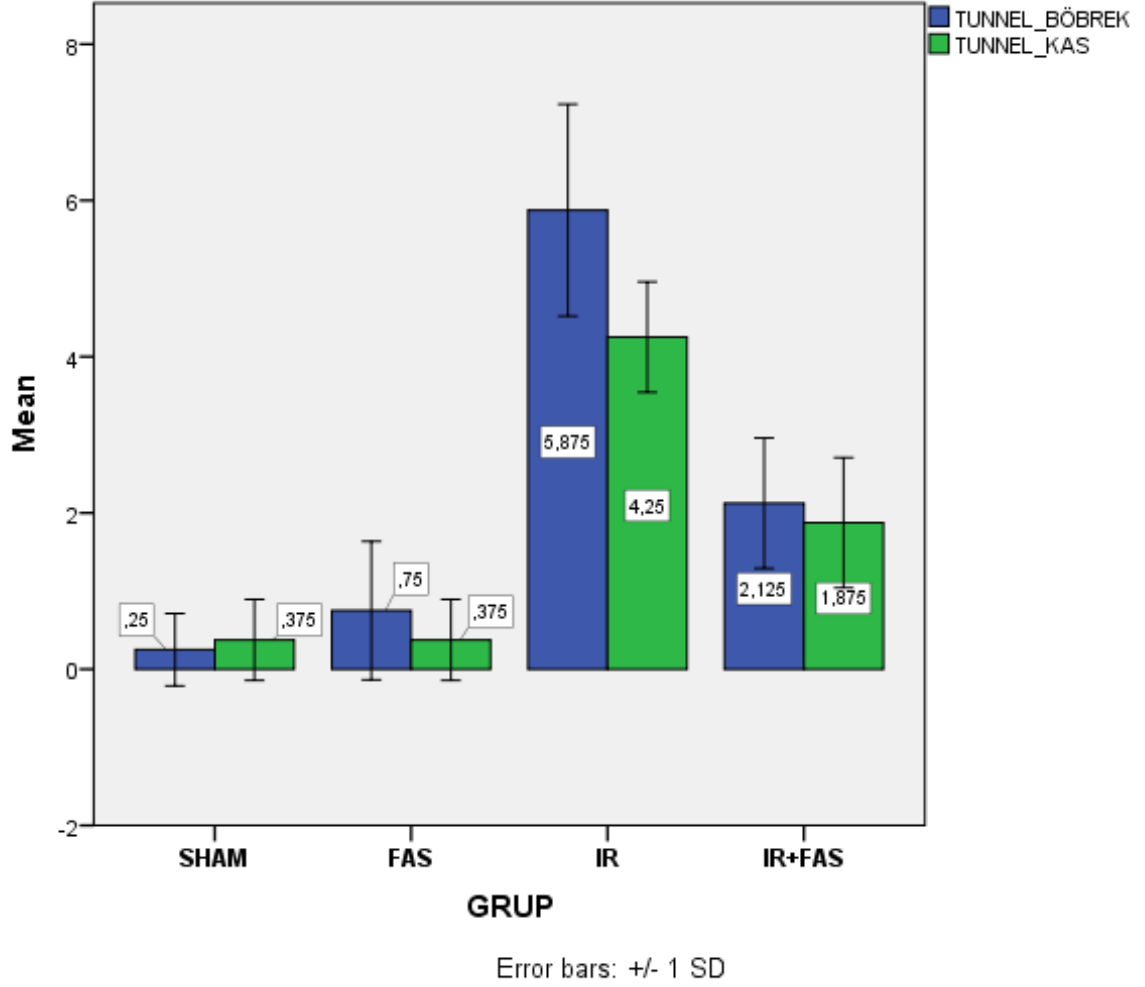
Grafik 20 Gruplara göre serum, böbrek ve kasa ait TOS ölçümleri



TOS ölçümleri serum, böbrek, kasda karşılaştırıldı. En yüksek TOS değeri IR grubu böbreğinde görüldü. IR ve IR+FAS grupları arasında anlamlı fark bulunmadı ancak önemli oranda TOS seviyelerini azaltığı görüldü. (B>K>S).

#### 4.7.6. Gruplara Göre Serum, Böbrek Ve Kasa Ait TUNNEL Ölçümleri

Grafik 21 Gruplara göre serum, böbrek ve kasa ait TUNNEL ölçümleri



TUNNEL ölçümleri böbrek, kasa karşılaştırıldı. En yüksek TUNNEL değeri IR grubu böbreğinde görüldü. IR ve IR+FAS grupları arasında anlamlı fark bulunmadı ancak önemli oranda TUNNEL seviyelerini azaltığı görüldü.

## 5. TARTIŞMA

IRH klinikte; kardiyak cerrahide, abdominal aort cerrahisinde, organ transplantasyonunda, koroner anjioplasti ve trombolitik tedavi sonrasında dokunun reperfüzyonunda, periferik arter hastalıklarında, akut veya kronik damar tıkanıkları sonucu oluşabilmektedir. İskemik dokunun reperfüzyonuyla birlikte lokal ve sistemik etkiler ortaya çıkmaktadır. Beraberinde birçok dokuda; kalp, akciğer, böbrek, iskelet kası, santral sinir sistemi ve gastrointestinal sistemde IRH' nin geliştiğini, morbitidesi ve mortalitesini bildiren çok sayıda yayın mevcuttur (238-240).

Alt ekstremitte iskemisi klinikte akut ve kronik olarak karşımıza çıkmaktadır. Akut alt ekstremitte iskemisinde, ekstremitteyi koruyabilmek için, hızlı tanı ve tedavi uygulamak gereklidir. Erken tedavi, iskeminin süresini kısaltmakla birlikte hastanın prognozunu etkilemektedir. Akut alt ekstremitte iskemisi sonrasında oluşan hasar, iskeminin ekstremitteye verdiği zarar kadar reperfüzyon ile de ilişkilidir (241, 242). Reperfüzyon sonrasında lokal ve sistemik enflamatuar yanıt oluşur. Yaygın mikrovasküler disfonksiyon ve doku bariyerinin fonksiyonun değişmesi ile sonuçlanır. Eğer reperfüzyona verilen yanıtın şiddeti fazla ise IR sonrasında oluşan inflammatuar yanıt sistemik inflammatuar yanıt sendromu veya multiple organ disfonksiyonu ile sonuçlanır. Deneysel araştırmalarda ekstremitte iskemisinin oluşturulabilmesi için çok sayıda model geliştirilmiştir. Bunlardan birisi de sıçan çalışma modellerinde alt ekstremitteye iskemisi için infrarenal abdominal aortaya mikroklemple ile iskemiyi oluşturulma yöntemidir. IRH' nin sistemik etkilerinin araştırılacağı çalışmalarda sıklıkla kullanılır (228-230).

Biz de çalışmamızda laparotomi yapıp infrarenal abdominal aortaya mikrovasküler klemple yöntemi ile 2 saatlik iskemiyi, 2 saatlik reperfüzyon uyguladık. Gastroknemius kası, böbrek dokusu ve serumda IRH' nin etkilerini araştırdık. Alt ekstremitenin iskemi-

reperfüzyonun uzak organ hasarı üzerine olumsuz etkilerinin mannitol, allopürinol, askorbik asit, SOD gibi bazı maddeler ile azaltıldığı deneysel araştırmalarla gösterilmesine rağmen ‘Fasudil’ in alt ekstremite IRH’ nin neden olduğu lokal ve sistemik hasarı azalttığı ile ilgili literatürde çok fazla yayın görülmedi. Fasudil’ in alt ekstremitede hedef organ gastrokinemius kası uzak organ olarak böbreğin IRH’ yi incelediğimiz bu çalışmamızda, 100µg/kg/dk dozunda fasudil etken maddesi 30 dk’lık iv olarak infüzyonu ile reperfüzyon döneminde verildi. Reperfüzyon dönemindeki böbrek kas ve serumdaki hasara etkileri incelendi. Bu amaç için NO, iNOS, TAS, TOS, ROCK kiti, TUNNEL ile apoptoz ve histopatolojik skorlama yöntemleri kullanılarak iv infüzyon olarak verilen fasudil’ in IRH’ ye olan etkilerine bakıldı.

*Uzak organ hasarına, böbrekte, hps’larına baktığımızda; değişikliğin olmama oranı (hps=0) %59 iken hafif hasar veya ağır hasar olma (hps=1,2,3,4) oranı %41 olarak bulundu.* Burada en çok nötrofil hasarı gözlendi. Nötrofil hasarı, böbrek IR grubunda; SHAM, FAS, IR+FAS grubuna göre anlamlı ölçüde farklıydı ( $p<0,05$ ). Yine aynı şekilde böbrek IR grubunda mutlaka bir histopatolojik hasar vardı. IR grubunda, diğer gruplara göre değişikliğin olmama (hps=0) oranı anlamlı ölçüde farklıydı ( $p<0,05$ ). Uzak organ hasarında ön planda nötrofillerin olduğu, inflamatuvar yolakların aktiflendiği düşünöldü. Nekrozun ise, tüm böbrek gruplarında görülmemesi deneysel çalışmanın kurgusuna bağlandı. İnfrarenal seviyeden konan klembin böbrek iskemisine yol açmaması sonucu nekroz görülmedi. Böbreğe yansıyan asıl olay reperfüzyon hasarı ile sistemik dolaşıma geçen radikallerin, böbrekte yapmış olduğu hasardır. Böbrekte intersitisyel ödemin görülmemesi, böbrek arteriyolleri gibi multifaktöriyal dinamikler ile etkileşim sonucu uzak organ hafif hasarını önlediğini düşöndürdü. IR-FAS grubunda nötrofil enfiltrasyonun IR grubuna göre anlamlı ölçüde fark bulundu ( $p<0,05$ ). IRH’ nda mutlaka histopatolojik bir bulgu olur ve bu hasar Fasudil ile normal histopatolojisine kadar geriletebilir.

