



T. C.
ÇUKUROVA ÜNİVERSİTESİ
TIP FAKÜLTESİ
PLASTİK REKONSTRÜKTİF VE ESTETİK
CERRAHİ ANABİLİM DALI

**FARE ALT EKSTREMİTE İSKEMİ-REPERFÜZYON
MODELİNDE RHO-RHO KİNAZ SİNYAL İLETİ
YOLUNUN İNCELENMESİ**

Dr. Anıl Arif OLGUNER

UZMANLIK TEZİ

TEZ DANIŞMANI
Prof. Dr. Osman Metin Yavuz

ADANA - 2015

TEŞEKKÜR

Çukurova Üniversitesi Tıp Fakóltesi Plastik Rekonstrüktif ve Estetik Cerrahi Anabilim Dalında yapmış olduğum asistanlık eğitimim boyunca kendisinden gerek mesleki gerek insani boyutta çok şey öğrendiğim, her zaman örnek alacağım kıymetli hocam ve tez danışmanım Sayın Prof. Dr. Osman Metin Yavuz'a şükranlarımı sunarım.

Yine bu süreçte birlikte çalışma şansına eriştiğim, bilgi ve deneyimlerini paylaşarak mesleki gelişimime büyük katkıları olan hocalarım; Prof. Dr. Erol Kesiktaş, Yrd. Doç. Dr. Eyüphan Gencel ve Yrd. Doç. Dr. Cengiz Eser'e teşekkür ederim.

Birlikte çalışmaktan büyük keyif aldığım araştırma görevlisi ve diğer tüm çalışma arkadaşlarıma teşekkür ederim.

Tezimin deneysel aşamasında yardımlarını esirgemeyen Prof. Dr. Ergin Şingirik, Yrd. Doç. Dr. Arbil Açıkalm, Yrd. Doç. Dr. Emine Bağır Kılıç ve Dr. Mahir Kara'ya teşekkür ederim.

Yanımda olamasa da uzaklardan beni izlediğini bildiğim babama, herşeyimi borçlu olduğum biricik anneme ve sevgili eşime teşekkür ederim.

İÇİNDEKİLER

TEŞEKKÜR	I
İÇİNDEKİLER	II
TABLO LİSTESİ.....	IV
ŞEKİL LİSTESİ.....	V
KISALTMALAR	VI
ÖZET	VIII
ABSTRACT.....	IX
1. GİRİŞ	1
2.GENEL BİLGİLER.....	4
2.1 İskemi.....	4
2.2 Reperfüzyon	6
2.3 İskemi - Reperfüzyon Hasarı	7
2.4 İskemi –Reperfüzyon Hasarının Mekanizması	9
2.5. İskemi/Reperfüzyon Hasarında Lökositlerin Rolü.....	14
2.6. İskemi/Reperfüzyon Hasarında Serbest Radikallerin Rolü.....	16
2.7. Plastik Cerrahi Uygulamalarında İskemi-Reperfüzyon Hasarı.....	17
2.7. Rho Kinaz.....	19
2.7.1 Özellikleri	19
2.7.2 Ekspresyon ve Etkinliğinin Düzenlenmesi.....	20
2.7.3 Patolojik Olaylardaki Rolü	22
3. GEREÇ VE YÖNTEM.....	24
3.1. Çalışma Grupları	24
3.2. Cerrahi Yöntem.....	24
3.3. Doku Homojenatı Süpernatantlarının Hazırlanması	25
3.4. Doku Homojenatı Süpernatantlarında Rho-kinaz etkinliği, Rho-kinaz protein ekspresyonu ve RhoA protein ekspresyonu ölçülmesi.....	26
3.5. Protein Düzeyi Standardizasyonu	26
3.6. Histopatolojik İnceleme	26
3.7. İstatistiksel Analiz.....	27

4. BULGULAR	28
4.1 Rho-Kinaz Aktivitesi	28
4.2 Rho-Kinaz Ekspresyonu.....	29
4.3 Rho-A protein ekspresyonu.....	30
4.4 Histopatolojik Değerlendirme	31
5. TARTIşMA	33
6. SONUÇ ve ÖNERİLER	40
KAYNAKLAR	41
ÖZGEÇMİş	54

TABLO LİSTESİ

Tablo 1. Gruplara göre Rho A düzeyi, Rho Kinaz aktivitesi ve Rho Kinaz düzeyi dağılımları. Ort, Ortalama; Med, Median; p-MYPT, Fosforile miyozin fosfataz target subunit.....	31
--	-----------

ŞEKİL LİSTESİ

Şekil 1.	Hücre hasarında sitoplazmik Ca ²⁺ artışının kaynakları ve sonuçları.....	12
Şekil 2.	İskemide membran hasarının mekanizmaları.....	12
Şekil 3.	İskemide pürin metabolizmasının gelişimi ve KDH'nın KO'ya transformasyonu, reperfüzyon ile beraber doku hasarı gelişimi.	14
Şekil 4.	Rho Kinaz'ın substratları.....	19
Şekil 5.	Rho Kinaz etkinliğinin düzenlenmesi.....	22
Şekil 6.	ROCK'lerin çeşitli kardiyovasküler hastalıklardaki rolü.	23
Şekil 7.	Rho Kinaz'ın çeşitli kardiyovasküler hastalıkların patojenezindeki rolü.	23
Şekil 8.	Dört saat iskemi sonucunda sağ arka ekstremitede oluşan siyanoz.....	25
Şekil 9.	Gruplara göre Rho Kinaz Aktivitesi (p-MYPT pg/mg) Dağılımı	28
Şekil 10.	Gruplara göre Rho Kinaz enzim düzeyi (pg/ml) dağılımı	29
Şekil 11.	Gruplara göre RhoA protein düzeyi (pg/ml) dağılımı	30
Şekil 12.	Kas liflerinde iskemiye sekonder balonlaşma dejenerasyonu ve nekroz alanları.....	31
Şekil 13.	Kas liflerinde iskemiye sekonder nekroz alanları (H&E×200)	32
Şekil 14.	ROCK aktivitesini direk etkileyen faktörler.AA araşidonik asid, SPC sfingofosfokolin .	37

KISALTMALAR

5-HT	: 5-Hidroksi triptamin
A2	: Anjiyotensin 2
AA	: Araşidonik asid
AMP	: Adenozin monofosfat
ATP	: Adenozin trifosfat
Ca²⁺	: Kalsiyum
cAMP	: siklik AMP
CAT	: Katalaz
CDC 42	: Cell Division Control Protein 42
Cu	: Bakır
ET-1	: Endotelin-1
GAP	: GTPaz aktive edici protein
GDI	: Guanin dissociation inhibitor
GDP	: Guanozin difosfat
GEF	: Guanin exchange factor
GSH	: Glutasyon
GTP	: Guanozin 5' trifosfat
H₂O₂	: Hidrojen peroksit
IL-1	: İnterlökin-1
IL-3	: İnterlökin-3
İ/R	: İskemi-reperfüzyon
K⁺	: Potasyum
KDH	: Ksantin dehidrojenaz
KO	: Ksantin oksidaz
LPA	: Lizofosfatidik asid
MDA	: Malondialdehid
MLC	: Myosin light chain
Mn	: Manganez
MRC	: Medical Research Council

Na⁺	: Sodyum
NAD	: Nikotinamid adenin dinükleotid
NADPH	: Nikotinamid difosfonükleotid
NO	: Nitrik oksid
O₂	: Oksijen
O₂⁻	: Süperoksid anyonu
OH	: Hidroksil radikali
OksiHb	: Oksihemoglobin
PKA	: Protein kinaz A
PMNL	: Polimorf nüveli lökosit
PMSF	: Fenilmetosülfonilfluoride
P-MYPT	: Fosforile-miyozin fosfataz target subunit
RIPA	: Radioimmune precipitation assay
ROCK	: Rho Kinaz
S1P	: Sfingozin 1 fosfat
Se	: Selenyum
SOD	: Süperoksid dismutaz
SOR	: Süperoksid radikalleri
SPC	: Sfingofosforil kolin
TNF	: Tümör Nekrozis Faktör

ÖZET

Fare Alt Ekstremitte İskemi-Reperfüzyon Modelinde Rho-Rho Kinaz Sinyal İleti Yolunun İncelenmesi

Giriş ve Amaç: İskemi ve reperfüzyon (İ/R) hasarı, enfeksiyon veya kanser gibi çok sayıda klinik durumu ilgilendiren; klinik veya moleküler düzeyde pek çok basamağı tam olarak aydınlatılmamış geniş fizyopatolojik bir süreçtir. Rho-Rho Kinaz sinyal ileti yolunun iskemi-reperfüzyon hasarı ile ilişkili olduğu; serebral, renal, myokardiyal ve hepatik sistemlerde gösterilmiştir. Bu çalışmada amaç, fare alt ekstremitesinde oluşturulan iskemi reperfüzyon hasarında, Rho-Rho Kinaz sinyal ileti yolunun iskelet kası dokusunda gerek enzim aktivitesi gerek protein düzeyleri anlamında uğradığı değişikliklerin irdelenmesidir. Bu sayede, özellikle serbest kas dokusu transferlerinde, iskemi-reperfüzyon hasarının azaltılmasına yönelik yeni stratejiler geliştirilmesi amaçlanmıştır. Ayrıca, Rho Kinaz inhibitörlerinin, plastik cerrahinin klinik uygulamalarında kullanılabileceği alanlar tartışılmıştır.

Materyal ve Metod: Ağırlıkları 20-30g arasında değişen, swiss albino cinsi fareler, kontrol ve deney grubu olarak 12'şer fareden oluşan iki gruba ayrıldı. Deney grubu, ksilazin ve ketamin anestezisi altında, alt ekstremitesine "trochanter majus" düzeyinden uygulanan turnike ile, 4 saat iskemiye maruz bırakıldı. Dört saatin sonunda turnike çözüldü ve 4 saat reperfüzyon dönemine bırakıldı. Toplam 8 saatin sonunda "biceps femoris" kasından kas örneği alınarak ELISA yöntemi ile RhoA proteini, Rho Kinaz enzimi düzeyi ve Rho Kinaz enzim aktivitesi ölçüldü. Kontrol grubunda ise turnike uygulanmaksızın, 8 saat anestezisi sonrası kas biyopsisi alındı ve ELISA ile sonuçlar karşılaştırıldı. İskemi reperfüzyon hasarını göstermek amacı ile histopatolojik inceleme için, kas dokusundan örnekler alındı.

Bulgular: Rho kinaz aktivitesi İ/R grubunda kontrole göre anlamlı olarak artmıştır. Rho Kinaz düzeylerinde fark bulunmazken, RhoA düzeyleri İ/R grubunda anlamlı olarak azalmıştır.

Sonuçlar: Bu çalışmanın sonuçları, Rho-Rho Kinaz sinyal ileti yolunun, iskelet kası iskemi-reperfüzyonu ile, kinaz aktivitesi düzeyinde uyarıldığını göstermektedir. Rho Kinaz inhibitörleri, özellikle serbest kas dokusu transferlerinde, gerek nekrozun gerek apoptozun azalmasına katkı sağlayarak, ameliyat başarısına olumlu etkilerde bulunabilirler.

Anahtar Kelimeler: İskemi-reperfüzyon, iskelet kası, Rho, Rho Kinaz

ABSTRACT

Analysis of Rho-Rho Kinase Pathway in a Mouse Model of Hindlimb Ischemia-Reperfusion

Aim: Ischemia-reperfusion (I/R) damage is a broad and not fully understood physiopathological process in both clinical and molecular aspects; which is related to multiple clinical conditions such as infection and cancer. Rho-Rho Kinase signal transduction pathway has shown to be related to cerebral, renal, myocardial and hepatic ischemia-reperfusion. This study is planned to demonstrate alterations in Rho-Rho Kinase signal pathway in mouse skeletal muscle ischemia-reperfusion in both enzyme activity and protein expression levels. By means of the results, new strategies are to be planned to overcome ischemia-reperfusion injury in free muscle transfers. Additionally, Rho Kinase inhibitors' fields of use concerning plastic surgery is discussed.

Materials and Methods: Swiss albino mice weighing between 20-30 g were divided to 2 groups as control and study, 12 each. Study group was subjected to ischemia by application of tourniquet from great trochanteric level for 4 hours. At the end of 4 hours tourniquet was ended and reperfusion period started. By the end of totally 8 hours muscle specimens from biceps femoris muscle were taken and RhoA protein level, Rho Kinase enzyme level and Rho Kinase activities were assessed by ELISA. In control group only 8 hours of anesthesia was applied without tourniquet application, results of ELISA study were compared. Muscle biopsies were also taken in order to make a histopathological evaluation.

Results: Rho Kinase activity is significantly higher in the study group. While no difference was observed in Rho Kinase levels, RhoA levels found to be lower in study group.

Conclusions: Results of this study which used a mouse hindlimb ischemia-reperfusion model demonstrates that Rho-Rho Kinase pathway is stimulated during skeletal muscle ischemia-reperfusion at kinase activity level. Rho kinase inhibitors may be useful agents by means of reducing both necrosis and apoptosis during free muscle transfers.

Keywords: Ischemia-reperfusion, skeletal muscle, Rho, Rho-Kinase

1. GİRİŞ

İskemi ve reperfüzyon (İ/R) hasarı, enfeksiyon veya kanser gibi çok sayıda klinik durumu ilgilendiren; klinik veya moleküler düzeyde pek çok basamağı tam olarak aydınlatılmamış geniş fizyopatolojik bir süreçtir. Akut ya da kronik dolaşım bozuklukları, organ perfüzyonlarının etkilendiği klinik durumlar, flep cerrahisi sonrası iskemik sorunlar, damar yaralanmalı kırıklar, turnike süresinin uzadığı cerrahi girişimler ile kompartman sendromu ekstremitayı iskemiye maruz bırakabilmektedir.

Plastik cerrahi pratiği perspektifinden bakıldığında özellikle otolog serbest doku nakilleri, işlemin vasküler klempleme aşaması ile birlikte İ/R hasarını beraberinde getiren bir süreç oluşturmaktadır. Kullanımı gittikçe yaygınlaşan serbest doku aktarımlarında, total flep kaybının çok az olduğu seriler olmakla birlikte, bazı serilerde total flep kaybı % 16'ya kadar ulaşabilmektedir. Flep kaybı sonucu oluşacak komplikasyonlar nedeni ile hastanın geçireceği ameliyat sayısı, hastanede kalış süresi, ekonomik sıkıntı, fizyolojik ve psikolojik rahatsızlık artmakta, hatta ekstremita kaybı ve ölüm gerçekleşebilmektedir.¹⁻³ Serbest flepler, doku rekonstrüksiyonu için son basamak olarak değerlendirilmektedirler. Bu yüzden serbest fleplerin kaybının önlenmesi, hayati önem taşımaktadır.

İskemi-reperfüzyon hasarı oldukça karmaşık, hücrenel ve humoral olaylar dizisidir. İskemiye maruz kalan dokuda başlayan çok sayıda kimyasal reaksiyon sonucunda, hücrenel enerji depolarının tükenmesi ve toksik metabolitlerin birikmesine bağlı olarak, hücrenel disfonksiyon ve nekroz gelişir. İskemik dokuda hücrelerin rejenerasyonu ve toksik metabolitlerin temizlenebilmesi için, yeniden kan akımının başlaması gerekir. Ancak iskemik dokunun reperfüzyonu, dokuda paradoksal olarak hasarın artışına neden olur. Reperfüzyon sürecinde, gerçekleşen reaksiyonların sitotoksik oksidanlar ile ilişkili olması nedeniyle, bu süreçte meydana gelen hasarın yalnızca iskemi döneminde oluşan hasara göre, çok daha ciddi olduğu bildirilmiştir.⁴ Akut ekstremita iskemisi kollateral damarların gelişmiş olduğu kronik ateroskleroz durumunda bile, oldukça ciddi morbidite ve mortaliteye yol açabilen klinik bir sorun olarak karşımıza çıkmaktadır. Akut iskemiye yol açan durum ortadan kaldırılıp reperfüzyon sağlanabilse dahi, mortalite ve morbidite riski devam etmektedir. Cerrahi

müdahalenin geciktiği vakalarda bu riskler giderek artış göstererek öne çıkmaktadır.⁵ Ekstremitte reperfüzyonunun tam olarak sağlanması halinde bile, ekstremitte kaybına ve uzak organ hasarına (böbrek, akciğer, kalp, beyin gibi) yol açabilecek olaylar dizisi gelişebilir.⁶ Akut ekstremitte iskemisinin cerrahi olarak ortadan kaldırılması ile ilgili tekniklerdeki ilerlemelere rağmen, bu istenmeyen olaylardan tamamen kurtulmak mümkün olmamıştır ve bu konuda yapılan çalışmalar devam etmektedir.⁷ Doğaldır ki, bu durumu önlemeye yönelik uygulama metodu ve ilaçların bulunması için, öncelikle bu olayın başlamasına sebep olan durumların gelişiminin değerlendirilmesi gerekmektedir. İskemi-reperfüzyon ile ilgili yapılan çok sayıda çalışmada, reperfüzyon hasarı; iskemi sonrası Ca^{2+} birikimi, asidoz, enerji depolarının tükenmesi ve bu olaylar sonrası oksijen (O_2) ile yeniden buluşma döneminde oluşan serbest oksijen radikallerinin (SOR) başlattığı, nötrofil aktivasyonunun da rol oynadığı ve nihayet hücre ölümü ile sonuçlanan olaylar dizisi olarak belirtilmiştir.⁸

Fleplerin, kanlanma paternlerine göre yapılan sınıflandırma içerisinde bir alt grup olan kas flepleri, doku eksikliklerinin rekonstrüksiyonunda sıklıkla kullanılan bir flep çeşididir. Tanımlanmış güvenilir pedikülleri olması, derin doku defektleri için kitlesel doku kaynağı olması, alıcı alandaki yapılar için güvenilir bir örtü sağlaması, iyi kanlanmaları ve enfeksiyonlara dirençli olmaları gibi özellikleri nedeniyle kas flepleri, sıklıkla iyi bir rekonstrüksiyon seçeneği olarak değerlendirilirler.⁹ Muskülokutan fleplerde, kaybın temel sebebi kanlanmadaki yetersizliktir. Bu yetersizliğin sebebi, cerrahinin herhangi bir aşamasında vasküler yapıların hasarlanması veya vasküler yapı üzerindeki baskının artması olabilir. Ayrıca hematoma ve/veya tünelden geçirilmiş cilt de damar üzerine bası yaparak dolaşım bozukluğuna yol açabilir. Serbest doku transplantasyonlarında ise, damar anastomozları tamamlanana kadar, kaçınılmaz şekilde rutin prosedürün bir parçası olarak flep, bir süre iskemiye maruz kalmaktadır.

