



TC.  
UFUK ÜNİVERSİTESİ TIP FAKÜLTESİ  
PLASTİK, REKONSTRÜKTİF VE ESTETİK CERRAHİ  
ANABİLİM DALI

**C1 ESTERAZ İNHİBİTÖRÜ'NÜN EKSTREMİTEDE  
İSKEMİ / REPERFÜZYON HASARI ÜZERİNDEKİ ETKİSİ**

**Dr. Senem Özge TURAÇLI KARAGÜVEN**

**TIPTA UZMANLIK TEZİ**

**TEZ DANIŞMANI**

**Prof. Dr. Erdem YORMUK**

**ANKARA**

**2014**

## ÖNSÖZ

*Oluşturduğu bilimsel çatı altında uzmanlık eğitimi alma fırsatı bulduğum, tez çalışmamda maddi ve manevi desteğini eksik etmeyen değerli hocam Prof. Dr. Rıdvan EGE'ye, eşsiz tecrübelerini bize aktararak eğitimimde önemli katkıları olan ve yanında yetiştirme ayrıcalığını yaşadığım Anabilim Dalı Başkanımız değerli hocam Prof. Dr. Erdem YORMUK'a, bir dönem bilgi ve tecrübelerinden yararlanma fırsatı bulduğum değerli hocam Prof. Dr. M. Ruşen KAPUCU'ya teşekkürü borç bilirim.*

*Tezimin hazırlanmasında bilgisi ve motive edici önerileriyle bana yol gösteren, beraber çalışmaktan her zaman güven ve mutluluk duyduğum sevgili ağabeyim Op. Dr. Başar KAYA'ya, asistanlık eğitimimin ilk gününden itibaren cesaret verici ve sıcak bir çalışma ortamı sağlayarak o yılları içtenliği ve desteği ile güzelleştiren sevgili ağabeyim Op. Dr. Onur Evren YILMAZ'a,*

*Tez çalışma verilerimin incelenmesinde yardımlarını esirgemeyen Prof. Dr. Aytaç GÖKÖZ, Prof. Dr. Ömür ATAÖĞLU, Uzm. Dr. Egemen AKINCIOĞLU, Dr. Sedat ÖZDEMİR ve Gizem ERKUT'a, deney aşamasındaki yardımları için Vet. Hekim Elif KAYA'ya, istatistiksel analizler için Yrd. Doç. Dr. Aslıhan ALHAN'a,*

*Tez çalışmamda kullandığım ilacın temini için Centurion Pharma'ya,*

*Tezimin tüm aşamalarında sağladığı destek ve yardımlar ile her zaman yanımda olan sevgili arkadaşlarım Duru ARAS ve Gözde TÖREYEN'e,*

*Beni bugünlere getiren canım aileme; anneme, ağabeyime ve cerrahi meslek aşkını bana aşılayarak bu güzel mesleğe adım atmama önyak olan, her zaman örnek aldığım sevgili babam Prof. Dr. M. Erol TURAÇLI'ya,*

*Asistanlık eğitimim boyunca bana her zaman destek olan sevgili eşim Yrd. Doç. Dr. Doğan KARAGÜVEN'e sonsuz teşekkürlerimi sunarım.*

**Dr. Senem Özge TURAÇLI KARAGÜVEN**

# İÇİNDEKİLER

Sayfa No:

ÖNSÖZ .....	ii
İÇİNDEKİLER .....	iii
SİMGELER VE KISALTMALAR .....	v
ŞEKİLLER DİZİNİ .....	vi
TABLolar DİZİNİ .....	viii
<b>1 GİRİŞ VE AMAÇ .....</b>	<b>1</b>
<b>2 GENEL BİLGİLER .....</b>	<b>3</b>
2.1 İSKEMİ .....	3
2.2 İSKEMİ / REPERFÜZYON HASARI .....	5
2.2.1 <i>No-reflow Fenomeni</i> .....	6
2.2.2 <i>Lökositlerin Rolü</i> .....	7
2.2.3 <i>Serbest Oksijen Radikallerinin Rolü</i> .....	8
2.2.4 <i>Kompleman Sisteminin Rolü</i> .....	11
2.3 EKSTREMİTEDE I/R HASARININ FİZYOPATOLOJİSİ.....	12
2.3.1 <i>I/R Sonrası Oluşan Vasküler Disfonksiyon</i> .....	12
2.3.2 <i>I/R Sonrası Oluşan İskelet Kası Hasarı</i> .....	13
2.3.3 <i>I/R Sonrası Oluşan Periferik Sinir Hasarı</i> .....	14
2.4 APOPİTOZ .....	15
2.5 LİPİT PEROKSİDASYONU VE MALONDİALDEHİT .....	16
2.6 C1 ESTERAZ İNHİBİTÖRÜ.....	17
<b>3 GEREÇ VE YÖNTEM .....</b>	<b>18</b>
3.1 C1 INH HAZIRLANMASI VE UYGULANMASI.....	18
3.2 DENEKLERİN GRUPLANDIRILMASI .....	19
3.3 CERRAHİ TEKNİK .....	20
3.3.1 <i>Alt Ekstremitte İskemi / Reperfüzyon Modeli</i> .....	20
3.3.2 <i>Doku Örnekleme</i> .....	23
3.4 HİSTOPATOLOJİK DEĞERLENDİRME .....	24

3.5	İMMÜNFLORESAN DEĞERLENDİRME.....	25
3.6	BİYOKİMYASAL DEĞERLENDİRME.....	26
3.7	İSTATİSTİKSEL DEĞERLENDİRME .....	26
<b>4</b>	<b>BULGULAR .....</b>	<b>27</b>
4.1	HİSTOPATOLOJİK DEĞERLENDİRME .....	27
4.1.1	<i>Femoral Arter</i> .....	27
4.1.2	<i>Gastroknemius Kası</i> .....	28
4.1.3	<i>Siyatik Sinir</i> .....	32
4.1.4	<i>Deri</i> .....	33
4.2	DOKUDA APOPİTOZ ORANLARI.....	33
4.2.1	<i>Femoral Arter</i> .....	34
4.2.2	<i>Gastroknemius Kası</i> .....	37
4.2.3	<i>Siyatik Sinir</i> .....	40
4.2.4	<i>Deri</i> .....	43
4.3	DOKU MALONDİALDEHİT (MDA) DÜZEYLERİ .....	46
<b>5</b>	<b>TARTIŞMA.....</b>	<b>49</b>
<b>6</b>	<b>SONUÇLAR.....</b>	<b>58</b>
<b>7</b>	<b>ÖZET.....</b>	<b>59</b>
<b>8</b>	<b>SUMMARY.....</b>	<b>61</b>
<b>9</b>	<b>KAYNAKLAR.....</b>	<b>63</b>

## SİMGELER VE KISALTMALAR

<b>AP-1</b>	:	Aktivatör Protein 1
<b>ATP</b>	:	Adenozin Trifosfat
<b>C1</b>	:	Kompleman 1
<b>C1 INH</b>	:	C1 Esteraz İnhibitörü
<b>C5a</b>	:	Kompleman 5a
<b>DNA</b>	:	Deoksiribonükleik Asit
<b>H2O2</b>	:	Hidrojen Peroksit
<b>HE</b>	:	Hematoksilen Eozin
<b>I/R</b>	:	İskemi / Reperfüzyon
<b>L-</b>	:	Lipit Serbest Radikali
<b>LOO-</b>	:	Lipit Peroksit Radikali
<b>LOOH-</b>	:	Lipit Peroksit
<b>MAK</b>	:	Membran Atak Kompleksi
<b>MASP-2</b>	:	Mannan Bağlayıcı Lektin ile İlişkili Proteaz-2
<b>MBL</b>	:	Mannoz Bağlayıcı Lektin
<b>MCP-1</b>	:	Monosit Kemotaktik Protein-1
<b>MDA</b>	:	Malondialdehit
<b>NAD</b>	:	Nikotinamid Adenin Dinükleotit
<b>NF-κB</b>	:	Nükleer Faktör-kappaB
<b>NO</b>	:	Nitrik Oksit
<b>O2-</b>	:	Superoksit
<b>OH-</b>	:	Hidroksil Radikali
<b>PMNL</b>	:	Polimorfonükleer Lökosit
<b>sCRI</b>	:	Solübl Kompleman Reseptör tip 1
<b>SOR</b>	:	Serbest Oksijen Radikalleri
<b>TNF-α</b>	:	Tümör Nekrozu Faktörü-α
<b>tPA</b>	:	Doku Plazminojen Aktivatörü
<b>TUNEL</b>	:	TerminalDeoksi Nükleotidil Transferaz Nick EndLabeling

## ŞEKİLLER DİZİNİ

- Şekil 2.1.** Hücre hasarında mitokondriyal disfonksiyon
- Şekil 2.2.** İskemi / reperfüzyon hasarının mekanizması
- Şekil 2.3.** Lökositler ve endotel hücreleri arasında yapışma moleküllerinin aracı olduğu ilişki
- Şekil 2.4.** SOR'lerinin oluşumu ve temizlenmesi
- Şekil 2.5.** I/R hasarında rol alan SOR'leri ve ksantin oksidaz sistemi
- Şekil 2.6.** Kompleman sisteminin aktivasyonu
- Şekil 2.7.** Ekstrinsik ve intrinsik apoptoz yolları
- Şekil 3.1.** C1 INH (Cetor) kullanımı
- Şekil 3.2.** Çalışmada turnike amacıyla kullanılan plastik kelepçe ve turnike uygulaması
- Şekil 3.3.** İskeminin başlamasıyla beraber sol ekstremitede gelişen morarma ve turnike uygulanmayan sağ ekstremitede normal pembe renk
- Şekil 3.4.** a) Reperfüzyon dönemine yeni girmiş bir ekstremitede "flushing" görüntüsü  
b) Pembe renkli normal dolaşımı olan bir ekstremitede  
c) İskemik dönemde sol alt ekstremitede morarma
- Şekil 3.5.** Doku örnekleme sonrası cilt, femoral arter, siyatik sinir ve gastroknemius kasında histolojik ve biyokimyasal incelemeler için dokunun parçalara ayrılması
- Şekil 3.6.** a) Siyatik sinir eksplorasyonu b) Gastroknemius kas eksizyonu
- Şekil 4.1.** Femoral Arter HE Kesitleri
- Şekil 4.2.** Femoral Arter HE Kesitleri
- Şekil 4.3.** Gastroknemius Kası HE Kesitleri
- Şekil 4.4.** Gastroknemius Kası HE Kesitleri
- Şekil 4.5.** Gastroknemius Kası HE Kesitleri
- Şekil 4.6.** Siyatik Sinir HE Kesitleri
- Şekil 4.7.** Deri HE Kesitleri

- Şekil 4.8.** Kontrol Grubu Femoral Arter Hücrelerinde TUNEL İşaretlemeleri
- Şekil 4.9.** I-10 Grubu Femoral Arter Hücrelerinde TUNEL İşaretlemeleri
- Şekil 4.10.** R-20 Grubu Femoral Arter Hücrelerinde TUNEL İşaretlemeleri
- Şekil 4.11.** R-10 Grubu Femoral Arter Hücrelerinde TUNEL İşaretlemeleri
- Şekil 4.12.** Kontrol Grubu Gastroknemius Kas Hücrelerinde TUNEL İşaretlemeleri
- Şekil 4.13.** I-10 Grubu Gastroknemius Kas Hücrelerinde TUNEL İşaretlemeleri
- Şekil 4.14.** R-20 Grubu Gastroknemius Hücrelerinde TUNEL İşaretlemeleri
- Şekil 4.15.** R-10 Grubu Gastroknemius Hücrelerinde TUNEL İşaretlemeleri
- Şekil 4.16.** Kontrol Grubu Siyatik Sinir Hücrelerinde TUNEL İşaretlemeleri
- Şekil 4.17.** I-10 Grubu Siyatik Sinir Hücrelerinde TUNEL İşaretlemeleri
- Şekil 4.18.** R-20 Grubu Siyatik Sinir Hücrelerinde TUNEL İşaretlemeleri
- Şekil 4.19.** R-10 Grubu Siyatik Sinir Hücrelerinde TUNEL İşaretlemeleri
- Şekil 4.20.** Kontrol Grubu Deri Hücrelerinde TUNEL İşaretlemeleri
- Şekil 4.21.** I-10 Grubu Deri Hücrelerinde TUNEL İşaretlemeleri
- Şekil 4.22.** R-20 Grubu Deri Hücrelerinde TUNEL İşaretlemeleri
- Şekil 4.23.** R-10 Grubu Deri Hücrelerinde TUNEL İşaretlemeleri

## TABLolar DİZİNİ

- Tablo 3.1.** Iskemi / Reperfüzyon Döngüsü Ve Grupların Şematik Görünümü
- Tablo 4.1.** Kontrol ve Deney Gruplarının Kas Dokusundaki Dejeneratif Histoloji Skorları
- Tablo 4.2.** Kas Dokusundaki Dejeneratif Histoloji Skorlarının Karşılaştırmalı Dağılımı
- Tablo 4.3.** Femoral Arter Hücrelerinde Apoptoz İndeks Değerlerinin Karşılaştırmalı Dağılımı
- Tablo 4.4.** Gastroknemius Kas Hücrelerinde Apoptoz İndeks Değerlerinin Karşılaştırmalı Dağılımı
- Tablo 4.5.** Siyatik Sinir Hücrelerinde Apoptoz İndeks Değerlerinin Karşılaştırmalı Dağılımı
- Tablo 4.6.** Deride Apoptoz İndeks Değerlerinin Karşılaştırmalı Dağılımı
- Tablo 4.7.** Femoral Arterde MDA Düzeylerinin Karşılaştırmalı Dağılımı
- Tablo 4.8.** Gastroknemius Kasında MDA Düzeylerinin Karşılaştırmalı Dağılımı
- Tablo 4.9.** Siyatik Sinirde MDA Düzeylerinin Karşılaştırmalı Dağılımı
- Tablo 4.10.** Deride MDA Düzeylerinin Karşılaştırmalı Dağılımı
- Tablo 5.1.** C1 INH'nün Tüm Dokulardaki Etkilerinin Literatürle Karşılaştırmalı Değerlendirilmesi



# 1 GİRİŞ ve AMAÇ

Trafik kazaları, iş kazaları, ezilme tarzında yaralanmalar, turnike kullanımı, arter yaralanmaları, replantasyonlar ve serbest doku aktarımları gibi durumlarda, ilgili ekstremitenin bir süre iskemik kalmasının ardından tekrar kanlanması; iskemi/reperfüzyon (I/R) hasarına yol açar. Günümüzdeki modern cerrahi yöntemlere ve teknolojinin sunduğu geniş olanaklara rağmen bu durum morbidite ve mortaliteyi artırmakta ve karşımıza önemli bir sorun olarak çıkmaktadır.

**İskemi**; bir dokunun kan akımının azalmasına bağlı yaşayabilmesi için gerekli oksijen ve besinlerden uzak kalmasıdır. İskemik dokuda hem hücre rejenerasyonu, hem de toksik metabolitlerin temizlenmesi için yeniden kan akımının sağlanması gerekir. Kan akımının yeniden sağlanması ise **reperfüzyon** olarak isimlendirilir. Reperfüzyon, iskemik dokuda enerji ihtiyacını sağlamak ve toksik metabolitleri uzaklaştırmak gibi olumlu etkileri yanında, uzamış iskemilerde metabolik yan ürünlerin üretimini tetikleyerek doku yıkımını artırır. Dolayısıyla paradoksal olarak sadece iskemi ile oluşabilecek hasara göre çok daha ciddi bir yıkım ortaya çıkar. Oluşan bu doku yıkımı da **iskemi / reperfüzyon hasarı** olarak bilinir.

İskemi ve reperfüzyon çok sayıda karmaşık moleküler olayın rol aldığı inflamatuvar bir süreçtir. Bu süreçte lökositlerin, serbest oksijen radikallerinin, sitokinlerin, eikazonoidlerin yanında kompleman sistem aktivasyonunun da önemli rol oynadığı bilinir. Reperfüzyon sağlanmadan oluşan immün kompleksler kompleman sistem aktivasyonuna yol açar. Doğal antikolar kompleman sistemini C1q ile klasik yoldan, Ig M'nin mannoz bağlayıcı lektine (MBL) bağlanması ile de lektin yoldan aktive eder (1, 2). Kompleman aktivasyonu ile üretilen potent anafilatoksinler hücrenin parçalanmasına ve lizisine sebep olur. Doğal antikoların ve kompleman sisteminin I/R'daki rolleri

çok iyi ortaya konmuş olsa da kinin ve koagülasyon sisteminin de eşit oranda rol oynadığı gösterilmiştir (3).

C1 esteraz inhibitörü (C1 INH); Serin proteaz inhibitör ailesinden olup kompleman klasik yolunun majör inhibitörüdür (4). C1 INH sadece kompleman sistemi üzerinde değil aynı zamanda koagülasyon ve kinin sistemlerinde de etki eder (5). Bu özelliği nedeniyle de I/R hasarında gelecek vaat eden yeni bir tedavi seçeneği sunmaktadır.

C1 INH'nün reperfüzyonla ilişkili mikrodolaşım düzensizliklerini en aza indirdiği, lokal ve uzak organ yıkımında koruyucu olduğu daha önce yapılan birçok çalışmada gösterilmiştir. C1 INH, ilk olarak miyokard reperfüzyonu sırasında kompleman klasik yolunun inhibe edilmesi için kullanılmış ve iskemik miyokard dokusunu reperfüzyon hasarından efektif olarak koruduğu gözlenmiştir. Daha sonraki deneysel çalışmalarda ise kalp, beyin, karaciğer ve kas I/R hasar modellerin de olumlu etkileri gösterilmiştir. Elde edilen başarılı sonuçlar nedeniyle sepsis ve miyokard infarktüsü gibi çeşitli hastalıkların insanlar üzerindeki çalışmalarına başlanmıştır (6-10). Ancak C1 INH'nün alt ekstremitte üzerine etkileri yeterince araştırılmamıştır.

*Çalışmamızın amacı C1 INH'nün rat alt ekstremitte deneysel I/R hasar modelinde femoral arter endoteli, gastroknemius kası, siyatik sinir ve deride oluşan değişimler üzerindeki etkisini araştırmaktır. Elde edilecek veriler doğrultusunda I/R hasarı oluşma olasılığı yüksek olan yaralanmalarda ve cerrahi uygulamalarda, doku hasarını minimuma indirmek için C1 INH'nün klinik kullanımı hakkında bilgi edinileceği düşünülmektedir.*

## 2 GENEL BİLGİLER

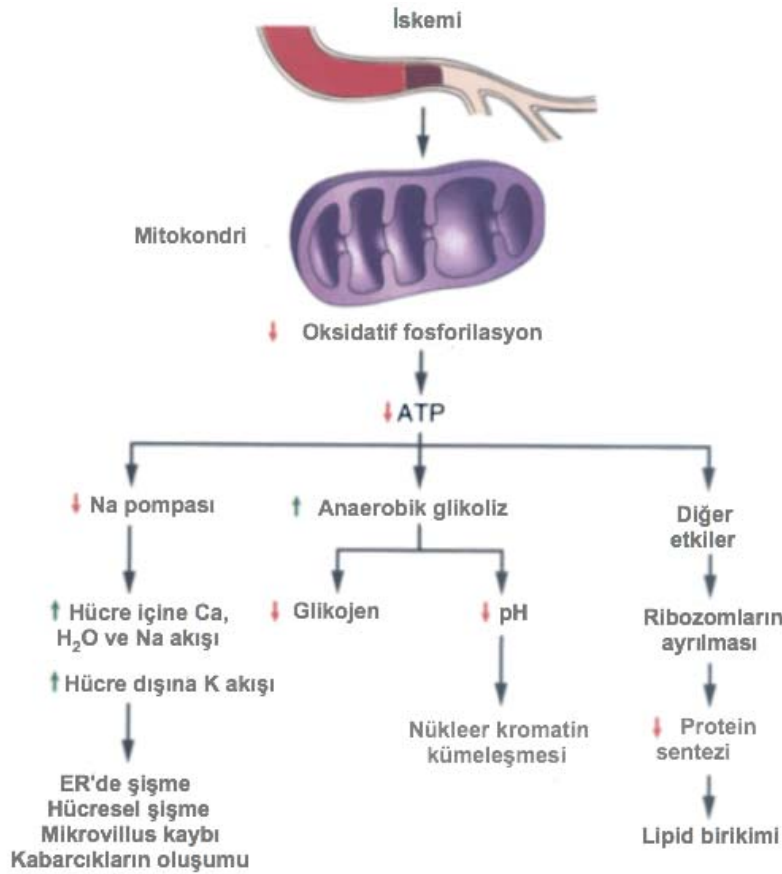
### 2.1 İSKEMİ

İskemi; dolaşım tarafından dokunun oksijen ve diğer metabolitlere olan ihtiyacının sağlanamaması ve oluşan atık ürünlerin uzaklaştırılamamasıdır. Normal koşullar altında, hücreler çeşitli biyokimyasal işlemlerini dengeleyerek yaşamlarını düzenlerler. İskemik süreçte dokular bir süre kendi enerji depoları ile idare edebilirken uzayan iskemilerde bir noktadan sonra dokuların enerji depoları tükenir ve iskemi kalıcı hücre hasarı oluşturmaya başlar. Bu süre kritik iskemi süresi olarak isimlendirilir ve her dokunun kendine özgü bir kritik iskemi süresi mevcuttur. Normotermik koşullarda bu süre iskelet kası için 4 saat, sinir dokusu için 8 saat, yağ dokusu için 13 saat, deri için 24 saat ve kemik dokusu için 4 gündür (11).

İskemi, öncelikle mitokondrilerdeki oksidatif fosforilasyonu etkileyerek, ATP ve fosfokreatin depolarında azalmaya neden olur. Mevcut ATP sırasıyla adenzindifosfat, adenzinmonofosfat, inozin ve hipoksantin'e yıkılır. Oluşan ve biriken bu metabolitler fosfofruktokinaz enzimini uyararak hücrel metabolizmanın anaerobik yöne kaymasına neden olur. Bu metabolik değişim, daha fazla glikojen kullanımı ancak daha az ATP üretimi ile sonuçlanır. İskeminin devam etmesi, hipoksantin ve anaerobik glikoliz ürünlerinin (laktik asit, hidrojen iyonu, inorganik fosfatlar) hücre içinde birikimi, asidozda artış ve dolayısıyla enzim ve protein yıkımıyla sonuçlanır (12).

ATP depolarındaki azalma, ATP bağımlı hücre zarı pompalarında fonksiyon bozukluğuna neden olarak, hücre dışı potasyum kaybı ve hücre içi ani sodyum-kalsiyum-klorür artışına ikincil hücrel şişmeyle sonuçlanır. Bu hidropik değişiklik, inorganik fosfatlar, laktik asit ve pürin nükleotidleri gibi metabolitlerin birikimi sonucu artan osmotik yükü daha da belirginleşir.

Sonrasında, ribozomların granüllü endoplazmik retikulumdan ayrılması ve polizomlardan monozomların oluşumu ile protein sentezinde azalma oluşur. İskemi düzelmez ise; mitokondri fonksiyonunda kötüleşme ve membran geçirgenliğinde artışa bağlı hücresel şişme ve fosfolipidden zengin dansiteler ile karakterize morfolojik bozulma görülür. Hücresel iskelet; mikrovillus gibi yapısal özelliklerin kaybı, hücreler arasındaki bağların gevşemesi ve hücre yüzeyinde kabarcıkların oluşumu ile bozulur. Hücre çekirdeği granüler ve fibriller elemanlarında dağılma meydana gelir. Osmotik regülasyon kaybı sonucunda mitokondri, endoplazmik retikulum ve hemen hemen tüm hücre organellerinde hidropik değişiklikler oluşur. Eğer doku perfüzyonu düzelirse tüm bu değişimler geri dönüşümlü olup iskeminin devamı durumunda geri dönüşümsüz bir yıkım ile sonuçlanır.



Şekil 2.1. Hücre hasarında mitokondriyal disfonksiyon (13)

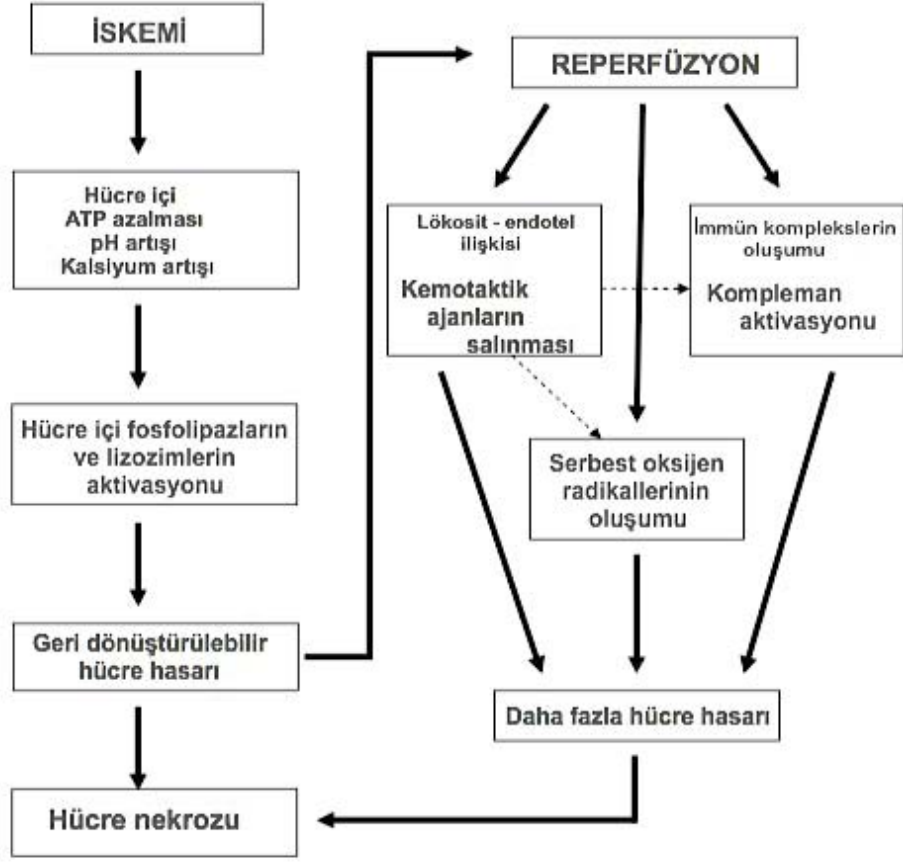
## 2.2 İSKEMİ / REPERFÜZYON HASARI

İskemik dokuda, hem hücrenin rejenerasyonu, hem de toksik metabolitlerin temizlenmesi için, yeniden kan akımının sağlanması gerekir. Yetersiz kan akımı ile oluşan geri dönüşümsüz yıkımı ve nekrozu önlemenin ise tek efektif tedavisi dokunun tekrar kanlanması yani reperfüzyonunun sağlanmasıdır. Ancak reperfüzyon sırasında dokuya sağlanan oksijen ve metabolitler, hasarı geriletebilecekleri gibi bir dizi olayın başlaması ile paradoksal olarak doku yıkımının ilerlemesine de neden olabilirler (Şekil 2.2).