*Hedef organ hasarına, kasda, hps'larına baktığımızda;* değişiklik olmama (hps=0) oranı %41 iken hafif veya ağır hasar (hps=1,2,3,4) oranı %59 olarak bulundu. SHAM ve FAS grubu %50 lik bir popülasyonu kapsadığı düşünülürken IR'da hedef organ olarak kasda mutlaka histopatolojik hasar oluşturduğu görüldü. IR grubu; SHAM ve FAS grubuna göre anlamlı farklıydı ( $p<0,05$ ). Kas IR grubunda en çok nötrofil hasarı görüldü. Bunu nekroz takip etti. Hedef organdaki ağır hasar (hps=3,4) oranı çok yüksekti. IR+FAS grubunda, nekroz ve nötrofil hasarını önlemede IR grubuna göre anlamlı bir fark vardı ( $p<0,05$ ). Fasudil kas dokusunda IR hasarını hps'a göre %87,5 oranında azalttı. IR+FAS grubu ile SHAM ve FAS grupları arasında ise anlamlı fark yoktu. Bu da reperfüzyonda verilen fasudilin, histopatolojik görünümünü SHAM ve FAS grubundaki gibi (hps=0,1) normal patolojiye getirdiğini göstermektedir. Kasda IRH' nda mutlaka bir histopatolojik değişiklik olur ve bu hasar iv Fasudil infüzyonu ile normal histopatolojisine kadar geriletebilir.

*Uzak organ hasarına, böbrekte, tunnel yöntemi ile apoptoza baktığımızda;* SHAM, FAS gruplarının IR grubuna göre anlamlı bir farklılık vardı ( $P<0,05$ ). En çok apoptoz IR' nda görüldü. IR grubuna göre IR+FAS grubunda anlamlı fark bulundu. IR+FAS grubu reperfüzyonda apoptozisi baskılar ve hücre ölümüne engel olur. IRH' nda böbrek apoptozis artar. Amano, Fukata, Seasholtz ve arkadaşlarının yaptığı çalışmalara göre (147-159), RhoE' nin ise genotoksik stres sırasında ROCK I' i inhibe ettiği ve böylece apoptozu önlediği bildirilmiştir. Bizim çalışmamızda da bu artan apoptozis yükü iv infüzyonla verilen fasudil ile azaltılabilmektedir. *Uzak organ hasarına, kasda, tunnel yöntemi ile apoptoza baktığımızda;* yine en yüksek apoptozis IR grubunda vardı. SHAM, FAS grupları ile IR grubu arasında anlamlı bir fark bulundu ( $P<0,05$ ). IR ile IR+FAS grupları arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunmadı. İstatistiksel olarak anlamlı bir fark çıkmasada, reperfüzyon döneminde uygulanan Fasudil' in apoptozisi önemli bir oranda azalttığı görüldü. IRH' nda kasda apoptozis artar. Bu artan apoptozis yükü iv infüzyonla verilen fasudil ile azaltılabılır.

*Serum NO seviyelerine gruplar arası baktığımızda;* en yüksek değerin IR grubunda olduğu görüldü. SHAM, FAS gruplarına göre IR grubunda serum NO seviyesi anlamlı bir fark ile yüksek bulundu ( $p<0,05$ ). NO; asetilkolin uyarısı, endotoksin, hipoksi, hücresel zedelenme veya mekanik kesilme stresine yanıt olarak dolaşıma salınabilmektedir. IR' daki yükselen NO değerlerini, IR+FAS grubu önemli bir oranında azaltsada istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunamıştır. Kurose ve arkadaşlarının yaptığı çalışmaya göre (136) NO donörleri olan organik nitratların; birçok IR modelinde, lökosit-endotel adhezyonu, lökosit-trombosit adhezyonu, mast hücresi degranülasyonu ve artmış vasküler geçirgenliği azalttığı gösterilmiştir. Frostell ve arkadaşlarının (135) yapmış olduğu çalışmaya göre inhaler veya serum fizyolojikte çözülmüş olarak tatbik edilen NO gazının, IRH' nı ve lökosit adhezyonunu azalttığı saptanmıştır. Anaya ve arkadaşlarının yaptığı çalışmaya göre (75), NO tedavisi ile hayvan IR modellerinde, doku hasarında azalma sağlamıştır. IRH' ına bağlı gelişen endotel hücre disfonksiyonunda, NO sentezinde azalma oluşarak IRH derinleşir. IRH' da serum NO değerleri tepki olarak artar. Bu hasar sonucu seruma salınan NO değerleri fasudil tedavisi ile hasarın iyileşmesi sonucunda seruma salından NO değerlerinde %25 oranında bir fayda sağlamıştır. *Böbrek NO seviyelerine gruplar arası baktığımızda;* en yüksek değeri IR grubunda görüldü. SHAM ve FAS gruplarında düşük NO değerleri elde edildi. SHAM, FAS grupları ile IR grupları arasında anlamlı fark vardı ( $p<0,05$ ). IR+FAS grubu IR grubunda göre %25' in üzerinde düzeltme sağladı. Fasudil, alt extremitedeki IRH sonucu gelişen NO yükünü, uzak organ böbrekte azaltabilir. IRH' da böbrekte NO değerleri tepki olarak artar. Bu hasar sonucu ortama salınan NO değerleri fasudil tedavisi ile hasarın iyileşmesi sonucunda seruma ortam salınan NO değerlerinde %25 oranında bir azalma sağlamıştır. *Kas NO seviyelerine gruplar arası baktığımızda;* en yüksek NO değeri IR' nda olduğu görüldü. SHAM ve FAS gruplarına göre IR grubu istatistiksel olarak anlamlı bir farka sahipti ( $p<0,05$ ). IR grunda IRH'na yanıt olarak salınan NO nun salınımının artması IR+FAS

grubunda hasarın % 30 oranında iyileşmesine bağlı olarak daha düşük bir NO değerlerine neden olduğunu görüldü. Kas dokusunda Fasudil IRH'nın yapmış olduğu hasardan koruyabilir.

*Serum iNOS seviyelerine gruplar arası baktığımızda;* en yüksek değerler IR+FAS grubunda olduğu görüldü. SHAM, FAS gruplarına göre IR grubunda anlamlı bir fark bulunmadı ( $p < 0,05$ ). IR ile IR+FAS grubu arasında iNOS enzim miktarı açısından istatistiksel anlamlı bir fark bulunmadı. Ancak enzimi %22,3 oranında miktarının arttığı görüldü. Inos; endotoksitite, sitotoksitite, inflamasyon gibi çeşitli uyarılar ile indüklenebilmektedir. NOS substrat olarak yarı esansiyel bir amino asit olan L-arjini kullanır ve ürün olarak NO ile L-sitrülin oluşur. Fasudil çeşitli uyarılarla indüklenebilen inos enzimi sayesinde NO'yu artırır. Rivera ve arkadaşlarının (137) bir çalışmada ise tedavide NOS inhibitörü kullanmıştır. Ancak, selektif olmayan bir NOS inhibitör kullanımı veya eNOS geni yokluğunda reperfüzyon hasarı artarken, selektif iNOS inhibisyonu ile IRH'nda azalma elde edilmiştir. Bizim çalışmamızda da inos uyarılabilirliği IR+FAS grubu ile hem IR'un kendisi hem de fasudil infüzyonunun etkisi ile pig yapmıştır. *Böbrek iNOS seviyelerine gruplar arası baktığımızda;* en yüksek inos değerleri IR+FAS grubunda görüldü. SHAM, FAS grubuna göre IR ve IR+FAS grupları istatistiksel olarak anlamlı bir fark vardı ( $p < 0,05$ ). IR+FAS grubu IR grubuna göre anlamlı fark çıkmasında enzim ekspresyonunda %10 civarında artırdığı görüldü. Enzimatik aktivitenin ölçülmediği çalışmada enzim ekspresyonları miktarlarının aktiviteye ciddi katkılarının olabileceğine de akılda tutulmalıdır. *Kas iNOS seviyelerine gruplar arası baktığımızda;* en yüksek iNOS değerlerinin IR+FAS grubunda olduğunu gördük. SHAM gruplarına göre IR grubu anlamlı bir fark bulundu ( $p < 0,05$ ). FAS grubuna göre de IR+FAS grubu anlamlı bir farka sahipti ( $p < 0,05$ ). IRH'nda hasarın giderilebilmesi adına iNOS'un indüklendiğini bulduk. Bu indüklenmenin fasudil ile daha da arttığı düşünülmektedir. İnos bir enzimdir. IR grubuna göre IR+FAS grubundaki enzim miktarındaki

%20 e yakın bir artışın enzim aktivitesine de olumlu yansıdığını düşünmekteyiz. Fasudil IRH' nda iNOS un ekspresyonunu önemli miktarda artırarak hasarın giderilmesinde koruyucu bir rol oynayabilir.