Özellikle fonksiyonel serbest iskelet kası transferlerinde, yaşayabilir kas dokusunun korunması, ameliyatın başarısı açısından son derece önemlidir. Eisanhardt ve ark. tarafından yapılan ve 11 hastada gerçekleştirilen serbest kas dokusu transferi operasyonlarında, iskemi öncesi ve operasyon sonrası beşinci günde yapılan kas biyopsilerinin karşılaştırıldığı çalışmada; 70 dakikalık iskemi süresinde bile anlamlı kas dokusu kaybı yaşandığı bildirilmiştir.¹⁰ Ayrıca ilgili çalışmada kas dokusu kaybının

sadece İ/R nedenli nekroza bağılı olmadığı, ilerleyen dönemde gelişen “apoptozun” (programlanmış hücre ölümü) da önemli bir doku kaybı nedeni olduğu ileri sürülmüştür.

Hücre içi birçok sinyalleme mekanizmasına aracılık eden küçük G proteini Rho'nun, memelilerde en az 10 üyesi bulunmaktadır.¹¹ Rho Kinazlar (ROCK), küçük G proteini olan Rho-A'nın en iyi tanımlanmış efektörlerinden birisidir.¹¹

Rho Kinazın ROCK1 ve ROCK2 olarak adlandırılan 2 izoformu bulunmaktadır. Rho Kinazların birçok fizyolojik ve patolojik olayda rol oynadıkları gösterilmiştir. Düz kas kasılması, sekretuvar aktivitelerin ve endotel hücre permeabilitesinin düzenlenmesi gibi fizyolojik olaylar ile hipertansiyon, preeklampsi ve kanser gibi çeşitli patolojiler, bu enzimlerin yer aldığı olaylar arasında sayılabilir.¹²

Rho/Rho Kinaz yolağının vazokonstrüksiyon, hipertansiyon, koroner arter spazmı, kanser invazyonu, kalp ve karaciğer gibi organlarda iskemi-reperfüzyon hasarlanması, akciğerde doku hasarlanması gibi patolojik süreçlerde rol oynadığı gösterilmiştir.¹³⁻¹⁶ Ancak literatür taranmasında, alt ekstremitte iskemi reperfüzyon modelinde ve iskelet kası üzerinde Rho-Rho Kinaz yolağı hakkında yeterli veri olmadığı görülmüştür. Ayrıca plastik cerrahi ile alakalı Rho-Rho Kinaz sistemini irdeleyen deneysel çalışmaya rastlanılmamıştır. Bu nedenle mevcut çalışmada, flep cerrahisinde önemli morbidite nedenlerinden biri olan iskemi-reperfüzyon hasarının iskelet kası üzerindeki etkisinde Rho-Rho Kinaz yolağının etkileniyor olabileceği düşünülerek hedef organ “biceps femoris” kasında Rho A proteini, Rho Kinaz enzimi ve aktivitesi incelemeye alınmıştır. Bu çalışmadan elde edilecek sonuçlar ışığında, ileri çalışmalar planlanarak iskelet kası İ/R hasarının azaltılmasına yönelik, yeni yaklaşımların planlanması amaçlanmıştır. Ayrıca özellikle fonksiyonel kas transferlerinde, cerrahi başarıyı etkileyecek olan kas dokusu vaskülarizasyonu ve fonksiyon kaybının azaltılmasına yönelik, yeni çalışmalara öncülük yapması hedeflenmiştir.

2.GENEL BİLGİLER

Çizgili kas İ/R hasarı klinikte; periferik arter hastalıkları cerrahisinde aort klemplenmesi, tromboembolik oklüzyon sonrası sağlanan reperfüzyon, arter greftleme operasyonları, ekstremitte replantasyonları, ezilme yaralanmaları, bazı ortopedi ameliyatlarında uygulanan turnike iskemisi ve serbest flep cerrahisi sırasında görülebilir. Bu patolojik olayın ortaya çıkmasından sorumlu olabilecek bir dizi mekanizma söz konusudur: SOR (süperoksid radikalleri), proinflamatuvar medyatörler, lökosit infiltrasyonu, Ca^{2+} yüklenmesi, fosfolipid peroksidasyonu ve fosfolipid azalması, bozulmuş nitrik oksit metabolizması ve azalmış ATP (adenozin trifosfat) sentezi gibi.¹⁷ İskemi-reperfüzyon hasarı; karaciğer, kalp, kas, böbrek, akciğer ve bağırsaklarda sık rastlanılan ve ciddi patolojilere yol açabilen olaylar kompleksidir. Hangi organda olursa olsun İ/R hasarı, sistemik enflamatuvar bir yanıt oluşturur. İskelet kasında olduğunda ise, ekstremitede işlev kaybı ve amputasyonla sonuçlanabilir.^{18,19} Hatta, kardiyovasküler, respiratuvar, hepatik ve renal disfonksiyonlara bağlı ölüm görülebilir.²⁰ İskemi-reperfüzyon hasarını açıklayabilmek amacıyla çok sayıda hipotez ileri sürülmüştür. Bunlar arasında en kabul gören mekanizma reperfüzyon anında ksantin oksidazdan (KO) üretilen SOR'lardır. Oksidatif stresi azaltmak amacıyla vücutta geliştirilen mekanizmalar arasında, katalaz(CAT) ve glutatyon (GSH) sistemleri sayılabilir. Ayrıca iskemi ya da reperfüzyon aşamalarında daha farklı birçok ajan kullanılmıştır.²¹

2.1. İskemi

Dokulara kan sağlayan damarların, mekanik bir nedenle tıkanması veya başka bir nedenle perfüzyonun azalması sonucu, dokunun beslenmesinin engellenmesi ve metabolizmasının bozulması durumuna, iskemi denir. Bir dokunun kanlanması kesildiğinde, ilgili dokuya ait hücrelerin işlev bozukluğu ile başlayan ve hücre ölümüne kadar ilerleyen, çok sayıda ve kompleks bir dizi kimyasal reaksiyon gerçekleşir. Hücresel fonksiyonların devamlılığının sağlanabilmesi için, metabolitlerin O_2 ile yakılması gerekmektedir. Normal hücre fonksiyonları için gerekli olan yüksek enerjili

fosfat bağları, aerobik metabolizma yoluyla sağlanır. Oksijen yokluğu durumunda anaerobik metabolizma devreye girer. Bu da, laktik asit ve toksik metabolitler gibi çeşitli ürünlerin birikimi ile sonuçlanır. Oluşan asidoz sebebiyle, normal enzim kinetiği değişir ve yüksek enerjili fosfat bağlarının yapımı azalır. Bu durumda, hücre kendi devamlılığı için gerekli olan enerjiden yoksun kalır.²²⁻²⁴

Dokuların iskemiye dayanabilirlikleri ve bununla ilgili olarak kritik iskemi süreleri birbirinden farklıdır. İskelet kaslarının iskemiye uzun süre dayanabilmesine karşın, sinir hücrelerinde dakikalar içinde geri dönüşümsüz hasarlar ortaya çıkabilir.²²⁻²⁵ Bunun yanında deri ve kemik dokuları, İ/R'ye; iskelet kası ve intestinal mukozaya göre daha dayanıklıdır.

Kritik iskemi süresi; kan akımının kesilmesinden sonra, bir dokunun tolere edebildiği ve canlılığını devam ettirebildiği, azami iskemi süresidir. Kritik iskemi süresi, doku türüne ve sıcaklığına bağlı olarak değişir.²⁶ Karaciğer ve böbrekte 10-15 dakika, iskelet kasında 4 saattir. Beyin dokusunda ise bu süre, 5 dakikadan daha azdır. Bu sürenin uzaması büyük nöronal ölümlere ve enfarktüse neden olur. Kritik iskemi süresinin aşılmasından sonra gerçekleşen reperfüzyon, endotelial ve parankimal hasar ile sonuçlanır.²⁷ Kritik iskeminin süresi, farklı doku tiplerine göre değişir. Ortalama kritik iskemi süresi ise, dokunun %50'sinin hayatta kalıp %50'sinin kaybedileceği iskemi süresidir. Aksiyel paternli ve random paternli deri fleplerinde kabaca ortalama iskemi süresi 13 saattir.²⁷ Bununla birlikte, bu uygulamaların sekonder kritik iskemi süresi sadece 4.7 saattir.²⁸ Sekonder iskemi süresi, mikrocerrahi anastomoz işleminin tamamlanıp dokunun tekrar reperfüze olmasını takiben herhangi bir nedenle flep dokusunda yeniden iskemi gelişmesi durumunda, dokunun canlılığını koruyabildiği azami iskemi zamanıdır. Örnek olarak, serbet flep operasyonunda mikroklemple yerleştirilmesini takiben, anastomoz tamamlanıncaya kadar geçen süre primer iskemi süresidir. Ameliyat sonrası dönemde gelişen bir tromboz neticesinde, flep beslenmesinin bozulması ise sekonder iskemidir. Flep dokusu, sonradan gelişen sekonder iskemiye ilk iskemi (primer iskemi) kadar dayanıklı olmayacaktır. Anlaşılacağı üzere flepler, her iskemik atakta daha kısa kritik iskemi sürelerine geçiş yapmaktadırlar. Diğer bir ifade ile flepler, her iskemik atağa bir öncekinden daha fazla duyarlıdırlar.

Hangi organda olursa olsun İ/R süreci, sistemik bir enflamatuvar yanıt oluşturur.^{28,29} “Hücrel homeostaz (hücrel denge)” için gerekli olan enerji kaynaklarının tükenmesi (özellikle ATP), hücre membranında iyon dengesinin bozulmasına neden olur. Na⁺ ve Ca²⁺ iyon dengesi bozulur. Bunu asidoz ve ozmotik şok gibi klinik göstergeler ile kromatin kümelenmesi ve “piknozis” (nükleer yoğunlaşma) gibi histolojik bulgular takip eder.^{22,25}

2.2. Reperfüzyon

Reperfüzyon, iskekiye neden olan etkenin ortadan kaldırılarak iskeki sırasında engellenen kan akımının yeniden normale dönmesidir. Reperfüzyonun, iskemik dokuda enerji ihtiyacının sağlanması ve toksik metabolitlerin uzaklaştırılması gibi olumlu iki etkisi vardır. Yani reperfüzyon, iskemik hasarın düzeltilebilmesi için mutlaka gerekli bir süreçtir. İskemik dokuda veya organda kan akımı normale dönebilse dahi, iskemik doku/organ, fonksiyonlarının sadece bir kısmını geri kazanabilir. Böylece oksijenlenmiş kanın iskemik dokuya dönüşü, dokuda daha fazla hasar oluşturan bir reaksiyon sürecini başlatır.^{24,30}

Reperfüzyon hasarı; SOR, endotelial faktörler ve nötrofillerin eşlik ettiği karmaşık bir mekanizmayla gerçekleşir. Süper oksit (O₂⁻) anyonu, hidrojen peroksit (H₂O₂) ve hidroksil radikali (OH⁻), en iyi bilinen SOR türleridir. Bu ürünlerin oluşumunda nikotinamid adenin difosfonükleotid (NADPH) sistemi ile KO sistemi etkin rol oynamaktadır.³¹ Sonuçta dokularda, iskemik süreçten çok daha ciddi bir hasar meydana gelir. Hasarı asıl tetikleyen etkenin, endotel hücrelerindeki zedelenme olduğu düşünülmektedir.^{24,25,28-33} İskemi sonrası dönemde, iskemik dokudaki serbest radikallerin en önemli kaynağı, KO enzimidir. Bu enzim, “dehidrojenaz” ve “oksidaz” aktivitesine sahip olarak, iki şekilde bulunur. Çalışmalarda iskeki sırasında ksantin dehidrojenaz (KDH) enziminin Ca²⁺ aracılı bir proteaz katalizörlüğünde KO’ya dönüşümünün; intestinal dokuda 10 saniye, kardiyak kasta 8 dakika, karaciğer, dalak, böbrek ve akciğerde 30 dakika sürdüğü gösterilmiştir. Bu da değişik dokuların İ/R hasarına neden farklı oranlarda cevap verdiği ve iskeki sürelerinin her doku için farklı oluşu konusunda açıklayıcı faktörlerden biridir. Ayrıca hipoksantin ve ksantin oksidasyonu serbest radikallerin oluşumuna yol açar.^{22,33,34}

Ksantin Dehidrogenaz



Ksantin oksidaz



Sonuç olarak dokularda iskemik süreçten çok daha ağır bir hasar meydana gelir. Ayrıca reperfüzyon, organizmada istenmeyen birçok olayı harekete geçirdiği gibi kolon kanseri gibi kanser hücrelerinin metastazında da rol oynamaktadır.³⁵

2.3 İskemi - Reperfüzyon Hasarı

İskemi/reperfüzyon (I/R) hasarı; travma, beyin ya da myokard infarktüsü gibi beklenmeyen durumlarda ve organ transplantasyonu gibi nedenler ile arteriyel sisteme klempl uygulanması gibi cerrahi işlem sırasında gözlenmektedir. İskemi-reperfüzyon hasarı yalnızca doğrudan etkilenen organ ile sınırlı kalmayıp, uzak organlarda da hasar oluşumuna neden olmaktadır. Uzak organ hasarı, I/R'nin ilk ortaya çıktığı organ dışındaki dokularda özellikle böbrek ve akciğerde, gelişen önemli bir hasardır. Yapılan çalışmalarda, hastalarda yerel hasar ve sistemik inflamatuvar yanıt ile birlikte iskelet kası, bağırsak, karaciğer ve aortik oklüzyon reperfüzyonu durumlarında gelişen böbrek, akciğer veya karaciğer işlev bozukluğu ya da çoklu organ yetersizliğinin ölüme neden olduğu da bildirilmiştir. İskemi-reperfüzyon hasarının klinik yansımaları; yerel, uzak ve sistemik düzeyde etkiler olmak üzere üç grupta incelenmektedir. Yerel düzeydeki etkiler hemen hemen tüm organlarda ortak bir etyolojiden kaynaklanmaktadır. Ortaya çıkan hücrel değişiklikler ise organa özgüdür.³⁶⁻⁴⁰ Genellikle sızıntılı kapiller yatakların yol açtığı sıvı ekstrasvazyonu, doku ödemi ile belirgin olan sistemik düzeydeki etkiler ve uzak organlardaki işlev bozukluğu ise tam olarak açıklanamamıştır.

Genellikle "çoklu organ işlev bozukluğu sendromu" ile sonuçlanabilen, son derece karmaşık süreçlerin bir sonucu olarak ortaya çıktığı iddia edilmektedir.

İskemi-reperfüzyon hasarı; yetersiz O₂ sunumu ile başlayan, nötrofil ve SOR'ların rol aldığı ikincil enflamatuvar cevapla ilerleyen karmaşık patolojik bir süreçtir.⁴¹⁻⁴⁹ Dokuya giden kan akımı durduğu zaman, hücrel fonksiyon bozukluğuna neden olan zincirleme kimyasal olaylar başlar. Oksijene bağımlı metabolizma normal hücre fonksiyonlarının devamı için normal şartlarda kullanılan yoldur. Oksijen yokluğu ise anaerobik metabolizma ile sonuçlanır ve laktik asidin birikimi artar. Asidoz sonucunda hücrede normal enzim kinetikleri değişir, yüksek enerji bağları parçalanır ve hücre, hayati dengesini idame ettirebilmek için gerekli olan enerjiyi kaybeder.^{42,50-52} Organizmanın iskemiye verdiği cevap, hücre/doku türü ve iskemi süresine bağlı olarak değişir. Örneğin; insan kas dokusunda normal sıcaklıkta kritik iskemi süresi 2 saatten daha uzunken, ince bağırsakta bu değişiklikler yaklaşık 30 dakikalık iskeminin ardından başlar.⁴² Fizyolojik ve anatomik çalışmalarda kas dokusunda yaklaşık 3 saatlik iskemi sonrası geri dönüşümsüz hücrel hasarın başladığı ve 6. saatte neredeyse tamamlandığı gösterilmiştir.⁵⁰ Sonuç itibariyle iskemik hasarın derecesini gösteren iskemi alanının genişliği ve süresi iki önemli faktördür.