Reperfüzyon hasarı ilk olarak 1960 yılında uzamış arter klemplemesi sonrası reperfüzyon ile gelişen şok ve asidoz tablosu ile fark edilmiştir (14). Daha sonra iskemik dokularda biriken toksik metabolitlerin sisteme karışmasından kaynaklandığı anlaşılmış ve 1975 yılında Cerra ve ark. tarafından ilk defa tanımlanmıştır. Birçok çalışma reperfüzyonun uzamış iske mi sonrası oluşan doku yıkımında en önemli neden olduğunu kabul etmiştir (15).

İske mi / reperfüzyon hasarı çok sayıda karmaşık moleküler olayın rol aldığı inflamatuvar bir süreçtir. Bu hasara başlıca ;

- Polimorfonükleer lökositlerin (PMNL) aktivasyonu (16)
- Serbest oksijen radikallerinin (SOR) ortaya çıkması (17)
- Sitokinlerin salınımındaki artış (18)
- Eikasonoidlerin üretimindeki artış (19)
- Kompleman sisteminin aktivasyonu neden olur (20).



Şekil 2.2. İskemi / reperfüzyon hasarının mekanizması (15)

### 2.2.1 No-reflow Fenomeni

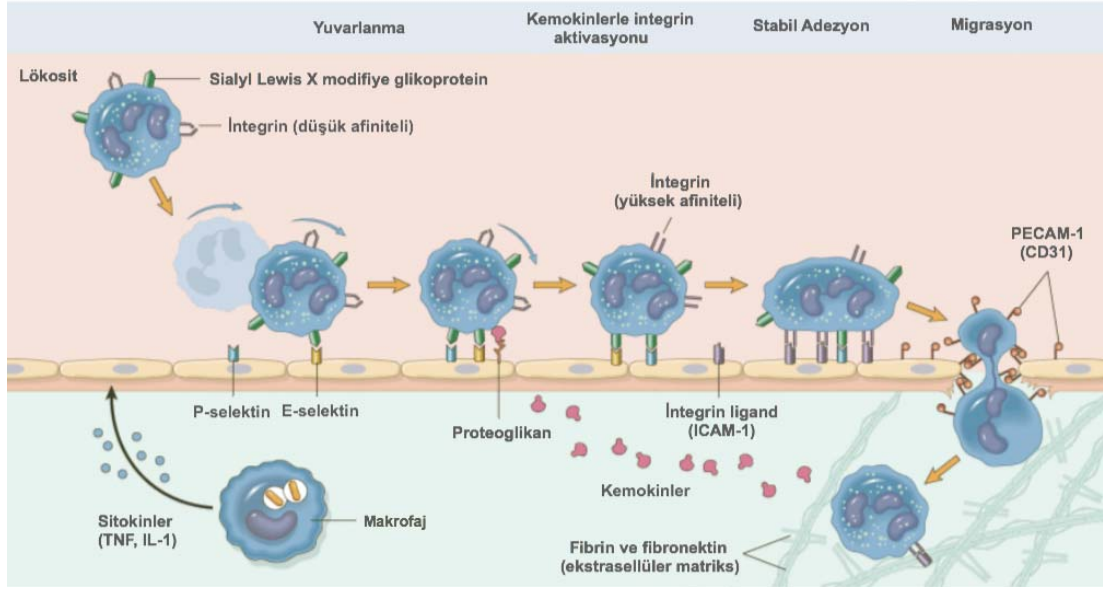
“**No-reflow**” fenomeni, uzamış iskemi sonunda doku reperfüzyonuna rağmen mikrodolaşımın geri dönüşümsüz olarak kapanmasıdır. İlk kez Ames tarafından tavşan iskemik beyin modelinde tariflenmiştir (21). Patolojik olarak tanımlanması ise Brooks tarafından yapılmıştır. Çalışmasında köpeklerde uzun arteriyel tıkanıklıklar oluşturmuş ve kan akımı sağlandıktan sonra kasların bazı bölgelerinde arteriyel pulsatil akıma karşın nekroza giden alanlar görmüştür (22).

Menger, “no-reflow” fenomeninin oluşumunu ayrıntılı olarak incelemiştir. Endotel bütünlüğünün bozulması ile başlayan yıkımın endotel hücre içine ve intersitisiyel alana sıvı kaybına yol açtığını belirtmiştir. İntravasküler hemokonsantrasyonun, endotel hücre şişmesinin ve intersitisiyel ödem oluşumunun; hidrolik rezistansa, kapiller lümen daralmasına ve sonuçta kan dolaşımının bozulmasına katkı sağladığını bildirmiştir. Lökosit birikiminin ise tıkanmada bir neden olmaktan çok dolaşımdaki yavaşlamanın sonucu olduğu görüşüne varılmıştır (23).

### **2.2.2 Lökositlerin Rolü**

Doku iskemisi sonrası trombositler, endotel hücreleri ve diğer lökositlerden salınan kemotaktik sinyaller; lökosit aktivasyonu, kemotaksis ve lökosit-endotel hücre adhezyonuna yol açar (24). Dolaşımda serbest dolaşan nötrofiller aktive olduklarında, iskemik doku endoteline yapışarak, interstisiyel alana geçer. PMNL’lerin bu göçü üç aşamalı gerçekleşir:

- İlk olarak adhezyon moleküllerinin de yardımıyla endotel boyunca yuvarlanma hareketi gerçekleşir (25).
- Daha sonra oluşturdukları kuvvetli bağlarla endotel hücrelerine sıkıca yapışırlar. Endotele yapışma, hücrelerin harekete geçmesi ve SOR’lerinin salınması için gerekir (26).
- Lökositler daha sonra endotel hücreleri arasındaki zayıf bölgelerden hücrelerarası mesafeye geçer. Ekstravasküler kompartmana ulaşan lökositler hasar bölgesine doğru göç etmeye başlar (kemotaksis).



**Şekil 2.3.** Lökositler ve endotel hücreleri arasında yapışma moleküllerinin aracı olduğu ilişki (13)

İskemi / reperfüzyon hasarında PMNL'in rolü ile ilgili bazı mekanizmalar ileri sürülmüştür (27). Bunlar:

- Mikrovasküler oklüzyon
- Serbest oksijen radikallerinin salınması
- Sitotoksik enzim salınması
- Vasküler permeabilite artışı
- Sitokin salınmasında artıştır.

### 2.2.3 Serbest Oksijen Radikallerinin Rolü

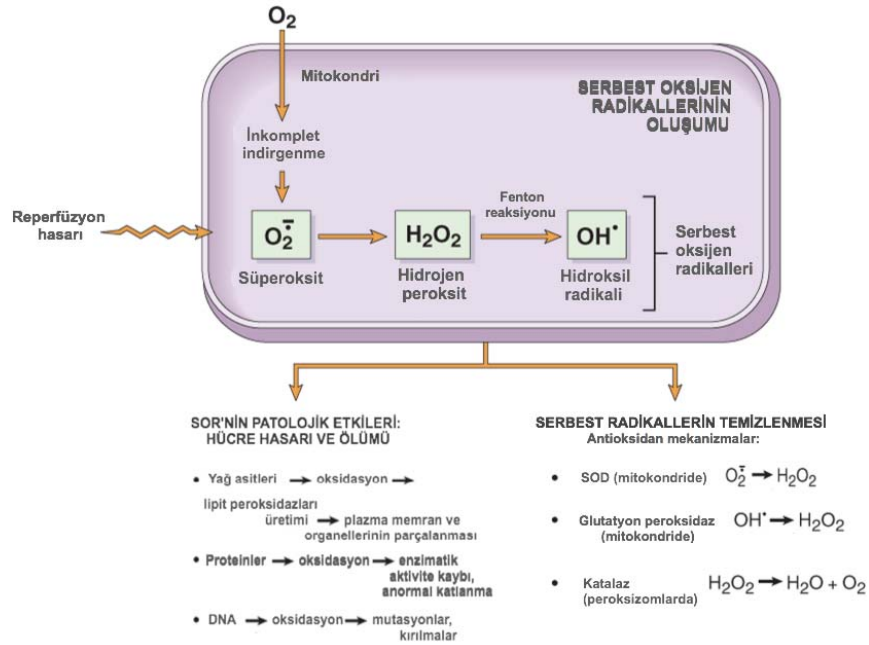
Serbest oksijen radikalleri en dış yörüngesinde tek sayıda elektron içeren, ileri derecede reaktif ve stabil olmayan, kısa ömürlü moleküllerdir. Bu moleküller hücrelerin aerobik metabolizmasında oksijenin redüksiyonu ile ara ürün olarak oluşur. SOR'leri normal hücre metabolizmasında düşük miktarda üretilmelerine karşın fizyolojik mekanizmalarla kolaylıkla etkisiz hale getirilirler. Ayrıca inflamasyon sırasında nötrofil ve makrofajlarda üretilerek



konak savunmasında da rol alırlar. Üç temel tip serbest oksijen radikali vardır.

- **Süperoksit (O<sub>2</sub><sup>-</sup>)**, ksantin oksidaz ve NADPH oksidaz sistemi ile
- **Hidrojen peroksit (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>)**, süperoksit dismutaz enzimi ile
- **Hidroksil radikali (OH<sup>-</sup>)**, ise demir moleküllerinin katalize ettiği reaksiyonlar sonucu oluşur.

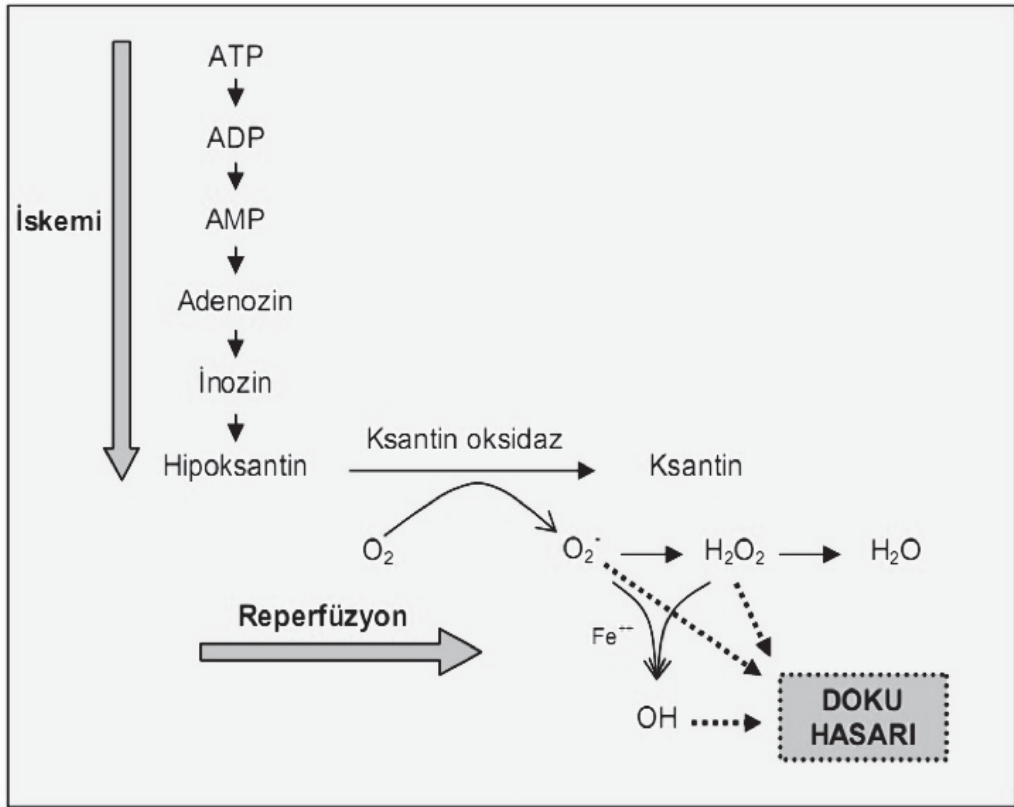
Bu yapılar, özel enzimlerin katalize ettiği reaksiyonlarla birbirlerine dönüşerek organizmada dengede bulunurlar (Şekil 2.4).



Şekil 2.4. SOR'lerinin oluşumu ve temizlenmesi (13)

Hüresel iskemi sırasında ATP kaynakları kullanılır ve ATP yıkımı sonucu hipoksantin oluşur. Fizyolojik koşullar altında, hipoksantin, ksantin dehidrogenaz enzimi ile ksantine oksitlenir. Ancak iskemi sırasında ksantin dehidrogenaz, ksantin oksidaza dönüştürülür. Ksantin dehidrogenaz substrat olarak nikotinamid adenin dinükleotiti (NAD) kullanırken ksantin oksidaz substrat olarak oksijeni kullanır. Bu nedenle iskemi sırasında hipoksantin ksantine dönüşümü gerçekleşemez ve dokuda fazla miktarda hipoksantin birikimi olur. Reperfüzyon sırasında dokuya yeniden oksijen gelmesi ile fazla

miktardaki hipoksantin, ksantin oksidaz enzimi ile toksik SOR'lerine dönüştürülür (28, 29). İskemi uzayıp ATP tüketimi arttıkça hipoksantin üretimi dolayısıyla da reperfüzyon sırasında üretilen süperoksit radikallerinin miktarı da artar. I/R hasarı sırasında oksijen radikallerinin üretimi Şekil 2.5'te görülmektedir.

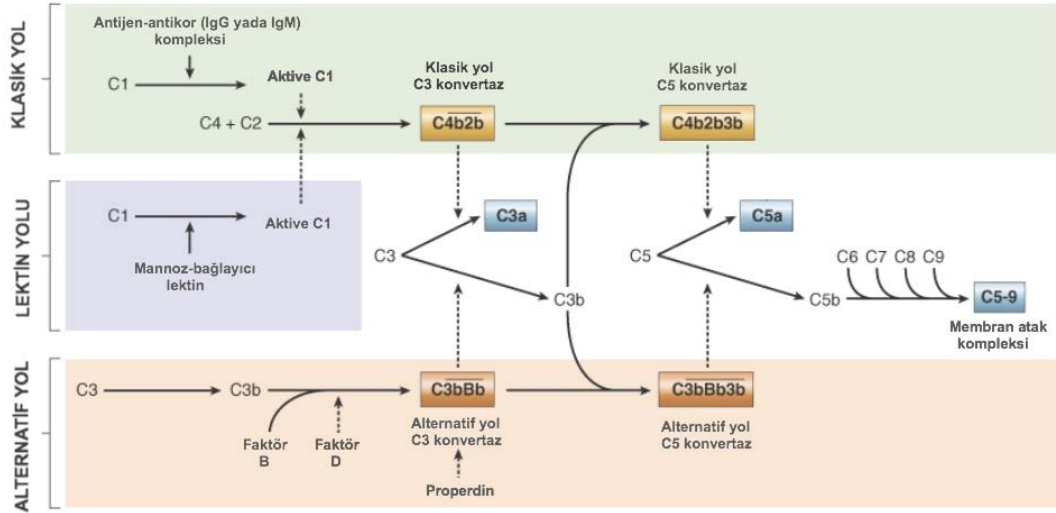


Şekil 2.5. I/R hasarında rol alan SOR'leri ve ksantin oksidaz sistemi

SOR'leri çeşitli mekanizmalarla doku hasarına neden olurlar. Potent oksitleyici ve redükte edici ajanlar oldukları için lipid peroksidasyonu ile direkt hücre membranını hasarlarlar (28, 30). Bunun yanında araşidonik asit oluşumunu sağlayan plazma membran fosfolipaz A<sub>2</sub> oluşumunu tetikleyerek artan eikozanoidlerin üretimi sonucu lökosit aktivasyonu ve kemotaksisini sağlarlar (30). Ayrıca NF-κB ve aktivatör protein 1 (AP-1) gibi transkripsiyon faktörlerini de uyararak lökosit adezyon molekülü ve sitokin gen ekspresyonunu artırır (30).

## 2.2.4 Kompleman Sisteminin Rolü

Kompleman sistemi plazmada inaktif olarak bulunan enzimlerin kademeli aktivasyonu ile oluşan bir yoldur. Bu proteinler 3 farklı enzimatik yolda birbirleri ile etkileşerek şiddetli inflamatuvar bir yanıt meydana getirirler (Şekil 2.6).



Şekil 2.6. Kompleman sisteminin aktivasyonu (13)

**Klasik yol:** Antijen-antikor immün kompleksi, CRP, fibronektin ve fibrinojen tarafından aktive olur. Ayrıca Ig G ve Ig M de klasik yolu aktive edebilir. Sistem aktivasyonu C1 proteininin bu maddelerden birine direkt bağlanmasıyla veya plazmin gibi bazı fibrinolitik enzimlerin C1 üzerine direkt enzimatik atakları ile başlar. Antikoru C1'e bağlanması serin proteazı aktive eder ve C4C2'nin C4bC2a'ya dönüşümünü sağlar. C4bC2a ise C3'ün C3a ve C3b dönüşümünü sağlar. C3b, C5'in bağlanması için yer oluşturur. Son olarak C5 membran atak kompleksinin (MAK) oluşumunu başlatır. MAK hücre zarında porlar meydana getirerek hücre lizisine neden olur.

**Lektin yolu:** Mikroorganizmaların yüzeylerindeki mannoz ve N-asetilglukozamin gibi karbonhidratları tanıyan MBL de klasik kompleman yolunu aktive edebilir.

**Alternatif yol:** Bakteriyel polisakkaritler ve diğer mikrobiyal hücre duvarı komponentleri alternatif yolun aktivatörleridir. Konağın antikor üretimi için yeterli zamanı bulamadığı dönemde devreye girer ve properdin, faktör B ve faktör D gibi plazma proteinlerini içeren ayrı bir yolu başlatır.

Yapılan birçok çalışma I/R hasarında kompleman sistemin her 3 yolunun da aktive olduğunu göstermiştir. Kompleman sistem aktivasyonu ile C3a ve C5a gibi anaflatoksinler, iC3b ve C5b-9 gibi çeşitli inflamatuvar mediatörler oluşur. C5a bu inflamatuvar mediatörler içinde en potent olandır ve C3a'dan 20 kat daha fazla etkilidir (27, 31). Hem lökosit aktivasyonu ve kemotaksisini hem de tümör nekroz faktör -  $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ), IL-1, IL-6, monosit kemoatraktan protein 1 (MCP-1) gibi çeşitli pro-inflamatuvar sitokinlerin sentezini indükleyerek I/R'a karşı oluşan inflamatuvar yanıtı artırır (27, 31).

C5b-9 ve iC3b endotel fonksiyon değişikliklerine neden olur. C3b parçalanması sonucu oluşan iC3b, lökosit CD11b/CD18 (Mac-1) yüzey molekülü için endotel üzerinde bir adezyon alanı oluşturur. C5b-9 ise adezyon moleküllerinde artışa, lökosit aktivasyonuna, endotel bağımlı vazodilatasyonda inhibisyona neden olur (27, 31). Dolayısıyla I/R'a bağlı kompleman sistem aktivasyonu, vasküler değişikliklere ve lökosit-endotel adezyon eğilimine yol açarak doku iskemisini derinleştirir (27).

## **2.3 EKSTREMİTEDE I/R HASARININ FİZYOPATOLOJİSİ**

### **2.3.1 I/R Sonrası Oluşan Vasküler Disfonksiyon**

Endotel hücreleri, hem iskemi hem de reperfüzyona çok duyarlı hücrelerdir. İskemi ile ilk olarak kapiller endotel hücreleri etkilenir ve hem lümen hem de sitoplazmaya uzanan parmaksı çıkıntılar oluşur. İskeminin devamıyla birlikte endotelial veziküllerde artış meydana gelir. Bu arada hücreler arası bağlar zayıflar ve endotel hücreleri arasındaki boşluk genişler. Uniform olmayan endotel hücre ödemi eritrositleri kapiller lümeninde sıkıştırır.

İskeminin dördüncü saatinden sonra mikrosirkülasyonda hücrel etkileşimler (eritrositik, trombotik ve lökositik) başlar. Venöz ve arteryel kılcallar sıkışmış eritrositlerle kapanmış görünümündedir. Erken reperfüzyon döneminde, rulo halindeki eritrosit kümeleri endotel yüzeyinde hasarlanma oluşturur. Endotel hücre sitoplazmasındaki dağılıma sonucu hücreler arası boşluklar daha da genişler. Reperfüzyonla birlikte, özellikle venöz kılcallarda, lumen içi trombosit ve fibrin kümeleri ile karakterize trombotik etkileşimler baskın hale gelir. Bu trombosit kümeleri, endotel yüzeyinde oluşan geniş defektleri kapatır. Venlerde lökosit diapedezi olurken, venöz kılcallarda lökositler, lenfosit ve monositlerle kümeleşerek lümeni tıkarlar. Bütün bunların sonucunda da lokalize endotel disfonksiyonu gelişir (11).

Endotel hücreleri, I/R döneminde daha fazla serbest oksijen radikali fakat daha az NO üretir. NO ve SOR arasındaki dengesizlik endotel hücrelerinden inflamatuvar mediatörlerin ve lökosit adhezyon moleküllerinin üretim ve salınımında artışa yol açar. Salınan mediatörler iskemik yıkıma maruz kalmayan uzak organlarda da endotel hücrelerinin aktivasyonuna yol açar. Bu uzak organ cevabı lökosit bağımlı mikrovasküler hasar ile sonuçlanır ve multiple organ disfonksiyon sendromunun temelini oluşturur (16).

### **2.3.2 I/R Sonrası Oluşan İskelet Kası Hasarı**

Ekstremitelerde I/R hasarının en önemli bölümünü iskelet kası oluşturur (11). Fizyolojik ve anatomik çalışmalar iskemiye takiben 3. saatte irreversible kas hasarının, 6. saatte de yaklaşık %97'lik fonksiyonel doku kaybının oluştuğunu göstermiştir (32). İskemik kas dokusunda öncelikle glikojen ve kreatin fosfat azalırken bu dönemde çok fazla kas nekrozu 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 gelişir (33).

Kas lifleri, içerdikleri myoglobin miktarına bağlı olarak, kırmızı (tip 1) ve beyaz (tip 2) olarak sınıflandırılır. Çoğu kas her iki türü içerse de biri daha baskın bulunur. Örneğin bacağın ön kompartmanında daha çok tip 1 (yavaş kasılan) lifler baskın olup, enerji üretiminde aerobik metabolizmayı kullanmaları bu kas grubunu iskemiye daha duyarlı kılar. Bacağın arka kompartmanında ise tip 2 (hızlı kasılan) liflerin baskın olması nedeniyle, enerji üretiminde anaerobik metabolizma ön plandadır (11). İskemi süresi ve etkilenen lif tipi iskemik hasarda önemli olmakla birlikte dokunun vücuttaki konumu da önemlidir. Örneğin, çabuk soğuma nedeniyle, distal ekstremitelerde kas dokusu proksimal kas dokusuna göre iskemiye daha dirençlidir (11).

### **2.3.3 I/R Sonrası Oluşan Periferik Sinir Hasarı**

Periferik sinirler enerji gereksinimlerinin düşük olması, ekstra ve intranöral yaygın vasküler anastomozlar içermesi ve anaerobik metabolizma ile yaşayabilme yeteneği nedeniyle santral sinir sistemine göre I/R hasarına oldukça dirençlidir. İmpuls iletimi ve aksonal transport intranöral mikrosirkülasyon ile sağlanan aralıksız enerjiye bağlıdır. Kan sirkülasyonundaki kesintinin hızla düzelmemesi aksonal ölümle sonuçlanır (34, 35).

İskemik sinir yıkımı segmental demiyelinizasyon, endonöral ödem, iletimde bozulma, aksonal dejenerasyon ile multifokal veya diffüz sinir lifi kaybını içerir (35). Geçici iskemi periyodundan sonra kan akımının yeniden başlaması reperfüzyon hasarına neden olur. Reperfüzyon hasarı aşırı  $Ca^{++}$  yüklenmesi, serbest yağ asitlerinde yükselme, ekstrasellüler asidoz, kapiller permeabilitede artma, kan sinir bariyerinde ve NO metabolizmasında bozulmaya neden olur (35). Ayrıca reperfüzyon sinirde oksidatif strese yol açar ve serbest radikal oluşumu hücrenin savunma mekanizmalarını bozar (34). Periferik sinir sisteminde bol miktarda bulunan lipitten zengin miyelin, reperfüzyon esnasındaki serbest radikal aracılı lipid peroksidasyonunun hedefidir. Bu nedenle I/R miyelinli liflerde daha fazla yıkıma yol açar (35).

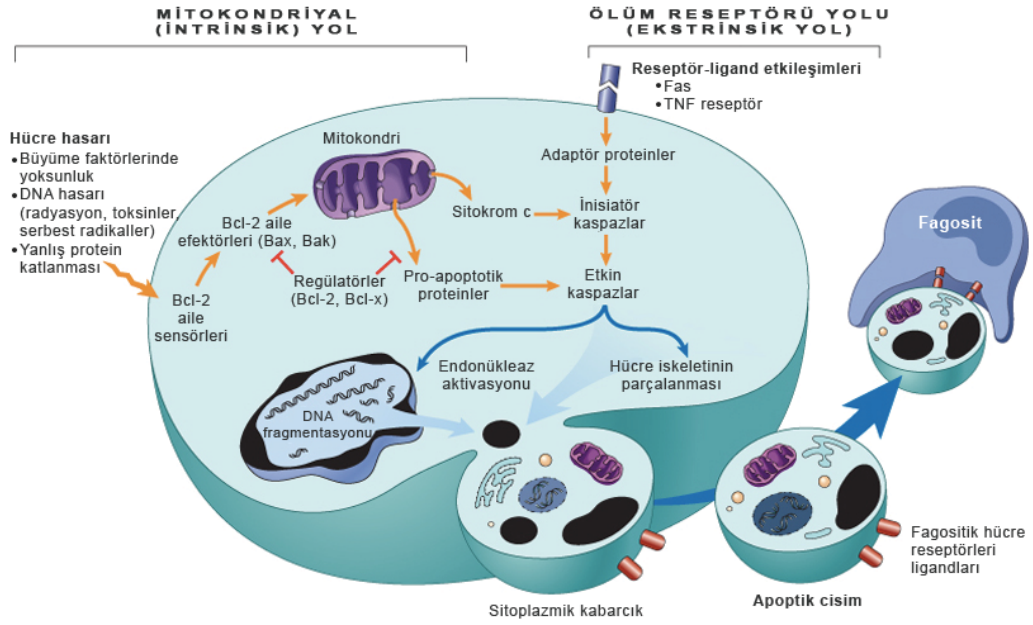
## 2.4 APOPİTOZ

Yaşayan organizmada iki temel hücre ölümü vardır: Apoptoz ve nekroz. Apoptozda çok odaklı, tek tek hücre ölümü vardır. Bu, programlanmış hücre ölümüdür ve geriye dönüşümü yoktur. Fizyolojik ya da patolojik uyarılar ile düzenlenir. Oluştığı bölgede diğer hücre yapılara zarar vermez ve herhangi bir inflamasyona neden olmaz. Apoptozda;

- Hücrede büzülme,
- DNA hasarı,
- Düzenli kromatin kümelenmesi,
- Plazmada baloncukların oluşması,
- Plazma zarından fosfatidilserinin dışarı atılması gözlenir (36).