*Serum ROCK 1eliza kit seviyelerine gruplar arası baktığımızda;* en yüksek değer FAS grubunda bulundu. En düşük değer ise IR grubunda bulundu. FAS grubu IR gurubuna göre anlamlı fark bulundu ( $p<0,05$ ). IR grubu ile IR+FAS grubu da anlamlı farklıydı ( $p<0,05$ ). Fasudil selektif Rho kinaz enzimi inhibitörüdür. IRH' nda çok azalan ROCK seviyeleri ile klinik patolojilerden sorumlu olduğu gösterir. Rock yolunun Fasudil ile bloklanması, IR hasarından koruduğu istatistiksel olarak gösterilmiştir ( $p<0,05$ ). Fasudil serum rock yolağının güçlü bir inhibitörüdür ve IRH' ndan korur. Chitaley ve arkadaşlarının (204) yaptığı bir çalışmada NO ilişkili vazodilatasyonun Rho kinazın vazokonstriktör aktivitesinin inhibisyonu aracılığıyla olduğu hipotezi ileri sürülmüştür. Masumato ve arkadaşlarının (193) yapmış olduğu bir çalışmada rho kinaz inhibitörü olan fasudil hipertansif hastalarda kullanılmış ve bu çalışmanın sonuçları rho-rho kinaz yolağının hipertansif hastalarda yükselmiş sistemik vasküler rezistansa katıldığını göstermiştir. Mukai ve arkadaşları (205) yapmış oldukları çalışmada hipertansif sıçanlarda Rho-kinaz aktivitesinin ve ekspresyonunun arttığını tespit etmiştir. Yang ve arkadaşlarının (208) yapmış olduğu çalışmada RhoA/ROCK yolağı aynı zamanda trombusun şekillenmesi ve vasküler inflamasyon mekanizması ile de ilişkilidir. ROCK birçok mekanizma aracılığı ile endotelial hücreler tarafından üretilen NO negatif yönde düzenler. Salvarani ve arkadaşlarının (209) yapmış olduğu çalışmada RhoA/ROCK aktivasyonu endotelial NO sentaz (eNOS) ekspresyonunu azalttığını bildirmiştir. Eto ve arkadaşlarına (210) göre sonuç olarak, ROCK inhibitörleri veya statinler eNOS ekspresyonunu kontrol ederler. Laufs (211) ve Li (212) ardaşlarına göre ROCK enzimleri aynı zamanda, PI3-kinaz/ protein kinaz B (Akt) yolunu inhibe etmek ve arjinaz aktivitesini uyarmak suretiyle eNOS fonksiyonlarını negatif yönde

düzenlerler. ROCK bağımlı sinyal yolu, vasküler fonksiyonları düzenleyen temel düzenleyici olarak bilinmektedir ve hipertansiyon gibi arteriyal fonksiyon bozukluklarında önemli bir rol oynamaktadır. *Böbrek ROCK 1 eliza kit seviyelerine gruplar arası baktığımızda;* serum grubundaki gibi bir grafik elde edildi En yüksek değer FAS grubundaydı. Bunu IR+FAS grubu takip etti. SHAM grubuna göre FAS grubunda anlamlı fark bulundu ( $p<0,05$ ). IR grubundaki hasradan sorumlu mekanizmaların rock yolundan kaynaklanabildiği pek çok literatürde ifade edilmiştir. Bu açıdan da baktığımızda IR+FAS grubu ile IR grubu arasındaki farkın istatistiksel olarak farklı çıkması nedeni ile ( $p<0,05$ ) Fasudil IRH' nda rock yolağını inhibe ederek iyileşme göstermiştir. FAS grubu ile IR grupları arasındaki ciddi farkın olması da spesifik rho kinaz inhibitörlerinin IRH'nda koruyucu bir rol oynadığının göstergesi olmuştur. *Kas ROCK 1 eliza kit seviyelerine gruplar arası baktığımızda;* en yüksek ROCK 1 miktarının FAS grubu ile elde ettiğini görmekteyiz. SHAM ve FAS grubu istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık gösterdi ( $p<0,05$ ). Fasudil iyi bir rock yolağı inhibitörüdür. SHAM grubuna göre IR grubunda istatistiksel olarak anlamlı bir fark çıkmadı. Ancak %40-50 ye yakın bir oranda bir azalma görüldü. IRH'nda oluşan hasarın rock yolu ile gerçekleştiğini düşünmekteyiz. Spesifik rho kinaz inhibitörü olan fasudilin bu hasarı IR grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı bir fark ile rock yolunu bloklayarak düzeltme yaptığını gösterdik ( $p<0,05$ ).

*Serum TOS seviyelerine gruplar arası baktığımızda;* toplam oksidan duruma en yüksek IR' da görüldü. En düşük değer FAS grubunda görüldü. SHAM grubu ile IR grubu arasında anlamlı fark vardı ( $p<0,05$ ). SHAM grubuna göre FAS grubunda tos da %50 e yakın bir oranda oksidan stresi azalttığı görüldü. IR grubuna göre IR+FAS grubu oksidan yükü %32 olarak azaltığı görüldü. IRH' nda oksidan stress artar. Fasudil oksidan yükü azaltır. *Böbrek TOS seviyelerine gruplar arası baktığımızda;* en yüksek total oksidan durumun IR grubunda ortaya çıktığı görüldü. SHAM ve FAS gruplarına göre IR grubu istatistiksel olarak

anlamli bir fark mevcuttu ( $p<0,05$ ). IR+FAS grubunun IR grubuna göre istatiksl olarak anlamli bir fark ıkmasada total osidan durum miktarlarında %12 lik bir azaltma sağlamıştır. Fasudil toplam oksidan miktarlarında azaltma yapabilir. *Kas TOS seviyelerine gruplar arasında baktığımızda*; en yüksek total oksidan durumun IR grubu ile olmuştur. SHAM, FAS grubuna göre IR grubu istatiksl olarak anlamli bir fark ile yüksek bulunmuştur ( $p<0,05$ ). Yine aynı şekilde SHAM grubuna göre IR+FAS grubu farklıydı ( $p<0,05$ ). IR grubuna göre IR+FAS grubu %25-30 civarındaki bir oranla toplam oksidan durumunu alattmıştır. Fasudil IRH' nda oksidan yükü önemli bir oranda azaltır.

*Serum TAS seviyelerine gruplar arası baktığımızda*; toplam antioksidan duruma en çok FAS grubunda rastlandı. FAS grubunda SHAM grubuna göre %20 e yakın antioksidan total durum ölçümü yapıldı. IR+FAS grubunda IR grubuna göre IRH' nı %35 e yaklaşan oranla iyileşme sağladı. Fasudil antioksidandır, IRH' na karşı antioksidan yolaklar üzerinden de koruma sağlamıştır. *Böbrek TAS seviyelerine gruplar arası baktığımızda*; en yüksek toplam antioksidan durumun FAS grubu ile elde edildiği görüldü. SHAM grubuna göre FAS grubu istatiksl olarak anlamli bir fark bulundu ( $p<0,005$ ). Bu fark IR grubu ile FAS grubu arasında da anlamli bulundu ( $p<0,05$ ). IR grubu ile IR+FAS grubu arasında istatiksl anlamli fark ıkmasada total antioksidan durum ölçümlerinde % 30 oranında iyileşme tespit edildi. *Böbrek TAS seviyelerine gruplar arası baktığımızda*; en yüksek değerin FAS grubunda olduğunu görmekteyiz. FAS grubu SHAM gruna göre istatiksl olarak anlamli ıkmasada önemli bir oranda sadece fasudil bile antioksidan toplam durmunu artırmaktadır. IR grubu hem SHAM hemde FAS gruplarına göre anlamli bir fark vardı ( $p<0,05$ ). IR grubu IR+FAS grubu ile karşılaştırıldığında ise %30-40 oranında total antioksidan durumun artıyı görüldü. IRH' nda antioksidan toplam miktarı azalır. Bu azalma Fasudil infüzyonu ile nlenebilir. Fasudil antioksidandır.

## 6. SONUÇ

Rho kinaz enzimi protein kinazdır, hücre iletişiminden sorumludur. Hücrelerin stoplazmasında bulunur ve uyarıldıklarında membran ile etkileşir. Bir çok klinik sorunun patofizyolojinde rho kinaz yolağının, ROCK yolağının, etkisi olduğu gösterilmiştir.

IRH' nda fasudil rock yolağını inhibe ederek rock aracılı gelişin sorunların önüne bir set olabilir. Bunun yanı sıra fasudil oksidan, antioksidan, enflamatuar, endotelial yolaklar üzerinden de IRH' nı azaltabilmektedir. Inos u artırır, toplan oksidatif yükü azaltır, antioksidan yükü artırır. Fasudil serum, böbrek ve kas dokularındaki IRH' na karşı koruyucu olduğunu düşünmekteyiz.

Çin ve Japonya' da uzun yıllardır klinik olarak insanlar üzerinde kullanılmakta olan fasudil' in kardiyovasküler sistemler üzerindeki koruyucu etkilerin pek çok çalışmada bildirilmiştir. Alt extremitte yaşanan IRH' ndaki etkilerine baktığımızda hedef organ ve uzak organ hasarlarına karşı fasudilin periferik damar hastalıklarında da klinik olarak kullanılabileceğini düşünmekteyiz. Periferik arter hastalığı, korner arter hastalığı birlikteliğin de yüksek olduğunu düşünürsek fasudilin hem periferik hem kalp açısından da faydalı olabilir. Zaten bu amaçla hipertansiyon, anjina, kalp yetmezliği, pulmoner hipertansiyon, miyokard infarktüsü gibi kardiyovasküler hastalıklarda; Alzheimer, serebral vasospazm tedavilerinde; erektil disfonksiyon tedavisinde gibi pek çok hastalıkta fasudil denenmektedir.

Fasudil doz bağımlıdır. Denek düzeneğinde düşük doz tercih edilmiştir. Bir sonraki çalışmalarda yüksek doz fasudil infüzyonu ile daha iyi sonuçlar alınabilir. Rho kinaz ve inos enzimlerinin miktarlarındaki artışın, aktivite ölçümleri ile daha iyi klinik yorum yapılabilir.

Sonuç olarak deneysel çalışmaların tamamlanıp klinik çalışmalara başlanması ve ilaç olarak hizmete sunulması noktasında da olumlu düşünmekteyiz.

## KAYNAKLAR

1. Alaçam B. Ratlarda alt ekstremitte iskemi reperfüzyon hasarına Karnozinin etkisi: Adnan Menderes Üniversitesi, Tıp Fakültesi; 2008.
2. Phillips L, Toledo AH, Lopez-Neblina F, Anaya-Prado R, Toledo-Pereyra LH. Nitric oxide mechanism of protection in ischemia and reperfusion injury. *Journal of Investigative Surgery*. 2009;22(1):46-55.
3. Grace P. Ischaemia-reperfusion injury. *British Journal of Surgery*. 1994;81(5):637-47.
4. Andreoli SP. Mechanisms of endothelial cell ATP depletion after oxidant injury. *Pediatric research*. 1989;25(1):97-101.
5. Khalil AA, Aziz FA, Hall JC. Reperfusion injury. *Plastic and reconstructive surgery*. 2006;117(3):1024-33.
6. Gute DC, Ishida T, Yarimizu K, Korthius RJ. Inflammatory responses to ischemia, and reperfusion in skeletal muscle. *Molecular and cellular biochemistry*. 1998;179(1-2):169-87.
7. Collard CD, Gelman S. Pathophysiology, clinical manifestations, and prevention of ischemia-reperfusion injury. *The Journal of the American Society of Anesthesiologists*. 2001;94(6):1133-8.
8. Ferrara N, Davis-Smyth T. The biology of vascular endothelial growth factor. *Endocrine reviews*. 1997;18(1):4-25.
9. Senger DR, Galli SJ, Dvorak AM, Perruzzi CA, Harvey VS, Dvorak HF. Tumor cells secrete a vascular permeability factor that promotes accumulation of ascites fluid. *Science (New York, NY)*. 1983;219(4587):983-5.
10. Ferrara N. Role of vascular endothelial growth factor in the regulation of angiogenesis. *Kidney international*. 1999;56(3):794-814.