İskemik dokuya yeniden kan akımının sağlanmasıyla birlikte; enerji temin edilir, hasar gören hücre onarılır ve toksik metabolitler ortamdaki uzaklaştırılır. Reperfüzyon, iskemik hasarın düzelebilmesi için gerekli olmakla beraber, tehlikeli metabolik sonuçlara neden olabilir. İleri derece bölgesel doku hasarını başlatabilir ve toksik metabolitler sistemik dolaşıma geçip sistemik hasara yol açabilir. İskemi-reperfüzyonun yol açtığı doku hasarının büyük oranda reperfüzyon döneminde gerçekleştiğiyle ilgili çok sayıda çalışma bulunmaktadır.^{42,53-55} Hasarlanmaya neden olan doku perfüzyonundaki bozulma, damar permeabilitesinin artışı ve sekonder gelişen doku ödemiyle ilişkilidir. Damar endotelini koruyan ve endotel fonksiyonlarını bozacak patolojik süreçleri hafifleten ajanlar ve yaklaşımlar hasarlanmaya karşı profilaktik etkinlik göstermişlerdir.^{50-52,56}

Klinik çalışmalarda vasküler kan akımının yeniden sağlanmasından sonra, iskemik organa kan akımının tam olarak geri dönmediği gösterilmiştir. Fakat, bu perfüzyon sorununun altında yatan mekanizmalar tam olarak aydınlatılamamıştır. Bu duruma; damar lümeninde trombosit-lökosit birikimi, interstisyel sıvı birikimi (ödem),

endotelial vazorelaksanların (nitrik oksit, prostasiklinler) azalması ve sonuç itibariyle, mekanik olarak kan akımı azalmasının neden olduğu ileri sürülmektedir. Klinik açıdan bakıldığında; infarkt sahasında artma, transplant greftininin reddi, ameliyat sonrası dönemde organ yetersizliğinde artış şeklinde karşımıza çıkar. Söz konusu bu olay "*no-reflow fenomeni*" olarak adlandırılır. Bu fenomene neden olarak sıklıkla lökosit adezyonu üzerinde durulmaktadır. Örneğin, iskemi sonrası dokuda yeniden kan akımı oluşmayan kapillerlerin sayısı ile burayı infiltre eden lökosit sayısı arasında güçlü bir korelasyon saptanmıştır. Yapılan çalışmalarda nötrofillerin baskılanması ile myokard, beyin ve iskelet kasında bu oluşumun azaltılabildiği gösterilmiştir. Ayrıca SOR oluşumu önlendiğinde, kapiller akımın onarıldığı ve lökosit/endotel hücre adezyonunun engellendiği de, çok sayıda çalışma ile ortaya konulmuştur.^{45,51,57}

Travmalarda ve travma cerrahilerinde, hipovolemi ya da kanama kontrolü nedeni ile yapılan klemp ve tampon uygulamaları iskemiye neden olmaktadır. Kardiyopulmoner resüsitasyon sonrası gelişen reperfüzyon ile de İ/R hasarının olduğu gösterilmiştir. Kardiovasküler cerrahide; aort ya da periferik arter klemp uygulaması sonrası ortaya çıkan tablo, İ/R hasarı ile ilgilidir. Ayrıca serbest doku nakillerinde, işlemin doğası gereği flepler bir süre iskemiye maruz kalmakta ve anastomozu takiben reperfüzyon hasarı gelişmektedir.

2.4 İskemi –Reperfüzyon Hasarının Mekanizması

İskemi, organı veya dokuyu perfüze eden kan akımı yetersizliğine bağlı olarak metabolik ve yapısal değişiklikler ile gelişen geriye dönüşümlü veya dönüşümsüz hücre/doku zedelenmesine neden olmaktadır.⁵⁸ İskemi sonrasında hücrelerde pek çok metabolik ve yapısal değişiklikler oluşmaktadır. Bunlardan biri; iskeminin hücrede oksidatif fosforilasyonu bozarak hücre içi ATP (Adenozin 5'trifosfat) ve fosfokreatin sentezinde azalmaya yol açmasıdır. Bu durum hücre membranının ATP'ye bağımlı iyonik pompa fonksiyonunu (Na^+/K^+ ATPaz pompası) bozarak hücreye daha fazla kalsiyum (Ca^{2+}), sodyum (Na^+), su (H_2O) girmesi ve potasyum (K^+) çıkışı ile sonuçlanmaktadır.⁵⁶ İntraselüler Ca^{2+} artışı hücre için sitotoksiktir.

Nitekim yine bu dönemde hücrede iyon konsantrasyonunun değişimi ile proinflamatuvar sitokinlerin ve lökosit adhezyon moleküllerinin yapımında artış, buna

karşılık antioksidan enzimlerin aktivitesinde azalma olur. Bu durum hücreyi reperfüzyon dönemindeki hasara karşı dayanıksız kılar. İskemik dönemde ATP üretimi durduğu halde kullanımı devam ettiği için ATP'den adenozin monofosfat (AMP) ve adenozin oluşur. Adenozin, hızla hücre dışına difüze olur ve inozin ve hipoksantine parçalanır. Dolayısıyla, iskemi sonucu yüksek enerjili fosfat bileşiklerinin yıkımı, dokuda ksantin ve hipoksantin gibi pürin metabolitlerinin birikimine ve ksantin dehidrojenazın (KDH) ksantin oksidaza (KO) dönüşümüne yol açar. Normal şartlarda hipoksantin ürik asite metabolize olur. Bu reaksiyonda elektron alıcı pozisyonunda olan metabolit NAD^+ (nikotinamid adenin dinükleotidin okside formu)'dir. Ancak hipoksi ya da iskemi nedeniyle $\text{KDH} \rightarrow \text{KO}$ 'ya aktivasyonunda hipoksantin ürik asite dönüşümü, KO tarafından gerçekleşir ve bu reaksiyonda ise elektron alıcı olarak, moleküler O_2 kullanılır.⁶⁰ Süperoksid radikal türevleri; iskemi sonrasında o bölgedeki kan akımının yeniden sağlanması (reperfüzyon) ve hücre içine moleküler O_2 'nin yeniden taşınması ile birlikte, hızla oluşmaktadır.⁶¹

İskeminin ilk dakikalarında aşırı uyarılan glikolitik yol, ortamda sitrat, laktat, nikotinamid adenin dinükleotid (NADH) birikimi ve doku asidozunun oluşması ile durur. İskemik dokuda bulunan O_2 ise oksidatif fosforilasyonu devam ettirebilmek için yetersiz kalır ve glikoliz sonucu oluşan piruvatın laktata dönüşümü gerçekleşir. Böylece glikojenden ATP oluşumu ile hücre enerji kaynakları korunur. Glikoliz, laktik asit ve fosfat türevlerinin hidrolizi sonucu oluşan inorganik fosfat birikimine neden olur. Sonuç olarak, hücre içi pH düşer ve buna bağlı olarak asidoz gelişir.⁶²

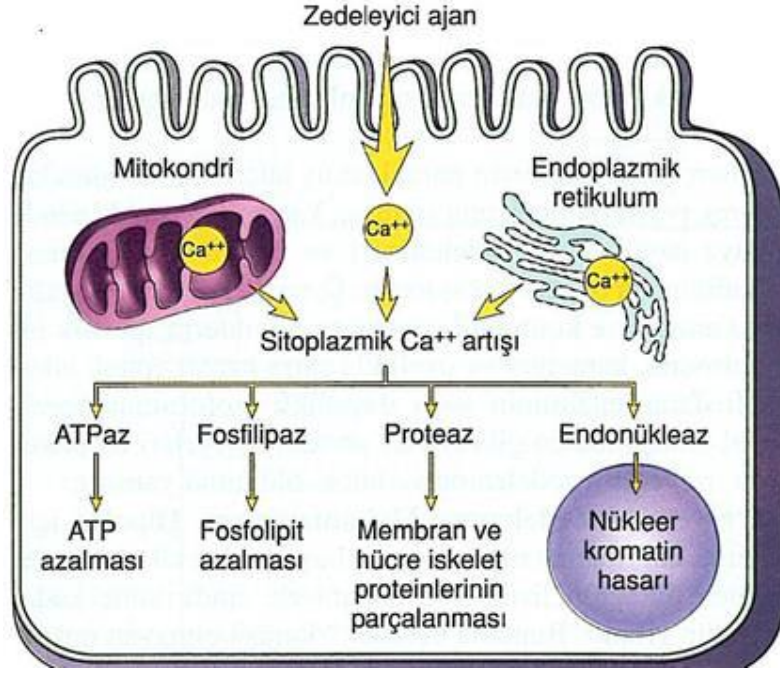
ATP kaybı intraselüler çok sayıda ve birbiriyle ilişkili sistemi genel olarak aynı anda etkiler. Bunlar⁶²:

1. Na^+/K^+ ATPaz pompasının bozulması: Fizyolojik koşullarda hücreden 3 Na^+ iyonunun ekstraselüler ortama, 2 K^+ iyonunun intraselüler ortama iletilmesi işlemi, bir ATP molekülünün ADP'ye yıkılmasıyla, metabolik enerjinin harcanmasını gerektirmektedir. Özellikle hücrede ATP aktivitesinin azalması, membranda aktif Na^+ pompasının yetersizliğine yol açarak, intraselüler Na^+ artışına ve hücredeki K^+ 'un dışarı atılmasına neden olur. Solid materyalin birikimine izoozmotik su birikimi eşlik eder ve akut hücresel şişme oluşur. Bu durum serbest kas flebi operasyonlarında karşılaşılan kas ödemi açıklamaktadır.

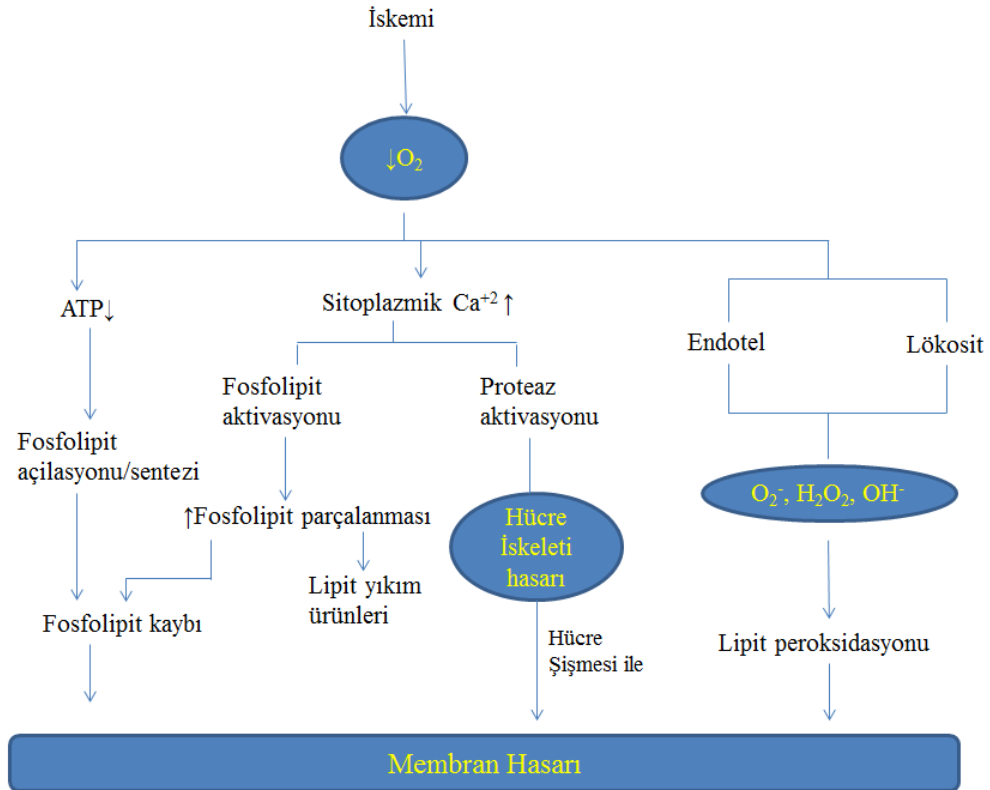
2. İntraselüler asidoz oluşumu ve buna bağlı olarak pH'nın düşmesi: Doku O₂ düzeylerindeki azalma laktat birikimine neden olur ve doku pH'sı düşer.

3. İntraselüler ortamda Ca²⁺ birikimi: Fizyolojik koşullarda, sitozolik serbest Ca²⁺ ekstraselüler düzeyi ile intraselüler düzeyi karşılaştırıldığında, intraselüler düzeyi daha düşük seviyelerde bulunur ve bunun da çoğunluğu mikokondri ve endoplazmik retikulum içinde tutulur. Bu denge membran Ca²⁺ATPaz pompası tarafından düzenlenir. İskemi veya belirli toksinler, erken dönemde sitozolik Ca²⁺ seviyelerinde artış oluşturur, bu durum mitokondri ve endoplazmik retikulumdan Ca²⁺ salınımı ve plazma membranından net Ca²⁺ geçişi ile ilişkilidir. Hücrede Ca²⁺ artışı, membran geçirgenliğinde nonspesifik artışla desteklenir. Artmış Ca²⁺, çok sayıda enzimin aktivasyonuna yol açar. Bunlar; fosfolipaz (membran hasarını başlatır), proteaz (membran ve hücre iskeleti proteinlerini parçalar), ATPaz (ATP'nin azalmasını hızlandırır) ve endonükleaz (kromatin parçalanması ile birliktedir) dir.⁶³ (Şekil1.)

4. Pürin metabolitlerinin birikimi: İskemi süresi uzadıkça ATP yıkımı başlar, dokuda ksantin ve hipoksantin gibi pürin metabolitleri birikimi şekillenir. Hipoksi ve intraselüler Ca²⁺ artışı; aynı zamanda KDH'nın, KO'ya aktivasyonuna yol açar. KDH'nın, KO'ya aktivasyonu Ca²⁺ bağımlı proteaz katalizörlüğünde gerçekleşir. Bu proteazların aktivasyonu, iskemi sırasında; Tümör Nekrozis Faktör (TNF), interlökin-1 (İL-1), interlökin-3 (İL-3), nötrofillerden salınan elastaz ve kompleman sistem aktivasyonu tarafından gerçekleştirilmektedir. Bu arada endotelde bazı proinflamatuvar ürünlerin (lökosit adhezyon molekülleri ve sitokinler) ve biyoaktif ajanların (endotelin, tromboksan A2) yapımı artarken, diğer bazı koruyucu ürünlerin (yapısal nitrikoksit sentetaz, trombomodulin) ve biyoaktif ajanların (prostasiklin, NO; nitrik oksid) yapımı baskılanır.⁶⁴ Böylece iskemi, daha sonraki reperfüzyon döneminde doku zedelenebilirliğini arttıran proinflamatuvar bir durumu başlatır.⁶³



Şekil 1. Hücre hasarında sitoplazmik Ca²⁺ artışının kaynakları ve sonuçları.



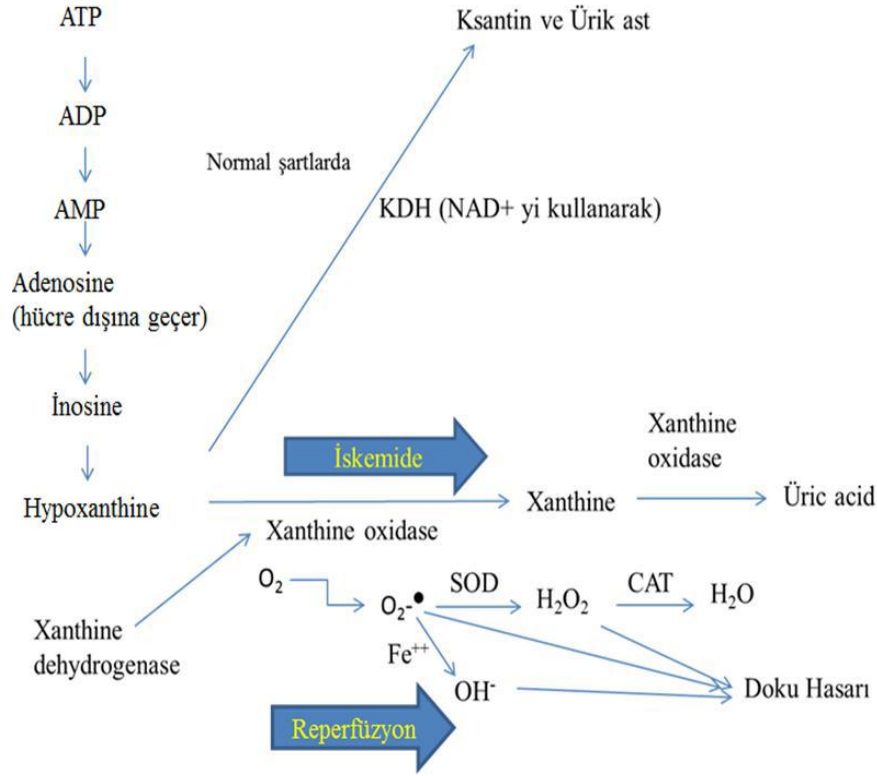
Şekil 2. İskemide membran hasarının mekanizmaları.

Membran hasarının birçok potansiyel nedeni vardır.⁶² (Şekil 2.)

İskemiye bağlı sitoplazmik Ca^{2+} artışı ile endojen fosfolipazların aktivasyonu, parçalanmaya yol açarak membran fosfolipitlerinin kaybına yol açar. İntraselüler Ca^{2+} artışı ile aktive olan proteazlar, hücre iskeletine zarar verebilirler. Fosfolipit parçalanması sonucu iskemik hücrelerde biriken bu katabolik ürünler, membranlar üzerinde deterjan etkisi yapar. Kalsiyumun bol miktarda hücre içine girmesi, mekanizmaları ne olursa olsun, yukarıda tanımlanan olaylar neticesinde, membran hasarıyla sonuçlanır (Şekil 1.).⁶²

İskeminin hücresel etkileri temel olarak:

- Membran potansiyelinin değişmesi,
- İyon dağılımının değişmesi (intraselüler Ca^{2+}/Na^+),
- Hücresel şişme,
- Hücre iskeletinin disorganizasyonu,
- Azalmış ATP,
- Artmış hipoksantin,
- Azalmış fosfokreatin,
- Hücresel asidoz,
- GSH düzeyinde azalma şeklinde özetlenebilir.⁵¹(Şekil 3.)



Şekil 3. İskemide pürin metabolizmasının gelişimi ve KDH'nın KO'ya transformasyonu, reperfüzyon ile beraber doku hasarı gelişimi.⁶⁵

2.5. İskemi/Reperfüzyon Hasarında Lökositlerin Rolü

SOR'ların önemli bir kaynağı aktive olmuş lökositlerdir; bu hücreler ayrıca salıverdikleri sitotoksik enzimler ve mikrosirkülasyonda oluşturdukları obstrüksiyonla da İ/R hasarına katkıda bulunabilirler. Çizgili kasta, İ/R periyodundan sonra lökositlerin biriktiği gösterilmiştir.⁶⁶ İskemi-reperfüzyon, lökosit aktivasyonu, kemotaksis ve lökosit endotel hücre adhezyonuna neden olur. Polimorf nüveli lökositler (PMNL) de, endotel hücrelerine benzer şekilde SOR üretme kapasitesine sahiptir. İskemi-reperfüzyon hasarında PMNL'in rolü ile ilgili bazı mekanizmalar ileri sürülmüştür. Bunlar⁶⁷:

1. Mikrovasküler oklüzyon
2. SOR'ların salınması
3. Sitotoksik enzim salınması
4. Vasküler permeabilite artışı
5. Sitokin salınımında artış şeklinde sıralanabilir.⁶⁷

Polimorf nüveli lökositlerin başlangıçtaki kemoatraksiyonları endotel hücreleri ve KO aracılığı ile gerçekleşir. Aktivasyon ve migrasyonları ise endotel hücrelerinde ve lökositlerde bulunan adhezyon molekülleri aracılığı ile olur. Lökosit adhezyon molekülleri, lökositlerde ve diğer başka hücrelerde de bulunan; gelişme, haberleşme, inflamasyon ve apoptoz gibi çok sayıda ve çeşitte biyolojik olaylarda rol alan yapılardır. Selektin grubu adhezyon molekülleri, doku hasarı olan bölgede aktive olmuş endotele, PMNL'lerin başlangıçtaki adhezyonunda rol alırlar. E, L ve P selektin olmak üzere bilinen üç üyesi vardır.