Nekroz ise hücre yaralanmalarında ortaya çıkan patolojik hücre ölümüdür. İlerleyen yapısal ve metabolik değişiklikler görülür. Sonuçta hücrelerin membran bütünlüğü bozulur ve hücre parçalanır. Nekroz geriye dönüşü olmayan bir olaydır ve apoptozdan farklı olarak ortaya çıktığı bölgede inflamatuvar olaylar vardır (36).

Kaspazlar tüm hücrelerde bulunan ve hücrenin apoptoza gitmesinin tetiğini çeken proteinlerdir. Bunlar hücre sitoplazmasında büyük, inaktif öncüler olarak bulunur (pro-kaspazlar) ve genellikle bir kaspaz diğeri tarafından parçalanarak aktifleşir. Böylece proteolitik bir döngü oluşur. Yapılan in-vitro çalışmalar apoptozun ani gerçekleşen hızlı bir olay olduğunu gösterir. Protoplazmanın zardan uzaklaşmasından, apoptotik cismin oluşumuna kadar bütün olaylar zinciri birkaç dakika sürer. Kaspazlar inaktif olarak sentezlenir ancak hücrenin stres ya da ölüm reseptörleri ile uyarılmasından sonra aktif enzimlere dönüşürler. Öncelikle başlangıç kaspazları (örneğin kaspaz-8 ve -10) aktive olur, bunlar ise etkin kaspazları (örneğin kaspaz-3, -6, ve -7) aktive eder. Etkin kaspazlar bir kez aktive olduktan sonra artık geri dönüş yoktur ve hücre apoptoza gider (36).



**Şekil 2.7.** Ekstrinsik ve intrinsik apoptoz yolları (13)

Apoptozu değerlendirmek için birçok histokimyasal tetkik vardır. TUNEL (Transferase-mediated d-UTP-biotin Nick End Labeling) bu yöntemlerden birisidir. Enzimatik olarak in-situ, DNA fragmentasyonunun tespitine olanak sağlar. Bu yöntemin temel prensibi tek ve/veya çift zincir kırıklı DNA bölgesine, işaretli nükleotitlerin girmesi veya eklenmesidir. TUNEL yöntemi diğer apoptoz tespit yöntemlerine göre daha sensitiftir (37).

## 2.5 LİPİT PEROKSİDASYONU VE MALONDİALDEHİT

Lipitler serbest radikallerin etkilerine karşı en duyarlı biyomoleküllerdir. Hücre zarlarındaki kolesterol ve yağ asitlerinin doymamış bağları, serbest radikallerle kolayca reaksiyona girerek peroksidasyon ürünleri oluşturur. Çoklu doymamış yağ asitlerinin oksidatif yıkımı lipit peroksidasyonu olarak bilinir. Hücre zarlarında lipit serbest radikalleri (L-) ve lipit peroksit radikallerinin (LOO-) oluşması, reaktif oksijen türlerinin neden olduğu hücre yıkımının önemli bir özelliği olarak kabul edilir (38).



Lipit radikali (L-) dayanıksız bir bileşiktir ve bir dizi değişikliğe uğrar. Lipit radikallerinin (L-) moleküler oksijenle (O<sub>2</sub>) etkileşmesi sonucu lipit peroksit radikalleri (LOO-) oluşur. Lipit peroksit radikalleri (LOO-), zar yapısındaki diğer çoklu doymamış yağ asitlerini etkileyerek yeni lipit radikallerinin oluşumuna yol açarken kendileri de açığa çıkan hidrojen atomlarını çalarak lipit peroksitlerine (LOOH-) dönüşür. Böylece olay kendi kendini katalizleyerek devam eder. Lipit peroksitleri (LOOH-) yıkıldığında çoğu biyolojik olarak aktif olan aldehitler oluşur. Bu bileşikler ya hücre düzeyinde metabolize edilir ya da başlangıçtaki etki alanlarından hücrenin diğer bölümlerine hasarı yayarlar. Üç veya daha fazla çift bağ içeren yağ asitlerinin peroksidasyonunda malondialdehit (MDA) meydana gelir (39). MDA lipit peroksit seviyelerinin göstergesi olarak kullanılır.

## 2.6 C1 ESTERAZ İNHİBİTÖRÜ

C1 esteraz inhibitörü (C1 INH) serin proteaz inhibitör ailesinden olup kompleman sisteminde C1r, C1s ve MASP2'yi; koagülasyon sisteminde kallikrein, Faktör 11 ve 12'i; fibrinolitik sistemde de tPA ve plazmini inhibe eder (40). Dolayısıyla sadece kompleman sistemi üzerinde değil aynı zamanda koagülasyon ve kinin sistemlerinde de etki eder.

Kompleman klasik yolunun aktivasyonu C1 INH tarafından düzenlenir. C1 INH klasik yoldaki aktive C1s ve C1r serin proteinazlarının bilinen tek inhibitörüdür. C1 INH kompleman klasik yolundaki inhibitör etkisini; intakt C1'in proenzimatik C1r ve C1s'ine reversibel olarak bağlanması sonucu otoaktivasyonunu önleyerek ya da aktive C1r ve C1s bağlanması ile C1q'dan ayırarak gösterir (4). C1 INH, C1 esteraz kompleks (C1qC1rC1s) oluşumunu inhibe ederek C4'ün C4b'e, C2'nin C2a'ya dönüşümünü ve sonuçta C3 konvertazın oluşumunu engeller. Purifiye insan C1 INH'ü yıllardır herediter anjiyoödem için kullanılmaktadır.

### 3 GEREÇ ve YÖNTEM

Bu tez çalışması, Gazi Üniversitesi Rektörlüğü Deney Hayvanları Etik Kurul Başkanlığı'nın G.Ü.ET-14.019 kod numarası ile onayı alınarak, Gazi Üniversitesi Deneysel Araştırmalar Merkezi'nde gerçekleştirildi. Çalışmada, ağırlıkları 230-270 gram arasında değişen, 24 adet Wistar Albino tipi dişi sıçan kullanıldı. Sıçanlar uygun kafeslerde,  $21\pm 2$  C° sıcaklıkta ve 12 saat karanlık - 12 saat aydınlık ortamın sağlandığı koşullarda barındırıldı. Deneklerin beslenme ihtiyaçları, standart laboratuvar yemi ve su verilerek düzenli olarak karşılandı. Tüm cerrahi işlemler % 10'luk ketamin HCl (50 mg/kg) ve ksilazin HCl (5 mg/kg) anestezisi altında, aynı cerrah tarafından steril koşullarda gerçekleştirildi. Deney boyunca ölen hayvan olmadı.

#### 3.1 C1 INH HAZIRLANMASI VE UYGULANMASI

C1 esteraz inhibitörü (Cetor ) Centurion Pharma İlaç Sanayi ve Tic Ltd Şti tarafından sağlandı. Normalde 2-8°C'de muhafaza edilen flakon ve enjeksiyonluk su oda sıcaklığına (15-25°C) getirildi. On dakika içinde kurutulmuş protein fraksiyonu, 5 mL enjeksiyonluk su içinde çözüldü ve 3 saat içerisinde kullanıldı. İskemiden 10 dakika, reperfüzyondan 20 dakika ya da reperfüzyondan 10 dakika önce verilecek şekilde planlanan deney gruplarına 100 IU/kg C1 INH (Cetor) intraperitoneal olarak verildi.



**Şekil 3.1.** C1 INH (Cetor) kullanımı

### 3.2 DENEKLERİN GRUPLANDIRILMASI

Ratlar, eşit sayıda (n=6) ve rastgele dört gruptan birine dahil edildi.

**Kontrol Grubu:** Sol alt ekstremiteye turnike ile 3 saat iskemi sonrasında 3 saat reperfüzyon uygulandı.

**I-10 Grubu:** Sol alt ekstremiteye iskemiden 10 dakika önce intraperitoneal olarak 100 IU/kg C1 INH verildi.

**R-20 Grubu:** Sol alt ekstremiteye reperfüzyondan 20 dakika önce intraperitoneal olarak 100 IU/kg C1 INH verildi.

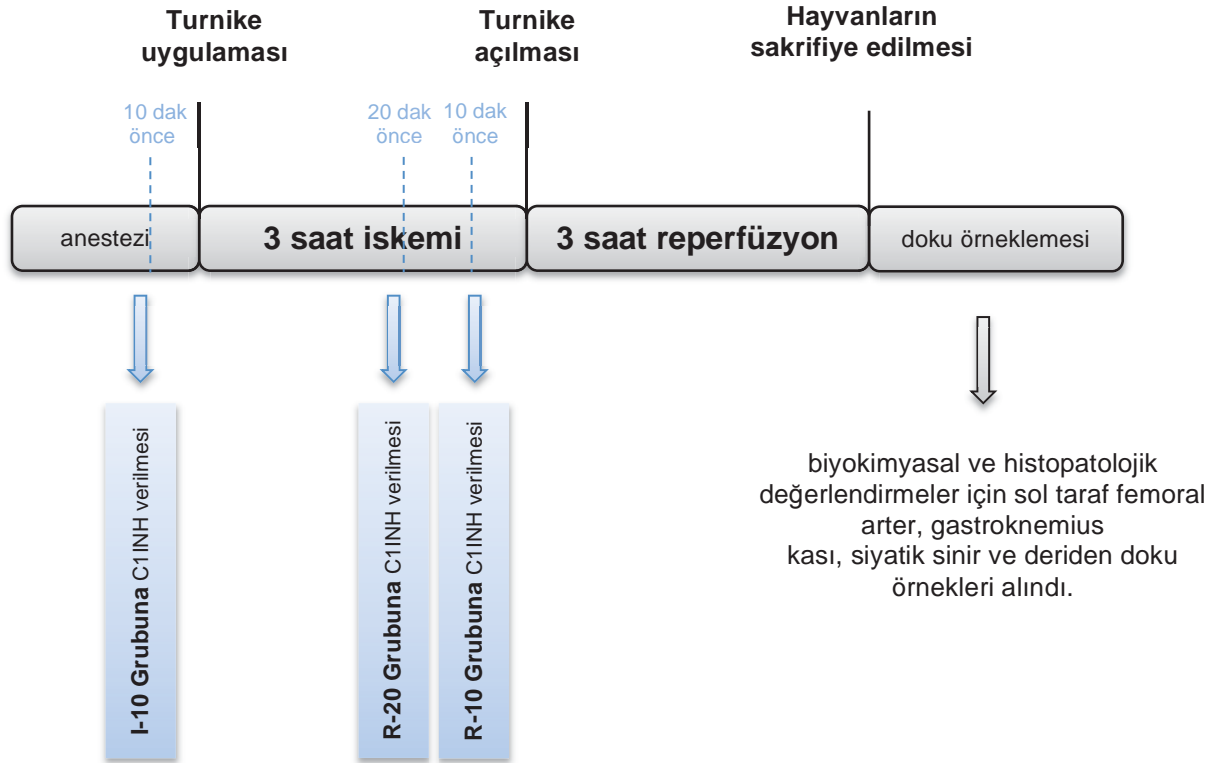
**R-10 Grubu:** Sol alt ekstremiteye reperfüzyondan 10 dakika önce intraperitoneal olarak 100 IU/kg C1 INH verildi.

### 3.3 CERRAHİ TEKNİK

#### 3.3.1 Alt Ekstremité İskemi / Reperfüzyon Modeli

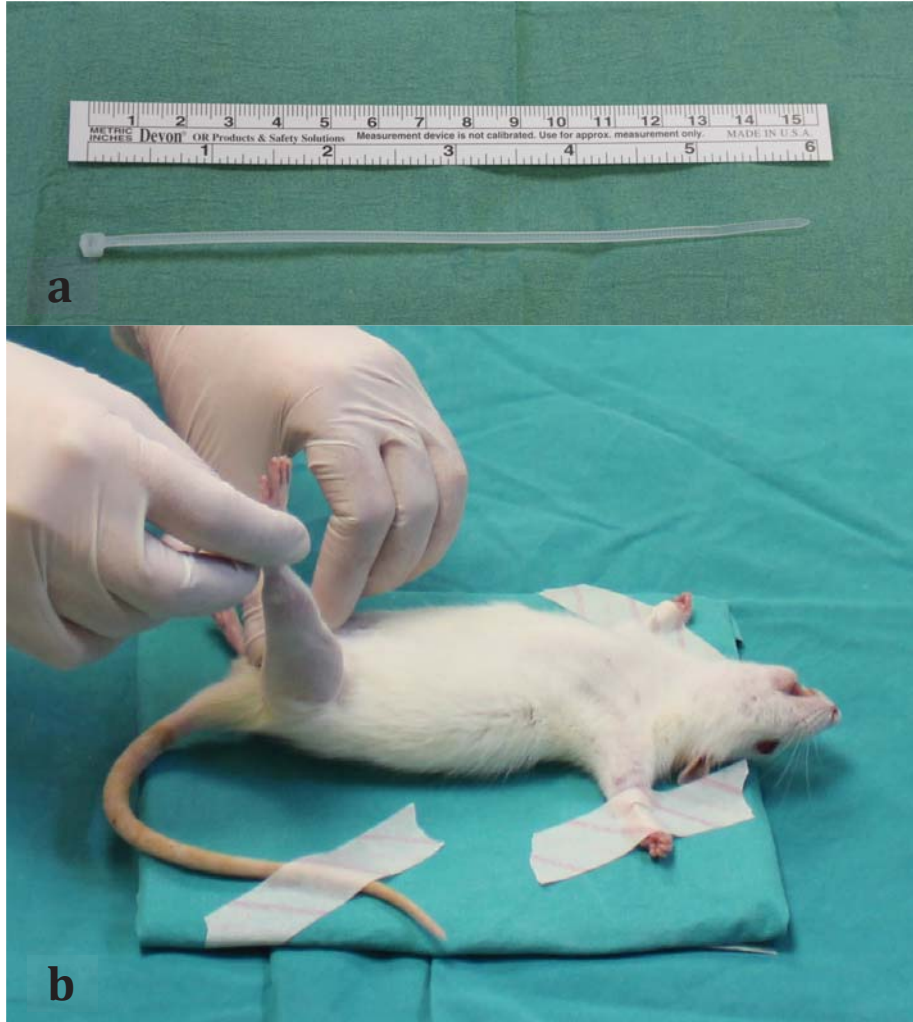
Literatürde yapılmış çalışmalar referans alınarak iskemi ve reperfüzyon süreleri belirlendi. Deneklere 3 saat iskemi sonrasında, 3 saat reperfüzyon uygulandı (Tablo 3.1.). I/R döngüsünün sonunda tüm ratların sol taraf femoral arterleri, gastroknemius kasları, siyatik sinirleri ve deriden incelenmek üzere doku örnekleri alındı. Denekler derin anestezi altında intrakardiyak kan alınarak sakrifiye edildi.

**Tablo 3.1.** İskemi / reperfüzyon döngüsü ve grupların şematik görünümü



### 3.3.1.1 İskemi

Sıçanların sol arka bacaklarına iskemi uygulamak amacıyla kalça eklemi hizasında 2,5 mm kalınlığındaki plastik kelepçe ile turnike uygulaması gerçekleştirildi (Şekil 3.2.). Plastik kelepçenin bir kere sıkıldıktan sonra bir daha gevşememesi turnikenin başarısını arttırdı. Turnike uygulaması sonrasında sıçan arka bacaklarında ısı kaybı ve morarma geliştiğinin görülmesi ile iskeminin başladığı anlaşıldı (Şekil 3.3.).



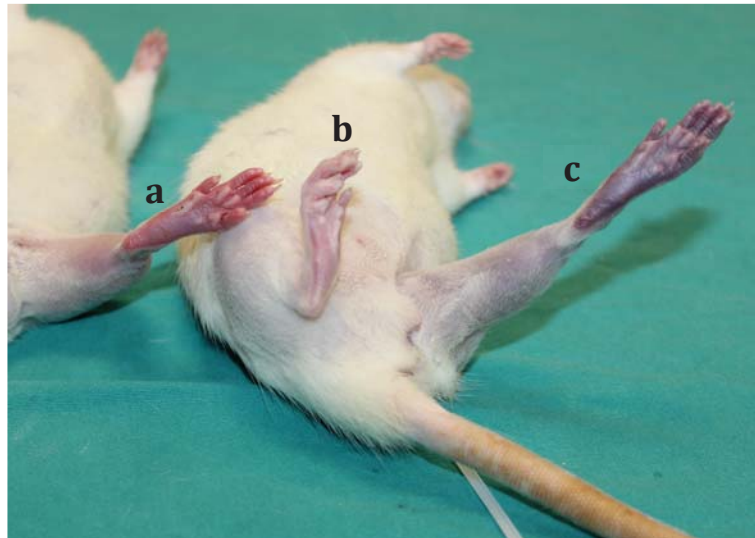
Şekil 3.2. Çalışmada turnike amacıyla kullanılan plastik kelepçe ve turnike uygulaması



**Şekil 3.3.** İskeminin başlamasıyla beraber sol ekstremitede gelişen morarma ve turnike uygulanmayan sağ ekstremitede normal pembe renk

### **3.3.1.2 Reperfüzyon**

Üç saatlik iskemi süresi sonunda turnike makas yardımıyla kesildi ve reperfüzyon evresi başlatıldı. Turnikenin açılmasıyla beraber ekstremitede yaklaşık 20 - 30 dakika süreyle devam eden aşırı kızarıklık (flushing) görüldü (Şekil 3.4.). Reperfüzyonun takip eden döneminde ekstremitenin rengi normale döndü.

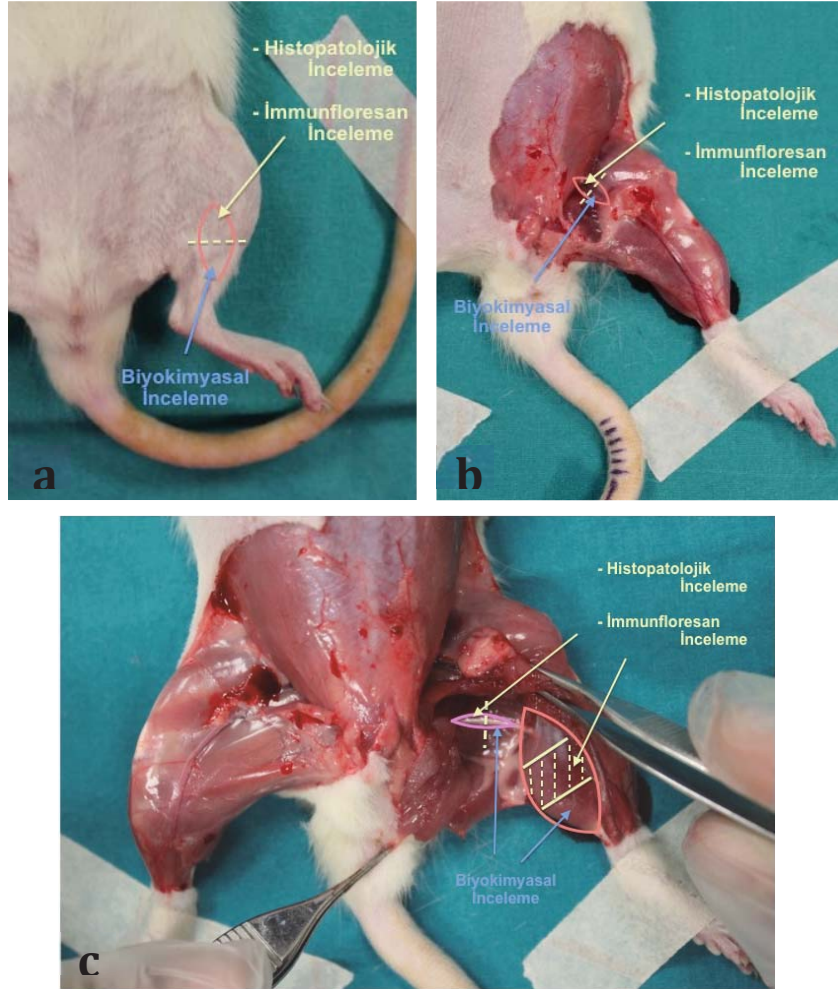


**Şekil 3.4.** a) Reperfüzyon dönemine yeni girmiş bir ekstremitede "flushing" görüntüsü  
b) Pembe renkli normal dolaşımı olan bir ekstremita  
c) İskemik dönemde sol alt ekstremitede morarma

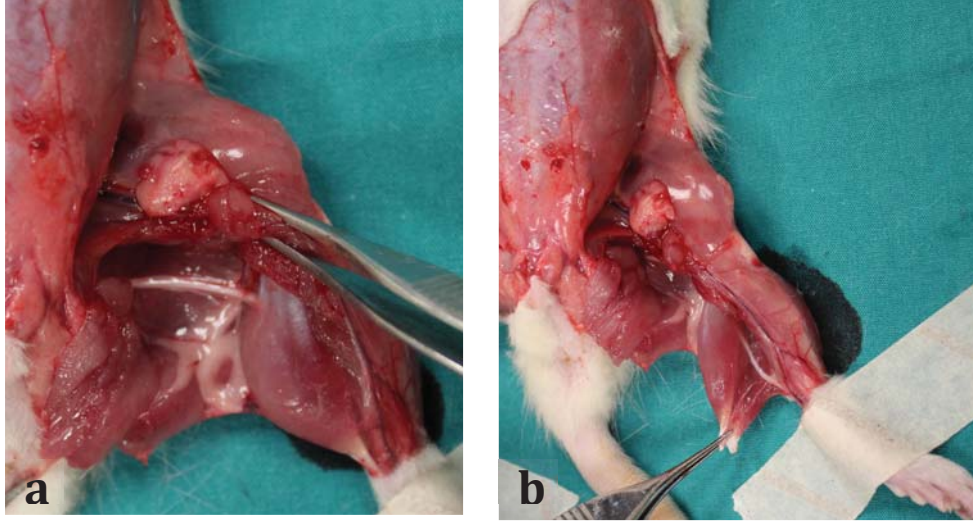


### 3.3.2 Doku Örnekleme

Üçer saatlik iskemî reperfüzyon döngülerinin sonunda tüm ratların sol taraf femoral arter, gastroknemius kası, siyatik siniri ve ciltlerinden incelenmek üzere doku örnekleri alındı. Daha sonra denekler derin anestezi altında intrakardiyak kan alınarak sakrifiye edildi. Alınan doku örnekleri histopatolojik, immunfloresan ve biyokimyasal incelemeler için parçalara bölündü (Şekil 3.5.).



**Şekil 3.5.** Doku örnekleme sonrası **a)** cilt **b)** femoral arter **c)** siyatik sinir ve gastroknemius kasında histolojik ve biyokimyasal incelemeler için dokunun parçalara ayrılması



**Şekil 3.6. a)** Siyatik sinir eksplorasyonu

**b)** Gastrocnemius kas eksizyonu

### 3.4 HİSTOPATOLOJİK DEĞERLENDİRME

Alınan doku örnekleri, oda ısısında %10'luk formol solüsyonu içerisinde 72 saat tespit edildi. Tespit edilen dokular standart ışık mikroskobu takip yönteminden geçirilerek parafin bloklar elde edildi. Parafin bloklardaki örneklerden mikrotom ile 5- $\mu$ m kalınlıkta kesitler alındı ve her örnek hematoxilen–eozin (HE) boyası ile boyandı. HE boyalı kesitler ışık mikroskopunda histopatolojik olarak değerlendirildi. Her örnekte en az iki farklı kesit incelendi. Tüm patolojik incelemeler, kesitlerin hangi gruba ait olduğu bildirilmeden tek bir patolog tarafından kör olarak yapıldı.

Histopatolojik incelemede; damarda endotel hasarı, kasta dejeneratif bulgular, sinirde vakuolizasyon ve deride nötrofil infiltrasyonu değerlendirildi. Kas dokularında dejeneratif bulguların değerlendirilmesi için 5 parametre incelendi; hücre çekirdeğinin merkeze göçü, enine çizgilenme kayıpları, kas liflerinde ayrılma, ödem ve inflamatuvar hücre sayısı. Her denekten hazırlanan preparatlar dejeneratif bulgular açısından ayrı ayrı değerlendirilerek skorlandı. Elde edilen skorlar ayrı ayrı toplanıp 5'e bölünerek her hayvan için bir skor oluşturuldu.



Skorlamada;

0 = dejeneratif bulgu yok

1 = minimal dejeneratif bulgu

2 = orta düzeyde dejeneratif bulgu

3 = ileri düzeyde dejeneratif bulgu şeklinde puanlandı.

Daha sonra bu skorlar istatistiksel anlamlılık açısından değerlendirildi.