11. Ferrara N. Vascular endothelial growth factor: basic science and clinical progress. *Endocrine reviews*. 2004;25(4):581-611.
12. Clauss M, editor *Molecular biology of the VEGF and the VEGF receptor family*. Seminars in thrombosis and hemostasis; 1999.
13. Stein I, Itin A, Einat P, Skaliter R, Grossman Z, Keshet E. Translation of vascular endothelial growth factor mRNA by internal ribosome entry: implications for translation under hypoxia. *Molecular and cellular biology*. 1998;18(6):3112-9.
14. Hicklin DJ, Ellis LM. Role of the vascular endothelial growth factor pathway in tumor growth and angiogenesis. *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology*. 2005;23(5):1011-27.
15. Zimmerman BJ, Granger DN. Reperfusion injury. *Surg Clin North Am*. 1992;72(1):65-83.
16. Wilhelm J. Metabolic aspects of membrane lipid peroxidation. *Acta Universitatis Carolinae Medica Monographia*. 1990;137:1-53.
17. Hyslop P, Hinshaw D, Halsey W, Schraufstatter I, Sauerheber R, Spragg R, et al. Mechanisms of oxidant-mediated cell injury. The glycolytic and mitochondrial pathways of ADP phosphorylation are major intracellular targets inactivated by hydrogen peroxide. *Journal of Biological Chemistry*. 1988;263(4):1665-75.
18. Semenza GL. Cellular and molecular dissection of reperfusion injury ROS within and without. *Circulation Research*. 2000;86(2):117-8.
19. 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 Dergisi*. 2000;8(1):10-6.
20. Lin E, Lowry SF, Calvano SE. The systemic response to injury. *Principles of Surgery* New York: McGraw-Hill. 1999:3-51.

21. Ertan T, Soran A, Kılıç M, Aşlar A, Koç M, Cengiz Ö. Kan Malondialdehid ve total antioksidan seviyesinin (TAS) önemi. Cerr Tıp Bült. 2001;2(4):154-67.
22. White M, Heckler F. Oxygen free radicals and wound healing. Clinics in plastic surgery. 1990;17(3):473.
23. Acworth I, Bailey B. Reactive Oxygen Species, in the handbook of oxidative metabolism. Massachusetts, ESA Inc. 1997;1(1).
24. Reiter RJ. Oxidative processes and antioxidative defense mechanisms in the aging brain. The FASEB journal. 1995;9(7):526-33.
25. Davies S, Reichardt-Pascal S, Vaughan D, Russell G. Differential effect of ischaemia-reperfusion injury on anti-oxidant enzyme activity in the rat kidney. Experimental nephrology. 1994;3(6):348-54.
26. Reiter RJ, ACUÑA-CASTROVIEJO D, TAN DX, Burkhardt S. Free radical-mediated molecular damage. Annals of the New York Academy of Sciences. 2001;939(1):200-15.
27. Marnett LJ. Oxyradicals and DNA damage. Carcinogenesis. 2000;21(3):361-70.
28. Ertan T, Soran A, Kılıç M, Aşlar A, Koç M, Cengiz Ö. Kan Malondialdehid ve total antioksidan seviyesinin (TAS) önemi. Cerrahi Tıp Bulteni. 2001;2(4):154-67.
29. Girotti AW. Lipid hydroperoxide generation, turnover, and effector action in biological systems. Journal of lipid research. 1998;39(8):1529-42.
30. Unno N, Fink MP. Intestinal epithelial hyperpermeability. Mechanisms and relevance to disease. Gastroenterol Clin North Am. 1998;27(2):289-307.
31. Mickle D, Weisel R. Future directions of vitamin E and its analogues in minimizing myocardial ischemia-reperfusion injury. The Canadian journal of cardiology. 1992;9(1):89-93.
32. Virág L, Szabó C. The therapeutic potential of poly (ADP-ribose) polymerase

inhibitors. *Pharmacological reviews*. 2002;54(3):375-429.

33. TORLAK Z. RATLARDA DENEYSEL ALT EKSTREMİTE İSKEMİ - REPERFÜZYON MODELİNDE OZON TEDAVİSİNİN ANTİOKSİDAN ETKİNLİĞİNİN ARAŞTIRILMASI [UZMANLIK TEZİ]. İSTANBUL (TC): İSTANBUL ÜNİVERSİTESİ; 2014.

34. Chen H, Kou Y. Vagal and mediator mechanisms underlying the tachypnea caused by pulmonary air embolism in dogs. *Journal of Applied Physiology*. 2000;88(4):1247-53.

35. Kutty RK, Kutty G, Wiggert B, Chader GJ, Darrow RM, Organisciak DT. Induction of heme oxygenase 1 in the retina by intense visible light: suppression by the antioxidant dimethylthiourea. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 1995;92(4):1177-81.

36. Kingston R, Kelly C, Murray P. The therapeutic role of taurine in ischaemia-reperfusion injury. *Current pharmaceutical design*. 2004;10(19):2401-10.

37. Halliwell B, Gutteridge JM. The antioxidants of human extracellular fluids. *Archives of biochemistry and biophysics*. 1990;280(1):1-8.

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

39. Frangogiannis NG. Chemokines in ischemia and reperfusion. *THROMBOSIS AND HAEMOSTASIS-STUTTGART*-. 2007;97(5):738.

40. Korthuis RJ, Granger DN. Reactive oxygen metabolites, neutrophils, and the pathogenesis of ischemic-tissue/reperfusion. *Clinical cardiology*. 1993;16(S1):19-26.

41. Duru S, Koca U, Öztekin S, Olguner C, Kar A, Coker C, et al. 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(8):1142-8.

42. Eltzschig HK, Collard CD. Vascular ischaemia and reperfusion injury. *British*

medical bulletin. 2004;70:71-86.

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

44. Rice-Evans C, Diplock A, Symons M. Mechanisms of radical production. *Laboratory techniques in biochemistry and molecular biology*. 1991;22:19-50.

45. Diepenhorst GM, van Gulik TM, Hack CE. Complement-mediated ischemia-reperfusion injury: lessons learned from animal and clinical studies. *Annals of surgery*. 2009;249(6):889-99.

46. Monsinjon T, Richard V, Fontaine M. Complement and its implications in cardiac ischemia/reperfusion: strategies to inhibit complement. *Fundamental & clinical pharmacology*. 2001;15(5):293-306.

47. Weight S, Bell P, Nicholson M. Renal ischaemia-reperfusion injury. *British Journal of Surgery*. 1996;83(2):162-70.

48. Mackman N. The role of tissue factor and factor VIIa in hemostasis. *Anesthesia and analgesia*. 2009;108(5):1447.

49. Derweesh IH, Novick AC. Mechanisms of renal ischaemic injury and their clinical impact. *BJU international*. 2005;95(7):948-50.

50. Lefer DJ, Scalia R, Campbell B, Nossuli T, Hayward R, Salamon M, et al. Peroxynitrite inhibits leukocyte-endothelial cell interactions and protects against ischemia-reperfusion injury in rats. *Journal of Clinical Investigation*. 1997;99(4):684.

51. Hoffmann JN, Vollmar B, Laschke MW, Fertmann JM, Jauch K-W, Menger MD. Microcirculatory alterations in ischemia-reperfusion injury and sepsis: effects of activated protein C and thrombin inhibition. *Critical Care*. 2005;9(Suppl 4):S33.

52. Majno G, Ames A, Chiang J, Wright RL. No reflow after cerebral ischaemia. *The Lancet*. 1967;290(7515):569-70.

53. Kuijper P, Torres HG, Van Der Linden J, Lammers J, Sixma J, Koenderman L, et al. Platelet-dependent primary hemostasis promotes selectin-and integrin-mediated neutrophil adhesion to damaged endothelium under flow conditions. *Blood*. 1996;87(8):3271-81.
54. Barroso-Aranda J, Schmid-Schönbein G, Zweifach BW, Engler RL. Granulocytes and no-reflow phenomenon in irreversible hemorrhagic shock. *Circulation research*. 1988;63(2):437-47.
55. Gawaz M. Role of platelets in coronary thrombosis and reperfusion of ischemic myocardium. *Cardiovascular research*. 2004;61(3):498-511.
56. Leo R, Pratico D, Iuliano L, Pulcinelli FM, Ghiselli A, Pignatelli P, et al. Platelet activation by superoxide anion and hydroxyl radicals intrinsically generated by platelets that had undergone anoxia and then reoxygenated. *Circulation*. 1997;95(4):885-91.
57. Arzilli F, Giovannetti R, Lenzi M, Salvetti A. Acute hemodynamic (systemic and renal) and humoral effects of three increasing doses of iloprost in essential hypertensives. *American journal of hypertension*. 1989;2(11 Pt 1):856-60.
58. Dohrmann GJ. Experimental spinal cord trauma: a historical review. *Archives of neurology*. 1972;27(6):468.
59. García-Villalón AL, Amezquita YM, Monge L, Fernández N, Salcedo A, Diéguez G. Endothelin-1 potentiation of coronary artery contraction after ischemia–reperfusion. *Vascular pharmacology*. 2008;48(2):109-14.
60. Unno N, Fink MP. Intestinal epithelial hyperpermeability: Mechanisms and relevance to disease. *Gastroenterology clinics of North America*. 1998;27(2):289-307.
61. Sener G, Sakarcan A, Yeğen BÇ. Role of garlic in the prevention of ischemia-reperfusion injury. *Molecular nutrition & food research*. 2007;51(11):1345-52.
62. TURAN Aİ. İZOLE RAT AORTASINDA FASUDİLİN VAZODİLATASYON ETKİSİNİN SODYUM NİTROPRUSSİD VE PAPAVERİN İLE KARŞILAŞTIRILMASI

[UZMANLIK TEZİ]. EDİRNE (TC): TRAKYA ÜNİVERSİTESİ; 2015.