İskemi-reperfüzyon, endotelde P-selektin ekspresyonunu artırır. Bu molekül, PMNL'lerde bulunan P-selektin glikoprotein 1 adlı reseptör ile etkileşerek düşük afiniteye sahip lökosit-endotel bağlantısını oluşturur. İkinci aşamada lökosit Beta-2 integrinler ile endotelial intersellüler adhezyon molekülü 1 arasında etkileşim sonucu lökosit adhezyonu ve agregasyonu gelişir. Üçüncü aşamada platelet endotelial hücre adhezyon molekül 1 ile endotel hücre bağlantıları arasındaki etkileşim ile lökosit transmigrasyonu gelişir. Aktive lökositler ekstravasküler kompartmana ulaştınca, hasar bölgesine doğru göç etmeye başlarlar (kemotaksis). Burada aktive lökosit yanıtı şu mekanizmalar ile olur^{22,23,48,49}:

1. Fosfolipaz A2 aktivasyonu sonucu araşidonik asit metabolitleri (prostoglandin ve lökotrienler) üretilir.

2. Degranülasyon sonucu lizozomal enzimler salınır.

3. SOR'ların üretimi gerçekleşir.

Bu ürünler endotel hasarı ve doku zedelenmesinin güçlü mediyatörleridir ve başlangıçtaki inflamatuvar uyarının etkisini güçlendirir. Bazı durumlarda lizozomal enzimler hücre dışına salınabilir. Hasar yapıcı etkeni ortadan kaldırmaya veya dilüe etmeye yönelik bu inflamatuvar cevap sonucu; mikrovasküler permeabilite artışı, tromboz, ödem ve parankim hücre ölümü gerçekleşebilir. Görevini tamamlayan lökositler, apoptotik hücre ölümü ile lenfatik dolaşım vasıtasıyla ortamdan uzaklaştırılırlar.⁶⁷ Reperfüzyon sonrası, dolaşımda IL-1, IL-6 ve Tümör Nekrozis Faktor- α (TNF- α) gibi sitokinler gözlenir. Bu ajanlara karşı antagonistler kullanılarak, hem IL-1'in hem de TNF- α 'nın vasküler yaralanmaya katkıda buldukları ve endotel adezyon moleküllerini arttırdıkları gösterilmiştir.^{22,23} İskemi-reperfüzyonda sitokin salınımının olduğu bilinen bir gerçektir. Ancak sitokinlerin, permeabilite üzerine olan

etkilerinin direk mi yoksa hücre adezyon molekülleri ekspresyonu ve nötrofil adezyon aktivasyonu yoluyla mı olduğu bilinmemektedir.⁶⁸

2.6. İskemi/Reperfüzyon Hasarında Serbest Radikallerin Rolü

Yaşamın sürekliliğinin sağlanması, hareket, iş yapabilme ve büyüme gibi bütün fizyolojik olaylar, enerji tarafından sağlanır. Tüm diğer aerobik canlılar gibi, yaşamak için O₂'ye ihtiyaç duyan insanlar da, enerji gereksinimini, oksidatif metabolizma yani aerobik metabolizma sonucu elde eder. Aerobik metabolizma, karbon ve hidrojen içeren metabolitlerin, CO₂ ve H₂O'ya tamamen yükseltgenmesini kapsar.⁵⁸ Oksijen, oksidatif metabolizma sırasında enerji eldesi için H₂O'ya indirgenirken çok az bir kısmı da "serbest radikaller" adı verilen, elektronlarını kaybetmiş zararlı maddelere dönüşür. Serbest radikaller, tek elektron eksiklikleri nedeniyle başka moleküllerle kolayca elektron alışverişi yapabilir veya onlarla birleşebilirler. Böylece diğer moleküllerin yapı ve fonksiyonlarını bozabilir, hatta çok sayıda hücre ve doku hasarı meydana getirebilirler.

Elektron ve proton sayıları eşit olmayan yapı iyon olarak adlandırılır. İyonlar oldukça kararsız yapılardır ve yüksek enerjilerinden kurtulmak için ortamdaki başka atom veya moleküller ile etkileşime girerler. Serbest radikal, eşlenmemiş elektron içeren atom veya molekül olarak tanımlanır. Genelde elektronlar, atom veya molekülde çiftli halde bulunmaları nedeniyle, moleküller stabildir ve reaktif değildirler. Ancak elektron ilavesi ya da bir elektron kaybı söz konusu olduğunda molekül, reaktif hale gelir. Çeşitli mekanizmalarla organizmada oluşan serbest radikaller, hücre, doku ve organlarda hasara yol açmaktadırlar. Bu açıdan serbest radikaller, son yıllarda büyük bir ilgi alanı oluşturmaktadır. İnsanda her yıl 2 kg O₂⁻ oluştuğu bildirilmiştir.

Organizmanın aldığı O₂'nin %5'den fazlası O₂ türevi radikallere dönüşerek hasar oluşturur.^{6 9} Organizmada SOR; enerjetik, reaktif ve metabolik olmak üzere üç ana mekanizmayla oluşmaktadır. Metabolik reaksiyonlar en önemli SOR kaynağı olarak karşımıza çıkmaktadırlar. Oluşan SOR'lar yüksek derecede reaktif olmalarından dolayı, hücrelerde zararlı etkiler meydana getirmektedirler.⁷⁰ Her hücre için intrinsik oksidanlar ve antioksidanlar arasındaki dengenin fizyolojik sınırlarda tutulması doku ve organlar için oldukça önemlidir.⁷⁰⁻⁷² Singlet oksijenin (yüksek enerjili O₂, ¹O₂) eliminasyonunda

(süpürülerek temizlenmesinde), β -karoten ve vitamin A rol almaktadırlar. H_2O_2 , Selenyum (Se) içeren GSH-Px (Glutasyon Peroksidaz) enzimi tarafından metabolize edilir. Süperoksit anyonu ise, bakır (Cu) ve çinko (Zn) içeren sitoplazmik enzimler ya da mangenez (Mn) içeren mitokondriyal SOD (Süperoksit Dismutaz) tarafından uzaklaştırılır.⁷² Oksidatif strese bağlı olarak, lipidler, proteinler, enzimler, karbonhidratlar ve DNA zarar görebilirler. Membranlardaki hasarın neticesinde DNA zincirlerinde rastgele kırılmalar ve bağlanmalar meydana gelebilir. Enzim ve yapısal proteinlerin zarar görmesi hücrenin ölmesiyle sonlanabileceği gibi bu mekanizmalar, kanser, nörodejeneratif, kardiyovasküler hastalıklar ile diyabet ve otoimmün bozuklukların gelişiminde moleküler temeli oluşturmaktadır.^{68, 72, 73}

2.7. Plastik Cerrahi Uygulamalarında İskemi-Reperfüzyon Hasarı

İskemi-reperfüzyon hasarı replantasyon, serbest doku transferi, kompozit doku allotransplantasyonu ve zaman gerektiren komplike ekstremite rekonstrüksiyonu gibi durumlarda adeta kaçınılmaz hale gelmektedir. Her ne kadar mikrocerrahi tekniklerinde sağlanan gelişmeler flep kayıplarını geçmişe göre azaltmış olsa da, farklı serilerde %63'e varan flep sağkalım oranları bildirilmektedir.⁷⁴ Chen ve ark.'ın yaptığı 1142 vakayı içeren çalışmada, ilk 24 saatte serbest fleplerde dolaşım problemi %82 gibi yüksek oranda görülmüş ve bunların %10'unda reeksplorasyon cerrahisine gerek görülmüştür.⁷⁴ İskemi-reperfüzyon hasarına bağlı komplikasyonlar; morbiditeyi arttırdığı gibi, ameliyat başarısı, hastanede kalış süresi ve ekonomik yükü arttırmak şeklinde olumsuz sonuçlar da doğurmaktadır.⁷⁵ Vignaud ve ark., iskelet kasının İ/R hasarı sonrası kas fonksiyonlarını inceledikleri uzun dönemli (56 gün) çalışma sonucunda, kas fonksiyonlarının 56 gün sonunda bile ameliyat öncesi düzeye gelemediğini göstermişlerdir.⁷⁶ Aynı çalışmada iskelet kasının İ/R hasarı sonrası histolojik olarak rejenerasyon olabilese de "kalite" olarak eski fonksiyonelliğine ulaşamayabileceği ifade edilmiştir.⁷⁶ Bu veriler ışığında, özellikle fonksiyonel kas transferi açısından baktığımızda, İ/R hasarının önemi çarpıcı biçimde vurgulanmaktadır.

Günümüzde, fasiyal paralizi sonrası yüz simetrisinin yeniden sağlanması, brakial pleksus hasarı, elektrik yaralanmalarına bağlı üst ve alt ekstremite defektleri, tümör cerrahisi sonrası alt dudak onarımları ve travma sonrası oluşan defekt onarımları

gibi durumlarda, fonksiyonel serbest kas dokusu transferleri gerçekleştirilmektedir. Bu operasyonlardan sonra kas gücünün değerlendirildiği ve sıklıkla kullanılan skalalardan biri de MRC (Medical Research Council) derecelendirmesidir.⁷⁷ Buna göre:

M₀: Kasılma yok

M₁: Eser miktarda kasılma

M₂: Aktif hareket, yerçekimi engellenmiş

M₃: Aktif hareket, yerçekimine karşı

M₄: Aktif hareket, yerçekimi ve dirence karşı

M₅: Normal hareket

olarak sınıflandırılmıştır.

Fonksiyonel kas dokusu transferlerinin sonuçları incelendiğinde, örneğin Chuang ve ark.'ın yayınladığı 167 hastalık seride serbest “grasilis” fonksiyonel kas transferinde hastaların yarısının M₃ seviyesinde kas gücüne ulaştığı raporlanmıştır.⁷⁸ Barrie ve ark.'ın gerçekleştirdiği 29 hastalık serbest fonksiyonel grasilis flebi serisinde, hastaların %45 inde M₃ ve altı kas gücüne erişilmiş, 5 hastadaki yetersiz sonuç post-operatif vasküler yetersizliklere atfedilirken 2 hastada histolojik olarak sorun olmasa da fonksiyonun geri gelmediği belirtilmiştir.⁷⁹ Terzis ve Kostoupoulos'un 73 hastada üst ekstremiteye yönelik uyguladıkları fonksiyonel latissimus dorsi ve grasilis kas flebi sonuçlarını paylaştıkları çalışmada, hastaların %32'sinde M₃ derecesi altında kas gücüne ulaştıkları görülmektedir.⁸⁰ Bu sonuçlara göre, fonksiyonel beklentinin ön sırada olduğu vakalarda, İ/R hasarının daha da önem kazandığı düşünülebilir.

Günümüzde plastik cerrahinin özellikle rekonstrüksiyon basamağında, temel bilimler ile içiçe geçmiş şekilde planlanmış birçok deneysel model aracılığı ile, flep sağkalımını arttırmaya yönelik çeşitli çalışmalar sürdürülmektedir. Bu bağlamda, özellikle İ/R hasarını azaltmaya yönelik olarak, Tempol,⁸¹ KoenzimQ,⁸² Ekstraselüler SOD,⁸³ Aspartat⁸⁴ ve Melatonin⁸⁵ gibi birçok ajan denenmiş ve kısmen başarılı da bulunmuştur. Ancak bu araştırmalar, geniş ölçekli, randomize ve çok merkezli çalışmalar ile desteklenerek, henüz uygulama alanına girememişlerdir.

Bu çalışma ile, henüz plastik cerrahi deneysel araştırmalarına konu olmamış, ancak farklı branşlarda özellikle İ/R hasarı bağlamında ciddi yol alınmış olan Rho/Rho Kinaz sisteminin, iskelet kası İ/R modelindeki etkileşiminin irdelenmesi amaçlanmıştır.

2.7. Rho Kinaz

2.7.1 Özellikleri

Rho Kinaz yaklaşık 1388 amino asit dizisinden oluşmuştur. Bu dizide, amino (N) ve karboksil (C) uçları bulunmaktadır. Rho Kinaz aynı zamanda Rho Kinaz α /ROK α /ROCK2 ve Rho Kinaz β /ROK β /ROCK1 veya p160ROCK/ROCK β olarak da adlandırılmaktadır. İnsanda ROCK1 ve ROCK2 genleri sırası ile 18. kromozom (18q11.1) ve 2. kromozomda (2p24) yer almaktadır. Rho Kinaz enziminin hemen hemen her dokuda varlığı gösterilmiştir. ROCK2, beyin ve kalpte daha fazla eksprese edilir. ROCK1'in; akciğer, karaciğer, dalak, böbrek ve testiste daha fazla eksprese edildiği bildirilmiştir. Rho Kinaz'ın, N-terminalinde kinaz bölgesi, orta bölgesinde kuramsal olarak kangal gibi kıvrılmış (*coiled-coil*) bölge ve C-terminal bölgesinde "plekstrin homoloji bölgesi" bulunmaktadır. Etkinleşen Rho, Rho Kinaz'ın C-terminal parçası ile etkileşerek kinaz bölgesini etkinleştirir. Bu olay sonucunda etkinleşen Rho Kinaz (Şekil 4.)'de belirtilen substratlarını fosforile ederek çeşitli hücre içi olaylara katkıda bulunmaktadır.⁸⁶⁻¹⁰²

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

CPI-17, *17-kDa protein kinase C-potentiated inhibitory protein of protein phosphatase-1*; CRMP-2, *collapsin response mediator protein-2*; ERM, *eşrin-radiksin-moesin*; ZIPK, *zipper interacting-kinase*.

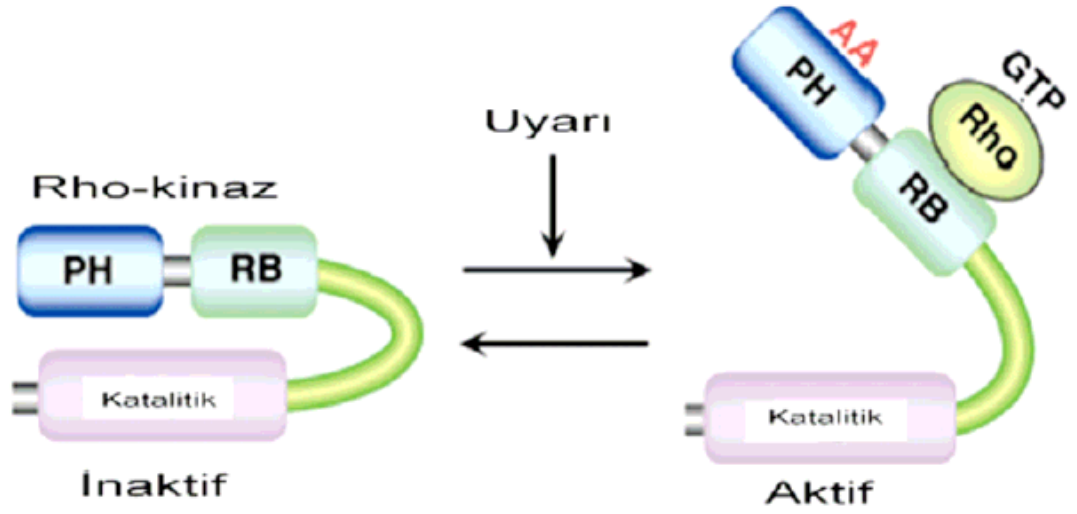
Şekil 4. Rho Kinaz'ın substratları

2.7.2 Ekspresyon ve Etkinliğinin Dzenlenmesi

Küçük G proteinleri, öteki G proteinleri gibi, guanozin difosfat (GDP) ve guanozin 5'-trifosfat (GTP) ile özgül olarak etkileşirler. Ayrıca küçük G proteinler, GTP'az etkinliğinden sorumlu olan gerekli amino asit dizilimine ve efektörleri ile etkileşmek için ayrı bir bölgeye sahiptirler. Sentezlendikten sonra, lipitler ile translasyon (protein sentezi) sonrası değişikliklere gereksinim duyarlar. Bu lipit yapıları genellikle, Palmitoil (P), Farnesil (F) ve Geranilgeranil (GG)'dir. Küçük G proteinlerinin lipit modifikasyonu, bunların membrana ve düzenleyicilere bağlanmaları ve alt efektörlerini uyarabilmeleri için gereklidir. Küçük G proteinlerinin GDP'ye bağlıyken etkin olmayan ve GTP'ye bağlıyken etkin olan olmak üzere birbirine dönüşebilen iki biçimi bulunmaktadır (Şekil 5.).