### **3.5 İMMÜN FLORESAN DEĞERLENDİRME**

Alınan doku örnekleri, incelemenin yapılacağı güne kadar % 10'luk formol içinde, her bir rat için ayrı saklama kabında bekletildi. İnceleme yapılacağı zaman doku örnekleri doku takip kasetlerine alınarak rutin ışık mikroskobu takibinden geçirildi ve parafin bloklar haline getirildi. Her parafin bloktan 5-µm kalınlığında kesitler alındı, kesitler etüvde 56 C'de bir gece bekletilerek deparafinize edildi. Deparafinizasyon ksilol aşamasıyla tamamlandı, doku alkol serilerinden geçirilerek immün işaretlemeye hazır hale getirildi. Apoptozun varlığının tespiti amacıyla TUNEL yöntemi Roche marka ve floresan özellikli In situ Cell Death Detection Kit ile uygulandı. Kit uygulanmadan önce permeabilizasyonu sağlamak amacıyla kesitlere proteinaz K damlatıldı ve kesitler 30 dakika oda ısısında bekletildi. Kesitler Phosphate Buffer Saline (PBS) ile 3 kez yıkandı ve kurulandı. TUNEL enzim ve substrat solüsyonları karıştırılarak elde edilen çalışma solüsyonu 90 dakika boyunca karanlık ve nemli ortamda bekletildi. Kesitler PBS ile 3 kez yıkandı ve kurulandı. Hücre çekirdekleri Hoechst ile işaretlendi. Yıkama işleminin tekrarlanmasının ardından kesitler 1:1 PBS:Gliserol karışımıyla kapatıldı. Dokular immünfluoresan mikroskopta değerlendirildi. Tüm çekirdekler mavi renkte izlenirken, TUNEL pozitifitesi apoptoza özgü olarak parlak yeşil renkte ve çekirdekte lokalize olarak gözlemlendi. Apoptotik indeks her bir dokuya ait seri kesitler boyunca rastgele sayılan hücrelerden apoptotik hücrelerin sayılmasıyla % cinsinden belirlendi.

### **3.6 BİYOKİMYASAL DEĞERLENDİRME**

Alınan doku örnekleri tartıldıktan sonra distile su ile homojenizatörden geçirilerek homojenize edildi. Elde edilen örnekler 1 hafta -80 C de dondurularak saklandı. Çalışma günü hazırlanan örnekler oda ısısında çalışmaya hazırlandı. Doku örnekleri sinir, deri, kas ve damar olarak gruplandı. Homojenize edilmiş doku örnekleri Eastbiofarm marka MDA ELISA kiti ile Dynex marka ELISA cihazında sandwich prensibiyle çalışıldı. Çıkan sonuçlar gram başına hesaplandı.

### **3.7 İSTATİSTİKSEL DEĞERLENDİRME**

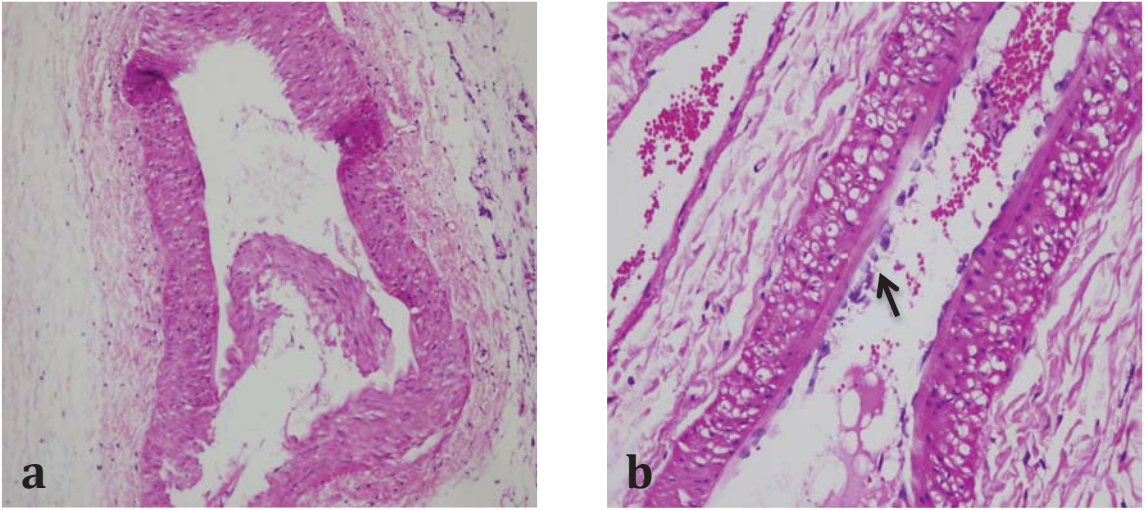
İstatistiksel analizlerde “IBM SPSS for Windows version 21.0” programı kullanıldı. Biyokimyasal, apoptoz ve kas histopatoloji bulgularının istatistiksel analizi için gruplar arasındaki anlamlı farkların belirlenmesinde Kruskal-Wallis testi, anlamlı olan grupların ikili karşılaştırmasında Siegel Castellan testi kullanıldı. “ $p<0,05$ ” değeri istatistiksel olarak anlamlı kabul edildi. Damar histopatolojik bulgularının yüzde frekansları hesaplandı ve gruplar arasında karşılaştırılarak yorumlandı.

## 4 BULGULAR

### 4.1 HİSTOPATOLOJİK DEĞERLENDİRME

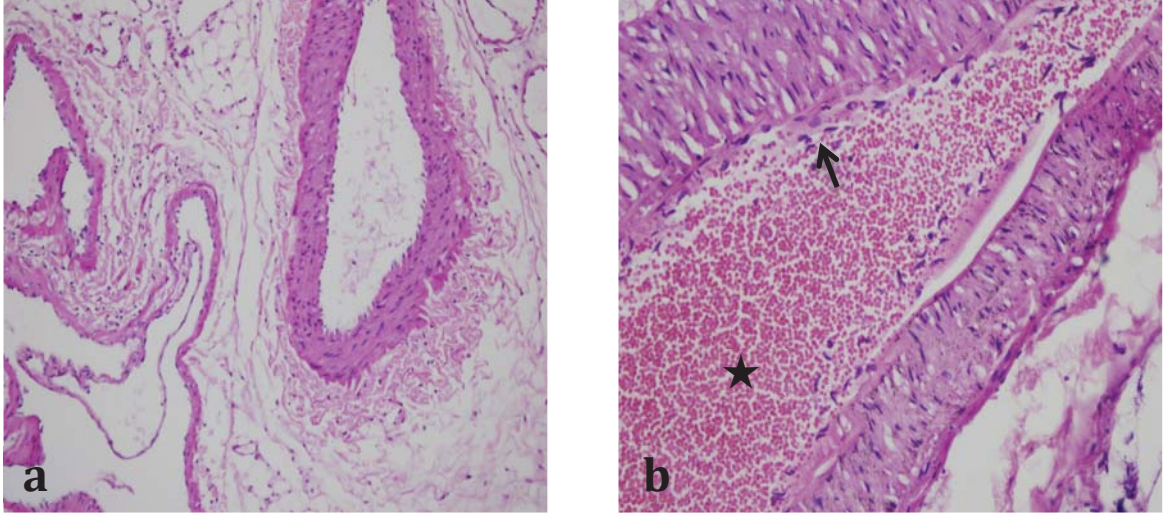
#### 4.1.1 Femoral Arter

Kontrol, I-10, R-10 gruplarının femoral arter HE kesitlerinde damar endotel hücrelerinde belirgin hidropik dejenerasyonlar izlendi. R-20 grubunda da normal endotel hücreleriyle beraber hidropik dejenerasyonlar görüldü. Gruplar arası yüzde frekans karşılaştırmasında; damarda hasar olanların %26.7'si kontrol, %26.7'si I-10, %20'si I-20, %26.7'si I-10 grubunda izlendi.



Şekil 4.1. Femoral Arter HE Kesitleri

- a) **Kontrol grubu** endotel hücreleri izlenmemekte (200 x HE)
- b) **I-10 grubu** endotel hücrelerinde hidropik dejenerasyon (↗) (400 x HE)



**Şekil 4.2.** Femoral Arter HE Kesitleri

**a) R-20 grubu** normal endotel hücreleri (200 x HE)

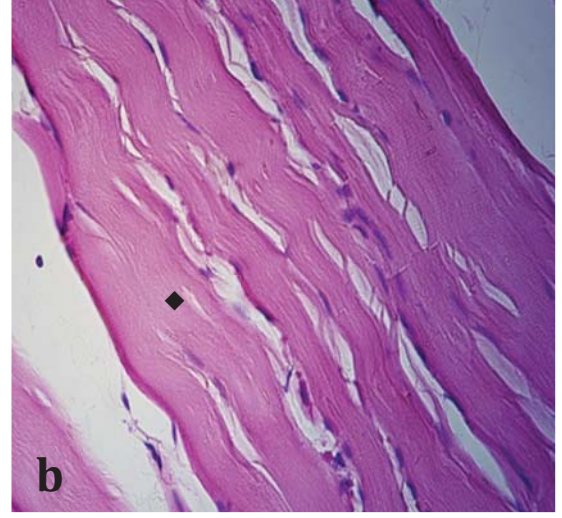
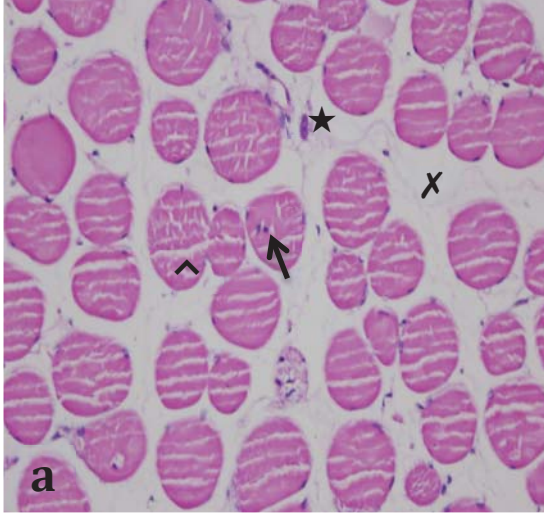
**b) R-10 grubu** endotel hücrelerinde hidropik dejenerasyon (↗) damarda konjesyon (★)  
(400 x HE)

#### 4.1.2 Gastrocnemius Kası

Kas dokularında dejeneratif bulgular değerlendirildi ve skorlamaları yapıldı. Deneklerin dejeneratif histoloji skorlarında ayrı ayrı aldıkları puanlar Tablo 4.1’de özetlenmiştir. Dejeneratif histoloji skorlarının en yüksek çıktığı grup kontrol grubu olmuştur. I/R döngüsü sonrası kontrol grubunda, enine çizgilenmelerde kayıplar, çekirdeklerin merkeze göçü, kas liflerinde ayrılma, bağ doku artışları ve intersellüler-interfasiküler ödem ile inflamatuvar hücre sayısında (nötrofil – mast hücre) artış dikkat çekicidir (Şekil 4.3.).

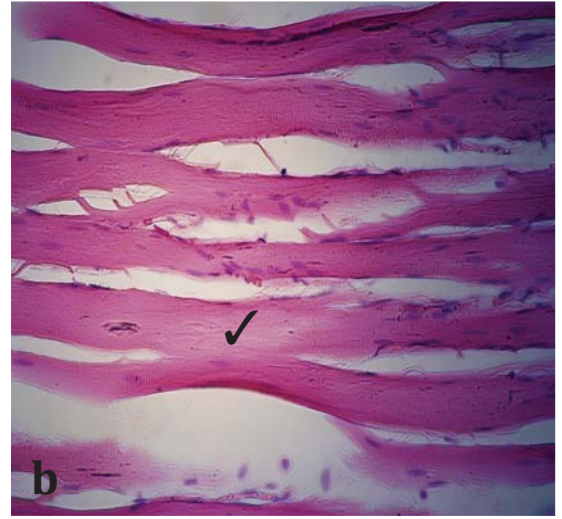
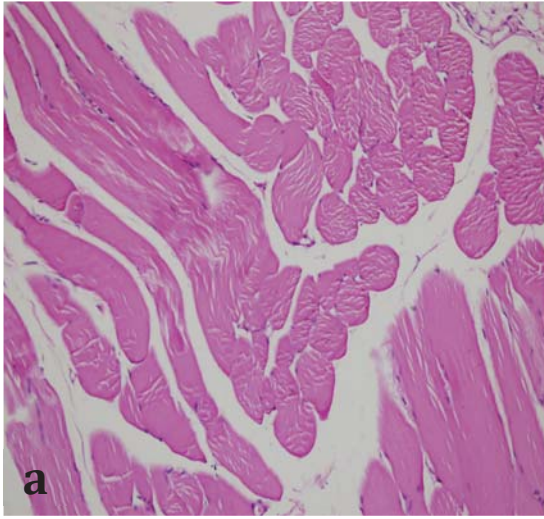
I-10, R-20 ve R-10 gruplarında enine çizgilenme kayıpları, çekirdeğin merkeze göçü, kas liflerinde ayrılma, intersellüler-interfasiküler ödem ve inflamatuvar hücre sayısında azalma olmasına rağmen aradaki fark istatistiksel olarak anlamlı bulunmamıştır.





**Şekil 4.3.** Gastroknemius Kası HE Kesitleri

- a) **Kontrol grubu** çekirdeklerin merkeze göçü (↗), kas liflerinde ayrılma (^), ödem (x) ve degranüle mast hücresi (★) (400 x HE)
- b) **Kontrol grubu** kas liflerinde enine çizgi kaybı (◆) (600 x HE)



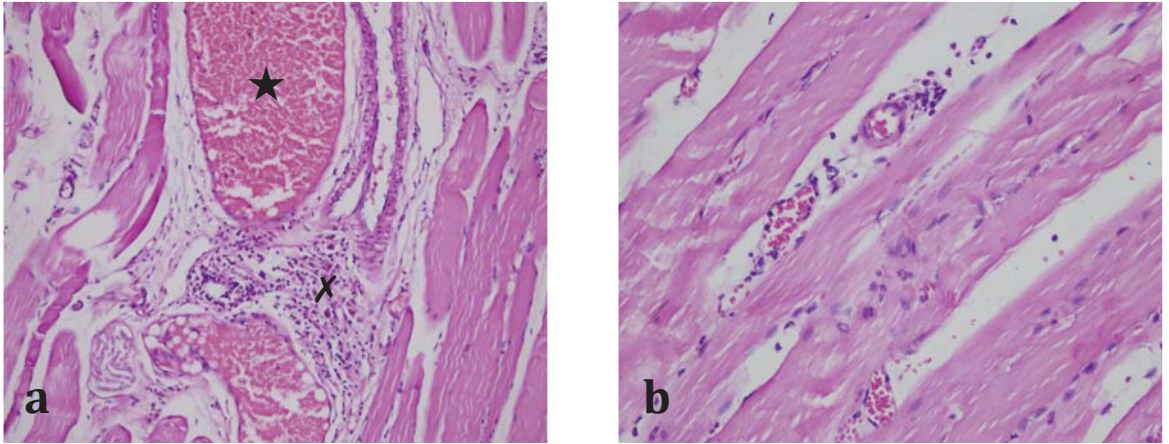
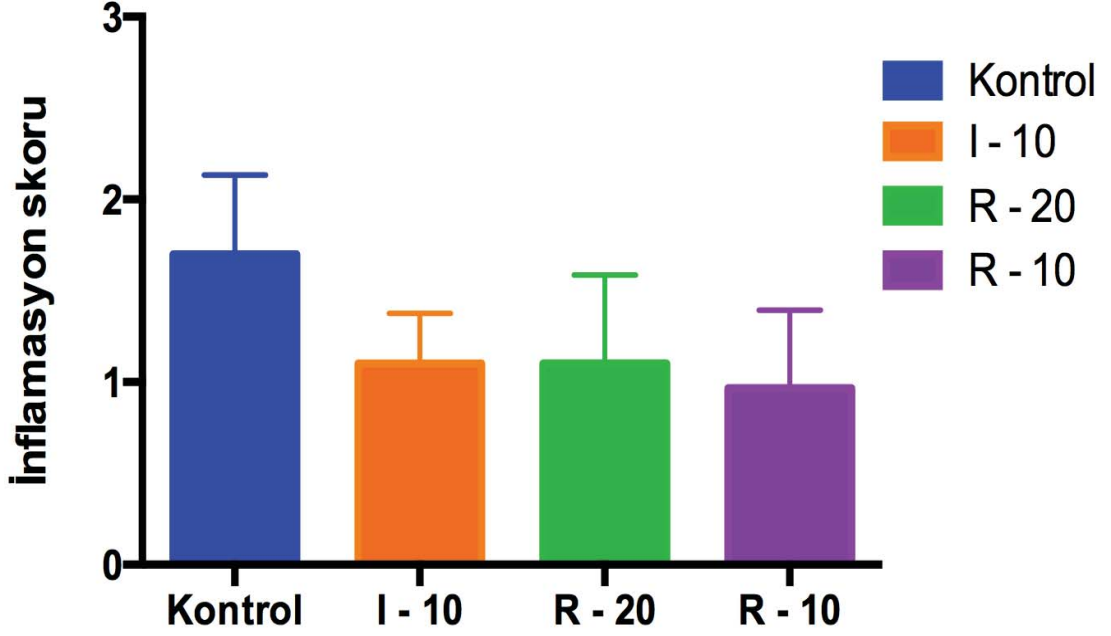
**Şekil 4.4.** Gastroknemius Kası HE Kesitleri

- a) **R-10 grubu** hasar olmayan kas lifleri (200 x HE)
- b) **R-10 grubu** kas liflerinde enine çizgilenmeler (✓) (400 x HE)

**Tablo 4.1.** Kontrol ve Deney Gruplarının Kas Dokusundaki Dejeneratif Histoloji Skorları

	Enine çizgilenme kayıpları	Çekirdeğin merkeze göçü	Kas liflerinde ayrılma	Ödem	İnflamatuvar hücre sayısı	Ortalama
K 1	1	1	2	1	2	1,70
K 2	2	1	1	3	1	
K 3	3	1	2	2	2	
K 4	2	1	2	2	1	
K 5	2	2	3	3	2	
K 6	2	0	2	2	0	
İ10 1	0	2	1	1	0	1,10
İ10 2	1	1	2	1	1	
İ10 3	0	1	1	2	0	
İ10 4	1	0	1	2	1	
İ10 5	2	1	1	2	1	
İ10 6	1	2	1	2	1	
R20 1	2	1	1	3	0	1,10
R20 2	2	1	1	1	1	
R20 3	1	1	2	3	0	
R20 4	1	1	2	2	2	
R20 5	0	1	0	0	1	
R20 6	1	1	1	0	0	
R10 1	2	2	2	2	0	0,97
R10 2	0	0	1	1	1	
R10 3	0	0	1	1	1	
R10 4	1	1	1	1	0	
R10 5	2	2	1	2	0	
R10 6	1	1	1	1	0	

**Tablo 4.2.** Kas Dokusundaki Dejeneratif Histoloji Skorlarının Karşılaştırmalı Dağılımı  
Kontrol grubu ile I-10, R-20 ve R-10 grupları karşılaştırıldığında histoloji skorlarında azalma olmasına karşın aradaki fark istatistiksel olarak anlamlı bulunmadı ( $p=0,061$ ).



**Şekil 4.5.** Gastrocnemius Kası HE Kesitleri

Kontrol ve deney gruplarının gastrocnemius kas HE kesitlerinde kesit dahilinde konjesyon dışında damar endotel hücrelerinde belirgin bir değişiklik gözlenmedi.

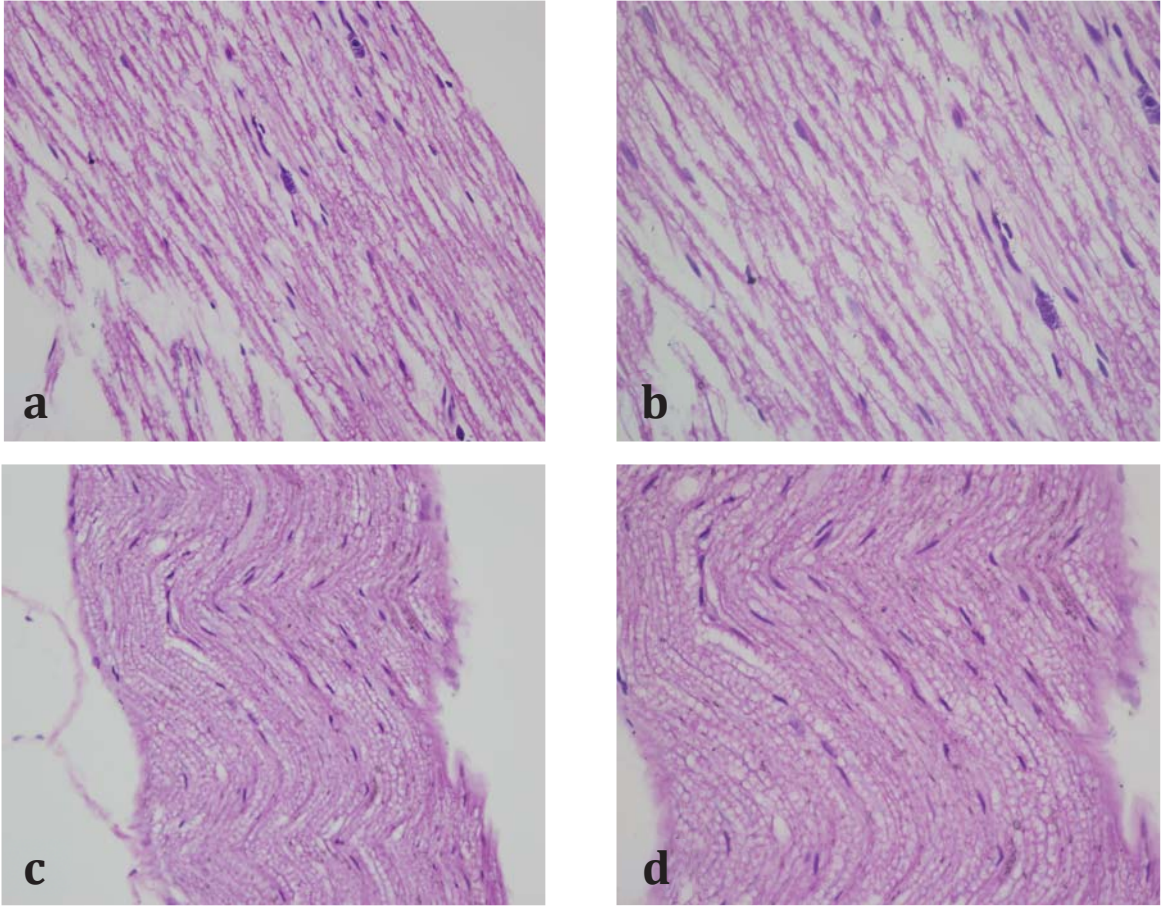
**a) Kontrol grubu** kas dokusunda inflamasyon (x) ve damarlarda konjesyon (★) (x200)

**b) R-20 grubu** kas dokusunda konjesyone damarlar, nötrofiller ve degranüle mast hücreleri (400 x HE)



### 4.1.3 Siyatik Sinir

Siyatik sinir histopatolojik incelemelerinde; kontrol grubunda miyelin kılıfta şişme, belirgin vakuolizasyon ve yoğun mast hücre degranülasyonu izlendi. I-10, R-20 ve R-10 deney gruplarında kontrol grubuna göre daha az miyelin kılıfta şişme ve vakuolizasyon mevcuttu. Özellikle bu azalma R-10 grubunda daha belirgindi. Kontrol grubu ile karşılaştırıldığında R-20 ve R-10 deney gruplarında çok az mast hücre degranülasyonu izlendi.



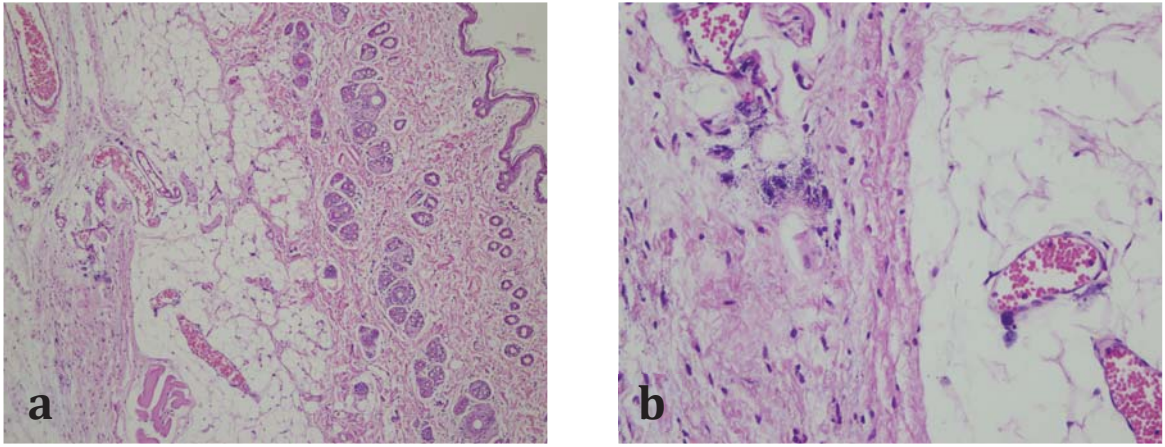
**Şekil 4.6.** Siyatik Sinir HE Kesitleri

- a) **Kontrol grubu** sinir dokusunda ödem ve vakuolizasyon (mast hücresi) (400 x HE)
- b) **Kontrol grubu** sinir dokusunda ödem ve vakuolizasyon (mast hücresi) (600 x HE)
- c) **R-10 grubu** minimal hasar izlenen sinir dokusu (400 x HE)
- d) **R-10 grubu** minimal hasar izlenen sinir dokusu (600 x HE)



#### 4.1.4 Deri

Kontrol ve deney gruplarında mast hücre degranülasyonu dışında belirgin bir değişiklik gözlenmedi. Kontrol grubunda yoğun mast hücre degranülasyonu izlenirken özellikle R-20 ve R-10 deney gruplarında mast hücre degranülasyonunun belirgin azaldığı gözlemlendi. Histolojik kesitlerin çoğunda erken dönem inflamasyon bulgusu olarak vasküler konjesyon mevcuttu.