63. Regan RF. The vulnerability of spinal cord neurons to excitotoxic injury: comparison with cortical neurons. *Neuroscience letters*. 1996;213(1):9-12.
64. Hartmann A, Yatsu F, Kuschinsky W. *Cerebral ischemia and basic mechanisms*: Springer Science & Business Media; 2012.
65. Sun Z, Wang X, Lasson Å, Björsson A, Annborn M, Andersson R. Effects of inhibition of PAF, ICAM-1 and PECAM-1 on gut barrier failure caused by intestinal ischemia and reperfusion. *Scandinavian journal of gastroenterology*. 2001;36(1):55-65.
66. López-Neblina F, Páez-Rollys AJ, Toledo-Pereyra LH. Mechanism of protection of verapamil by preventing neutrophil infiltration in the ischemic rat kidney. *Journal of Surgical Research*. 1996;61(2):469-72.
67. SCHOENBERG MH, BEGER HG. Reperfusion injury after intestinal ischemia. *Critical care medicine*. 1993;21(9):1376-86.
68. Goldsmith DR, Wagstaff AJ. Inhaled iloprost: in primary pulmonary hypertension. *Drugs*. 2004;64(7):763-73; discussion 74-5.
69. Diodati JG, Dakak N, Gilligan DM, Quyyumi AA. Effect of atherosclerosis on endothelium-dependent inhibition of platelet activation in humans. *Circulation*. 1998;98(1):17-24.
70. Lowenstein CJ, Dinerman JL, Snyder SH. Nitric oxide: a physiologic messenger. *Annals of internal medicine*. 1994;120(3):227-37.
71. Michel T, Feron O. Nitric oxide synthases: which, where, how, and why? *Journal of Clinical Investigation*. 1997;100(9):2146.
72. Lefer DJ, Jones SP, Girod WG, Baines A, Grisham MB, Cockrell AS, et al. Leukocyte-endothelial cell interactions in nitric oxide synthase-deficient mice. *American Journal of Physiology-Heart and Circulatory Physiology*. 1999;276(6):H1943-H50.

73. Koşay S, Bayındır O, Ülker S. Nitrik oksit'in patolojik olaylardaki rolü. İzmir: Ege Üniversitesi Basımevi. 1996.
74. Singh Su, Evans T. Nitric oxide, the biological mediator of the decade: fact or fiction? *European Respiratory Journal*. 1997;10(3):699-707.
75. Anaya-Prado R, Toledo-Pereyra LH, Lentsch AB, Ward PA. Ischemia/reperfusion injury. *Journal of surgical research*. 2002;105(2):248-58.
76. Tunçtan B, Altug S. The use of nitric oxide synthase inhibitors in inflammatory diseases: a novel class of anti-inflammatory agents. *Current Medicinal Chemistry-Anti-Inflammatory & Anti-Allergy Agents*. 2004;3(3):271-301.
77. Chatterjee A, Catravas JD. Endothelial nitric oxide (NO) and its pathophysiologic regulation. *Vascular pharmacology*. 2008;49(4):134-40.
78. Blantz RC, Munger K. Role of nitric oxide in inflammatory conditions. *Nephron*. 2002;90(4):373-8.
79. Kleinert H, Pautz A, Linker K, Schwarz PM. Regulation of the expression of inducible nitric oxide synthase. *European journal of pharmacology*. 2004;500(1):255-66.
80. Cuzzocrea S. Effect of inhibitors of nitric oxide in animal models and future directions for therapy in inflammatory disorders. *Current Medicinal Chemistry-Anti-Inflammatory & Anti-Allergy Agents*. 2004;3(3):261-70.
81. Schildknecht S, Ullrich V. Peroxynitrite as regulator of vascular prostanoid synthesis. *Archives of biochemistry and biophysics*. 2009;484(2):183-9.
82. Pacher P, Beckman JS, Liaudet L. Nitric oxide and peroxynitrite in health and disease. *Physiological reviews*. 2007;87(1):315-424.
83. Sharma J, Al-Omran A, Parvathy S. Role of nitric oxide in inflammatory diseases. *Inflammopharmacology*. 2007;15(6):252-9.
84. Bryan NS, Bian K, Murad F. Discovery of the nitric oxide signaling pathway and

- targets for drug development. *Frontiers in bioscience (Landmark edition)*. 2008;14:1-18.
85. Wimalawansa SJ. Nitric oxide: new evidence for novel therapeutic indications. *Expert opinion on pharmacotherapy*. 2008;9(11):1935-54.
86. Knott AB, Bossy-Wetzel E. Nitric oxide in health and disease of the nervous system. *Antioxidants & redox signaling*. 2009;11(3):541-53.
87. Hirata M, Kohse K, Chang C, Ikebe T, Murad F. Mechanism of cyclic GMP inhibition of inositol phosphate formation in rat aorta segments and cultured bovine aortic smooth muscle cells. *Journal of Biological Chemistry*. 1990;265(3):1268-73.
88. Komalavilas P, Lincoln TM. Phosphorylation of the inositol 1, 4, 5-trisphosphate receptor by cyclic GMP-dependent protein kinase. *Journal of Biological Chemistry*. 1994;269(12):8701-7.
89. Blatter L, Wier W. Nitric oxide decreases  $[Ca^{2+}]_i$  in vascular smooth muscle by inhibition of the calcium current. *Cell calcium*. 1994;15(2):122-31.
90. Furukawa K, Tawada Y, Shigekawa M. Regulation of the plasma membrane  $Ca^{2+}$  pump by cyclic nucleotides in cultured vascular smooth muscle cells. *Journal of Biological Chemistry*. 1988;263(17):8058-65.
91. Raeymaekers L, Hofmann F, Casteels R. Cyclic GMP-dependent protein kinase phosphorylates phospholamban in isolated sarcoplasmic reticulum from cardiac and smooth muscle. *Biochemical Journal*. 1988;252(1):269-73.
92. Sauzeau V, Le Jeune H, Cario-Toumaniantz C, Smolenski A, Lohmann SM, Bertoglio J, et al. Cyclic GMP-dependent protein kinase signaling pathway inhibits RhoA-induced  $Ca^{2+}$  sensitization of contraction in vascular smooth muscle. *Journal of Biological Chemistry*. 2000;275(28):21722-9.
93. Yanagisawa M, Kurihara H, Kimura S, Tomobe Y, Kobayashi M, Mitsui Y, et al. A novel potent vasoconstrictor peptide produced by vascular endothelial cells. *Nature*.

1988;332(6163):411-5.

94. Firth J, Ratcliffe P. Organ distribution of the three rat endothelin messenger RNAs and the effects of ischemia on renal gene expression. *Journal of Clinical Investigation*. 1992;90(3):1023.

95. Stammberger U, Carboni GL, Hillinger S, Schneiter D, Weder W, Schmid RA. Combined treatment with endothelin-and PAF-antagonists reduces posttransplant lung ischemia/reperfusion injury. *The Journal of Heart and Lung Transplantation*. 1999;18(9):862-8.

96. Souza D, Cara D, Cassali G, Coutinho S, Silveira M, Andrade S, et al. Effects of the PAF receptor antagonist UK74505 on local and remote reperfusion injuries following ischaemia of the superior mesenteric artery in the rat. *British journal of pharmacology*. 2000;131(8):1800-8.

97. Rodriguez C, Mayo JC, Sainz RM, Antolin I, Herrera F, Martin V, et al. Regulation of antioxidant enzymes: a significant role for melatonin. *Journal of pineal research*. 2004;36(1):1-9.

98. Reiter RJ, Melchiorri D, Sewerynek E, Poeggeler B, Barlow-Walden L, Chuang J, et al. A review of the evidence supporting melatonin's role as an antioxidant. *Journal of pineal research*. 1995;18(1):1-11.

99. Ross D. Glutathione, free radicals and chemotherapeutic agents: mechanisms of free-radical induced toxicity and glutathione-dependent protection. *Pharmacology & therapeutics*. 1988;37(2):231-49.

100. Hu M-L. Measurement of protein thiol groups and glutathione in plasma. *Methods in enzymology*. 1993;233:380-5.

101. Kanbağlı Ö. OKSİDATİF STRES GÖSTERGESİ OLARAK SERUMDA TOTAL SÜLFİDRİL DÜZEYLERİ VE GLUTATYON PEROKSİDAZ AKTİVİTESİ. *İstanbul Tıp*

Fakültesi Dergisi. 2000;63(3).

102. Carden DL, Granger DN. Pathophysiology of ischaemia-reperfusion injury. *The Journal of pathology*. 2000;190(3):255-66.

103. Davies M, Huynh T, Hagen P. *Endothelial physiology. Ischemia-reperfusion injury*: Blackwell Science Oxford; 1999. p. 157-79.

104. Al-Mehdi AB, Zhao G, Fisher AB. ATP-independent membrane depolarization with ischemia in the oxygen-ventilated isolated rat lung. *American Journal of Respiratory Cell and Molecular Biology*. 1998;18(5):653-61.

105. Seal JB, Gewertz BL. Vascular dysfunction in ischemia-reperfusion injury. *Annals of vascular surgery*. 2005;19(4):572-84.

106. Schütte H, Löckinger A, Seeger W, Grimminger F. Aerosolized PGE1, PGI2 and nitroprusside protect against vascular leakage in lung ischaemia-reperfusion. *European Respiratory Journal*. 2001;18(1):15-22.