Rho etkinliği siklik olarak düzenlenmektedir. Rho etkinliğinin; GTP'az etkinleştirici protein (GAP) ve GDP ayrışma inhibitörü (GDI) olmak üzere iki negatif ve guanin nükleotit değiştirici faktör (GEF) olmak üzere bir pozitif düzenleyicisi bulunmaktadır. Dinlenme durumundaki hücrelerde Rho-GDP ayrışma inhibitörü (Rho-GDI), GDP-Rho'ya bağlandıktan sonra, onun membrandan ayrılmasına neden olarak sitozole (hücre içi) geçmesini sağlamaktadır. Hücreler bazı agonistler ile uyarıldığında Rho'ya özel GEF'ler, GDP'nin ayrılmasını ve GTP'nin bağlanmasını başlatarak Rho'nun etkinliğini arttırmaktadırlar. GTP-Rho C-terminali geranilgeranillenmiş kuyruğu ile hücre membranına hedeflendikten sonra özgül hedefleri ile etkileşmektedir. GAP, Rho'nun intrinsik GTPaz etkinliğini hızlandırarak ve onu etkin olmayan GDP-Rho'ya dönüştürerek negatif regülatör gibi çalışmaktadır. GAP, Rho'nun intrinsik GTP'az etkinliğini arttırarak GTP'ye bağlı etkin biçiminin etkinliğini önlemektedir. Bu GDP/GTP dönüşüm reaksiyonunun hız kısıtlayıcı basamağı, Rho'nun GDP'ye bağlı olan biçiminden, GDP'nin ayrılmasıdır. Bu reaksiyon oldukça yavaştır ve GEF tarafından kontrol edilmektedir. Rho'nun etkinliği G12 ve G13 proteinleri ile düzenlenmektedir. G12 ve G13 küçük moleköl ağırlıklı GTP bağlayıcı Rho proteinini etkinleştirir. G12/G13 aynı zamanda, hücre iskeleti olaylarını da düzenleyebilen Na^+/H^+ değiş-tokuş proteinini de uyarmaktadır. Lipit yapısında kalsiyum duyarlaştıracı moleküller olan sfingosin-1-fosfat(S1P), sfingofosforilkolin (SPC) ve lizofosfatidik asit (LPA) RhoA/ROCK yolunu etkinleştirmektedirler. Bir G proteini olan G13'ün, Swiss

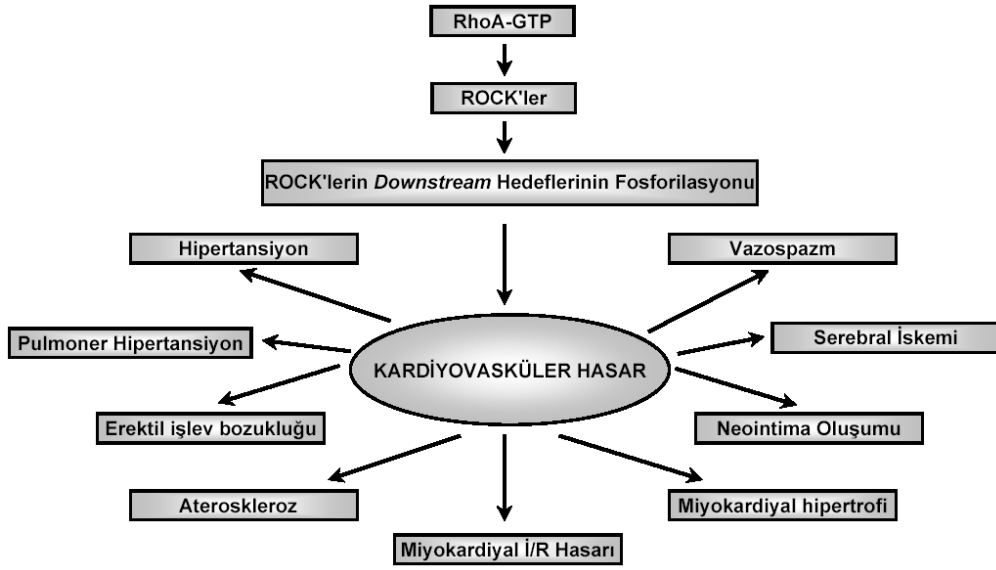
3T3 kültür fibroblastlarında Rho'yu etkinleştirmek için LPA (lizofosfatidik asid) reseptörleri ile kenetlendiği bildirilmiştir. Ayrıca, epidermal büyüme faktörü reseptörünün, G13 aracılığı ile Rho'nun etkinleşmesi ve stres lifleri oluşumu yolunda yer aldığına ilişkin veriler bulunmaktadır. Botulinum toksini C3, Rho'yu özgül olarak ADP-ribozillediğinden dolayı C3 toksini Rho'nun özgül inhibitörü olarak kabul edilmektedir. Rho, hücre bölünmesindeki bölünme yarığının oluşmasında yer alan miyozin II ve aktin filamentlerinin işlevleri için gereklidir. Bunun yanı sıra, sitokinez boyunca, hücrenin kasılma işlevi için de Rho sinyal yolu kullanılmaktadır. Rho Kinaz, aynı zamanda miyozin fosfatazi inhibe ederek de bölünme yarığının oluşmasına katkıda bulunabilir. Ayrıca, Rho'nun bazı işlevleri formin proteinleri aracılığı ile gerçekleşebilmektedir. Formin proteinleri, aktin polimerizasyonunda görev alırlar. Ayrıca, hücre hareketi ve mikrotübül oluşumunda rol alırlar. Rho Kinaz, radiksin (aktini hücre zarına bağlayan hücre iskeleti proteini) proteinini fosforilleyerek hücre iskeletinin plazma mebranına bağlanmasını düzenleyebilmektedir. Rho ve Cdc42'nin (Cell Division Control Protein 42) doğrudan formin proteinlerinin bazı bölgeleri ile etkileştiği ve forminlerin yeni aktin polimerizasyonu ile sinyal yolu arasında bağlantı kurduğu da gösterilmiştir. Rho Kinaz enziminin, düz kas hücrelerinde F-aktin, kalmodulin ve tropomiyozin bağlayıcı bir protein olan kalponini fosforile ettiği ve böylece kalponin-F-aktin bağlanmasını engellediği bildirilmiştir. Kalponinin bazik izoformunun, miyozin fosfataz ile defosforile edildiği, bu olayın ise kasılma ile ilişkili olduğu da gösterilmiştir. Fosforile olmamış kalponin F-aktine bağlanarak miyozin ATP'az etkinliğini önlemektedir; fosforile olduğunda ise bu özelliklerini kaybetmektedir. Ayrıca, Rho Kinaz ile miyozin ve adusin proteinlerinin fosforilasyonunun fibroblastlarda mikrovilüse benzeyen yapıların oluşmasında önemli rol oynadığı bildirilmiştir.⁸⁶⁻¹⁰⁷



Şekil 5. Rho Kinaz etkinliğinin düzenlenmesi

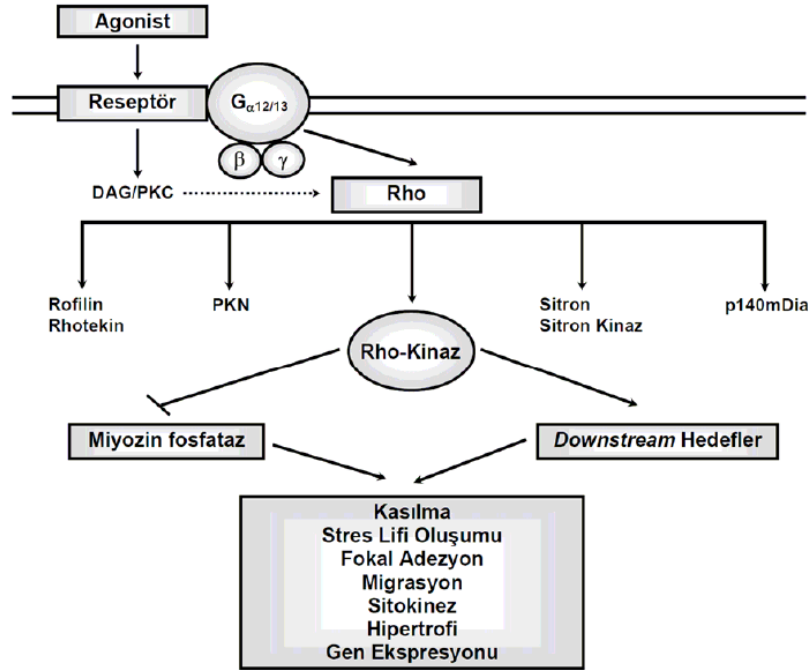
2.7.3 Patolojik Olaylardaki Rolü

Fasudil ve Y-27632 gibi seçici Rho Kinaz inhibitörleri ile yapılan klinik öncesi ve klinik çalışmalarda Rho Kinaz'ın; kardiyovasküler, santral, genitoüriner ve solunum sistemleri ile ilgili olarak ortaya çıkan çeşitli hastalıkların patogenezinde önemli rol oynadığı gösterilmiştir. Bunlar arasında; damar düz kası hücrelerinin aşırı kasılması sonucu oluşan serebral vazospazm, koroner vazospazm, hipertansiyon, pulmoner hipertansiyon gibi hastalıklar bulunmaktadır. Arteriyosklerotik hastalıklardan; anjina, myokard infarktüsü, restenoz, inme (*stroke*), hipertansif vasküler hastalık, kalp yetersizliği, kardiyak allograft vaskülopatisi ve ven yama (*graft*) hastalığı diğer bir gruptur. Ayrıca bronkiyal spazm, glokom, osteoporoz, erektil işlev bozukluğu ve bazı kanser türlerinde de sorumlu bulunmaktadır. ROCK'ların çeşitli kardiyovasküler hastalıklardaki rolü Şekil 6'da, kardiyovasküler hastalıkların patogenezi ile ilişkili mekanizmalardaki rolü ise Şekil 7'de özetlenmiştir.⁸⁶⁻¹⁰⁷



Şekil 6.ROCK'lerin çeşitli kardiyovasküler hastalıklardaki rolü.

ROCK'lerin downstream efektörleri arasında miyozin hafif zincir kinaz, miyozin hafif zincir, ezrin-radiksin-moesin proteinleri, LIM kinazlarve adusin gibi moleküller bulunmaktadır. GTP, guanozin 5'-trifofosfat; İ/R, iskemi/reperfüzyon; ROCK, Rho ile ilişkili kinaz.



Şekil 7.Rho Kinaz'ın çeşitli kardiyovasküler hastalıkların patojenezindeki rolü.

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

3. GEREÇ VE YÖNTEM

Bu çalışma, Çukurova Üniversitesi Rektörlüğü Deney Hayvanları Etik Kurul Başkanlığı'nın onayı alınarak, Çukurova Üniversitesi Tıp Fakültesi Deneysel Tıp Araştırma ve Uygulama Merkezi (DETAUM) ve Çukurova Üniversitesi Tıp Fakültesi Farmakoloji Anabilim Dalı Laboratuvarı'nda gerçekleştirildi. Çalışmada, 24 adet, ağırlıkları 20-30 g arasında değişen *Swiss albino fareler* kullanıldı. Uygun kafeslerde, oda sıcaklığında ve 12 saat karanlık, 12 saat aydınlık ortamın sağlandığı koşullarda barındırıldı. Deneklerin beslenme ihtiyaçları, standart laboratuvar yemi ve su verilerek düzenli olarak karşılandı.

3.1. Çalışma Grupları

24 adet fare iki gruba ayrılarak incelendi.

Grup 1 (n=12): (Kontrol grubu) İntraperitoneal anestezi ile fareler 8 saat anestezi altında tutuldu. Sekiz saatin sonunda “biceps femoris” kasından biyopsi alındı.

Grup 2 (n=12): (Deney grubu) İntraperitoneal anesteziyi takiben farelerin “trochanter majus” seviyesinden turnike uygulanarak 4 saat boyunca unilateral alt ekstremitesi iskemiye maruz bırakıldı. Takiben turnike çözülerek 4 saat reperfüzyon oluşturuldu. Sekiz saatin sonunda aynı ekstremiteden “biceps femoris” kas biyopsisi alındı.

3.2. Cerrahi Yöntem

Tüm cerrahi işlemler 100mg/kg ketamin ve 10mg/kg ksilazin i.p. anestezisi altında yapıldı. Yeterli anestezi derinliği sağlandığına emin olunduktan sonra “trochanter majus” seviyesinden turnike uygulandı¹⁰⁸ ve 4 saat boyunca ekstremitte iskemiye maruz bırakıldı (Şekil 8). İşlemi takiben 4. saatin sonunda turnike çözülerek, sonraki 4 saat boyunca reperfüzyonun gelişmesi sağlandı. Reperfüzyon periyodu akabinde kas biyopsisi alındı. Kas biyopsisi için “biceps femoris” kullanıldı. İlk olarak Lee ve ark. tarafından tariflenen “biceps femoris” kas flebi modeli çeşitli çalışmalarda

kullanılmıştır.^{109,110} İskemi-reperfüzyon siklusu sonrası tüm fareler sakrifiye edildi. Sağ “biceps femoris” kası tamamen eksize edildi ve orta segment histolojik çalışma, lateral-medial segmentler ise ELISA için ayrıldı.



Şekil 8. Dört saat iskemi sonucunda sağ arka ekstremitede oluşan siyanoz

3.3. Doku Homojenatı Süpernatantlarının Hazırlanması

Kas örneklerinin alınmasını takiben dokular -20°C 'de donduruldu ve saklandı. Ependorf içinde -20°C 'de dondurulmuş dokuların üzerine gram başına 3ml RIPA (Radio-Immunoprecipitation Assay) buffer, 30 μl PMSF (fenylmetanesulfonylfluoride), 30 μl sodyum vanadat, 30 μl proteaz inhibitörü eklenildi ve ultrasonik parçalama cihazıyla buz üzerinde dokular parçalanarak homojenatlar elde edildi. Homojenatlar 10.000 RPM'de 10 dakika santrifüj edilip üstte ayrılan kısımlar (süpernatantlar) alınıp, alttaki çökeltiler (pelletler) atıldı.

3.4. Doku Homojenatı Süpernatantlarında Rho-kinaz etkinliği, Rho-kinaz protein ekspresyonu ve RhoA protein ekspresyonu ölçülmesi

Doku homojenatlarından hazırlanan süpernatantlarda Rho Kinaz etkinliği “ROCK activity assay kit, Cell Biolabs Inc”, kullanılarak prospektüsünde yazıldığı biçimde *enzyme-linked immunosorbent assay* (ELISA) yöntemi ile ölçüldü. Ayrıca Rho-kinaz ve Rho-A protein düzeyleri “Cusabio Biotech Co. ROCK ELISA Kit” ve “RHOA ELISA Kit” kullanılarak ölçüldü. Literatürde ELISA yöntemi kullanılarak planlanmış benzer yapıda çalışmalar mevcuttur.¹¹¹⁻¹¹⁴

3.5. Protein Düzeyi Standardizasyonu

Homojenize edilmiş dokuların protein miktar tayini, Bradford yöntemi ile yapıldı. Sığır serum albumini (1µg/ml) kullanılarak 1, 2, 3, 5, 7, 8, 10 (µg/ml) konsantrasyonlarında standart hazırlanıp, her bir örnekten 10 µl alınarak distile su ile 100 µl’ye tamamlandı. Standart ve örneklerin üzerine 1ml Bradford solüsyonu eklenip vorteksle karıştırıldıktan sonra spektrofotometrede 595 nanometre dalga boyunda absorbans miktarları manuel olarak ölçüldü. "Prism" programında çizilen standart eğriye göre protein miktar tayini µg/µl cinsinden yapıldı.

3.6. Histopatolojik İnceleme

Eksize edilen “biceps femoris” kası segmentleri %10 formalin solüsyonunda 24 saat süreyle tespit edildi. Rutin takipten geçirilen dokular parafine gömüldü. Parafin bloklardan alınan 5 µm kalınlığındaki kesitler hematoksilin eosin (H&E) ile boyandı. Hazırlanan boyalı preparatlardaki tüm kesitler Nikon Eclipse E 600 ışık mikroskobunda incelendi.

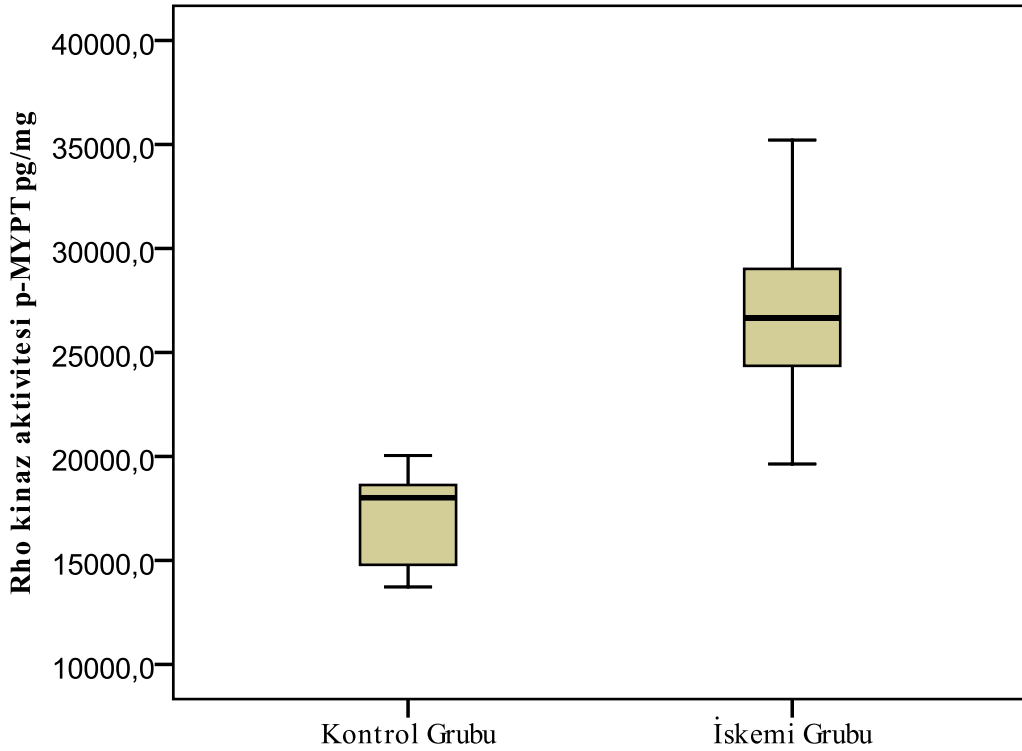
3.7. İstatistiksel Analiz

Verilerin istatistiksel analizinde SPSS 17.0 paket programı kullanıldı. Sürekli ölçümler ortalama ve ortanca (minimum - maksimum) olarak özetlendi. Gruplara göre sürekli ölçümlerin karşılaştırılmasında parametrik test Mann Whitney U testi kullanıldı. Tüm testlerde istatistiksel önem düzeyi 0.05 olarak alındı.