**Şekil 4.7.** Deri HE Kesitleri

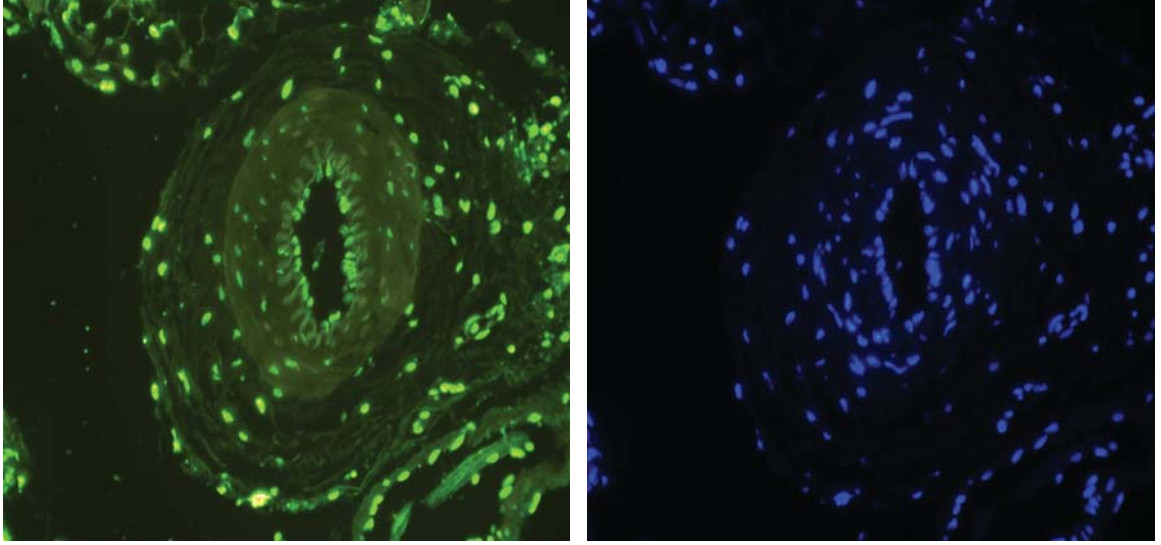
- a) Subkutan dokuda degranüle mast hücreleri, damarlarda konjesyon (100 x HE)
- b) Subkutan dokuda degranüle mast hücreleri, damarlarda konjesyon (400 x HE)

#### 4.2 DOKUDA APOPİTOZ ORANLARI

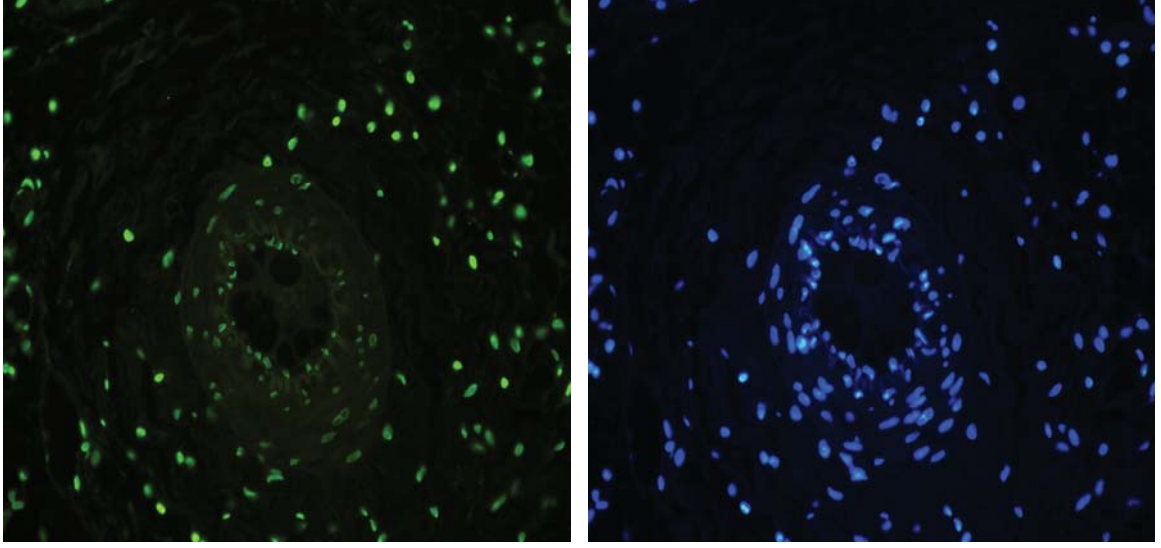
Apopitotik hücrelerde olması beklenen DNA kırıkları TUNEL yöntemiyle saptandı. Sağlıklı çekirdeklerde TUNEL işaretlenmesi izlenmezken, kırık DNA uçları apopitotik hücrelere özgü çekirdek morfolojisiyle uyumlu bir görünüm sergiledi. TUNEL-pozitif boyanan hücrelerin total hücre sayısına oranı % olarak hesaplandı.

#### 4.2.1 Femoral Arter

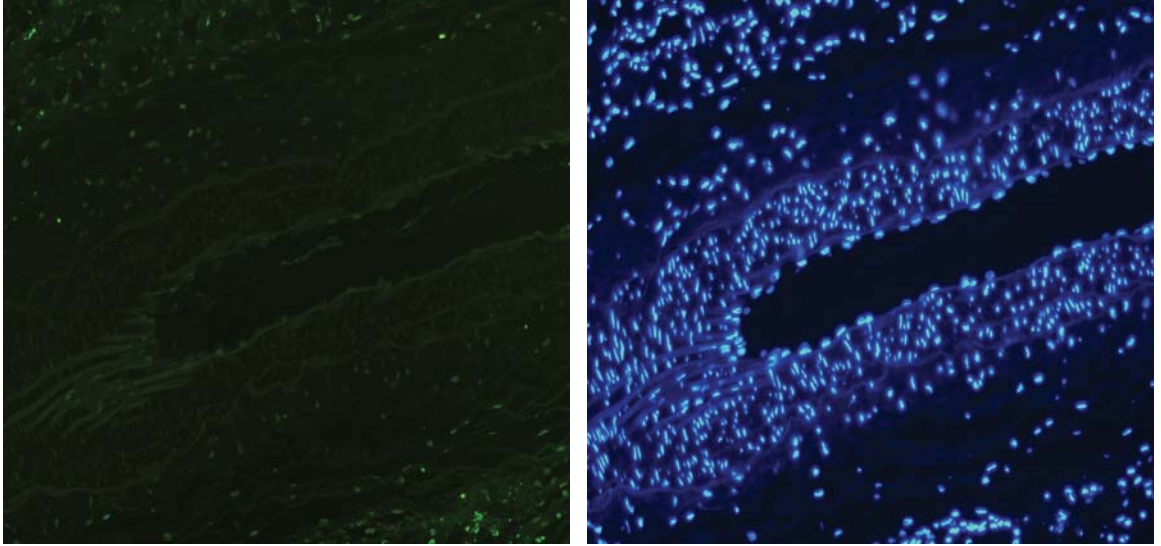
Kontrol grubuna göre reperfüzyondan önce C1 INH uygulanan gruplarda (R-20 ve R-10) apoptotik hücre sayısında istatistiksel olarak anlamlı azalma görüldü ( $p=0,050$ ). Bu azalma en çok R-10 grubunda izlendi.



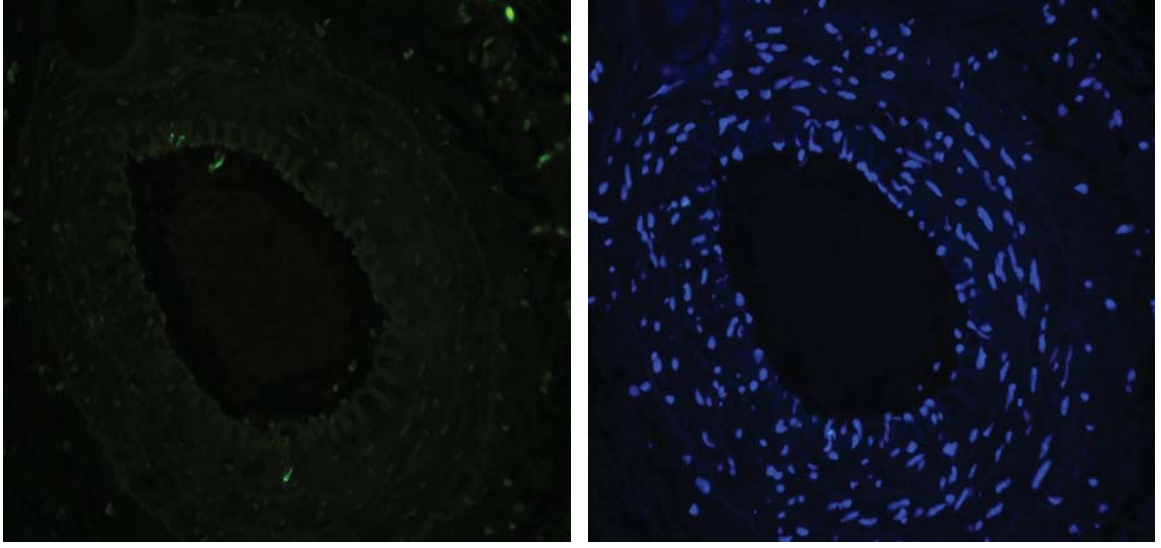
**Şekil 4.8.** Kontrol grubu femoral arter hücrelerinde yoğun miktarda apoptoz izlendi. Apoptotik hücelere ait çekirdekler TUNEL boyama ile yeşil, karşılık gelen bütün hücre çekirdekleri mavi renkte görünüm sergiledi (40 x).



**Şekil 4.9.** I-10 grubu femoral arter hücrelerinde yoğun miktarda apoptoz izlendi. Apoptotik hücelere ait çekirdekler TUNEL boyama ile yeşil, karşılık gelen bütün hücre çekirdekleri mavi renkte görünüm sergiledi (40 x).

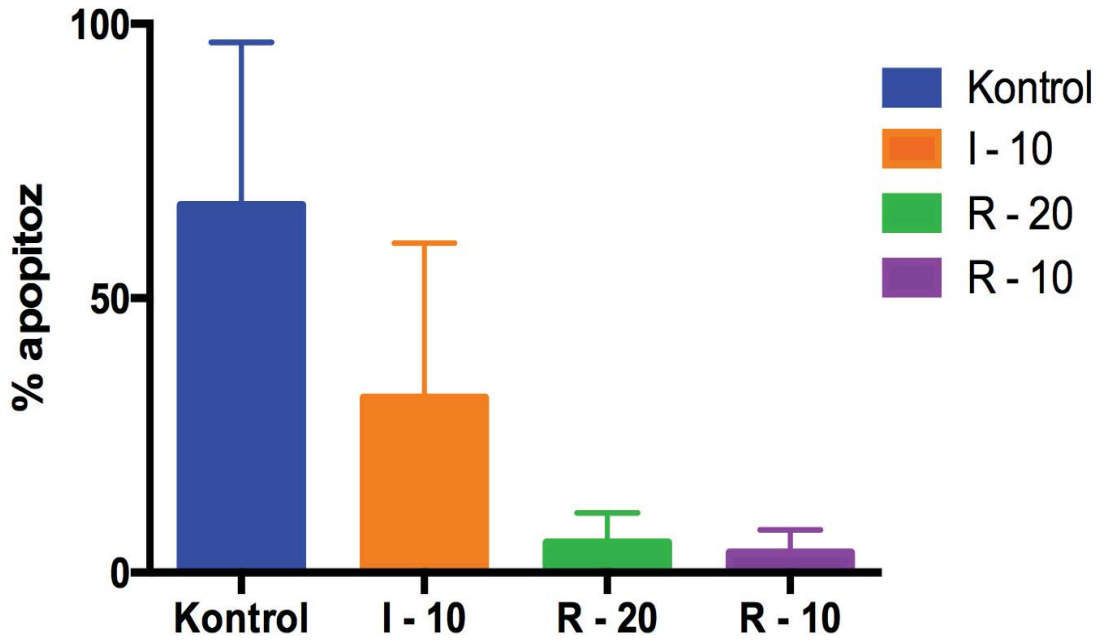


**Şekil 4.10.** R-20 grubu femoral arter hücelerinde az miktarda apoptoz izlendi. Apoptotik hücelere ait çekirdekler TUNEL boyama ile yeşil, karşılık gelen bütün hücre çekirdekleri mavi renkte görünüm sergiledi (40 x).



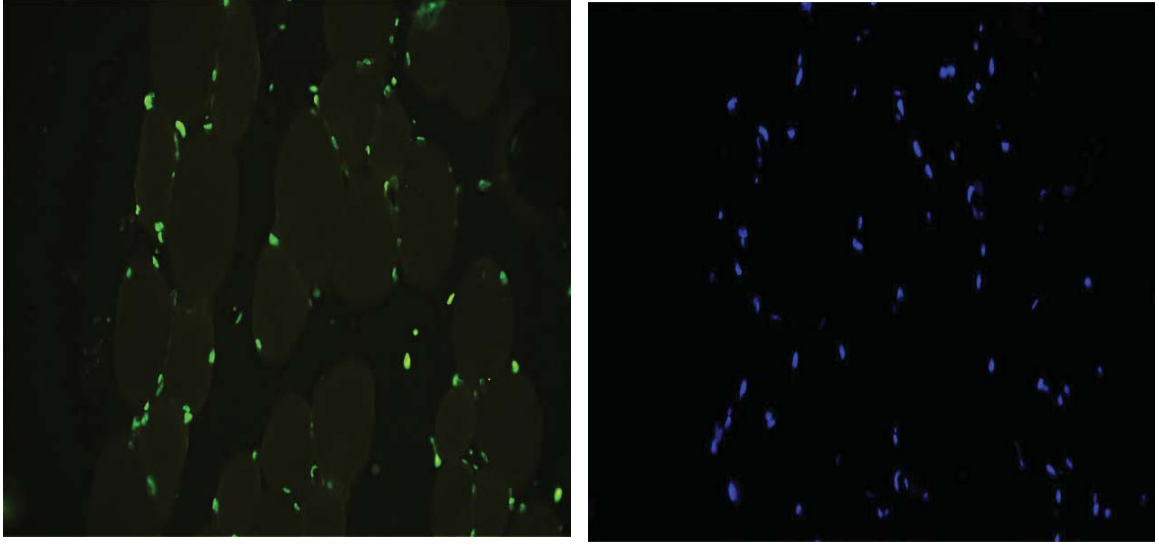
**Şekil 4.11.** R-10 grubu femoral arter hücrelerinde az miktarda apoptoz izlendi. Apoptotik hücelere ait çekirdekler TUNEL boyama ile yeşil, karşılık gelen bütün hücre çekirdekleri mavi renkte görünüm sergiledi (40 x).

**Tablo 4.3.** Femoral Arter Hücrelerinde Apoptoz İndeks Değerlerinin Karşılaştırmalı Dağılımı  
Reperfüzyondan önce C1 INH uygulanan gruplarda (R-20 ve R-10) apoptotik hücre sayısında anlamlı azalma izlendi ( $p=0,050$ ).



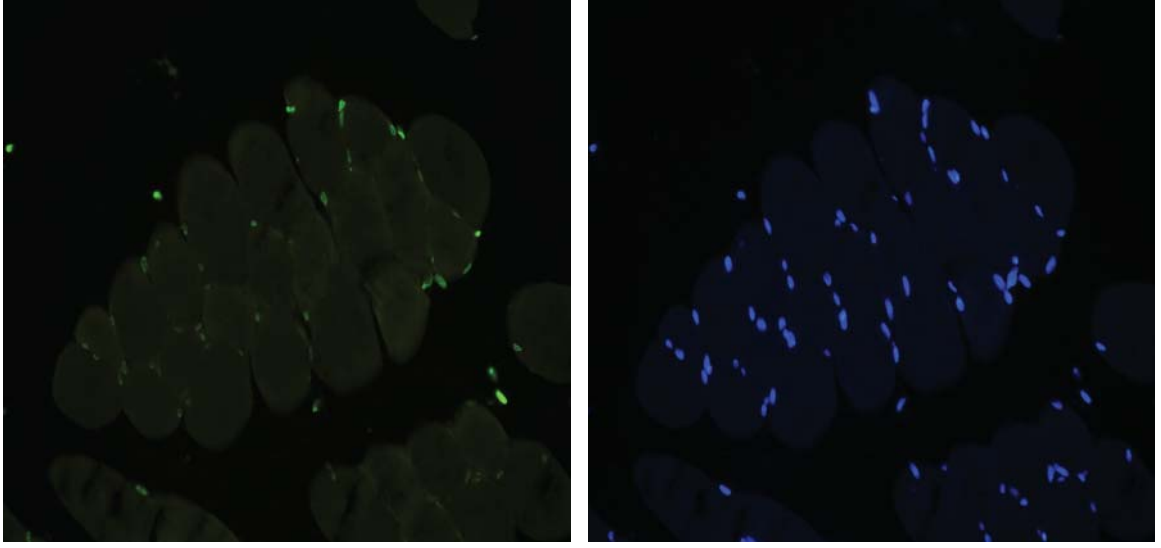
#### 4.2.2 Gastroknemius Kası

Kontrol grubuna göre reperfüzyondan önce C1 INH uygulanan gruplarda (R-20 ve R-10) apoptotik hücre sayısında istatistiksel olarak anlamlı azalma görüldü ( $p=0,003$ ). Reperfüzyondan 10 dakika önce C1 INH verilen grupta en az apoptoz izlendi.

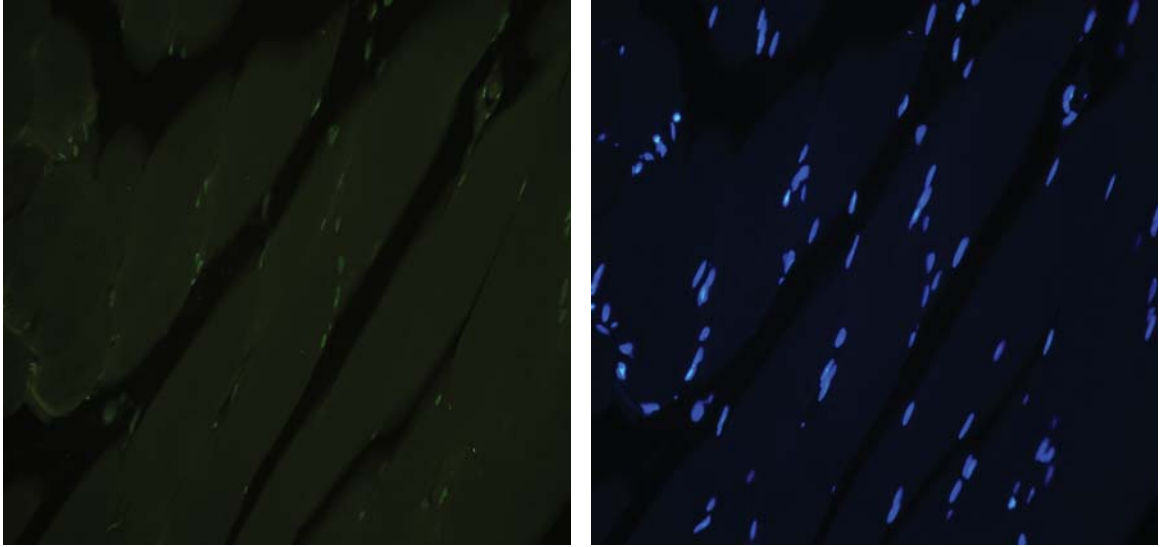


**Şekil 4.12.** Kontrol grubu gastroknemius kas hücrelerinde yoğun miktarda apoptoz izlendi. Apoptotik hücelere ait çekirdekler TUNEL boyama ile yeşil, karşılık gelen bütün hücre çekirdekleri mavi renkte görünüm sergiledi (40 x).

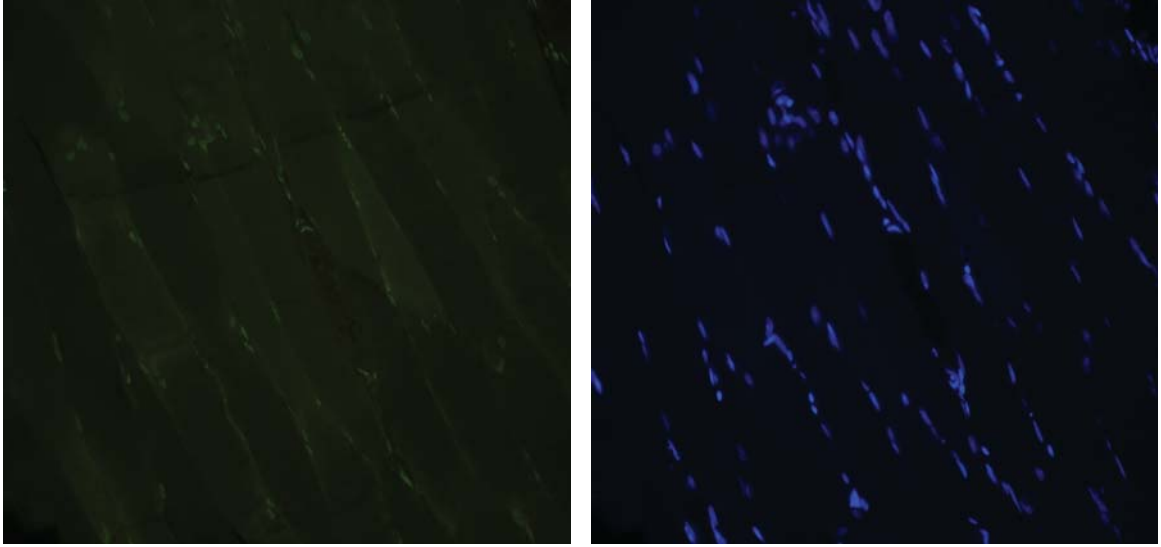




**Şekil 4.13.** I-10 grubu gastroknemius kas hücrelerinde kontrol grubuna göre daha az apoptoz izlendi. Apoptotik hücelere ait çekirdekler TUNEL boyama ile yeşil, karşılık gelen bütün hücre çekirdekleri mavi renkte görünüm sergiledi (40 x).

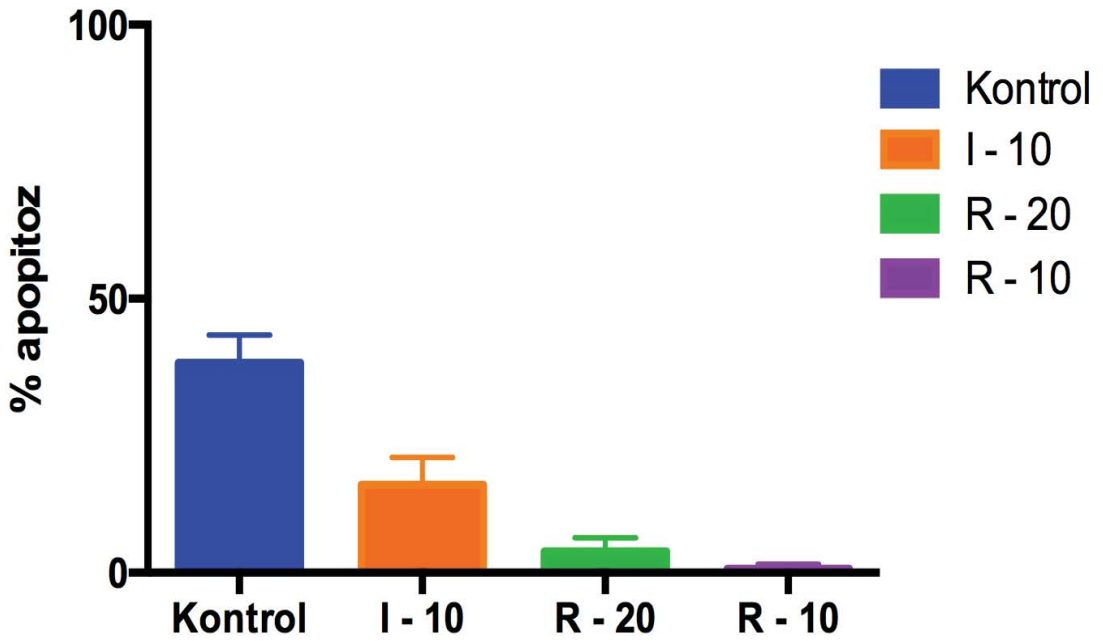


**Şekil 4.14.** R-20 grubu gastroknemius kas hücelerinde az miktarda apoptoz izlendi. Apoptotik hücelere ait çekirdekler TUNEL boyama ile yeşil, karşılık gelen bütün hücre çekirdekleri mavi renkte görünüm sergiledi (40 x).



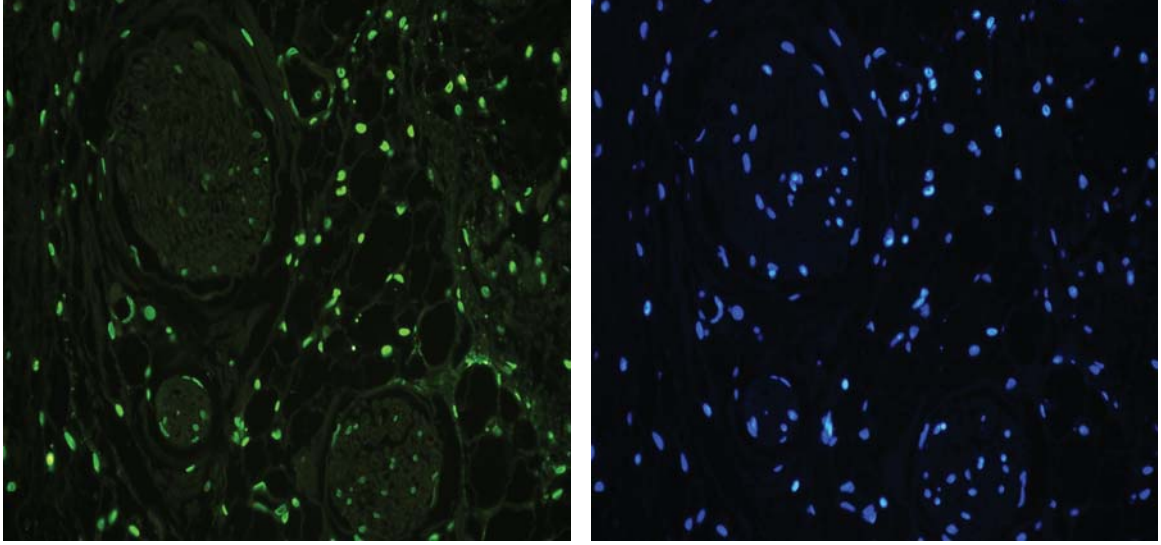
**Şekil 4.15.** R-10 grubu gastroknemius kas hücrelerinde az miktarda apoptoz izlendi. Apoptotik hücelere ait çekirdekler TUNEL boyama ile yeşil, karşılık gelen bütün hücre çekirdekleri mavi renkte görünüm sergiledi (40 x).

**Tablo 4.4.** Gastroknemius Kas Hücelerinde Apoptoz İndeks Değerlerinin Karşılaştırmalı Dağılımı Reperfüzyondan önce C1 INH uygulanan gruplarda (R-20 ve R-10) apoptotik hücre sayısında anlamlı azalma izlendi ( $p=0,003$ ).