107. Ostrovsky L, Woodman RC, Payne D, Teoh D, Kubes P. Antithrombin III prevents and rapidly reverses leukocyte recruitment in ischemia/reperfusion. *Circulation*. 1997;96(7):2302-10.

108. Blaisdell FW. The pathophysiology of skeletal muscle ischemia and the reperfusion syndrome: a review. *Vascular*. 2002;10(6):620-30.

109. Östman B, Michaelsson K, Rahme H, Hillered L. Tourniquet-induced ischemia and reperfusion in human skeletal muscle. *Clinical orthopaedics and related research*. 2004;418:260-5.

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

111. Hayes G, Liauw S, Romaschin A, Walker P, editors. *Separation of reperfusion injury*

from ischemia-induced necrosis. *Surg Forum*; 1988.

112. Aras O, Dilsizian V. Targeting ischemic memory. *Current opinion in biotechnology*. 2007;18(1):46-51.

113. Reffelmann T, Hale SL, Dow JS, Kloner RA. No-reflow phenomenon persists long-term after ischemia/reperfusion in the rat and predicts infarct expansion. *Circulation*. 2003;108(23):2911-7.

114. Turchányi B, Tóth B, Rácz I, Vendég Z. Ischemia reperfusion injury of the skeletal muscle after selective deafferentation. *Physiological research*. 2005;54(1):25.

115. Haimovici H. Muscular, renal, and metabolic complications of acute arterial occlusions: myonephropathic-metabolic syndrome. *Surgery*. 1979;85(4):461-8.

116. Goldman G, Welbourn R, Klausner JM, Kobzik L, Valeri C, Shepro D, et al. Mast cells and leukotrienes mediate neutrophil sequestration and lung edema after remote ischemia in rodents. *Surgery*. 1992;112(3):578-86.

117. Nelson P. Renal ischemia–reperfusion injury: Renal dendritic cells loudly sound the alarm. *Kidney international*. 2007;71(7):604-5.

118. Kuzu MA, Köksoy C, Kale IIT, Tanik A, Terzi C, Elhan AH. Reperfusion injury delays healing of intestinal anastomosis in a rat. *The American journal of surgery*. 1998;176(4):348-51.

119. Yassin M, Magdi MI, Harkin M, Denis W, Barros D'Sa M, Aires AB, Halliday PD, M Isla, Rowlands M, Brian J. Lower limb ischemia-reperfusion injury triggers a systemic inflammatory response and multiple organ dysfunction. *World journal of surgery*. 2002;26(1):115-21.

120. Panés J, Perry M, Granger DN. Leukocyte-endothelial cell adhesion: avenues for therapeutic intervention. *British journal of pharmacology*. 1999;126(3):537-50.

121. Chiang N, Gronert K, Clish CB, O'Brien JA, Freeman MW, Serhan CN. Leukotriene

B 4 receptor transgenic mice reveal novel protective roles for lipoxins and aspirin-triggered lipoxins in reperfusion. *The Journal of clinical investigation*. 1999;104(3):309-16.

122. Yokoyama H, Lingle DM, Crestanello JA, Kamelgard J, Kott BR, Momeni R, et al. Coenzyme Q 10 protects coronary endothelial function from ischemia reperfusion injury via an antioxidant effect. *Surgery*. 1996;120(2):189-96.

123. Celik O, Turkoz Y, Hascalik S, Hascalik M, Cigremis Y, Mizrak B, et al. The protective effect of caffeic acid phenethyl ester on ischemia-reperfusion injury in rat ovary. *European Journal of Obstetrics & Gynecology and Reproductive Biology*. 2004;117(2):183-8.

124. Wall J. Antioxidants in prevention of reperfusion damage of vascular endothelium. *TSMJ*. 2000;1:67.

125. Massey KD, Burton KP. Alpha-tocopherol attenuates myocardial membrane-related alterations resulting from ischemia and reperfusion. *American Journal of Physiology-Heart and Circulatory Physiology*. 1989;256(4):H1192-H9.

126. Bilgin-Karabulut A, Ademoğlu E, Aydın I, Erer M, Gökkuşu C. Protective effects of vitamins A and E pretreatment in venous ischemia/reperfusion injury. *Journal of reconstructive microsurgery*. 2001;17(06):425-30.

127. Bozkurt A. (Alpha)-tocopherol (vitamin E) and iloprost attenuate reperfusion injury in skeletal muscle ischemia/reperfusion injury. *Journal of Cardiovascular Surgery*. 2002;43(5):693.

128. Korthuis RJ, Granger DN, Townsley MI, Taylor AE. The role of oxygen-derived free radicals in ischemia-induced increases in canine skeletal muscle vascular permeability. *Circulation Research*. 1985;57(4):599-609.

129. Maxwell SR, Lip GY. Reperfusion injury: a review of the pathophysiology, clinical manifestations and therapeutic options. *International journal of cardiology*. 1997;58(2):95-

117.

130. Cutrn JC, Perrelli M-G, Cavalieri B, Peralta C, Catafau JR, Poli G. Microvascular dysfunction induced by reperfusion injury and protective effect of ischemic preconditioning. *Free Radical Biology and Medicine*. 2002;33(9):1200-8.

131. Adanali G, Ozer K, Siemionow M. Early and late effects of ischemic preconditioning on microcirculation of skeletal muscle flaps. *Plastic and reconstructive surgery*. 2002;109(4):1344-51.

132. Jerome SN, Akimitsu T, Gute DC, Korthuis RJ. Ischemic preconditioning attenuates capillary no-reflow induced by prolonged ischemia and reperfusion. *American Journal of Physiology-Heart and Circulatory Physiology*. 1995;268(5):H2063-H7.

133. Yamaguchi T, Dayton C, Shigematsu T, Carter P, Yoshikawa T, Gute DC, et al. Preconditioning with ethanol prevents postischemic leukocyte-endothelial cell adhesive interactions. *American Journal of Physiology-Heart and Circulatory Physiology*. 2002;283(3):H1019-H30.

134. Khalil AA, Aziz FA, Hall JC. Reperfusion injury. *Plast Reconstr Surg*. 2006;117(3):1024-33.

135. Frostell C, Fratacci M, Wain J, Jones R, Zapol W. Inhaled nitric oxide. A selective pulmonary vasodilator reversing hypoxic pulmonary vasoconstriction. *Circulation*. 1991;83(6):2038-47.

136. Kurose I, Wolf R, Grisham MB, Granger DN. Modulation of ischemia/reperfusion-induced microvascular dysfunction by nitric oxide. *Circulation Research*. 1994;74(3):376-82.

137. Rivera-Chavez FA, Toledo-Pereyra LH, Dean RE, Crouch L, Ward PA. Exogenous and endogenous nitric oxide but not iNOS inhibition improves function and survival of ischemically injured livers. *Journal of Investigative Surgery*. 2001;14(5):267-73.

138. Mowlavi A, Neumeister MW, Wilhelmi BJ, Song Y-H, Suchy H, Russell RC. Local hypothermia during early reperfusion protects skeletal muscle from ischemia-reperfusion injury. *Plastic and reconstructive surgery*. 2003;111(1):242-50.
139. Siemionow M, Arslan E. Ischemia/reperfusion injury: a review in relation to free tissue transfers. *Microsurgery*. 2004;24(6):468-75.
140. Zacharowski K, Otto M, Hafner G, Marsh HC, Thiemermann C. Reduction of myocardial infarct size with sCR1sLex, an alternatively glycosylated form of human soluble complement receptor type 1 (sCR1), possessing sialyl Lewis x. *British journal of pharmacology*. 1999;128(5):945-52.
141. Arumugam TV, Shiels IA, Woodruff TM, Reid RC, Fairlie DP, Taylor SM. Protective effect of a new C5a receptor antagonist against ischemia–reperfusion injury in the rat small intestine. *Journal of Surgical Research*. 2002;103(2):260-7.
142. AG T. Apoptoz: Programlı hücre ölümü. *T Klin Tıp Bilimleri*. 2003;23:499-508.
143. Öztürk F. Apopitoz. 2002.
144. Hatton J. Pharmacological treatment of traumatic brain injury. *CNS drugs*. 2001;15(7):553-81.
145. Madaule P, Axel R. A novel ras-related gene family. *Cell*. 1985;41(1):31-40.
146. Bishop AL, Hall A. Rho GTPases and their effector proteins. *The Biochemical journal*. 2000;348 Pt 2:241-55.
147. Amano M, Fukata Y, Kaibuchi K. Regulation and functions of Rho-associated kinase. *Experimental cell research*. 2000;261(1):44-51.
148. Barman SA, Zhu S, White RE. RhoA/Rho-kinase signaling: a therapeutic target in pulmonary hypertension. *Vascular health and risk management*. 2009;5:663-71.
149. Boettner B, Van Aelst L. The role of Rho GTPases in disease development. *Gene*. 2002;286(2):155-74.

150. Calò LA, Pessina AC. RhoA/Rho-kinase pathway: much more than just a modulation of vascular tone. Evidence from studies in humans. *Journal of hypertension*. 2007;25(2):259-64.
151. Dhanasekaran N, Dermott JM. Signaling by the G 12 class of G proteins. *Cellular signalling*. 1996;8(4):235-45.
152. Fukata Y, Kaibuchi K, Amano M. Rho–Rho-kinase pathway in smooth muscle contraction and cytoskeletal reorganization of non-muscle cells. *Trends in pharmacological sciences*. 2001;22(1):32-9.
153. Hirano K. Current topics in the regulatory mechanism underlying the Ca<sup>2+</sup> sensitization of the contractile apparatus in vascular smooth muscle. *Journal of pharmacological sciences*. 2007;104(2):109-15.
154. Kume H. RhoA/Rho-kinase as a therapeutic target in asthma. *Current medicinal chemistry*. 2008;15(27):2876-85.
155. Lee DL, Webb RC, Jin L. Hypertension and RhoA/Rho-kinase signaling in the vasculature highlights from the recent literature. *Hypertension*. 2004;44(6):796-9.
156. Liao JK, Seto M, Noma K. Rho kinase (ROCK) inhibitors. *Journal of cardiovascular pharmacology*. 2007;50(1):17.
157. LoGrasso PV, Feng Y. Rho kinase (ROCK) inhibitors and their application to inflammatory disorders. *Current topics in medicinal chemistry*. 2009;9(8):704-23.
158. Noma K, Oyama N, Liao JK. Physiological role of ROCKs in the cardiovascular system. *American Journal of Physiology-Cell Physiology*. 2006;290(3):C661-C8.
159. Seasholtz TM, Brown JH. Rho signaling in vascular diseases. *Molecular interventions*. 2004;4(6):348.
160. Etienne-Manneville S, Hall A. Rho GTPases in cell biology. *Nature*. 2002;420(6916):629-35.