4. BULGULAR

4.1 Rho-Kinaz Aktivitesi

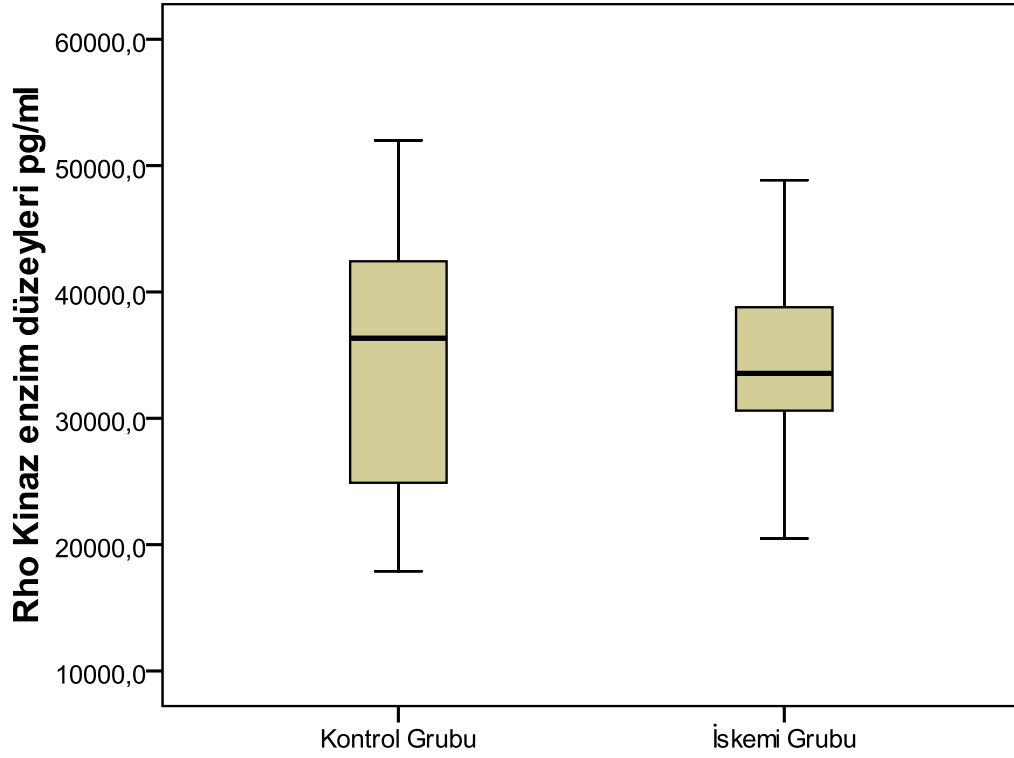
Rho Kinaz enzim aktivitelemi incelendiğinde; kontrol grubunun ortanca değeri 18020 (13724-20035) pg/mg iken, iskemi-reperfüzyon grubunda ortanca 25845 (14559-35213) pg/mg değerini aldığı saptandı. İskemi-reperfüzyon grubunda Rho-Kinaz aktivitesinin kontrol grubuna göre anlamlı olarak arttığı gözlemlendi.(p=0.004) (Şekil 9) (Tablo 1)



Şekil 9. Gruplara göre Rho Kinaz Aktivitesi (p-MYPT pg/mg) Dağılımı
p-MYPT, fosforile miyozin fosfataz hedef subunitesi. Rho Kinaz aktivitesi enzimin son ürünü olan p-MYPT referans alınarak ölçüldü. İskemi reperfüzyon grubunda Rho Kinaz aktivitesi anlamlı olarak daha yüksek bulundu.(p<0.05)

4.2 Rho-Kinaz Ekspresyonu

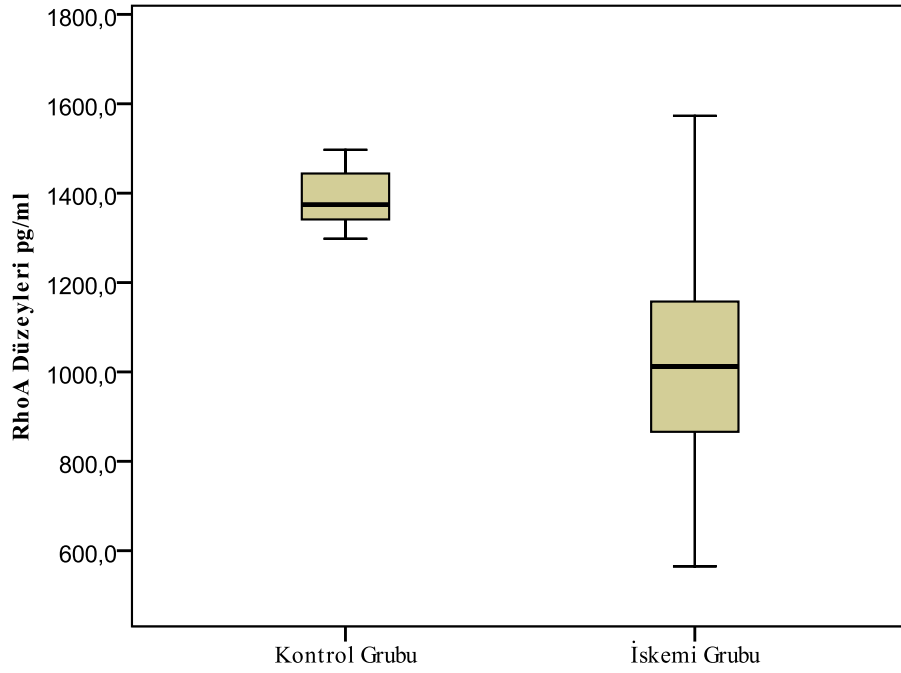
Rho Kinaz enzim düzeyleri incelendiğinde; kontrol grubunun ortanca değeri 36347 (17895-52001) pg/ml iken, iskemi-reperfüzyon grubunda ortanca 32791(15352-48847) pg/ml değerini aldığı saptandı. Gruplar arasında istatistik anlamlı bir fark olmadığı görüldü.(Şekil 10.) (Tablo 1)



Şekil 10. Gruplara göre Rho Kinaz enzim düzeyi (pg/ml) dağılımı
Kontrol ve iskemi –reperfüzyon grupları arasında anlamlı fark bulunmadı.

4.3 Rho-A protein ekspresyonu

Rho-A protein ekspresyonları incelendiğinde; kontrol grubunun ortanca değeri 1369(998-1644) pg/ml iken, iskemi-reperfüzyon grubunda ortanca 1012 (565-1573) pg/ml değerini aldığı saptandı. İskemi-reperfüzyon grubunda Rho A düzeyleri kontrol grubuna göre anlamlı olarak düşük bulundu. ($p=0.0001$) (Şekil 11) (Tablo 1)



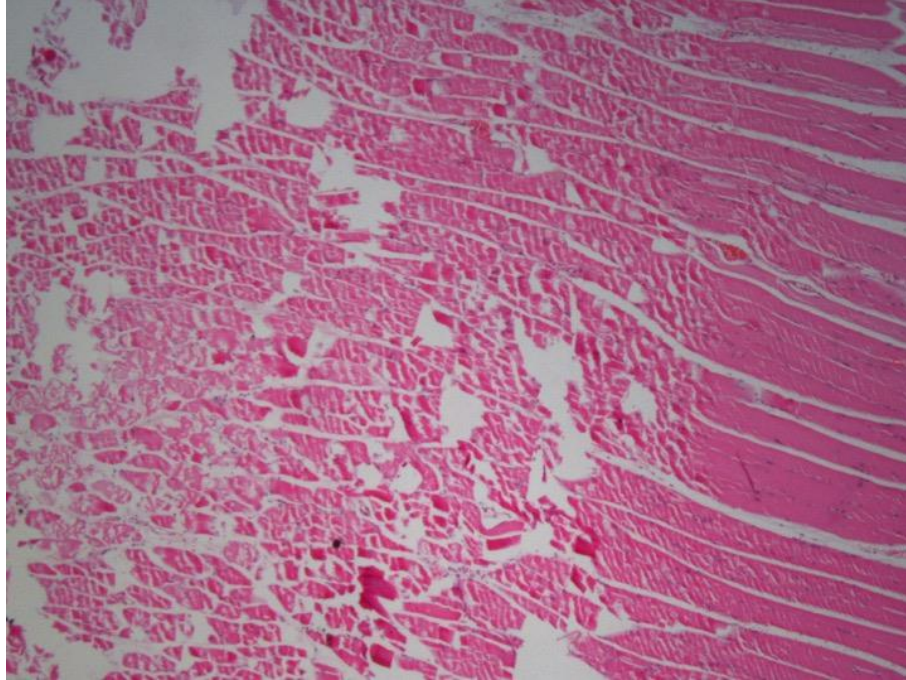
Şekil 11. Gruplara göre RhoA protein düzeyi (pg/ml) dağılımı
İskemi-reperfüzyon grubunda RhoA protein düzeyi kontrol grubuna göre anlamlı olarak daha yüksek bulundu.($p<0.05$)

Tablo 1. Gruplara göre Rho A düzeyi, Rho Kinaz aktivitesi ve Rho Kinaz düzeyi dağılımları. Ort, Ortalama; Med, Median; p-MYPT, Fosforile miyozin fosfataz target subunit

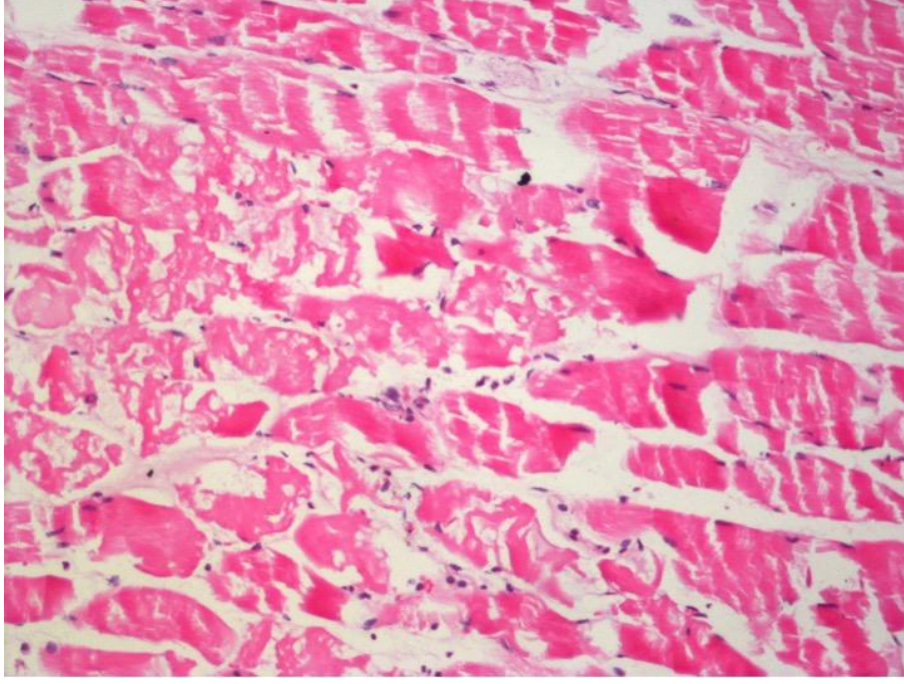
	Kontrol		İskemi		P
	Ort.	Med (Min-Maks)	Ort.	Med (Min-Maks)	
RhoA Düzeyleri pg/ml	1352, 4	1369(998-1644)	1025, 9	1012(565-1573)	0, 004
Rho kinaz aktivitesi p-MYPT pg/mg	17091, 0	18020(13724-20035)	25955, 8	25845(14559-35213)	0, 0001
Rho Kinaz enzim düzeyleri pg/ml	34548, 9	36347(17895-52001)	33209, 3	32791(15352-48847)	0, 630

4.4 Histopatolojik Değerlendirme

İskemi-reperfüzyona maruz bırakılan fare arka ekstremitesine ait “biceps femoris” kas doku örneklerinin ışık mikroskobu altında incelenmesi sonucunda kas liflerinde nekroz alanları olduğu gözlemlendi.(Şekil 12. ve Şekil 13.)



Şekil 12. Kas liflerinde iskemiye sekonder balonlaşma dejenerasyonu ve nekroz alanları (H&E×100) H&E, hematoksilin ve eozin



**Şekil 13.Kas liflerinde iskemiye sekonder nekroz alanları (H&E×200)
H&E, hematoksilen ve eozin**

5. TARTIŞMA

Arteriyel ya da venöz kan akımı azalmasına bağlı organ ve dokunun yetersiz perfüzyonu sonucu bu doku veya organların oksijenden yoksun kalması şeklinde tanımlanan iskemi, hücresel enerji depolarının boşalması ve toksik metabolitlerin birikmesi sonucunda hücre ölümüne yol açmaktadır. İskemik dokuya hem hücrenin rejenerasyonu, hem de toksik metabolitlerin temizlenmesi için yeniden kan akımı gerekir. Ancak, iskemik dokunun reperfüzyonu, dokuda paradoksal olarak sadece iskemi ile oluşan hasara göre çok daha ciddi bir hasara yol açabilir.⁴

İskelet kası iskemi-reperfüzyonu ile ilgili yapılan farklı çalışmalarda kritik iskemi süreleri 2, 5 saat ile 4 saat arasında bulunmuştur.^{42,115,116} Kritik iskemi süresi; bir doku iskemiye maruz kalmaya başladığı andan itibaren ATP depolarını kullanmaya başladığı ana kadar geçen süredir. Bu dönemde iskelet kası glikojen depoları ve fosfokreatini kullanarak ATP rezervlerini korur. ATP depolarını kullanmaya başlaması ile birlikte artık reperfüzyon bile başlasa, bir miktar hücre ölümü kaçınılmazdır. Hücre ölümünün dokunun yarısını kapsayacağı süre ise ortalama kritik iskemi süresidir. Farklı çalışmalarda iskelet kası için farklı kritik iskemi süreleri bulunmasının temel nedenleri araştırıldığında; vücut ısısı, kas tipi ve kollateral dolaşım gibi 3 temel faktörün etkili olduğu gösterilmiştir.¹¹⁶ Bu bilgilerin klinik düzeyde önemi, özellikle replantasyon ve serbest kas dokusu transferi gibi iskeminin kaçınılmaz olduğu durumlarda, anastomozun güvenli süre aralığında tamamlanması zorunluluğudur. Kliniğimizde yürüttüğümüz mikrocerrahi operasyonlarında genel olarak 1,5 saatte anastomoz aşaması bitirilmektedir. Çalışmamızda daha önce tanımlanmış olan turnike yöntemi uygulanmış ve iskemi süresi olarak 4 saatlik periyod tercih edilmiştir. Bu sürenin seçilmesindeki neden, hem kontrol grubuna göre dokuda nekroz oluşturulabildiği hem de dokunun tamamının nekroza gitmediği ideal bir süre olmasıdır. Bu sayede uygun kıyaslamalar yapılabilmektedir.¹⁰⁸⁻¹¹⁰

Rho/Rho-kinaz sinyal ileti mekanizmasının; hücre membranı şekil değişiklikleri, migrasyon, proliferasyon, sekresyon, invazyon, gen ekspresyonu, adezyon ve hücre bölünmesinde rol aldığı gösterilmiştir. Ayrıca, "aktin hücre iskeletinin" kontrolü ve stres liflerinin oluşmasında rol aldığı bilinmektedir. Rho Kinaz, hücresel mikrotübül ağına

etki ederek veziküler transport olaylarında da görev alır. İnflamasyon ve oksidatif strese, sinyal iletiminde rolü bulunmaktadır. Düz kas hücrelerinin Ca^{+2} duyarlılığını miyozin fosfataz aktivitesini inhibe ederek düzenlediği bilinmektedir. ROCK, GTP-bağlayıcı küçük Rho proteini efektörlerinden biri olarak tanımlanmıştır.^{13,99,103,117}

Son zamanlarda birçok nedenden dolayı Rho/Rho kinaz yolağı, kardiyovasküler sistemin yanısıra serebral, hepatik ve renal perfüzyon ile ilgili çalışmalara konu olmuştur. Patolojik olarak önemli 5-HT (5-hidroksitriptamin), OksiHb (oksihemoglobin), AII (anjyotensin-2) ve ET-1 (endotelin-1) gibi uyarıcı faktörler, çeşitli kardiyovasküler hastalıklarda RhoA-Rho Kinaz sinyal yolunu uyararak suretiyle etkili olmaktadır.¹¹⁸ Estrojenin serebral dolaşımında ROCK aktivitesini bastırıldığı ve böylece menapoz öncesi kadınlarda serebrovasküler hastalık insidansının azaltılmasına katkıda bulunduğu gösterilmiştir.¹¹⁹ Hipertansiyon oluşturulan birçok hayvan deneyinde, arterlerde GTP bağlı RhoA'nın doğrudan ölçülmesi ile, bu tür patolojik durumlarda ROCK aktivasyonunun yükselmesinden RhoA aktivitesindeki artış sorumlu tutulmuştur.^{120,121} Koroner vazospazm modeli kullanılan çalışmalarda fasudil ve hidroksifasudil gibi ROCK inhibitörlerinin koroner vazospazmı inhibe ettiği belirtilmiş,^{122,123} ROCK aktivitesinin, miyozin fosfatazın baskılanması sonucunda MLC (miyozin hafif zincir) fosforilasyonunu ve koroner spazmı kuvvetlendirmek suretiyle arteriosklerotik koroner lezyonları arttırdığı tespit edilmiştir.¹²⁴ Sato ve ark. tarafından gerçekleştirilen köpek subaraknoid kanama modelinde, ilk kez Rho kinaz sisteminin serebral vazospazmı etkili olduğu gösterilmiştir.¹²⁵ Bir çok dokunun perfüzyonu üzerinde etkileri bulunduğu anlaşılan Rho-ROCK ileti sistemi ile ilgili bir sonraki aşama, İ/R çalışmaları olmuştur.