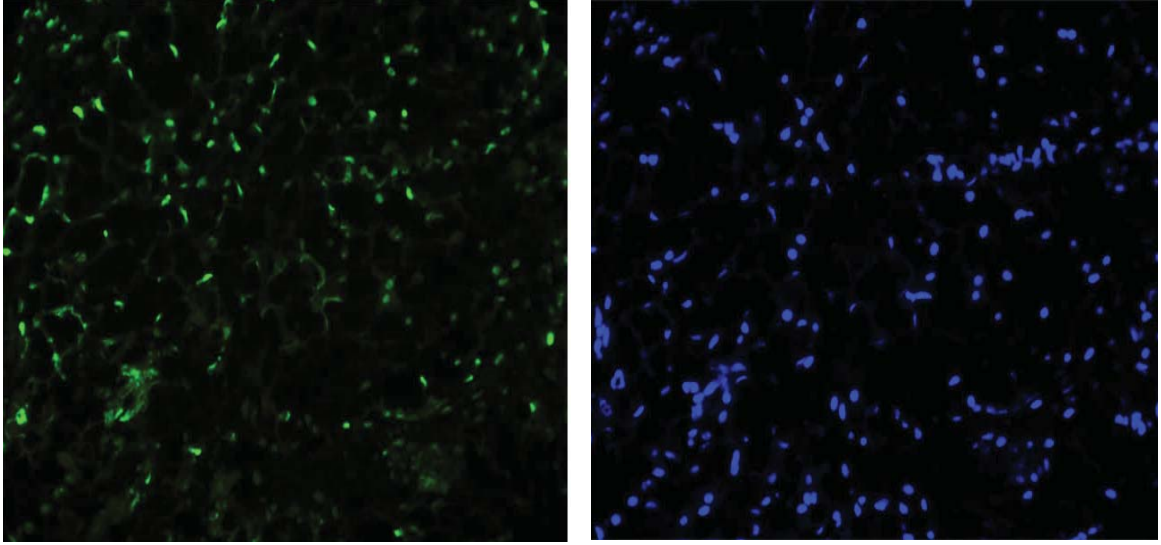
### 4.2.3 Siyatik Sinir

Kontrol grubuna göre reperfüzyondan önce C1 INH uygulanan gruplarda (R-20 ve R-10) apoptotik hücre sayısında istatistiksel olarak anlamlı azalma görüldü ( $p=0,041$ ). Bu azalma en çok R-10 grubunda izlendi.

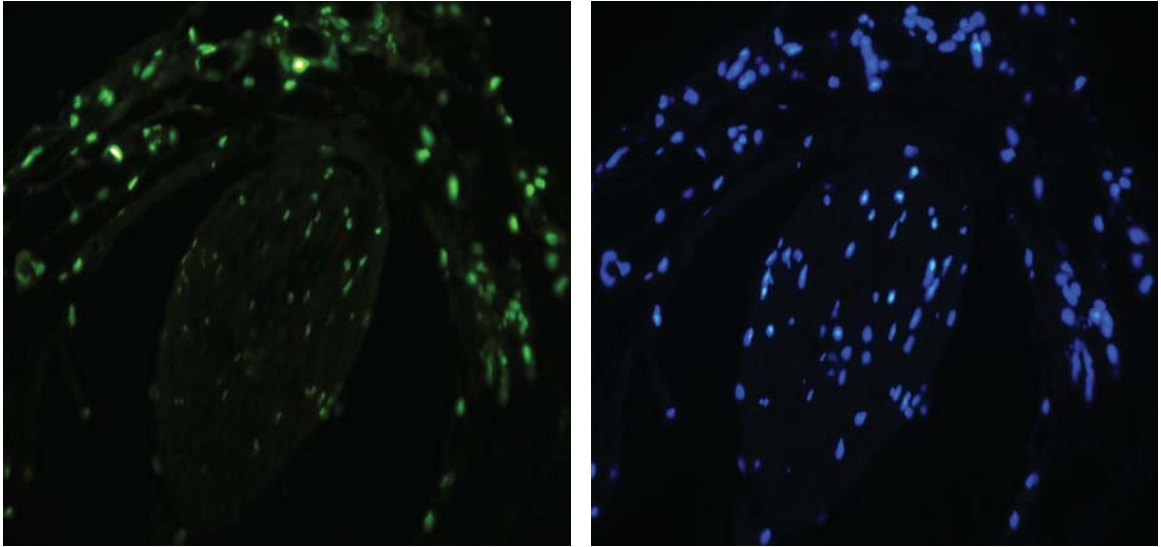


**Şekil 4.16.** Kontrol grubu siyatik sinir hücrelerinde yoğun miktarda apoptoz izlendi. Apoptotik hücelere ait çekirdekler TUNEL boyama ile yeşil, karşılık gelen bütün hücre çekirdekleri mavi renkte görünüm sergiledi (40 x).

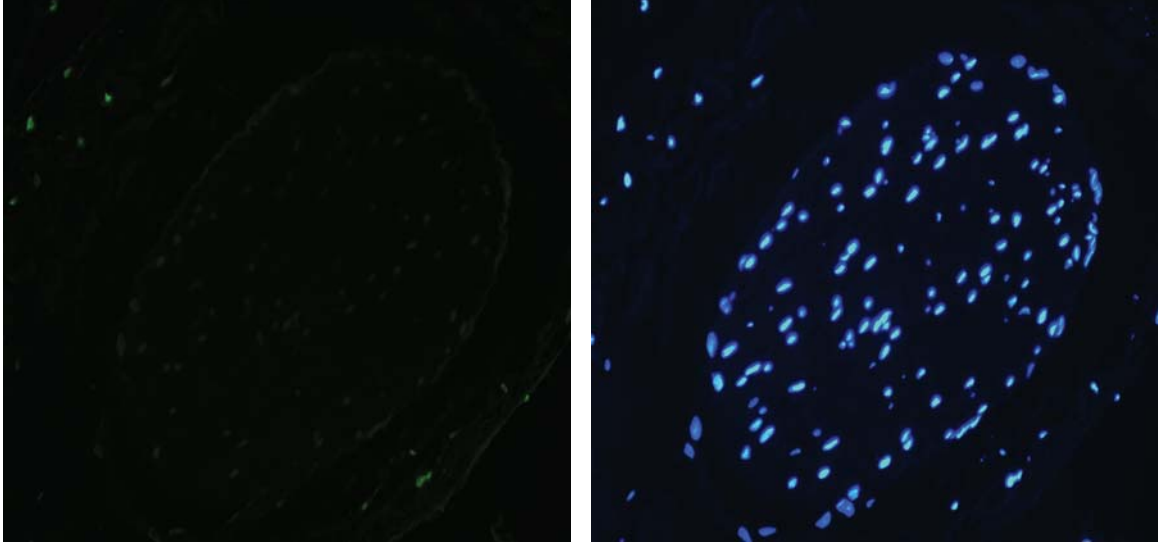




**Şekil 4.17.** I-10 grubu siyatik sinir hücrelerinde kontrol grubuna göre daha az apoptoz izlendi. Apoptotik hücelere ait çekirdekler TUNEL boyama ile yeşil, karşılık gelen bütün hücre çekirdekleri mavi renkte görünüm sergiledi (40 x).

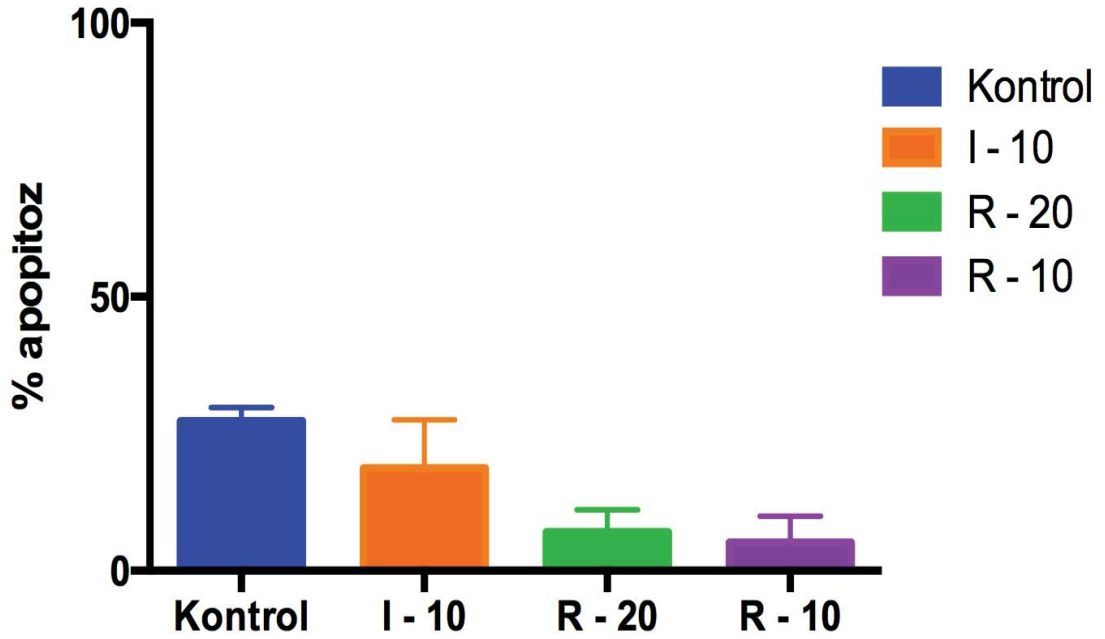


**Şekil 4.18.** R-20 grubu siyatik sinir hücelerinde az miktarda apoptoz izlendi. Apoptotik hücelere ait çekirdekler TUNEL boyama ile yeşil, karşılık gelen bütün hücre çekirdekleri mavi renkte görünüm sergiledi (40 x).



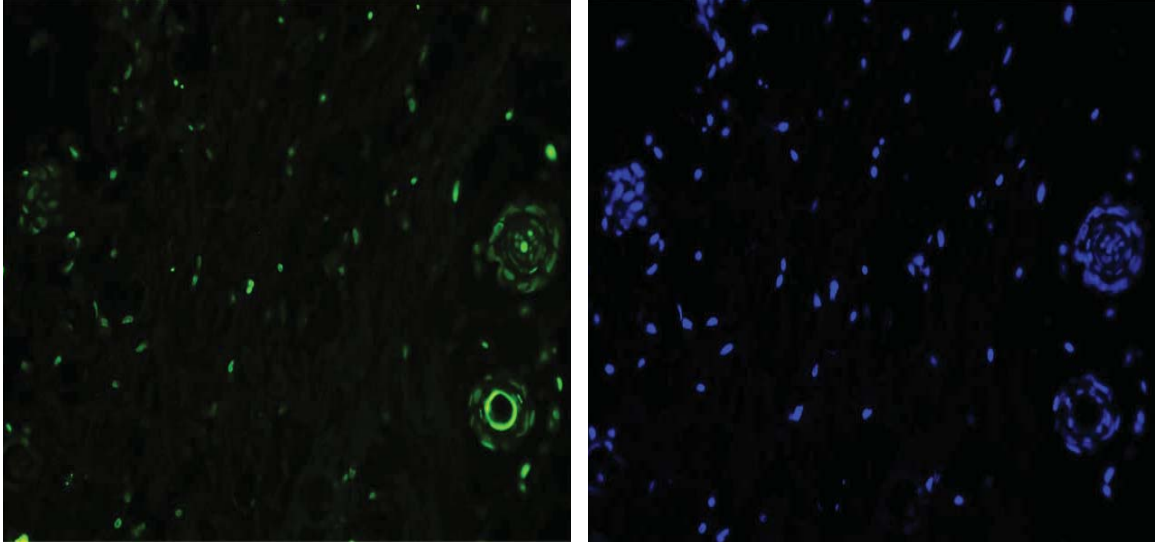
**Şekil 4.19.** R-10 Grubu siyatik sinir hücrelerinde az miktarda apoptoz izlendi. Apoptotik hücelere ait çekirdekler TUNEL boyama ile yeşil, karşılık gelen bütün hücre çekirdekleri mavi renkte görünüm sergiledi (40 x).

**Tablo 4.5.** Siyatik Sinir Hücrelerinde Apoptoz İndeks Değerlerinin Karşılaştırmalı Dağılımı Reperfüzyondan önce C1 INH uygulanan gruplarda (R-20 ve R-10) apoptotik hücre sayısında anlamlı azalma izlendi ( $p=0,041$ ).



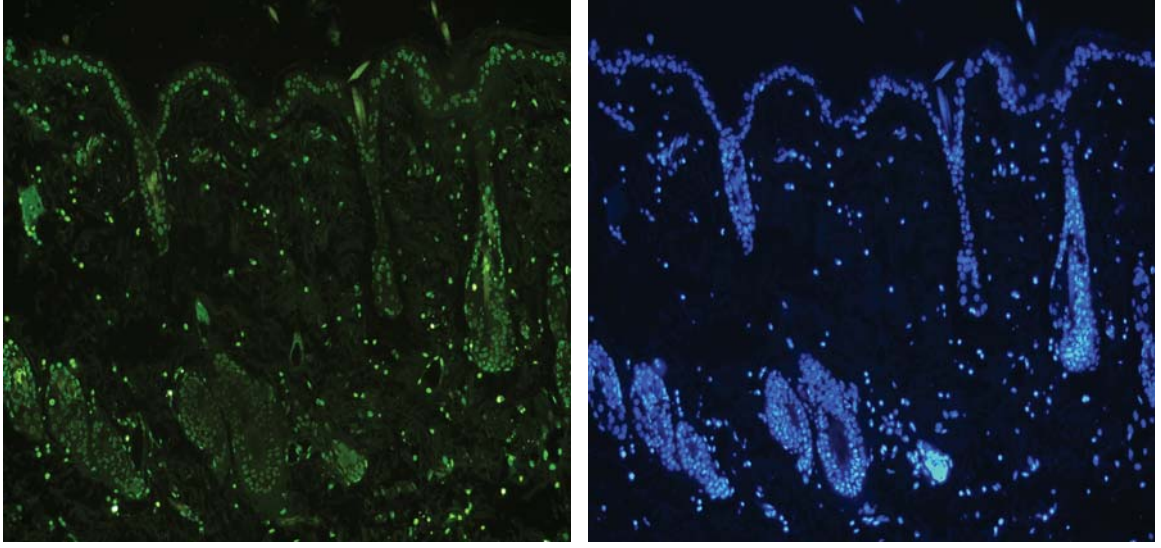
#### 4.2.4 Deri

C1 INH uygulanan deney gruplarının hepsinde apopitotik hücre sayıları kontrol grubuyla benzerdi. Gruplar arasında apopitotik hücre sayısı açısından anlamlı fark izlenmedi ( $p=0,247$ ).



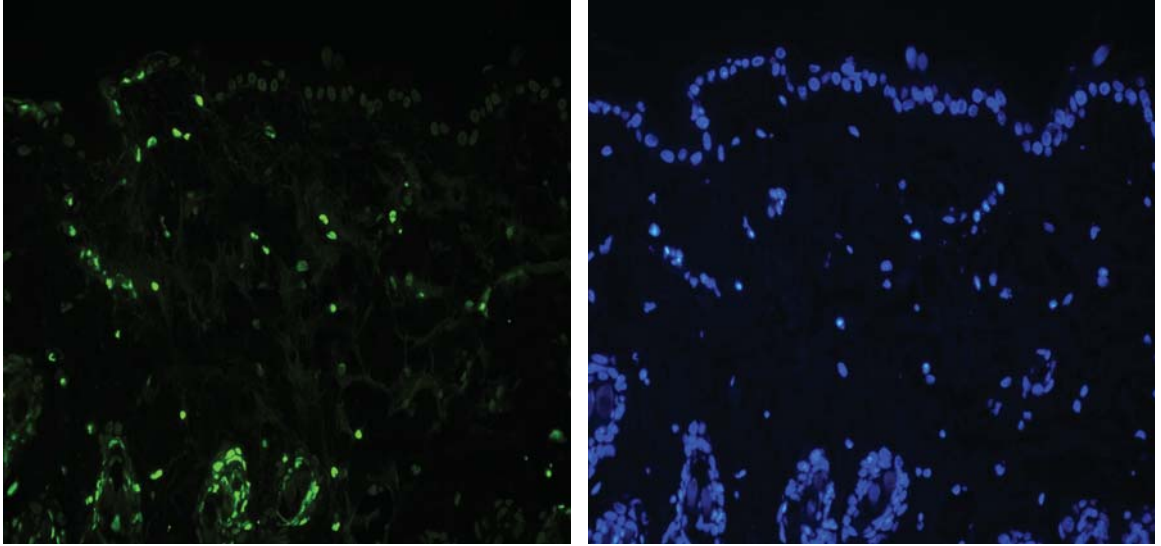
**Şekil 4.20.** Kontrol Grubu Deri Hücrelerinde TUNEL İşaretleme (40 x)

Apoptotik hücrelere ait çekirdekler TUNEL boyama ile yeşil, karşılık gelen bütün hücre çekirdekleri mavi renkte görünüm sergiledi.



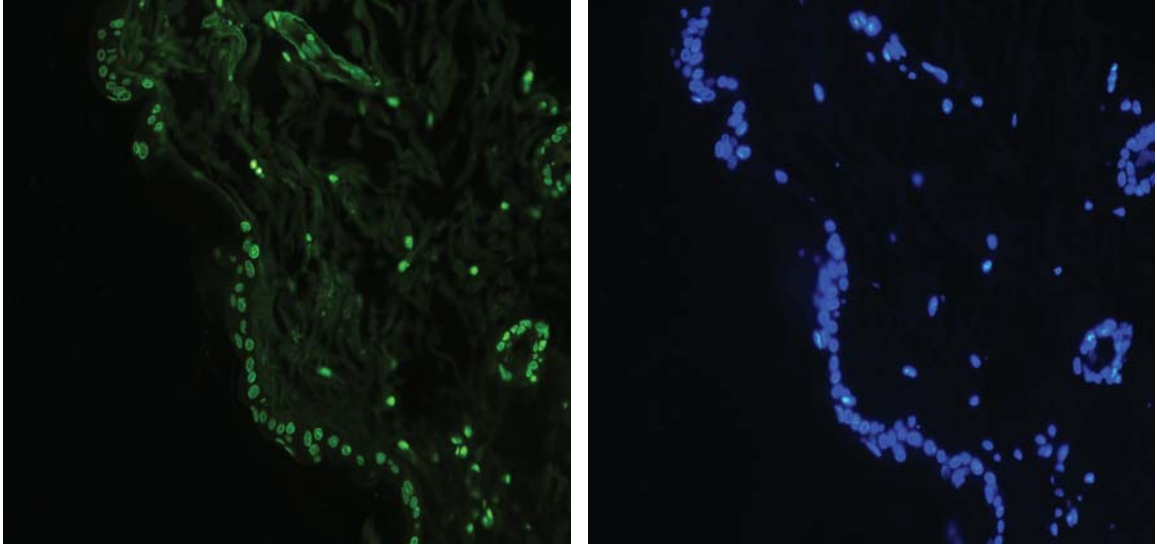
**ŞEKİL 4.21** I-10 Grubu Deri Hücrelerinde TUNEL İşaretlemeleri (20 x)

Apopitotik hücelere ait çekirdekler TUNEL boyama ile yeşil, karşılık gelen bütün hücre çekirdekleri mavi renkte görünüm sergiledi.



**Şekil 4.22.** R-20 Grubu Deri Hücrelerinde TUNEL İşaretlemeleri (40 x)

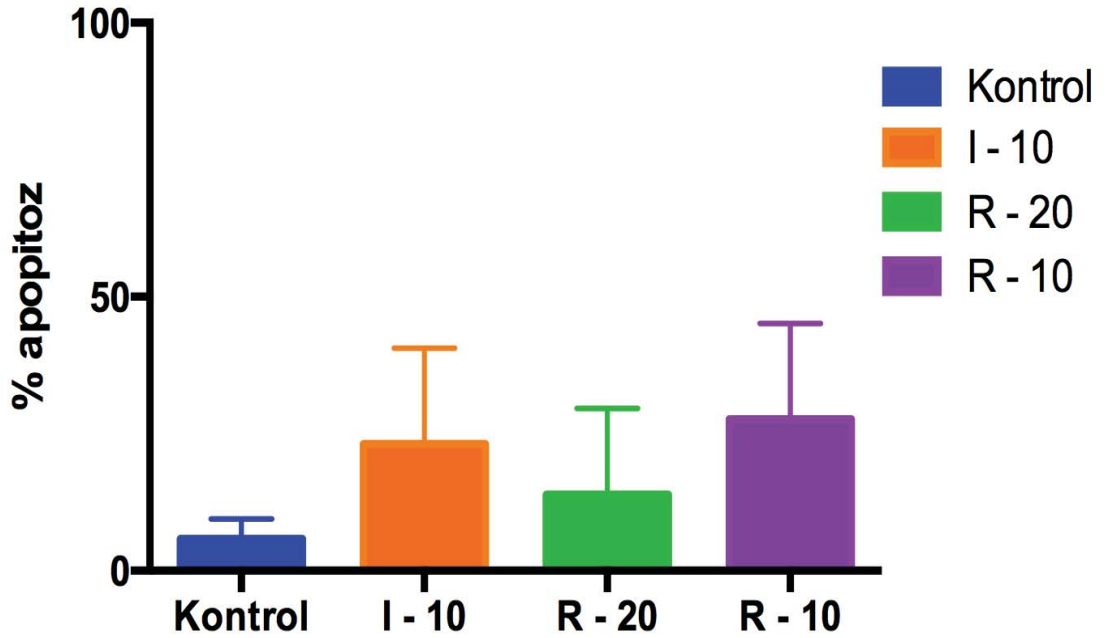
Apopitotik hücelere ait çekirdekler TUNEL boyama ile yeşil, karşılık gelen bütün hücre çekirdekleri mavi renkte görünüm sergiledi.



**Şekil 4.23.** R-10 Grubu Deri Hücrelerinde TUNEL İşaretlemeleri (40 x)  
Apoptotik hücelere ait çekirdekler TUNEL boyama ile yeşil, karşılık gelen bütün hücre çekirdekleri mavi renkte görünüm sergiledi.

**Tablo 4.6.** Deride Apoptoz İndeks Değerlerinin Karşılaştırmalı Dağılımı

Gruplar arasında apoptotik hücre sayısı açısından anlamlı fark izlenmedi ( $p=0,247$ ).

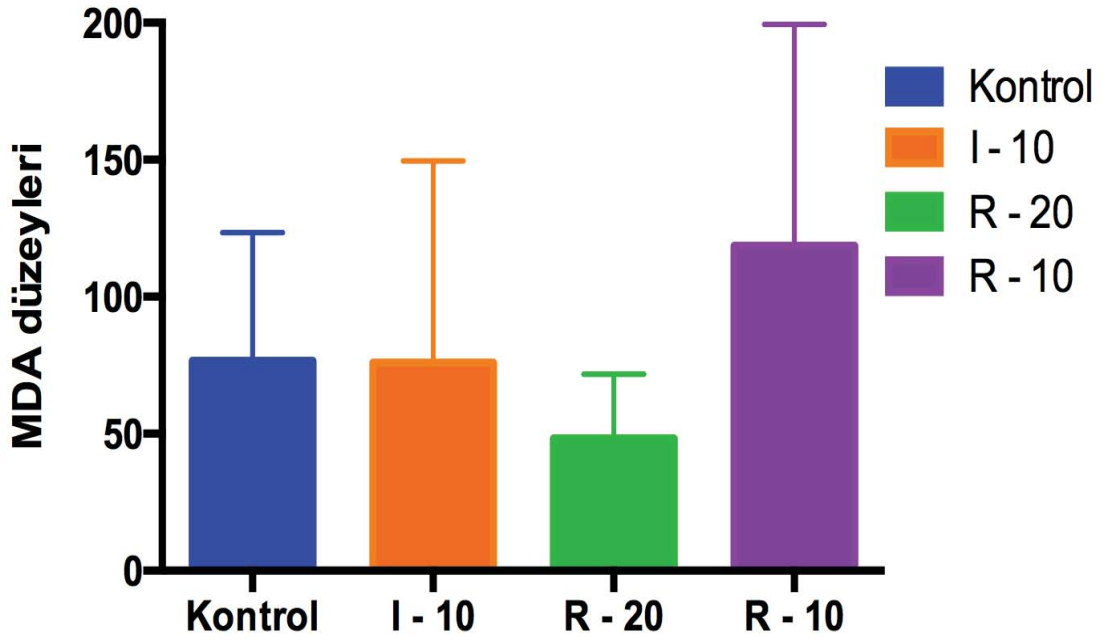


### 4.3 DOKU MALONDİALDEHİT (MDA) DÜZEYLERİ

Lipit peroksidasyonu son ürünü olan MDA düzeyleri kontrol ve deney grupları arasında karşılaştırıldığında femoral arter, gastroknemius kası, siyatik sinir ve deride anlamlı azalma görülmemiştir.

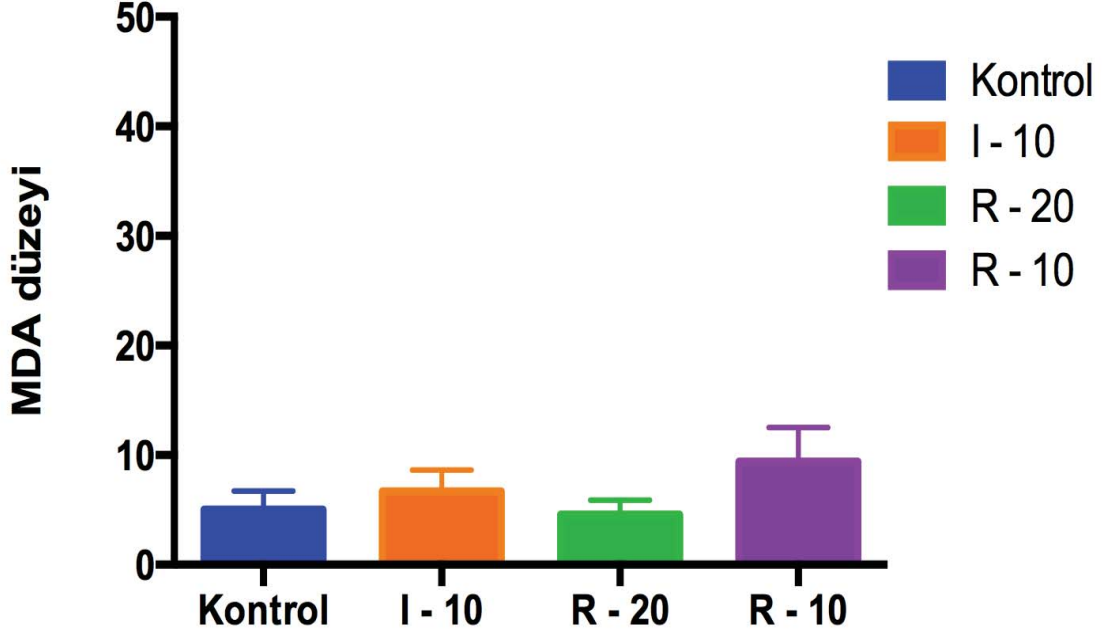
**Tablo 4.7.** Femoral Arter MDA Düzeylerinin Karşılaştırmalı Dağılımı

Kontrol ve deney grupları arasında MDA düzeyleri açısından anlamlı fark izlenmedi ( $p=0,679$ ).