161. Özdemir E, Bağcivan İ. Rho-kinaz enzim sisteminin vasküler kas tonusu üzerine fizyopatolojik etkileri. *Genel Tıp Dergisi*. 2011;21(1).
162. Miao L, Calvert JW, Tang J, Parent AD, Zhang JH. Age-related RhoA expression in blood vessels of rats. *Mechanisms of ageing and development*. 2001;122(15):1757-70.
163. Kaibuchi K, Kuroda S, Amano M. Regulation of the cytoskeleton and cell adhesion by the Rho family GTPases in mammalian cells. *Annual review of biochemistry*. 1999;68(1):459-86.
164. Vojtek AB, Cooper JA. Rho family members: activators of MAP kinase cascades. *Cell*. 1995;82(4):527-9.
165. Subauste MC, Von Herrath M, Benard V, Chamberlain CE, Chuang T-H, Chu K, et al. Rho family proteins modulate rapid apoptosis induced by cytotoxic T lymphocytes and Fas. *Journal of Biological Chemistry*. 2000;275(13):9725-33.
166. Zohn IM, Campbell SL, Khosravi-Far R, Rossman KL, Der CJ. Rho family proteins and Ras transformation: the RHOad less traveled gets congested. *Oncogene*. 1998;17(11).
167. Amano M, Nakayama M, Kaibuchi K. Rho-kinase/ROCK: a key regulator of the cytoskeleton and cell polarity. *Cytoskeleton*. 2010;67(9):545-54.
168. Kimura K, Ito M, Amano M, Chihara K. Regulation of myosin phosphatase by Rho and Rho-associated kinase (Rho-kinase). *Science (New York, NY)*. 1996;273(5272):245.
169. Matsui T, Amano M, Yamamoto T, Chihara K, Nakafuku M, Ito M, et al. Rho-associated kinase, a novel serine/threonine kinase, as a putative target for small GTP binding protein Rho. *The EMBO journal*. 1996;15(9):2208.
170. Shi J, Wei L. Rho kinase in the regulation of cell death and survival. *Archivum immunologiae et therapiae experimentalis*. 2007;55(2):61-75.
171. Wettschureck N, Offermanns S. Rho/Rho-kinase mediated signaling in physiology and pathophysiology. *Journal of molecular medicine (Berlin, Germany)*. 2002;80(10):629-

38.

172. Wettschureck N, Offermanns S. Rho/Rho-kinase mediated signaling in physiology and pathophysiology. *Journal of molecular medicine*. 2002;80(10):629-38.

173. Bishop AL, Alan H. Rho GTPases and their effector proteins. *Biochemical Journal*. 2000;348(2):241-55.

174. Amano M, Ito M, Kimura K, Fukata Y, Chihara K, Nakano T, et al. Phosphorylation and activation of myosin by Rho-associated kinase (Rho-kinase). *Journal of Biological Chemistry*. 1996;271(34):20246-9.

175. Singer WD, Brown a, H Alex, Sternweis PC. Regulation of eukaryotic phosphatidylinositol-specific phospholipase C and phospholipase D. *Annual review of biochemistry*. 1997;66(1):475-509.

176. Zhou Q, Gensch C, Liao JK. Rho-associated coiled-coil-forming kinases (ROCKs): potential targets for the treatment of atherosclerosis and vascular disease. *Trends in pharmacological sciences*. 2011;32(3):167-73.

177. Sin W-C, Chen X-Q, Leung T, Lim L. RhoA-binding kinase  $\alpha$  translocation is facilitated by the collapse of the vimentin intermediate filament network. *Molecular and cellular biology*. 1998;18(11):6325-39.

178. Somlyo AP, Somlyo AV. *Signal transduction and regulation in smooth muscle*. 1994.

179. Büssemaker E, Pistrosch F, Förster S, Herbrig K, Gross P, Passauer J, et al. Rho kinase contributes to basal vascular tone in humans: role of endothelium-derived nitric oxide. *American Journal of Physiology-Heart and Circulatory Physiology*. 2007;293(1):H541-H7.

180. Uehata M, Ishizaki T, Satoh H, Ono T, Kawahara T, Morishita T, et al. Calcium sensitization of smooth muscle mediated by a Rho-associated protein kinase in hypertension. *Nature*. 1997;389(6654):990-4.

181. Kandabashi T, Shimokawa H, Miyata K, Kunihiro I, Kawano Y, Fukata Y, et al.

Inhibition of myosin phosphatase by upregulated Rho-kinase plays a key role for coronary artery spasm in a porcine model with interleukin-1 $\beta$ . *Circulation*. 2000;101(11):1319-23.

182. Rao PV, Deng P-F, Kumar J, Epstein DL. Modulation of aqueous humor outflow facility by the Rho kinase-specific inhibitor Y-27632. *Investigative ophthalmology & visual science*. 2001;42(5):1029-37.

183. Takamura M, Sakamoto M, Genda T, Ichida T, Asakura H, Hirohashi S. Inhibition of intrahepatic metastasis of human hepatocellular carcinoma by Rho-associated protein kinase inhibitor Y-27632. *Hepatology*. 2001;33(3):577-81.

184. Köksel O, Yıldırım Ç, Tiftik RN, Kubat H, Tamer L, Cinel L, et al. Rho-kinase (ROCK-1 and ROCK-2) upregulation in oleic acid-induced lung injury and its restoration by Y-27632. *European journal of pharmacology*. 2005;510(1):135-42.

185. Bao W, Hu E, Tao L, Boyce R, Mirabile R, Thudium DT, et al. Inhibition of Rho-kinase protects the heart against ischemia/reperfusion injury. *Cardiovascular research*. 2004;61(3):548-58.

186. Takeda K, Jin MB, Fujita M, Fukai M, Sakurai T, Nakayama M, et al. A novel inhibitor of Rho-associated protein kinase, Y-27632, ameliorates hepatic ischemia and reperfusion injury in rats. *Surgery*. 2003;133(2):197-206.

187. Satoh S-I, Utsunomiya T, Tsurui K, Kobayashi T, Ikegaki I, Sasaki Y, et al. Pharmacological profile of hydroxy fasudil as a selective rho kinase inhibitor on ischemic brain damage. *Life sciences*. 2001;69(12):1441-53.

188. Levent A, Büyükafşar K. Expression of Rho-kinase (ROCK-1 and ROCK-2) and its substantial role in the contractile activity of the sheep ureter. *British journal of pharmacology*. 2004;143(3):431-7.

189. Büyükafşar K, Ün Is. Effects of the Rho-kinase inhibitors, Y-27632 and fasudil, on the corpus cavernosum from diabetic mice. *European journal of pharmacology*.

2003;472(3):235-8.

190. Büyükafşar K, Levent A. Involvement of Rho/Rho-kinase signalling in the contractile activity and acetylcholine release in the mouse gastric fundus. *Biochemical and biophysical research communications*. 2003;303(3):777-81.

191. Büyükafşar K, Levent A, Ark M. Expression of Rho-kinase and its functional role in the contractile activity of the mouse vas deferens. *British journal of pharmacology*. 2003;140(4):743-9.

192. Büyükafşar K, Yalçın İ, Kurt AH, Tiftik RN, Şahan-Fırat S, Aksu F. Rho-kinase inhibitor, Y-27632, has an antinociceptive effect in mice. *European journal of pharmacology*. 2006;541(1):49-52.

193. Masumoto A, Hirooka Y, Shimokawa H, Hironaga K, Setoguchi S, Takeshita A. Possible involvement of Rho-kinase in the pathogenesis of hypertension in humans. *Hypertension*. 2001;38(6):1307-10.

194. Shiokawa S, Iwashita M, Akimoto Y, Nagamatsu S, Sakai K, Hanashi H, et al. Small guanosine triphosphatase RhoA and Rho-associated kinase as regulators of trophoblast migration. *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*. 2002;87(12):5808-16.

195. Rees R, Ziessen T, Ralph D, Kell P, Moncada S, Celtek S. Human and rabbit cavernosal smooth muscle cells express Rho-kinase. *International journal of impotence research*. 2002;14(1):1-7.

196. Bivalacqua TJ, Champion HC, Usta MF, Celtek S, Chitaley K, Webb RC, et al. RhoA/Rho-kinase suppresses endothelial nitric oxide synthase in the penis: a mechanism for diabetes-associated erectile dysfunction. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2004;101(24):9121-6.

197. Chitaley K, Wingard CJ, Webb RC, Branam H, Stopper VS, Lewis RW, et al. Antagonism of Rho-kinase stimulates rat penile erection via a nitric oxide-independent

pathway. *Nature medicine*. 2001;7(1):119-22.

198. Satoh S-I, Ikegaki I, Asano T, Shimokawa H. Antiischemic properties of fasudil in experimental models of vasospastic angina. *The Japanese Journal of Pharmacology*. 2001;87(1):34-40.

199. Shimokawa H, Takeshita A. Rho-kinase is an important therapeutic target in cardiovascular medicine. *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology*. 2005;25(9):1767-75.

200. Funakoshi Y, Ichiki T, Shimokawa H, Egashira K, Takeda K, Kaibuchi K, et al. Rho-kinase mediates angiotensin II-induced monocyte chemoattractant protein-1 expression in rat vascular smooth muscle cells. *Hypertension*. 2001;38(1):100-4.