Rho-Rho kinaz sinyal ileti yolunun; beyin, testis, böbrek, myokard, diyafram, karaciğer, ileum gibi dokularda oluşan İ/R hasarında rolü olduğunu gösteren çalışmalar literatürde geniş yer kapsamaktadır.¹²⁶⁻¹³⁰

Sıçanlarda renal arterin klemplenmesi sureti ile oluşturulan iskemi-reperfüzyon hasarının Rho-kinaz inhibitörü Y-27632 nin, gerek iskemi öncesi gerek iskemi sonrası kullanımı ile azaltıldığı bildirilmiştir.¹²⁶ Takeda ve ark. tarafından yapılan sıçan karaciğer iskemi-reperfüzyon modelinde, Rho-kinaz inhibitörü kullanımının karaciğer fonksiyon testleri ve histolojik yapıda anlamlı olarak iyileşmeye neden olduğu belirtilmiştir.¹²⁷ Testiküler iskemi modeli olarak, testiste torsiyon-detorsiyon oluşturulan

sıçanlarda ROCK düzeylerinin arttığı raporlanmıştır.¹²⁸ Ancak yaptığımız geniş literatür taramasında, iskelet kasında Rho/Rho Kinaz yolunun etkinliği ve İ/R hasarındaki rolü ile alakalı sadece tek bir çalışmaya rastlanılmıştır. Sarı ve ark.'ın 2014 yılında yayınladıkları makalede, sıçan alt ekstremitesinde (gastroknemius kası) ve uzak organ böbrekte, İ/R hasarının gelişmesinde, Rho-ROCK yolağının etkisinin olduğunu dolaylı olarak göstermişlerdir.¹³¹ İlgili çalışmada, "gastroknemius kası" İ/R modelinde artış gösterdiği tespit edilen nitrotirozin (peroksinitrit oluşumu nedeni) ve MDA (malondialdehid) seviyelerinin, Rho kinaz inhibitörü varlığında azaldığı belirtilmiştir.

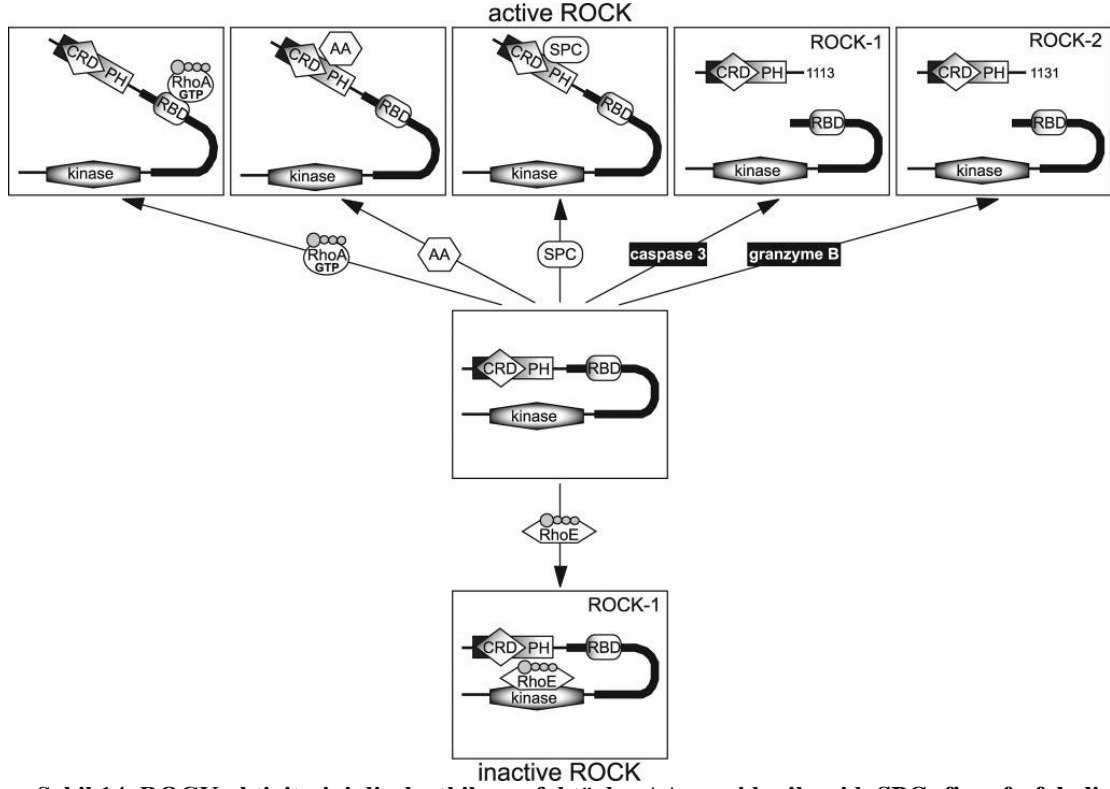
Flep cerrahisi kendi içerisinde kullanılan dokuların içeriğine ve defektin özelliklerine bağlı olarak değişiklikler gösterir. Flep cerrahisinde kullanılan dokulardan bir tanesi de, kas dokudur. Kas flepleri; üzerindeki deri ile birlikte veya tek başına, sıklıkla defekt onarımlarında kullanılırlar. Kas fleplerinde yaşanabilecek başarısızlığın temel nedeni, flep kanlanmasındaki yetersizliklerdir. İskemiye maruz kalan dokuda, öncelikle akut hücresel şişme ile başlayan geri dönüşümlü değişiklikler meydana gelir. Eğer bu evrede iskemi ortadan kalkmaz, doku reperfüze olmaz ise, mitokondri dış zarı parçalanması gibi geri dönüşümsüz değişiklikler oluşmaya başlar. Müdahale edilmezse süreç, hücre nekrozu ile sonuçlanır. Hücre nekrozunu engellemenin en önemli yolu, reperfüzyonun sağlanmasıdır. Bununla birlikte yukarıda değinildiği üzere reperfüzyonun kendisi "reperfüzyon hasarı" olarak adlandırılan patofizyolojik duruma yol açmaktadır.⁴ Bu çalışmada iskelet kası iskemi-reperfüzyon modeli kullanılarak literatür ışığında Rho-Rho kinaz ileti sisteminin nasıl etkilendiği belirlenmek istenmiştir.

Çalışmamızda Rho kinaz enzim aktivitesinin İ/R grubunda kontrol grubuna göre anlamlı şekilde arttığı görüldü. Bu sonuç literatürde yer alan birçok İ/R çalışmasında da benzer şekildedir. Bao ve ark.'ın 2004 yılında yayınladığı çalışmada, myokard İ/R hasarının ROCK aktivitesini arttırdığı ve inhibisyonu ile infarkt alanının azaldığı rapor edilmiştir.¹⁶ İskemi-reperfüzyon hasarında RhoA ve efektörü ROCK'un aktive olduğuna dair literatürde birçok çalışma bulunmaktadır.¹³¹⁻¹³⁸ Hipoksi, reaktif oksijen türleri (ROS), noradrenalin, endothelin-1 ve anjiyotensin-2, Rho kinazın potent stimüle edicileridirler.^{103,134} Her ne kadar reaktif oksijen türleri çalışmamızda direk olarak ölçülmüş olmasa da İ/R hasarının doğal sonucu olarak, artmış Rho kinaz aktivitesi ROS artışına bağlanabilir. Zira Rho Kinaz düzeyleri karşılaştırıldığında kontrol grubu ile İ/R

grubu arasında anlamlı fark bulunamamıştır. Yani Rho Kinaz ekspresyonunda bir artıştan ziyade enzimin direk aktivasyonunda artış olduğu düşünülebilir. Sıçan gastrik düz kasında oksidan stres ile indüklenmiş yanıtlar üzerinde Rho-Rho-kinaz aktivitesinin incelendiği benzer bir çalışmada, “oksidan stresin” Rho Kinaz protein düzeylerini etkilemeden, Rho Kinaz aktivitesini arttırdığı gösterilmiştir.¹¹⁷ Anlaşıldığı kadarı ile İ/R uyguladığımız modelde ROCK ekspresyonundan ziyade enzimin direk aktive olması, kinaz aktivitesini arttırmaktadır. Uygulanan modelin kronik iskemi modeli olmaması bu durumu açıklayabilir.

Anlamlı farkın oluştuğu diğer bir sonuç, İ/R grubunda kontrol grubuna göre RhoA protein miktarının azalmasıdır. İskemi-reperfüzyon modeli kullanılan çalışmaların çoğunda, RhoA ekspresyonu Rho kinaz ile korele artış göstermektedir.^{16,128,131,135} Ancak sonuçlarımız bu anlamda literatürün bir kısmı ile çelişmektedir. Bu durumda, Rho kinaz enzimi Rho A proteini aracılığı ile aktive oluyor ise, Rho A proteininin azaldığı şartlarda yine de Rho kinaz enzimi aktive olabilir mi sorusu akla gelmektedir. Loirand ve ark.’ın 2006 yılında yaptıkları Rho kinaz ve kardiyovasküler patofizyoloji konulu derlemede, araşidonik asid(AA) ve sfingofosfokolinlerin (SPC) Rho kinaz aktivitesini RhoA’dan bağımsız olarak ve RhoA ya göre 3 kata kadar daha fazla arttırdığı belirtilmiştir.¹³⁶ Araşidonik asid ve SPC’ler Rho kinazın negatif düzenleyici bölgesine bağlanarak bu bölgenin enzim üzerindeki inhibisyonunu engellediği düşünülmektedir. (Şekil 14.) Portal hipertansiyon oluşturulan sıçanların mezenterik arterlerinde yapılan başka bir çalışmada, RhoA düzeylerinin kontrole göre düşük seyrettiği farkedilmiştir.¹³⁷ Siklik AMP (cAMP) efektörü Protein kinaz A (PKA) ile RhoA arasında bir ilişki olabileceği düşünülerek, PKA inhibitörü Rp-Camps varlığında portal hipertansiyonlu sıçanlarda RhoA düzeyinin azalmadığı gösterilmiştir. Araştırmacılar, cAmp-PKA ileti sisteminin transkripsiyon düzeyinde veya RhoA proteinin hücre içi trafiğinde değişiklik yaratabileceğini öngörmüşlerdir. Howe tarafından aktin bazlı hücre migrasyonunun incelendiği bir derlemede, PKA’nın RhoA’yı C-terminusundaki Ser188 noktasından fosforile ederek, Rho-GDI guanin dissosiasyon inhibitörü ile etkileşimini arttırmak suretiyle, membrandan sitozole translokasyonunu hızlandırdığı bildirilmiştir.¹³⁸ Yine benzer bir çalışmada, cAMP agonisti forskolinin, renal CD8 hücrelerinde Rho-GDI-RhoA bağlanmasını arttırarak, aktif RhoA miktarını azalttığı gösterilmiştir.¹³⁹ Bu veriler beraber ele alındığında c-

AMP/PKA yolu ile RhoA/ROCK yolu arasında negatif düzenleyici bir ilişki olduğu görülmektedir.



Şekil 14. ROCK aktivitesini direk etkileyen faktörler. AA araşidonik asid, SPC sfingofosfokolin

İskelet kasında yoğun olarak bulunan beta-2 adrenerjik reseptörler, cAMP-PKA ileti yolunu aktive ederler. Beta-2 adrenerjik reseptör aracılı cAMP-PKA yolu RhoA inhibisyonu yaparken tam tersi de geçerlidir. Yani RhoA'nın aktive olduğu durumlarda beta 2 reseptör yanıtlarının azaldığı, insan epidermoid karsinomu A431 hücrelerinde gösterilmiştir.¹⁴⁰ İlgili çalışmada; lizofosfatidik asid (LPA) aracılı RhoA aktivasyonu oluşan hücrelerde isoproterenol ile stimüle beta 2 reseptör yanıtları azalırken, Clostridium botulinuma ait C3 egzotoksin aracılı RhoA inaktivasyonu oluşturulan hücrelerde isoproterenol yanıtlarının arttığı ifade edilmiştir.¹⁴⁰ Tüm bu veriler birleştirildiğinde iskelet kasında beta 2 reseptör yoğunluğunda veya duyarlılığında oluşabilecek bir artış, çalışmamızda RhoA düzeylerini baskılamış olabilir. Yapılan bir çalışmada spinal kord iskemi-reperfüzyonu sonrası tavşan spinal kordunda beta 2 reseptör yoğunluğunun arttığını gösterilmiştir.¹⁴¹ Ayrıca sıçan myokard iskemi-

reperfüzyon modeli kullanılan bazı çalışmalarda, özellikle beta2 adrenerjik reseptör yoğunluğunun, bu süreçte arttığı gösterilmiştir.^{142,143} Bunlarla beraber reseptör dansitesi dışında beta 2 aracılı yanıtların da, İ/R sonucu reseptörün alt efektör sistemini kovalent modifikasyonla uyarması da mümkün görünmektedir.^{144,145} Ancak mevcut çalışmamızda beta adrenerjik reseptör yoğunluğu veya agonist aracılı cevapları değerlendirilememiştir. İleri çalışmalar ile bu hipotezin desteklenmesi RhoA-Rho-kinaz sinyal ileti yolunun diğer yollar ile ilişkisi ve kendi içindeki regülasyonunun anlaşılması açısından faydalı olacaktır.

Çalışmanın İ/R modelinde yapılmış olduğu gözönüne alınacak olursa, plastik cerrahi pratiğinde özellikle serbest kas flebi transferlerinde halen bir sorun olarak karşımıza çıkan, İ/R hasarına da değinmek gerekmektedir. İskemi-reperfüzyon hasarının; sadece neden olduğu erken dönemli nekroza bağlı olarak değil, ayrıca bu hasar dolayısı ile oluşan apoptozla (programlanmış hücre ölümü) da iskelet kasında geç dönem hücre ölümüne neden olduğu gösterilmiştir.¹⁴⁶ Vignaud ve ark.'ın fare iskelet kası üzerinde yaptıkları İ/R çalışmasında, İ/R hasarının uzun dönemli yıpratıcı etkileri olduğu ortaya konulmuştur.⁷⁶ Aynı çalışmada, İ/R hasarı sonrası iskelet kasında 14. günde maksimum güç üretiminin %89 azalmış olduğu, 56. günde ise halen tam düzelmeden uzak olduğu ifade edilmiştir.⁷⁶ Hatta rejenerasyon sonrası bile tam iyileşmenin asla gelişmeyebileceği ve kas kalitesinde azalma olacağı belirtilmiştir. Yakın zamanda üst ekstremiteye yönelik fonksiyonel kas transferlerinin sonuçlarının derlendiği ve 177 hastadaki sonuçlarının incelendiği bir çalışmada, %17'den %42'ye kadar değişen oranlarda, M₃ derecesinin altında kas gücüne ulaşıldığı görülmektedir.¹⁴⁷

Başka bir çalışmada, 26 hastalık fonksiyonel serbest grasilis kas flebinde, hastaların %45'inde M₃ altı kas gücüne ulaşılabilirdiği gözlenmiştir.⁷⁹ Aynı çalışmada, özellikle yetersiz kas gücüne ulaşılan hastalarda vasküler problemler ana neden olarak gösterilmiştir. Tüm bu veriler ışığında, özellikle fonksiyonel serbest kas doku transferinde, İ/R hasarına yönelik yeni yaklaşımların önem kazandığı görülmektedir.

İskelet kası üzerinde yapılan deneysel çalışmalar ile farklı yollar ve ajanlar denenerek İ/R hasarının azaltılmasına yönelik çabalar, literatürde yer almaktadır. Bcl-2 proteini,¹⁴⁸ Adenozin,¹⁴⁹ Resveratrol,¹⁵⁰ E vitamini¹⁵¹ gibi farklı etki mekanizmasına sahip ajanlar denenmiş ancak hiçbirisi randomize, çok merkezli klinik çalışmalar ile desteklenerek plastik cerrahi pratiğinde yer bulamamıştır.

Spesifik bir Rho kinaz inhibitörü olan "fasudil", Japonya'da 1995 yılından beri klinik kullanıma girmiş durumdadır.¹⁵² Fasudil, serebral vazospazmın tedavisi için kullanımı onaylanmış bir spesifik kinaz inhibitörüdür.¹⁵² Belirgin vazodilatör etkisi¹⁵³ olan fasudil için, halen anjina pectoris tedavisi açısından, klinik denemeler yapılmaktadır.¹⁵⁴ Pulmoner arter hipertansiyonu olan 8 hastada yapılan denemede, Rho Kinaz inhibitörü fasudilin ortalama pulmoner arter basıncını, anlamlı ölçüde azalttığı görülmüştür.¹⁵⁵

Birçok hayvan modelinde, İ/R hasarında deneysel olarak da olumlu etkileri olduğu belirtilmiş olan Rho kinaz inhibitörleri, klinik perspektiften bakıldığında, hipotez olarak, iskelet kası İ/R sürecinde aktive olduğu görülen Rho kinaz enzimini baskılayarak, iskemi-reperfüzyon hasarını azaltabilir. Bununla beraber fonksiyonel kas transferlerinde, kritik öneme sahip olan iskemi süresini uzatarak dokunun iskemiye olan toleransını arttırabilirler. Replantasyon cerrahisinde kullanımı, reperfüzyon hasarını azaltarak operasyon sonuçları üzerinde olumlu etki yapabilir. Yukarıda belirtildiği gibi, serbest kas transferlerindeki kas kayıplarının sadece nekroza bağlı olmayıp, apoptozun da süreçte önemli bir yeri olduğu literatürde vurgulanmıştır. Rho kinaz inhibitörlerinin anti-apoptotik etkileri olması^{156,157}, pediküllü muskulokütan fleplerde Rho kinaz inhibitörü kullanılması, taşıdığı bölgede neovaskülarizasyon sürecinde flep hasarını azaltabilir. Myokardda önkoşullamada (tek veya tekrarlayan kısa süreli iskemik periyodların, uzun süreli iskemiye karşı dokuyu koruması) kullanılmış olan Rho kinaz inhibitörlerinin İ/R hasarına olumlu etkileri olduğu görülmüştür.¹⁵⁸⁻¹⁵⁹ Bu çalışmalar ışığında fasudilin farmakolojik bir önkoşullama ajanı olarak kullanılabileceği ileri sürülmüştür.¹⁶⁰ Her ne kadar pediküllü myokutan fleplerde benzer çalışma olmasa da, böyle bir çalışma planlanarak Rho kinaz inhibitörü ile farmakolojik önkoşullamanın flep sağkalımı üzerindeki etkisi değerlendirilebilir.