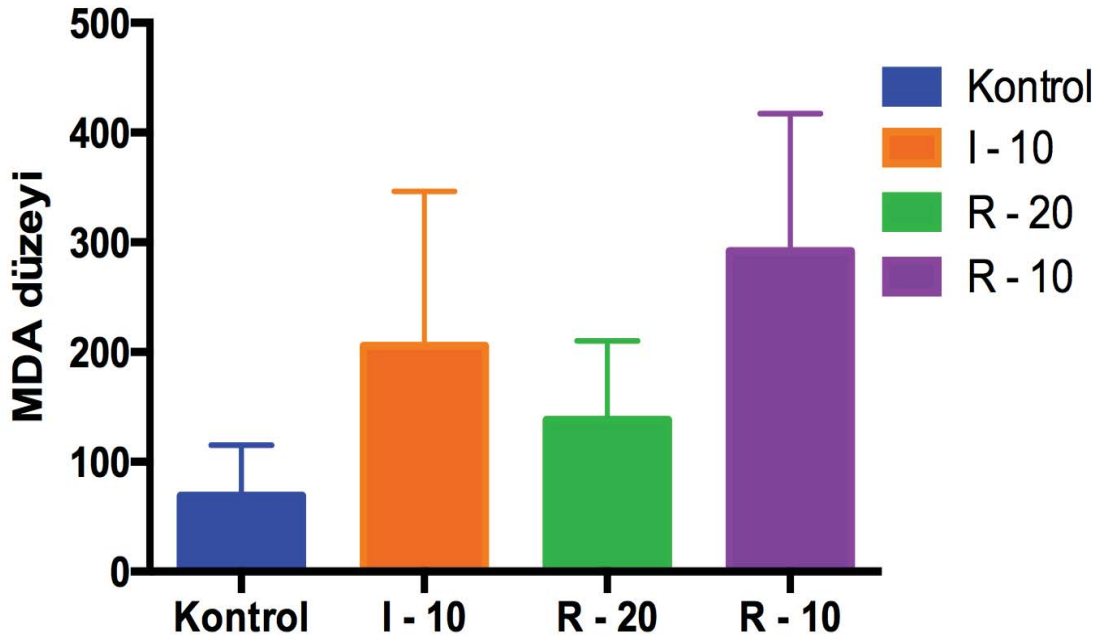
**Tablo 4.8.** Gastroknemius Kası MDA Düzeylerinin Karşılaştırmalı Dağılımı

Kontrol ve deney grupları arasında MDA düzeyleri açısından anlamlı fark izlenmedi ( $p=0,129$ ).



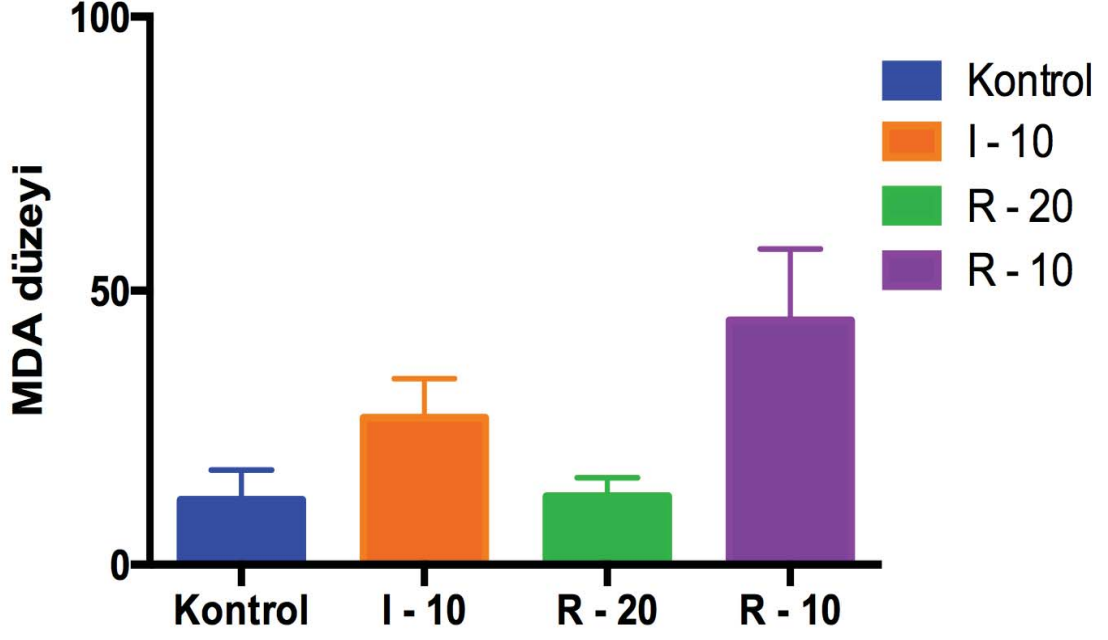
**Tablo 4.9.** Siyatik Sinir MDA Düzeylerinin Karşılaştırmalı Dağılımı

Kontrol ve deney grupları arasında MDA düzeyleri açısından anlamlı fark izlenmedi ( $p=0,092$ ).





**Tablo 4.10.** Deri MDA Düzeylerinin Karşılaştırmalı Dağılımı  
Kontrol ve deney grupları arasında MDA düzeyleri açısından anlamlı azalma izlenmedi ( $p=0,030$ ).





## 5 TARTIŞMA

Normal koşullarda, hücreler biyokimyasal işlemlerini dengeleyerek yaşamlarını düzenler. Herhangi bir sebeple iskemi ve ardından reperfüzyona etken kalan hücrelerdeki savunma işlevleri yetersiz kalır. Kan akımındaki azalma, etkilenen dokularda moleküler ve yapısal değişikliklere yol açar. Ardından reperfüzyon ise kompleks bir inflamatuvar yanıtı tetikler (16, 41). Bu inflamatuvar yanıt doku/organ duyarlılığında artışa ve sonuçta hücre yıkımına neden olur. Bu yıkıma neden olan faktörler; endotel hücre yaralanması, lökosit migrasyon ve aktivasyonu, serbest oksijen radikalleri, mikrosirkülasyondaki düzensizlikler, kompleman ve koagülasyon sistemlerinin aktivasyonu olarak özetlenebilir (15, 27). Ayrıca I/R yaralanmasına etken kalmış ekstremitelere sıklıkla karaciğer, akciğer, böbrek ve ince bağırsağı da etkileyen uzak organ hasarı eşlik eder. Bu uzak organ hasarından da sistemik inflamatuvar yanıt sorumludur (16, 42). Tüm bu birbiri ile ilişkili olayların karmaşıklığı aslında iskemi ve reperfüzyona bağlı yıkımı engelleyecek tek bir ilaç bulmanın ne kadar zor olduğunu göstermektedir.

Gouverneur ve ark. hemostaz durumunda, kan damarlarının iç yüzeyini döşeyen endotelin antikoagülan ve antiinflamatuvar bir ortam sağladığını göstermiştir (43). Mulivor ve Rehm ise bu dengenin sıkı bir ağ yapısına sahip negatif yüklü proteoglikanların oluşturduğu glikokaliks ile sürdürüldüğünü bildirmiştir. Ancak iskemi durumunda ilk olarak kapiller endotel hücreleri etkilenir ve glikokaliks kısmi olarak zarar görür (44, 45). Mulivor ve ark. bu yaralanmanın antiinflamatuvar ve antikoagülan durumu proinflamatuvar ve prokoagülatuar bir sürece dönüştürdüğünü ve lökositlerin endotel ile etkileşimlerinin kolaylaştığını göstermiştir (46).

Doku iskemisi sonrası trombositler, endotel hücreleri ve lökositlerden salınan kemotaktik sinyaller; lökosit aktivasyonu, kemotaksis ve lökosit-endotel hücre adhezyonuna yol açar (24). Dolaşımda serbest dolaşan nötrofiller aktive olduklarında, iskemik doku endoteline yapışarak interstisyel alana geçer.

PMNL'ler, sitotoksik enzimler ve serbest oksijen radikalleri üretir. Ayrıca salgıladıkları sitokinlerle ortama daha çok lökosit çeker (15). Breda ve ark. lökositten yoksun hayvanlarda yaptıkları çalışmalarda reperfüzyona bağlı yıkımda ciddi azalma olduğunu göstermişlerdir (47).

Serbest oksijen radikalleri reperfüzyona bağlı yıkımın ilerlemesinde önemli rol oynar (28). Wang ve ark. arter duvarında yaptıkları çalışmada süperoksit üretiminin reperfüzyonun ilk 5 dakikasında pik yaptığını ve reperfüzyondan 60 dakika sonra süperoksit üretiminin tekrar bazal düzeye düştüğünü göstermiştir (48). Arato ve ark. da alt ekstremitte revaskülarizasyonu sonrası erken reperfüzyon döneminde SOR'lerinin ciddi olarak arttığını bildirmiştir (49). SOR'leri potent oksitleyici ve redükte edici ajanlar oldukları için lipit peroksidasyonu ile direkt hücre membranına zarar verirler (28, 30). Ayrıca eikozanoidlerin üretimini tetikleyerek lökosit aktivasyonu ve kemotaksisini sağlarlar (30).

Hipoksik endotelde biriken antikorlar ve doku reperfüzyonuyla beraber nekrotik dokulardan salınan intrasellüler bileşenler kompleman sistem aktivasyonuna yol açar (31). Aktive olan kompleman sistemi potent anafilotoksinlerin üretimi ile hücre yüzeyinde porlar oluşturur ve sonuçta hücrenin lizisine neden olur (20). Doğal antikorlar kompleman sistemini C1q ile klasik yoldan ya da MBL'e bağlanarak lektin yolundan aktive eder (1, 2). Gastrointestinal sistem ve iskelet kası çalışmaları, iskemik dokuda klasik yol aktivasyonuna yol açan Ig M için özgün bağlanma bölgeleri olduğunu göstermiştir (3, 50). Ancak I/R'daki kompleman aktivasyonundan Ig M, MBL veya C1q'nun mu sorumlu olduğu halen tartışmalıdır. Son yapılan çalışmalar Ig M'in öncelikle iskemik dokuda oluşan neo-epitopa sonrasında da MBL'e bağlanarak kompleman sistem aktivasyonuna yol açtığını düşündürmektedir (51, 52). I/R yaralanmasında doğal antikorların ve kompleman sisteminin rolü iyi anlaşılmış olmasına rağmen Duehrkop ve ark. koagülasyon ve kinin sisteminin de oluşan yıkımda eşit öneme sahip olduğunu göstermiştir (3, 53).

Kompleman sistem inhibisyonu için hem tüm sistemi baskılayan hem de spesifik yolların komponentlerini inhibe eden birçok ilaç denenmiştir. Ancak çok az anti-kompleman tedavi klinik kullanım için onay almıştır. İlk çalışmalarda kobra venom faktörü kompleman etkisini azaltmak için kullanılmış fakat immünojenik yanıt oluşturmamasından dolayı klinik uygulamaya girememiştir. Spesifik kompleman inhibisyonu için de kompleman reseptör tip 1 (sCRI) kullanılmıştır. Birçok çalışmada etkili olduğu gösterilse de klinik uygulamada beklentiyi karşılayamamıştır (31).

C1 INH, serin proteaz inhibitör ailesinden olup kompleman sisteminde C1r, C1s ve MASP2'yi; koagülasyon sisteminde kallikrein, Faktör 11 ve 12'yi; fibrinolitik sistemde tPA ve plazmini inhibe ederek etki eder (40). Dolayısıyla sadece kompleman sistemi üzerinde değil aynı zamanda koagülasyon ve kinin sistemlerinde de etki etmektedir. C1 INH kompleman klasik yolundaki inhibitör etkisini; intakt C1'in proenzimatik C1r ve C1s'ine reversible olarak bağlanması sonucu otoaktivasyonunu önleyerek ya da aktive C1r ve C1s bağlanması ile C1q'dan ayırarak gösterir (4). Purifiye insan C1 INH'ü yıllardır herediter anjioödem için kullanılmaktadır (40).

Literatür taramalarında C1 INH'nün I/R yaralanması üzerine olan etkisi ile ilgili çalışmalar kısıtlıdır. Yapılan deneysel çalışmalarda C1 INH'nün farklı dokularda olumlu etkileri gösterilmiştir. C1 INH'nün bu olumlu etkileri Tablo 5.1.'de çalışmamızdaki bulgularla karşılaştırmalı olarak özetlenmiştir. Buerke ve ark. miyokardiyal I/R çalışmalarında nekroz alanında ve nötrofil infiltrasyonunda azalma, kardiyak kontraktilitede artış gözlemlenmiştir (7, 54). Horstick ve ark. domuzlarda, Lu ve ark. ise ratlarda yaptıkları çalışmalarda C1 INH'nün plazma keratin kinaz ve troponin T düzeylerinde düşüşe neden olduğunu ve önceki çalışmalara benzer kardiyoprotektif etkilerini saptamışlardır (8, 10, 55). İskelet kası çalışmalarında da kreatin kinaz düzeylerinde düşme, kas kontraktilitesinde artış, apoptozda ve lokal ödemde azalma olması C1 INH'nün yıkımın azaltılmasındaki olumlu etkilerini göstermiştir (56-58). Elde edilen bu başarılı sonuçlar nedeniyle de miyokard infarktüsü ve sepsis gibi çeşitli hastalıkların insanlar üzerindeki çalışmalarına başlanmıştır (6-10).

**Tablo 5.1.** C1 INH'nün Farklı Dokulardaki Etkisinin Literatürle Karşılaştırmalı Değerlendirilmesi  
 İv: intravenöz, İ/10: iskemiden 10 dakika önce, R/20: reperfüzyondan 20 dakika önce,  
 R/10: reperfüzyondan 10 dakika önce, İ: iskemi, R: reperfüzyon

DOKU	C1 INH	ETKİSİ	YAYIN
<b>Kalp Kası</b> (kedi)	15 mg/kg iv R - 10 dak önce	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Endotel hasarında</li> <li>• Nötrofil infiltrasyonunda</li> <li>• Nekroz alanında</li> <li>• Kardiyak kontraktilitede</li> </ul>	Buerke (7) 1995
<b>Kalp Kası</b> (rat)	10-50-100 IU/kg iv R - 2 dak önce	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Nötrofil infiltrasyonunda</li> <li>• Nekroz alanında</li> </ul>	Buerke (54) 1998
<b>Kalp Kası</b> (domuz)	20 IU/kg intrakardiyak R beraber 5 dak	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Nekroz alanında</li> <li>• Plazma kreatin kinaz</li> <li>• Plazma troponin T</li> <li>• Kardiyak kontraktilitede</li> </ul>	Horstick (8) 1997
<b>Kalp Kası</b> (domuz)	40-100-200 IU/kg iv R - 5-10 dak önce	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Nekroz alanında</li> <li>• Plazma kreatin kinaz</li> <li>• Plazma troponin T</li> </ul> <hr/> <ul style="list-style-type: none"> <li>✓ 100 IU → yararlı etki yok</li> <li>✓ 200 IU → yan etki + koagülasyon problemleri</li> </ul>	Horstick (10) 2001
<b>Kalp Kası</b> (rat)	40 IU/kg iv iskemiden önce	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Endotel hücre apoptozunda</li> <li>• Nötrofil infiltrasyonunda</li> <li>• Nekroz alanında</li> <li>• Kardiyak fonksiyonlarda</li> </ul>	Fu (59) 2006

**Tablo 5.1.(devam)** C1 INH'nün Farklı Dokulardaki Etkisinin Literatürle Karşılaştırmalı Değerlendirilmesi İv: intravenöz, İ/10: iskemiden 10 dakika önce, R/20: reperfüzyondan 20 dakika önce, R/10: reperfüzyondan 10 dakika önce, İ: iskemi, R: reperfüzyon

DOKU	C1 INH	ETKİSİ	YAYIN
<b>Kalp Kası</b> (fare)	0.4 IU/gr iv R - 5 dak önce	<ul style="list-style-type: none"> <li>Nötrofil birikiminde</li> <li>Nekroz alanında</li> <li>Plazma troponin I</li> </ul>	Lu (55) 2013
<b>İskelet Kası</b> (fare)	1000 IU/kg intraperitoneal iskemiden önce	<ul style="list-style-type: none"> <li>Plazma kreatin kinaz</li> </ul>	Nielsen (56) 2002
<b>İskelet Kası</b> (rat)	100 IU/kg iv R - 10 dak önce	<ul style="list-style-type: none"> <li>Kas kontraktilesinde</li> </ul>	Toomayan (57) 2003
<b>İskelet Kası</b> (rat)	50 IU/kg iv iskemiden önce	<ul style="list-style-type: none"> <li>Apopitozda</li> <li>Lokal ödem</li> <li>Kas yaşayabilirliği</li> </ul>	Duehrkop (58) 2013
<b>Karaciğer</b> (rat)	100 IU/kg iv R - 1 dak önce	<ul style="list-style-type: none"> <li>Lökositlerin endotele yapışmasında</li> <li>Endotel hasarında</li> <li>Plazma AST, ALT</li> </ul>	Lehmann (60) 2000
<b>Karaciğer</b> (rat)	100-200-400 U/kg iv İ - 5 dak önce R - 5 dak önce	<p><u>Preiskemik grupta;</u></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>Plazma ALT</li> <li>Safra sekresyonunda</li> </ul>	Heijnen (61) 2006
<b>Beyin</b> (rat)	50 IU/kg iv R - hemen önce	<ul style="list-style-type: none"> <li>Nötrofil infiltrasyonunda</li> <li>Nekroz alanında</li> </ul>	Akita (62) 2003

**Tablo 5.1. (devam)** C1 INH'nün Farklı Dokulardaki Etkisinin Literatürle Karşılaştırmalı Değerlendirilmesi İv: intravenöz, I/10: iskemiden 10 dakika önce, R/20: reperfüzyondan 20 dakika önce, R/10: reperfüzyondan 10 dakika önce, I: iskemi, R: reperfüzyon

DOKU	C1 INH	ETKİSİ	YAYIN
<b>Beyin</b> (fare)	15 IU iv İ - 5 dak sonra	<ul style="list-style-type: none"> <li>Nekroz alanında</li> <li>Nörolojik defisitte</li> </ul>	De Simoni (63) 2003
<b>Beyin</b> (fare)	15 Ü iv iskemi başında	<ul style="list-style-type: none"> <li>Proinflamatuvar sitokin gen ekspresyonunda</li> <li>Apoptozda</li> </ul>	Storini (64) 2005
<b>Beyin</b> (fare/rat)	7,5-15 IU (fare) 20 IU/kg (rat) iv iskemi sonrası	<ul style="list-style-type: none"> <li>Inflamasyonda</li> <li>Nekroz alanında</li> </ul>	Heydnreih (65) 2012
<b>İncebarsak</b> (rat)	100-200 IU/kg iv R - hemen önce	<ul style="list-style-type: none"> <li>Mikrosirkulatuar perfüzyonu koruma</li> <li>Lökositlerin endotele yapışmasında</li> <li>Metabolik asidoz</li> </ul>	Lauterbach (66) 2007
<b>Böbrek</b> (domuz)	500 IU/kg iv R - 5 dak önce	<ul style="list-style-type: none"> <li>Tübüler epitel hücre apoptozunda</li> <li>Tübüler hasarda</li> </ul>	Castellano (67) 2010
<b>Damar</b> <b>İskelet Kası</b> <b>Periferik Sinir</b> (rat)	100 IU/kg intraperitoneal I - 10 dak önce R - 20 dak önce R - 10 dak önce	<p><u>R/20 ve R/10 gruplarında;</u></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>Apoptozda</li> <li>Kas dejeneratif bulgularında</li> </ul>	Turaçlı Karagüven ve ark

Lehmann ve Heijnen rat karaciğer I/R çalışmalarında C1 INH uygulamaları ile karaciğer fonksiyonlarında düzelme ve endotel hasarında azalma olduğunu saptamıştır (60, 61). Akita ve ark. serebral I/R'da C1 INH'nün inflamasyonu azalttığını ve nekroz alanında azalmaya yol açtığını göstermiştir (62). Daha sonraki çalışmalarda da benzer nöroprotektif etkiler izlenmiştir (63-65). C1 INH'nün başarılı sonuçları ince barsak ve böbrek I/R modellerinde de gösterilmiştir (66, 67). Ancak periferik sinir ve cilt I/R hasarı üzerine etkileri daha önce hiç araştırılmamıştır. Çalışmamızda rat periferik I/R modelinde C1 INH'nün aynı ekstremitedeki damar endoteli, iskelet kası, periferik sinir ve ciltteki lokal doku yıkımına etkilerini inceledik. Dokularda dejeneratif histoloji bulgularını, apoptoz oranlarını ve MDA düzeylerini değerlendirdik.

İskemi / reperfüzyon çalışmalarında, reperfüzyonla beraber hücrelerde SOR'nin önemli derecede arttığı gösterilmiştir (48, 49). Artan SOR'nin en önemli hedef yapılarından biri lipitlerdir. Dokuda lipit peroksidasyonunun göstergesi olarak en sık kullanılan belirteç MDA seviyesinin ölçülmesidir. MDA seviyesindeki yükselme, lipit peroksidasyonunun yüksek olduğunu ve dolayısıyla hücre yıkımını göstermektedir (38, 39). Çalışmamızda damar endoteli, iskelet kası, periferik sinir ve deride MDA enzim aktivitesi açısından gruplar arasında anlamlı fark bulunmamıştır. Literatürde C1 INH uygulaması sonrası dokulardaki MDA düzeylerini karşılaştıran bir çalışmaya rastlanmamıştır. Bu nedenle çalışmamız C1 INH'nün oksidatif yıkıma etkisini gösteren ilk çalışmadır. Fakat elde edilen veriler damar endotelinde, iskelet kasında, periferik sinirde ve deride oksidatif yıkımı azaltmada etkisinin olmadığını göstermektedir.

Çalışmamızda ratlardan alınan dokularla hazırlanan preparatlar ışık mikroskobu altında incelendi. Tüm gruplarda damar endotel hücrelerinde belirgin hidropik dejenerasyonlar izlendi. Kas dokusu değerlendirmelerinde histopatolojik skorlama yapıldı. Skorlamada kesitlerde enine çizgilenme kayıpları, hücre çekirdeğinin merkeze göçü, kas liflerinde ayrılma, intersellüler-interfasiküler ödem ve inflamatuvar hücre sayısı değerlendirildi. Dejeneratif histoloji skorları en yüksek kontrol grubunda çıktı. I-10, R-20 ve R-10 grupları kontrol grubu ile karşılaştırıldığında histoloji skorlarında azalma olmasına karşın aradaki fark

istatistiksel olarak anlamlı bulunmadı. Fakat incelemelerde özellikle R-20 ve R-10 gruplarında inflamasyon bulgularının azalması iskelet kas dokusunda C1 INH'nün antiinflamatuvar etkisi olduğunu düşündürdü. Siyatik sinir histopatolojik incelemelerinde; kontrol grubunda miyelin kılıfta şişme, belirgin vakuolizasyon ve yoğun mast hücre degranülasyonu izlenmesine rağmen özellikle R-10 grubunda daha az miyelin kılıfta şişme, vakuolizasyon ve mast hücre degranülasyonu izlenmesi, C1 INH'nün olumlu etkisi olarak yorumlandı. Deride gruplar arasında belirgin bir değişiklik gözlenmedi. İnceleme sırasında preparatlarda seyrek nekroz alanları görüldü.

Son yıllarda yapılan çalışmalar, bilinenin aksine nekrozun iskemi ve reperfüzyon sonucu oluşan hücre ölümünden tek başına sorumlu olmadığını ve hücreyi ölüme götüren süreçte ilk olarak apoptozun rol oynadığını göstermiştir (68, 69). Wang ve ark. rat grasilis kasında uzamış iskemi sonrası reperfüzyonun sadece nekroza neden olmadığını aynı zamanda apoptozu da hızlandırıldığını bildirmiştir (70). Bir başka çalışmada I/R'nun iskelet kasında neden olduğu apoptoz ve nekrozdan, asıl sorumlu olanın kan damarlarını döşeyen endotel hücreleri olduğu öne sürülmüştür (71).

Mitokondriyal disfonksiyon iskemi ve reperfüzyona bağlı yıkımın önemli sonuçlarından biridir. Wang ve ark. reperfüzyonun membran potansiyelinde depolarizasyona yol açtığını ve dış mitokondriyal membran rüptürüne bağlı sitokrom c'nin sitozolik kompartmana salınmasının hücre apoptozunu aktive ettiğini bildirmiştir (72). Apoptozu değerlendirmek için birçok histokimyasal tetkik vardır. TUNEL bu yöntemlerden birisidir ve enzimatik olarak in-situ DNA fragmentasyonunun tespitine olanak sağlar. Fu ve ark. rat miyokard kasında, Duehrkop ve ark. ise rat iskelet kasında iskemiden önce verilen C1 INH'nün anti-apoptotik etkisini TUNEL yöntemiyle göstermişlerdir (71, 74). Ayrıca domuz böbrek tübüler epitel hücresinde ve rat beyin dokusunda da C1 INH'nün apoptozu azalttığı bildirilmiştir (64, 67).



Çalışmamızda C1 INH verilen gruplarda damar, iskelet kası ve periferik sinirde daha az apoptoz izlendi. Apoptoz indeksleri deney grupları arasında karşılaştırıldığında; C1 INH'nün reperfüzyondan önce uygulandığında hücre ölümünde ciddi azalmaya yol açtığı görüldü. Bu sonuç ilacın apoptoz üzerine olumlu etkisini göstermektedir. Elde ettiğimiz veriler Fu ve arkadaşlarının C1 INH'nün etkisini serin proteaz inhibitör aktivitesinden bağımsız direkt anti-apoptotik aktivite ile gösterdikleri çalışmayı desteklemektedir. Bu çalışmada akut miyokard infarktüsü geçiren ratlarda C1 INH'nün anti-apoptotik etkisini; Bcl-2/Bax protein salınım oranını normale getirerek sitokrom c translokasyonunu, caspase-3 ve sitokrom c bağımlı caspase-9 aktivasyonunu inhibe ederek direkt anti-apoptotik aktivite ile yaptığı gösterilmiştir (59). Dolayısıyla bu direkt anti-apoptotik etki C1 INH'nün çalışmamızdaki MDA düzeylerine ve oksidatif yıkım üzerine etkilerinde anlamlı fark olmamasını da açıklamaktadır.