201. Ashida N, Arai H, Yamasaki M, Kita T. Distinct signaling pathways for MCP-1-dependent integrin activation and chemotaxis. *Journal of Biological Chemistry*. 2001;276(19):16555-60.

202. Jalil J, Lavandero S, Chiong M, Ocaranza MP. [Rho/Rho kinase signal transduction pathway in cardiovascular disease and cardiovascular remodeling]. *Rev Esp Cardiol*. 2005;58(8):951-61.

203. Kara N, Senturk N, Gunes SO, Bagci H, Yigit S, Turanli AY. Lack of evidence for association between endothelial nitric oxide synthase gene polymorphism (glu298asp) with Behcet's disease in the Turkish population. *Archives of dermatological research*. 2006;297(10):468-71.

204. Chitale K, Webb RC. Nitric oxide induces dilation of rat aorta via inhibition of rho-kinase signaling. *Hypertension*. 2002;39(2):438-42.

205. Mukai Y, Shimokawa H, Matoba T, Kandabashi T, Satoh S, Hiroki J, et al. Involvement of Rho-kinase in hypertensive vascular disease: a novel therapeutic target in hypertension. *The FASEB Journal*. 2001;15(6):1062-4.

206. Seko T, Ito M, Kureishi Y, Okamoto R, Moriki N, Onishi K, et al. Activation of RhoA and inhibition of myosin phosphatase as important components in hypertension in vascular smooth muscle. *Circulation research*. 2003;92(4):411-8.
207. Rikitake Y, Liao JK. ROCKs as therapeutic targets in cardiovascular diseases. *Expert review of cardiovascular therapy*. 2005;3(3):441-51.
208. Yang G, Caldwell RB, Yao L, Romero MJ, Toque HA, Caldwell RW. The role of RhoA/Rho kinase pathway in endothelial dysfunction. *Journal of cardiovascular disease research*. 2010;1(4):165-70.
209. Salvarani C, Pipitone N, Catanoso MG, Cimino L, Tumiatei B, Macchioni P, et al. Epidemiology and clinical course of Behçet's disease in the Reggio Emilia area of Northern Italy: A seventeen-year population-based study. *Arthritis Care & Research*. 2007;57(1):171-8.
210. Eto M, Barandiér C, Rathgeb L, Kozai T, Joch H, Yang Z, et al. Thrombin Suppresses Endothelial Nitric Oxide Synthase and Upregulates Endothelin-Converting Enzyme-1 Expression by Distinct Pathways Role of Rho/ROCK and Mitogen-Activated Protein Kinase. *Circulation research*. 2001;89(7):583-90.
211. Laufs U, Marra D, Node K, Liao JK. 3-Hydroxy-3-methylglutaryl-CoA reductase inhibitors attenuate vascular smooth muscle proliferation by preventing rho GTPase-induced down-regulation of p27 Kip1. *Journal of Biological Chemistry*. 1999;274(31):21926-31.
212. Li Z, Dong X, Wang Z, Liu W, Deng N, Ding Y, et al. Regulation of PTEN by Rho small GTPases. *Nature cell biology*. 2005;7(4):399-404.
213. Chiba Y, Misawa M. [Probable involvement of the augmented agonist-induced Ca<sup>2+</sup> sensitization of airway smooth muscle contraction in the pathogenesis of airway hyperresponsiveness]. *Nihon yakurigaku zasshi Folia pharmacologica Japonica*. 1999;114(3):185-90.

214. Iizuka K, Shimizu Y, Tsukagoshi H, Yoshii A, Harada T, Dobashi K, et al. Evaluation of Y-27632, a rho-kinase inhibitor, as a bronchodilator in guinea pigs. *European journal of pharmacology*. 2000;406(2):273-9.
215. Moran C, Friel A, Smith T, Cairns M, Morrison J. Expression and modulation of Rho kinase in human pregnant myometrium. *Molecular human reproduction*. 2002;8(2):196-200.
216. Ark M, Yılmaz N, Yazıcı G, Kubat H, Aktaş S. Rho-associated protein kinase II (rock II) expression in normal and preeclamptic human placentas. *Placenta*. 2005;26(1):81-4.
217. Wibberley A, Chen Z, Hu E, Hieble JP, Westfall TD. Expression and functional role of Rho-kinase in rat urinary bladder smooth muscle. *British journal of pharmacology*. 2003;138(5):757-66.
218. Williams SK. Novel therapeutic targets for erectile dysfunction. *Maturitas*. 2012;71(1):20-7.
219. Maddala R, Reddy VN, Epstein DL, Rao V. Growth factor induced activation of Rho and Rac GTPases and actin cytoskeletal reorganization in human lens epithelial cells. *Mol Vis*. 2003;9(329):36.
220. Honjo M, Tanihara H, Inatani M, Kido N, Sawamura T, Yue BY, et al. Effects of rho-associated protein kinase inhibitor Y-27632 on intraocular pressure and outflow facility. *Investigative ophthalmology & visual science*. 2001;42(1):137-44.
221. Ying H, Biroc SL, Li W-w, Alicke B, Xuan J-A, Pagila R, et al. The Rho kinase inhibitor fasudil inhibits tumor progression in human and rat tumor models. *Molecular Cancer Therapeutics*. 2006;5(9):2158-64.
222. Fritz G, Kaina B. Rho GTPases: promising cellular targets for novel anticancer drugs. *Current cancer drug targets*. 2006;6(1):1-14.
223. Shibuya M, Suzuki Y. [Treatment of cerebral vasospasm by a protein kinase inhibitor

AT 877]. No to shinkei= Brain and nerve. 1993;45(9):819-24.

224. Nagaoka T, Fagan KA, Gebb SA, Morris KG, Suzuki T, Shimokawa H, et al. Inhaled Rho kinase inhibitors are potent and selective vasodilators in rat pulmonary hypertension. *American journal of respiratory and critical care medicine*. 2005;171(5):494-9.

225. Song Y, Chen X, Wang LY, Gao W, Zhu MJ. Rho Kinase Inhibitor Fasudil Protects against  $\beta$ -Amyloid-Induced Hippocampal Neurodegeneration in Rats. *CNS neuroscience & therapeutics*. 2013;19(8):603-10.

226. Hou Y, Zhou L, Yang Q, Du X, Li M, Yuan M, et al. Changes in hippocampal synapses and learning-memory abilities in a streptozotocin-treated rat model and intervention by using fasudil hydrochloride. *Neuroscience*. 2012;200:120-9.

227. Davies SP, Reddy H, Caivano M, Cohen P. Specificity and mechanism of action of some commonly used protein kinase inhibitors. *Biochemical Journal*. 2000;351(1):95-105.

228. Garbaisz D, Turoczi Z, Aranyi P, Fulop A, Rosero O, Hermes E, et al. Attenuation of skeletal muscle and renal injury to the lower limb following ischemia-reperfusion using mPTP inhibitor NIM-811. *PLoS One*. 2014;9(6):e101067.

229. Kirisci M, Oktar GL, Ozogul C, Oyar EO, Akyol SN, Demirtas CY, et al. Effects of adrenomedullin and vascular endothelial growth factor on ischemia/reperfusion injury in skeletal muscle in rats. *J Surg Res*. 2013;185(1):56-63.

230. Avci T, Erer D, Kucuk A, Ozturk Y, Tosun M, Oktar GL, et al. The effects of iloprost on ischemia-reperfusion injury in skeletal muscles in a rodent model. *J Surg Res*. 2014;187(1):162-8.

231. Köksoy C, Z. C, Sayek İ. İskemi Reperfüzyon Modelleri Cerrahi Araştırma. Ankara: Nobel Tıp Kitabevleri; 2005. 357 p.

232. Fukumoto Y, Matoba T, Ito A, Tanaka H, Kishi T, Hayashidani S, et al. Acute vasodilator effects of a Rho-kinase inhibitor, fasudil, in patients with severe pulmonary

hypertension. *Heart*. 2005;91(3):391-2.

233. Erdoğan D. Gelecekte pulmoner arter hipertansiyonu. *Tıp Araştırmaları Dergisi*. 2010;54 -6.

234. Badejo AM, Jr., Dhaliwal JS, Casey DB, Gallen TB, Greco AJ, Kadowitz PJ. Analysis of pulmonary vasodilator responses to the Rho-kinase inhibitor fasudil in the anesthetized rat. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*. 2008;295(5):L828-36.

235. Okamura N, Saito M, Mori A, Sakamoto K, Kametaka S, Nakahara T, et al. Vasodilator effects of fasudil, a Rho-kinase inhibitor, on retinal arterioles in stroke-prone spontaneously hypertensive rats. *J Ocul Pharmacol Ther*. 2007;23(3):207-12.

236. Erel O. A novel automated method to measure total antioxidant response against potent free radical reactions. *Clinical biochemistry*. 2004;37(2):112-9.

237. Erel O. A new automated colorimetric method for measuring total oxidant status. *Clinical biochemistry*. 2005;38(12):1103-11.

238. Okutan H, Ozcelik N, Yilmaz HR, Uz E. Effects of caffeic acid phenethyl ester on lipid peroxidation and antioxidant enzymes in diabetic rat heart. *Clinical Biochemistry*. 2005;38(2):191-6.

239. Roberts A, Nora J, Hughes W, Quintanilla A, Ganote C, Sanders Jr J, et al. Cardiac and renal responses to cross-clamping of the descending thoracic aorta. *The Journal of thoracic and cardiovascular surgery*. 1983;86(5):732-41.

240. Klausner JM, Paterson IS, Goldman G, Kobzik L, Valeri CR, Shepro D, et al. Thromboxane A2 mediates increased pulmonary microvascular permeability following limb ischemia. *Circulation research*. 1989;64(6):1178-89.

241. Fyman P, Reynolds J, Moser F, Avitable M, Casthely P, Butt K. Pharmacokinetics of sufentanil in patients undergoing renal transplantation. *Canadian journal of anaesthesia*. 1988;35(3):312-5.

242. Cohen IK, Diegelmann RF, Yager D, Wornum III I, Graham M, Crossland M.  
Wound care and wound healing. Principles of surgery. 1999;7:263-98.