C1 INH'nün etkin dozu tam olarak bilinmemektedir. Çalışmamızda diğer çalışmalara benzer olarak 100 IU/kg C1 INH uygulanmıştır (Tablo 5.1.). Ancak uygulama kolaylığı nedeniyle intraperitoneal yol seçilmiştir. Ratlarda 100 IU/kg iv. uygulanan çalışmalarda; Buerke ve ark. miyokardiyal I/R hasarının azaldığını, Toomayan ve ark. iskelet kasında kontraktıl fonksiyonlarda artış olduğunu, Lehmann ve Lauterbach ise lökositlerin endotele yapışmasında azalma olduğunu göstermişlerdir. Oysa ki Horstick ve arkadaşlarının domuzlar üzerindeki çalışmalarında düşük doz (20-40 IU/kg) C1 INH uygulamaları kardiyoprotektif etkiler gösterirken yüksek doz (200 IU/kg) uygulamalar önemli yan etkilere ve koagülasyon problemlerine yol açmıştır (8, 10). Tersine Nielsen ve ark. farelerde 1000 IU/kg i.p C1 INH uygulamalarına karşın yan etki izlememiştir (56). Klinik uygulamalarda ise Horstick ve ark. kalp cerrahisi geçiren yenidoğan bebeklere 500 IU/kg C1 INH uygulamışlar ve önemli ven trombozlarıyla karşılaşmışlardır (10). En başarılı klinik etkiyi ise De Zwann ve ark. akut miyokard enfarktüslü hastalarda 50-100 IU/kg başlangıç dozunu izleyen 48 saatlik 1.25-2 IU/kg/saat iv. infüzyon ile sağlamıştır (73). Her ne kadar türler, çalışma modelleri ve C1 INH uygulanış yoluna bağlı farklılıklar olsa da optimal C1 INH dozu ve verilış yolunun belirlenmesi için farklı çalışmalara gereksinim vardır.

## 6 SONUÇLAR

İskemi ve reperfüzyona etken kalmış ekstremitelerde C1 esteraz inhibitörünün apoptoz ve oksidatif yıkım üzerine olan rolünü ve tedavideki etkisini araştırdığımız çalışmamızdan elde edilen sonuçlar şunlardır:

- ✓ C1 INH'nün; nötrofillerin sebep olduğu lipit peroksidasyonu ve bunun sonucunda oluşan **oksidatif yıkımı engellemediği görülmüştür.**
- ✓ C1 INH'nün; deride hem oksidatif yıkımın azaltılmasında hem de apoptotik hücre ölümünün baskılanmasında etkisi olmamıştır.
- ✓ Ekstremitte I/R hasarında temel hücre ölüm yolunun sadece nekroz olmadığı, apoptozun da hasar oluşumunda çok önemli rolü olduğu gösterilmiştir.
- ✓ İskemik hasar oluştuktan sonra **reperfüzyon öncesi** C1 INH'ü uygulaması damar, iskelet kası ve periferik sinirde yıkımı anlamlı ölçüde azaltmıştır.
- ✓ İskelet kas dokusunda C1 INH'ü antiinflamatuvar etki göstermiştir.
- ✓ Özellikle reperfüzyondan önce C1 INH'ü uygulaması; damar, iskelet kası ve periferik sinirde **apoptotik hücre ölümünü belirgin baskılamıştır.**

Elde ettiğimiz bulgular C1 INH'nün, I/R'a karşı damar, iskelet kası ve periferik sinirdeki koruyucu etkisini serin proteaz inhibitör aktivitesinden bağımsız, direkt anti-apoptotik aktivite ile gösterdiğini desteklemektedir. İskemi ve reperfüzyona bağlı ekstremitte hasarının azaltılmasında C1 INH'nün etkili olduğu sonucuna varılmıştır. Her ne kadar türler, çalışma modelleri ve C1 INH uygulaması yoluna bağlı farklılıklar olsa da optimal C1 INH dozu ve veriliş yolunun belirlenmesi için farklı çalışmalara gereksinim vardır.

## 7 ÖZET

### C1 ESTERAZ İNHİBİTÖRÜ'NÜN EKSTREMİTEDE İSKEMİ / REPERFÜZYON HASARI ÜZERİNDEKİ ETKİSİ

**Giriş:** İskemi / reperfüzyona (I/R) bağlı doku yıkımı klinikte sıkça karşılaşılan, yüksek morbidite ve mortaliteyle seyreden bir durumdur. Kan akımındaki azalma etkilenen dokularda moleküler ve yapısal değişikliklere yol açar. Ardından reperfüzyon ise kompleks bir inflamatuvar yanıtı tetikler. Kompleman sisteminin bu inflamatuvar sürecin başlamasında önemli rol oynadığı düşünülmektedir. Çalışmamızda kompleman klasik yolunun majör inhibitörü olan C1 esteraz inhibitorünün (C1 INH) alt ekstremite I/R hasarında damar endoteli, iskelet kası, periferik sinir ve derideki lokal doku hasarını önlemedeki etkilerini araştırdık.

**Materyal ve Metod:** Yirmi dört adet Wistar-Albino rat rastgele ve eşit sayıda (n=6) dört gruba ayrıldı. Ratların sol alt ekstremitelerine turnike ile 3 saat iskemi ve ardından 3 saat reperfüzyon uygulandı. Kontrol grubunda sadece I/R hasarı gerçekleştirilirken deney gruplarına sırasıyla iskemiden 10 dakika önce (I-10), reperfüzyondan 20 dakika önce (R-20) veya reperfüzyondan 10 dakika önce (R-10) 100 IU/kg C1 INH intraperitoneal olarak verildi. Deney sonunda tüm ratlar sakrifiye edilerek femoral arter, gastroknemius kası, siyatik sinir ve deriden doku örnekleri alındı. Doku örneklerinde MDA düzeyleri ölçüldü, histopatolojik incelemeler yapıldı ve TUNEL testi ile immünfloresan mikroskopunda apoptotik hücre ölümü değerlendirildi.

**Bulgular:** Damar endoteli, iskelet kası, periferik sinir ve deride MDA enzim aktivitesi açısından gruplar arasında anlamlı fark bulunmadı. Tüm gruplarda damar endotel hücrelerinde hidropik dejenerasyonlar izlendi. Kontrol grubu ile I-10, R-20 ve R-10 grupları karşılaştırıldığında iskelet kası dejeneratif histoloji skorlarında azalma olmasına karşın aradaki fark istatistiksel olarak anlamlı

bulunmadı ( $p=0,061$ ). Femoral arter, gastroknemius kası ve siyatik sinirde reperfüzyondan önce C1 INH uygulanan gruplarda (R-20 ve R-10) apoptotik hücre sayısında istatistiksel olarak anlamlı azalma görüldü ( $p=0,050$ ;  $p=0,003$ ;  $p=0,041$ ). Deride gruplar arasında apoptotik hücre sayısı açısından anlamlı fark izlenmedi ( $p=0,247$ ).

**Sonuç:** Çalışmamızda C1 INH'nün; antioksidan etkisi saptanmamıştır. Ancak reperfüzyondan önce C1 INH verilmesinin iskemi reperfüzyona bağlı gelişen damar endoteli, iskelet kası ve periferik sinir yıkımını azalttığı ve en önemlisi apoptozda koruyucu olduğu gösterilmiştir. Elde ettiğimiz bulgular C1 INH'nün koruyucu etkisini serin proteaz inhibitör aktivitesinden bağımsız, direkt anti-apoptotik aktivite ile gösterdiğini desteklemektedir. Bu sonuçlar doğrultusunda C1 INH'nün periferik I/R hasarını önlemede etkin ve klinik uygulama için ümit verici olduğu düşünülmektedir.

**Anahtar Kelimeler:** İskemi-Reperfüzyon Hasarı, C1 Esteraz İnhibitörü, C1-INH Protein

## 8 SUMMARY

### THE EFFECT OF C1 ESTERASE INHIBITOR ON ISCHEMIA / REPERFUSION INJURY IN THE EXTREMITY

**Introduction:** Ischemia/reperfusion (I/R) injury which is frequently seen, is characterized by high morbidity and mortality. Deprivation of blood supply leads to molecular and structural changes in the affected tissue. A complex inflammatory response is activated upon reperfusion. It is believed that complement system has a significant role in triggering this inflammatory response. In our study we tested the local effects of C1 esterase inhibitor (C1 INH), which is the main inhibitor of the complement classical pathway, on vascular endothelium, skeletal muscle, peripheral nerve and skin for prevention of lower extremity ischemia / reperfusion injury.

**Material and method:** Twenty-four Wistar rats were divided into four groups (n=6). Rats were subjected to 3 hour left hind limb ischemia by tourniquet and following 3 hour reperfusion. In control group only I/R was performed whereas in experimental groups 100 IU/kg C1 INH was administered intraperitoneally 10 minutes before ischemia, 20 minutes before reperfusion or 10 minutes before reperfusion respectively. At the end of the experiments, rats were sacrificed and tissue samples of femoral artery, gastrocnemius muscle, sciatic nerve and skin were taken for subsequent analyses. In tissue samples MDA levels were measured, histological assessments were carried out and in immunofluorescence microscope apoptotic cell death was evaluated by TUNEL assay.

**Results:** No inter-group differences were found for MDA enzyme activity in vascular endothelium, skeletal muscle, peripheral nerve and skin. In all groups hydropic degeneration was apparent in vascular endothelium. Although there was a decrease in degenerative histological scores in skeletal muscle, there was no statistical difference between control and experimental groups ( $p=0,061$ ). C1

INH treatment before reperfusion led to a significant reduction of apoptotic cells in femoral artery, gastrocnemius muscle and sciatic nerve ( $p=0,050$ ;  $p=0,003$ ;  $p=0,041$ ). No difference was found for number of apoptotic cells in skin ( $p=0,247$ ).

**Conclusion:** In our study no antioxidant effect of C1 INH was determined. However C1 INH administration before reperfusion reduced vascular endothelium, skeletal muscle, peripheral nerve damage caused by I/R and it was shown that C1 INH is significantly protective against apoptosis. Our data supports that C1 INH improves the outcome of I/R injury via anti-apoptotic activity independent of its serine protease inhibitory activity. In conclusion, C1 INH is effective to reduce peripheral I/R injury and might be a promising therapy.

**Keywords:** Ischemia-Reperfusion Injury, C1 Esterase Inhibitor, C1-INH Protein

## 9 KAYNAKLAR

1. McMullen ME, Hart ML, Walsh MC, Buras J, Takahashi K, Stahl GL. Mannose-binding lectin binds IgM to activate the lectin complement pathway in vitro and in vivo. *Immunobiology*. 2006;211(10):759-66.
2. Cooper NR. The classical complement pathway: activation and regulation of the first complement component. *Advances in immunology*. 1985;37:151-216.
3. Weiser MR, Williams JP, Moore F, Kobzik L, Ma M, Hechtman HB, et al. Reperfusion injury of ischemic skeletal muscle is mediated by natural antibody and complement. *The Journal of experimental medicine*. 1996;183(5):2343-8.
4. Caliezi C, Wuillemin W, Zeerleder S, Redondo M, Eisele B, Hack C. C1-esterase inhibitor: an anti-inflammatory agent and its potential use in the treatment of diseases other than hereditary angioedema. *Pharmacological reviews*. 2000;52(1):91-112.
5. Zeerleder S. C1-inhibitor: more than a serine protease inhibitor. *Semin Thromb Hemost*. 2011;37(4):362-74.
6. Jansen PM, Eisele B, de Jong IW, Chang A, Delvos U, Taylor FB, et al. Effect of C1 inhibitor on inflammatory and physiologic response patterns in primates suffering from lethal septic shock. *The journal of immunology*. 1998;160(1):475-84.
7. Buerke M, Murohara T, Lefer AM. Cardioprotective effects of a C1 esterase inhibitor in myocardial ischemia and reperfusion. *Circulation*. 1995;91(2):393-402.
8. Horstick G, Heimann A, Go O, Hafner G, Berg O, Bo P, et al. Intracoronary application of C1 esterase inhibitor improves cardiac function and reduces



myocardial necrosis in an experimental model of ischemia and reperfusion. *Circulation*. 1997;95(3):701-8.

9. Hack CE, Ogilvie AC, Eisele B, Jansen PM, Wagstaff J, Thijs LG. Initial studies on the administration of C1-esterase inhibitor to patients with septic shock or with a vascular leak syndrome induced by interleukin-2 therapy. *Progress in clinical and biological research*. 1993;388:335-57.

10. Horstick G, Berg O, Heimann A, Götze O, Loos M, Hafner G, et al. Application of C1-Esterase Inhibitor During Reperfusion of Ischemic Myocardium Dose-Related Beneficial Versus Detrimental Effects. *Circulation*. 2001;104(25):3125-31.

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

12. Newmeyer DD, Ferguson-Miller S. Mitochondria: releasing power for life and unleashing the machineries of death. *Cell*. 2003;112(4):481-90.

13. Kumar V, Abbas AK, Fausto N, Aster JC. *Robbins and Cotran Pathologic Basis of Disease, Professional Edition: Expert Consult-Online: Elsevier Health Sciences*; 2009.

14. Jennings R, Sommers H, Smyth G, Flack H, Linn H. Myocardial necrosis induced by temporary occlusion of a coronary artery in the dog. *Archives of pathology*. 1960;70:68.

15. Khalil AA, Aziz FA, Hall JC. Reperfusion injury. *Plastic and reconstructive surgery*. 2006;117(3):1024-33.

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

17. Rose S, Floyd RA, Eneff K, Buehren V, Massion W. Intestinal ischemia: reperfusion-mediated increase in hydroxyl free radical formation as reported by salicylate hydroxylation. *Shock*. 1994;1(6):452-6.
18. Shames BD, Barton HH, Reznikov LL, Cairns CB, Banerjee A, Harken AH, et al. Ischemia alone is sufficient to induce TNF- $\alpha$  mRNA and peptide in the myocardium. *Shock*. 2002;17(2):114-9.
19. Myers S, Hernandez R, Turnage R, Bartula L, Taylor-Kalley B. Resuscitation of ischemia/reperfusion with hyperalimantation increases intestinal PGI<sub>2</sub> synthase (PS) content and PGI<sub>2</sub> release. *Shock (Augusta, Ga)*. 1995;3(6):422-9.
20. Riedemann NC, Ward PA. Complement in ischemia reperfusion injury. *The American journal of pathology*. 2003;162(2):363.
21. Ames 3rd A, Wright R, Kowada M, Thurston J, Majno G. Cerebral ischemia. II. The no-reflow phenomenon. *The American journal of pathology*. 1968;52(2):437.
22. Brooks B. Pathologic changes in muscle as a result of disturbances of circulation: an experimental study of Volkmann's ischemic paralysis. *Archives of Surgery*. 1922;5(1):188-216.
23. Menger MD, Rücker M, Vollmar B. Capillary dysfunction in striated muscle ischemia/reperfusion: on the mechanisms of capillary "no-reflow". *Shock*. 1997;8(1):2-7.
24. Frangogiannis NG. Chemokines in ischemia and reperfusion. *Thrombosis And Haemostasis-Stuttgart*. 2007;97(5):738.
25. Türegün M, Güdemez E, Newman P, Zins J, Siemionow M. Blockade of platelet endothelial cell adhesion molecule-1 (PECAM-1) protects against ischemia-reperfusion injury in muscle flaps at microcirculatory level. *Plastic and reconstructive surgery*. 1999;104(4):1033-40.

26. de la Ossa JC, Malago M, Gewertz BL. Neutrophil-endothelial cell binding in neutrophil-mediated tissue injury. *Journal of Surgical Research*. 1992;53(1):103-7.
27. Eltzschig HK, Collard CD. Vascular ischaemia and reperfusion injury. *British medical bulletin*. 2004;70(1):71-86.
28. Li C, Jackson RM. Reactive species mechanisms of cellular hypoxia-reoxygenation injury. *American Journal of Physiology-Cell Physiolog*. 2002;282(2):C227-C41.
29. Berry CE, Hare JM. Xanthine oxidoreductase and cardiovascular disease: molecular mechanisms and pathophysiological implications. *The Journal of physiology*. 2004;555(3):589-606.
30. Toyokuni S. Reactive oxygen species-induced molecular damage and its application in pathology. *Pathology international*. 1999;49(2):91-102.
31. Collard C, Lekowski R, Jordan J, Agah A, Stahl G. Complement activation following oxidative stress. *Molecular immunology*. 1999;36(13):941-8.
32. Belkin M, Brown RD, Wright JG, LaMorte WW, Hobson II RW. A new quantitative spectrophotometric assay of ischemia-reperfusion injury in skeletal muscle. *The American journal of surgery*. 1988;156(2):83-6.
33. Hayes G, Liauw S, Romaschin A, Walker P, editors. Separation of reperfusion injury from ischemia-induced necrosis. *Surg Forum*; 1988.
34. Rinker B, Fink BF, Barry NG, Fife JA, Milan ME, Stoker AR, et al. The effect of cigarette smoking on functional recovery following peripheral nerve ischemia/reperfusion injury. *Microsurgery*. 2011;31(1):59-65.
35. Bagdatoglu C, Saray A, Surucu HS, Ozturk H, Tamer L. Effect of trapidil in ischemia/reperfusion injury of peripheral nerves. *Neurosurgery*. 2002;51(1):212-20.

36. Van Cruchten S, Van Den Broeck W. Morphological and biochemical aspects of apoptosis, oncosis and necrosis. *Anatomia, histologia, embryologia*. 2002;31(4):214-23.
37. Loo DT, Rillema JR. Measurement of cell death. *Methods Cell Biol*. 1998;57:251-64.
38. Marnett LJ. Lipid peroxidation—DNA damage by malondialdehyde. *Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis*. 1999;424(1):83-95.
39. Kühn H, Borchert A. Regulation of enzymatic lipid peroxidation: the interplay of peroxidizing and peroxide reducing enzymes. *Free Radical Biology and Medicine*. 2002;33(2):154-72.
40. Davis III AE, Mejia P, Lu F. Biological activities of C1 inhibitor. *Molecular immunology*. 2008;45(16):4057-63.
41. Wang WZ, Baynosa RC, Zamboni WA. Update on ischemia-reperfusion injury for the plastic surgeon: 2011. *Plastic and reconstructive surgery*. 2011;128(6):685e-92e.
42. 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.
43. Gouverneur M, Berg B, Nieuwdorp M, Stroes E, Vink H. Vasculoprotective properties of the endothelial glycocalyx: effects of fluid shear stress. *Journal of internal medicine*. 2006;259(4):393-400.
44. Mulivor AW, Lipowsky HH. Inflammation-and ischemia-induced shedding of venular glycocalyx. *American Journal of Physiology-Heart and Circulatory Physiology*. 2004;286(5):H1672-H80.

45. Rehm M, Bruegger D, Christ F, Conzen P, Thiel M, Jacob M, et al. Shedding of the endothelial glycocalyx in patients undergoing major vascular surgery with global and regional ischemia. *Circulation*. 2007;116(17):1896-906.
46. Mulivor AW, Lipowsky HH. Role of glycocalyx in leukocyte-endothelial cell adhesion. *American Journal of Physiology-Heart and Circulatory Physiology*. 2002;283(4):H1282-H91.
47. Breda M, Drinkwater D, Laks H, Bhuta S, Corno A, Davtyan H, et al. Prevention of reperfusion injury in the neonatal heart with leukocyte-depleted blood. *The Journal of thoracic and cardiovascular surgery*. 1989;97(5):654-65.
48. Wang WZ, Fang XH, Stephenson LL, Khiabani KT, Zamboni WA. Melatonin reduces ischemia/reperfusion-induced superoxide generation in arterial wall and cell death in skeletal muscle. *Journal of pineal research*. 2006;41(3):255-60.
49. Arató E, Jancsó G, Sínay L, Kürthy M, Lantos J, Ferencz S, et al. Reperfusion injury and inflammatory responses following acute lower limb revascularization surgery. *Clinical hemorheology and microcirculation*. 2008;39(1):79-85.
50. Williams JP, Pechet TT, Weiser MR, Reid R, Kobzik L, Moore Jr FD, et al. Intestinal reperfusion injury is mediated by IgM and complement. *Journal of Applied Physiology*. 1999;86(3):938-42.
51. Zhang M, Takahashi K, Alicot EM, Vorup-Jensen T, Kessler B, Thiel S, et al. Activation of the lectin pathway by natural IgM in a model of ischemia/reperfusion injury. *The Journal of Immunology*. 2006;177(7):4727-34.
52. Busche MN, Pavlov V, Takahashi K, Stahl GL. Myocardial ischemia and reperfusion injury is dependent on both IgM and mannose-binding lectin. *American Journal of Physiology-Heart and Circulatory Physiology*. 2009;297(5):H1853-H9.

53. Duehrkop C, Rieben R. Ischemia/reperfusion injury: Effect of simultaneous inhibition of plasma cascade systems versus specific complement inhibition. *Biochemical pharmacology*. 2014;88(1):12-22.
54. Buerke M, Prüfer D, Dahm M, Oelert H, Meyer J, Darius H. Blocking of classical complement pathway inhibits endothelial adhesion molecule expression and preserves ischemic myocardium from reperfusion injury. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*. 1998;286(1):429-38.
55. Lu F, Fernandes SM, Davis III AE. The effect of C1 inhibitor on myocardial ischemia and reperfusion injury. *Cardiovascular Pathology*. 2013;22(1):75-80.
56. Nielsen E, Mollnes T, Harlan J, Winn R. C1-Inhibitor Reduces the Ischaemia–Reperfusion Injury of Skeletal Muscles in Mice after Aortic Cross-Clamping. *Scandinavian journal of immunology*. 2002;56(6):588-92.
57. Toomayan GA, Chen LE, Jiang HX, Qi WN, Seaber AV, Frank MM, et al. C1-esterase inhibitor and a novel peptide inhibitor improve contractile function in reperfused skeletal muscle. *Microsurgery*. 2003;23(6):561-7.
58. Duehrkop C, Banz Y, Spirig R, Miescher S, Nolte MW, Spycher M, et al. C1 esterase inhibitor reduces lower extremity ischemia/reperfusion injury and associated lung damage. *PloS one*. 2013;8(8):e72059.
59. Fu J, Lin G, Wu Z, Ceng B, Wu Y, Liang G, et al. Anti-apoptotic role for C1 inhibitor in ischemia/reperfusion-induced myocardial cell injury. *Biochemical and biophysical research communications*. 2006;349(2):504-12.
60. Lehmann T, Heger M, Münch S, Kirschfink M, Klar E. In vivo microscopy reveals that complement inhibition by C1-esterase inhibitor reduces ischemia/reperfusion injury in the liver. *Transplant International*. 2000;13(S1):S547-S50.

61. Heijnen B, Straatsburg I, Padilla N, Van Mierlo G, Hack C, Van Gulik T. Inhibition of classical complement activation attenuates liver ischaemia and reperfusion injury in a rat model. *Clinical & Experimental Immunology*. 2006;143(1):15-23.
62. Akita N, Nakase H, Kaido T, Kanemoto Y, Sakaki T. Protective effect of C1 esterase inhibitor on reperfusion injury in the rat middle cerebral artery occlusion model. *Neurosurgery*. 2003;52(2):395-401.
63. De Simoni M, Storini C, Barba M, Catapano L, Arabia A, Rossi E, et al. Neuroprotection by complement (C1) inhibitor in mouse transient brain ischemia. *Journal of Cerebral Blood Flow & Metabolism*. 2003;23(2):232-9.
64. Storini C, Rossi E, Marrella V, Distaso M, Veerhuis R, Vergani C, et al. C1-inhibitor protects against brain ischemia–reperfusion injury via inhibition of cell recruitment and inflammation. *Neurobiology of disease*. 2005;19(1):10-7.
65. Heydenreich N, Nolte MW, Göb E, Langhauser F, Hofmeister M, Kraft P, et al. C1-inhibitor protects from brain ischemia-reperfusion injury by combined antiinflammatory and antithrombotic mechanisms. *Stroke*. 2012;43(9):2457-67.
66. Lauterbach M, Horstick G, Plum N, Lotz J, Lauterbach E, Weilemann LS, et al. C1-esterase inhibitor reverses functional consequences of superior mesenteric artery ischemia/reperfusion by limiting reperfusion injury and restoring microcirculatory perfusion. *Shock*. 2007;27(1):75-83.
67. Castellano G, Melchiorre R, Loverre A, Ditunno P, Montinaro V, Rossini M, et al. Therapeutic targeting of classical and lectin pathways of complement protects from ischemia-reperfusion-induced renal damage. *The American journal of pathology*. 2010;176(4):1648-59.
68. McCully JD, Wakiyama H, Hsieh Y-J, Jones M, Levitsky S. Differential contribution of necrosis and apoptosis in myocardial ischemia-reperfusion injury.



American Journal of Physiology-Heart and Circulatory Physiology. 2004;286(5):H1923-H35.

69. Lopez-Neblina F, Toledo AH, Toledo-Pereyra LH. Molecular biology of apoptosis in ischemia and reperfusion. *Investigative Surgery*. 2005;18(6):335-50.

70. Wang WZ, Fang XH, Stephenson LL, Khiabani KT, Zamboni WA. Ischemia/reperfusion-induced necrosis and apoptosis in the cells isolated from rat skeletal muscle. *Journal of Orthopaedic Research*. 2008;26(3):351-6.

71. Wang WZ, Fang X-H, Stephenson LL, Khiabani KT, Zamboni WA. Ischemia-Reperfusion-Induced Apoptotic Endothelial Cells Isolated from Rat Skeletal Muscle. *Plastic and reconstructive surgery*. 2009;123(2S):131S-8S.

72. Wang WZ, Fang X-H, Stephenson LL, Zhang X, Khiabani KT, Zamboni WA. Melatonin attenuates I/R-induced mitochondrial dysfunction in skeletal muscle. *Journal of Surgical Research*. 2011;171(1):108-13.

73. De Zwaan C, Kleine A, Diris J, Glatz J, Wellens H, Strengers P, et al. Continuous 48-h C1-inhibitor treatment, following reperfusion therapy, in patients with acute myocardial infarction. *European heart journal*. 2002;23(21):1670-7.