6. SONUÇ ve ÖNERİLER

Fare iskelet kası iskemi-reperfüzyon modelinde Rho-Rho Kinaz ileti sistemini incelediğimiz bu çalışma sonucunda:

1. İskemi-reperfüzyon ile iskelet kasında Rho Kinaz enzim aktivitesi artarken, RhoA protein düzeyinin azaldığı, Rho Kinaz seviyesinin ise değişmediği görülmüştür. Mevcut bulgular, pekçok dokuda olduğu gibi iskelet kası İ/R sürecinde bu yolağın etkileniyor olduğunu göstermektedir.

2. İskelet kası dokusunda RhoA düzeyi azalırken Rho Kinaz aktivitesinin artmış olması, ileri araştırmaların konusu olmaya adaydır.

3. İskelet kasındaki beta-adrenerjik reseptör aktivitesi ile Rho-Rho Kinaz yolu arasında çapraz etkileşim olup olmadığı, ileri çalışmalarla aydınlatılmayı beklemektedir.

4. İskelet kası iskemi-reperfüzyon hasarında, Rho Kinaz inhibitörleri (Fasudil, Y-27632 gibi) kullanılarak, önceki çalışmalar da göz önünde bulundurulduğunda, hipotez olarak bu hasara olumlu etki edebileceği öne sürülebilir.

5. Rho Kinaz yolunun apoptoz üzerindeki etkisi hesaba katıldığında, İ/R hasarına bağlı apoptotik hücre ölümü üzerine de, Rho Kinaz inhibitörlerinin olumlu etkisi olabilir.

6. Serbest kas dokusu transferi yapılan hastalarda Rho Kinaz inhibitörlerinin kullanılmasının, hem kas dokusu canlılığı hem de kas fonksiyonu üzerindeki etkisi değerlendirilebilir.

7. Pediküllü kas-deri fleplerinde önkoşullamada, Rho Kinaz inhibitörleri, farmakolojik önkoşullama ajanı olarak denenebilir.

8. Rho Kinaz inhibitörlerinin vazodilatasyona neden olması özelliği ile, gerek serbest flep cerrahisinde gerekse pediküllü flep uygulamalarında, vaskülarizasyonu düzenlemek amacıyla kullanımı gündeme gelebilir.

9. Özellikle distal beslenme sorunu oluşabilecek boy/en oranı fazla olan random paternli fleplerde, Rho Kinaz inhibitörleri, distal flep beslenmesini arttırabilir.

KAYNAKLAR

1. **Banic A, Greulich M.** Late results of breast reconstruction with free TRAM flaps: a prospective multicentric study. *Plast Reconstr Surg* **1995**; 95:1195-1203.
2. **Batchelor A, Davison P, Sully L.** The salvage of congested skin flaps by the application of leeches. *Br J Plast Surg* **1984**; 37:358-60.
3. **Schusterman MA, Kroll SS, Eber RS et al.** Intraoral soft tissue reconstruction after cancer ablation: A comparison of the pectoralis major flap and free radial forearm flap. *Am J Surg* **1991**; 162:397- 405.
4. **Zimmerman BJ, Granger DN.** Reperfusion injury. *Surgical Clinics of North America* **1992**; 72:65-83.
5. **Robert W, Hobson II, Vincent JM, Walter ND.** Pathophysiology of skeletal muscle ischemia-reperfusion injury. In: Haimovici H (ed). *Haimovici's Vascular Surgery. Principal and Techniques*, 4th ed. Cambridge, Blackwell Science, **1996**.
6. **Parrino PE, Laubach VE, Gaughen JR, Shockey KS, Wattsman TA, King RC, Tribble CG, Kron IL.** Inhibition of inducible nitric oxide synthase after myocardial ischemia increases coronary flow. *The Annals of Thoracic Surgery* **1998**; 66:733-739.
7. **Cohen LH, Kaplan M, Bernhard VM.** Intraoperative streptokinase. An adjunct to mechanical thrombectomy in the management of acute ischemia. *Archives of Surgery* **1986**; 121:708-715.
8. **Hearse DJ.** Ischemia, reperfusion, and the determinants of tissue injury. *Cardiovascular Drugs and Therapy* **1990**; 4:767-776.
9. **Klebuc M, Zachary M.** Muscle flaps and their role in limb salvage. *Methodist Debaquey Cardiovasc J* **2013**; 9(2):95-99.
10. **Takai Y, Sasaki T, Matozaki T.** Small GTP-binding proteins. *Physiol Rev* **2001**; 81:153-208.
11. **Etienne-Manneville S, Hall A.** Rho GTPases in cell biology. *Nature* **2002**; 420:629-635.
12. **Hiroki J, Shimokawa H, Mukai Y, Ichiki T, Takeshita A.** Divergent effects of estrogen and nicotine on Rho-kinase expression in human coronary vascular smooth muscle cells. *Biochem Biophys Res Commun* **2005**; 326:154-159.

13. **Uehata M, Ishizaki T, Satoh H, Ono T, Kawahara T, Morishita T, Tamakawa H, Yamagami K, Inui J, Maekawa M, Narumiya S.** Calcium sensitization of smooth muscle mediated by a Rho-associated protein kinase in hypertension. *Nature* **1997**; 389:990-994.

14. **Kandabashi T, Shimokawa H, Miyata K, Kunihiro I, Kawano Y, Fukata Y, Higo T, Egashira K, Takahashi S, Kaibuchi K, Takeshita A.** Inhibition of myosin phosphatase by upregulated Rho-kinase plays a key role for coronary artery spasm in a porcine model with interleukin-1beta. *Circulation* **2000**; 101:1319-1323.

15. **Takamura M, Sakamoto M, Genda T, Ichida T, Asakura H, Hirohashi S.** Inhibition of intrahepatic metastasis of human hepatocellular carcinoma by Rho-associated protein kinase inhibitor Y-27632. *Hepatology* **2001**; 33:557-581.

16. **Bao W, Hu E, Tao L, Boyce R, Mirabile R, Thudium DT, Ma XL, Willette RN, Yue TL.** Inhibition of Rho-kinase protects the heart against ischemia/reperfusion injury. *Cardiovasc Res* **2004**; 61:548-558.

17. **Rubin BB, Romaschin A, Walker PM, Gute DC, Korthuis RJ.** Mechanisms of postischemic injury in skeletal muscle: intervention strategies. *Journal of Applied Physiology* **1996**; 80:369-387.

18. **Hinder RA, Stein HJ.** Oxygen-derived free radicals. *Archives of Surgery* **1991**; 126:104-105.

19. **Welbourn CR, Goldman G, Paterson IS, Valeri CR, Shepro D, Hechtman HB.** Pathophysiology of ischaemia reperfusion injury: central role of the neutrophil. *British Journal of Surgery* **1991**; 78:651-655.

20. **Weinbroum AA, Hochhauser E, Rudick V, Kluger Y, Karchevsky E, Graf E, Vidne BA.** Multiple organ dysfunction after remote circulatory arrest: common pathway of radical oxygen species?. *Journal of Trauma* **1999**; 47:691-698.

21. **Prem JT, Eppinger M, Lemmon G, Miller S, Nolan D, Peoples J.** The role of glutamine in skeletal muscle ischemia/reperfusion injury in the rat hind limb model. *American Journal of Surgery* **1999**; 178:147-150.

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

23. **Lin E LS, Calvano SE.** The systemic response to injury. In: S1 S (ed). *Principles of Surgery*, 7 th ed. Cambridge, Blackwell Science, **1999**.

24. **Semenza GL.** Cellular and molecular dissection of reperfusion injury ROS within and without. *Circulation Research* **2000**; 86:117-118.

25. **Girotti AW.** Lipid hydroperoxide generation, turnover, and effector action in biological systems. *Journal of Lipid Research* **1998**; 39:1529-1542.

26. **Gillani S, Cao J, Suzuki T, Hak DJ.** The effect of ischemia reperfusion injury on skeletal muscle. *Injury* **2012**; 43:670-675.
27. **Tapuria N, Kumar Y, Habib MM, Abu Amara M, Seifalian AM, Davidson BR.** Remote ischemic preconditioning: a novel protective method from ischemia reperfusion injury-a review. *Journal of Surgical Research* **2008**; 150:304-330.
28. **Siemionow M, Arslan E.** Ischemia/reperfusion injury: a review in relation to free tissue transfers. *Microsurgery* **2004**; 24:468-475.
29. **İşlekel H, İşlekel S, Güner G.** Biochemical mechanism and tissue injury of cerebral ischemia and reperfusion. *Journal of the Neurological Sciences* **2000**; 7:1984-2000.
30. **Kuzu MA, Koksoy C, Kale IT, Tanik A, Terzi C, Elhan AH.** Reperfusion injury delays healing of intestinal anastomosis in a rat. *American Journal of Surgery* **1998**; 176:348-351.
31. **Morris SF, Pang CY, Zhong A, Boyd B, Forrest CR.** Assessment of ischemia-induced reperfusion injury in the pig latissimus dorsi myocutaneous flap model. *Plastic and Reconstructive Surgery* **1993**; 92:1162-1172.
32. **Bathe OF, Chow AW, Phang PT.** Splanchnic origin of cytokines in a porcine model of mesenteric ischemia-reperfusion. *Surgery* **1998**; 123:79-88.
33. **Terzi C, Kuzu A, Tanik A, Kale T, Aşlar K, Elhan A.** Sıçanlarda intestinal iskemi modelinde profilaktik kısa ve uzun süreli yüksek doz Allopurinol kullanımının mortaliteye etkisi. *Klinik ve Deneysel Cerrahi* **2000**; 8:10-16.
34. **Ertan T, Soran A, Kılıç M, Aşlar AK, Koç M, Cengiz Ö.** Kan Malondialdehid ve total antioksidan seviyesinin (TAS) önemi. *Cerrahi Tıp Bülteni* **2001**; 2:154-167.
35. **Dennis SC, Shattock MJ, Hearse DJ, Ball MR, Sochor M, McLean P.** Two different metabolic responses to ischaemia: inherent variability or artefact?. *Cardiovascular Research* **1983**; 17:489-498.
36. **Carden DL, Granger DN.** Pathophysiology of ischemia-reperfusion injury. *J Pathol* **2000**; 190: 255-66.
37. **Davidge ST.** Prostaglandin H synthase and vascular function. *Circ Res* **2001**; 89(8):650-660.
38. **de Rougemont O, Lehmann K, Clavien PA.** Preconditioning, organ preservation, and postconditioning to prevent ischemia-reperfusion injury to the liver. *Liver Transpl* **2009**; 15(10):1172-1182.

39. **Gourdin MJ, Bree B, De Kock M.** The impact of ischaemia-reperfusion on the blood vessel. *Eur J Anaesthesiol* **2009**; 26(7):537-547.
40. **Granger DN, Korthuis RJ.** Physiologic mechanisms of postischemic tissue injury. *Annu Rev Physiol* **1995**; 57:311-332.
41. **Dammers R, Wehrens XH, Egbrink MG, Slaaf DW, Kurvers HA, Ramsay G.** Microcirculatory effects of experimental acute limb ischaemia-reperfusion. *British Journal of Surgery* **2001**; 88:816-824.
42. **Alizan A, Khalil C, Farah A, John C.** Reperfusion injury. *Plastic and Reconstructive Surgery* **2006**; 117:1024-1033.
43. **Cerra FB, Lajos TZ, Montes M, Siegel JH.** Hemorrhagic infarction: A reperfusion injury following prolonged myocardial ischemic anoxia. *Surgery* **1975**; 78:95-104.
44. **Duru S, Koca U, Oztekin S, Olguner C, Kar A, Coker C, Ulukus C, Tascl C, Elar Z.** Antithrombin III pretreatment reduces neutrophil recruitment into the lung and skeletal muscle tissues in the rat model of bilateral lower limb ischemia and reperfusion: a pilot study. *Acta Anaesthesiologica Scandinavica* **2005**; 49:1142-1148.
45. **Gute DC, Ishida T, Yarimizu K, Korthuis RJ.** Inflammatory responses to ischemia and reperfusion in skeletal muscle. *Molecular and Cellular Biochemistry* **1998**; 179:169-187.
46. **Hobson RW, 2nd, Neville R, Watanabe B, Canady J, Wright JG, Belkin M.** Role of heparin in reducing skeletal muscle infarction in ischemia-reperfusion. *Microcirculation, endothelium, and lymphatics* **1989**; 5:259-276.
47. **Koksal C, Bozkurt AK, Sirin G, Konukoglu D, Ustundag N.** Aprotinin ameliorates ischemia/reperfusion injury in a rat hind limb model. *Vascular Pharmacology* **2004**; 41:125-129.
48. **Leena S, Korvenoja M, Markku A.** Glucose, lactate and pyruvate response in an experimental model of microvascular flap ischemia and reperfusion: A Microdialysis Study. *Microsurgery* **2004**; 24:223-231.
49. **Tokito A, Silva J.** Ischemia and reperfusion syndrome of hind limbs functional and histological renal changes in rats. *Medicine Riberio Preto* **2005**; 38:294-300.
50. **Arasa O, Dilsizian V.** Targeting ischemic memory. *Current Opinion in Biotechnology* **2007**; 18:46-51.
51. **Collard CD, Gelman S.** Pathophysiology, clinical manifestations, and prevention of ischemia-reperfusion injury. *Anesthesiology* **2001**; 94:1133-1138.

52. **Schoenberg MH, Beger HG.** Reperfusion injury after intestinal ischemia. *Critical Care Medicine* **1993**; 21:1376-1386.
53. **Blaisdell FW.** The pathophysiology of skeletal muscle ischemia and the reperfusion syndrome: a review. *Cardiovascular Surgery* **2002**; 10:620-630.
54. **Parks DA, Granger DN.** Contributions of ischemia and reperfusion to mucosal lesion formation. *American Journal of Physiology* **1986**; 250:749-753.
55. **Schlag MG, Harris KA, Potter RF.** Role of leukocyte accumulation and oxygen radicals in ischemia-reperfusion-induced injury in skeletal muscle. *American Journal of Physiology Heart and Circulatory Physiology* **2001**; 280: 1716-1721.
56. **Rupinski S.** Effect of tourniquet ischemia of the arm on changes in selected parameters of muscle metabolism. *Annales Academiae Medicae Stetinensis* **1989**; 35:131-143.
57. **Korthuis RJ, Grisham MB, Granger DN.** Leukocyte depletion attenuates vascular injury in postischemic skeletal muscle. *American Journal of Physiology* **1988**; 254:823-827.
58. **Zimmerman BJ, Granger DN.** Mechanisms of reperfusion injury. *Am J Med Sci* **1994**; 307(4):284-192.
59. **Green CJ, Gower JD, Healing G, Cotterill LA, Fuller BJ, Simpkin S.** The importance of iron, calcium and free radicals in reperfusion injury: an overview of studies in ischaemic rabbit kidneys. *Free Radical Research Communication* **1989**; 7:255-264.
60. **Parks DA, Williams TK, Beckman JS.** Conversion of xanthine dehydrogenase to oxidase in ischemic rat intestine-a reevaluation. *American Journal of Physiology* **1988**; 254:768-774.
61. **Jennings RB, Reimer KA.** The cell biology of acute myocardial ischemia. *Annual Review of Medicine* **1991**; 42:225-246.
62. **Kumar V, Cotran R, Robbins SL.** Basic Pathology. In: Wi B. (ed). 6 th ed. Philadelphia, W.B. Saunders Company, **2000**.
63. **Yıldar M.** Deneysel Renal İskemi/Reperfüzyon Hasarında Splenektomi Ve Gadolinium Chloride (GdCl₃)'in Koruyucu Etkisi. Sağlık Bakanlığı Haydarpaşa Numune Eğitim ve Araştırma Hastanesi, Genel Cerrahi Kliniği, Uzmanlık Tezi, İstanbul, **2008**.
64. **Davies MG, Juynh TTT, Hagen P-O.** Ischemia-Reperfusion Injury, *Endothelial Physiology*. In: Grace PA, Mathie RT (eds). London, Blackwell Science, **1999**.
65. **Bulkey GB.** Free radical-mediated reperfusion injury: A selective review. *British Journal of Cancer* **1987**; 55:66-73.

66. **Rubin BB, Smith A, Liauw S, Isenman D, Romaschin AD, Walker PM.** Complement activation and white cell sequestration in postischemic skeletal muscle. *American Journal of Physiology* **1990**; 259:525-531.
67. **Yavuzer N.** Karaciğerde İskemi Reperfüzyon ile İndüklenmiş Rejenerasyon Modelinde Kompleman İnhibitörünün Rolü. Tıp Fakültesi, Genel Cerrahi Anabilim Dalı, Uzmanlık Tezi, Ankara: Başkent Üniversitesi, **2008**.
68. **Sun Z, Wang X, Lasson A, Bojesson A, Annborn M, Andersson R.** Effects of inhibition of PAF, ICAM-1 and PECAM-1 on gut barrier failure caused by intestinal ischemia and reperfusion. *Scandinavian Journal of Gastroenterology* **2001**; 36:55-65.
69. **Russel RJ.** Oxidative processes and antioxidative defense mechanisms in the aging brain. *The FASEB Journal* **1995**; 9:526-533.
70. **Pellegrini N, Miglio C, Del Rio D, Salvatore S, Serafini M, Brighenti F.** Effect of domestic cooking methods on the total antioxidant capacity of vegetables. *Int J Food Sci and Nutr* **2009**; 2:12-22.
71. **Cemeli E, Baumgartner A, Anderson D.** Antioxidants and the Comet assay. *Mutation Resarch* **2009**; 681:51-67.
72. **Hassimotto NMA, Pinto MDS, Lajolo FM.** Antioxidant status in humans after consumption of blackberry (*Rubus fruticosus* L.) juices with and without defatted milk. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **2008**; 56:11727–11733.
73. **Ratnam DV, Ankola DD, Bhardwaj V, Sahana DK, Kumar MN.** Role of antioxidants in prophylaxis and therapy: A pharmaceutical perspective. *Journal of Controlled Release* **2006**; 113:189-207.
74. **Chen KT, Mardini S, Chuang DC, et al.** Timing of presentation of the first signs of vascular compromise dictates the salvage outcome of free flap transfers. *Plast Reconstr Sur* **2007**; 120:187–195.
75. **Tüzüner M.** Serbest fleplerde cerrahi geciktirme işleminin reperfüzyon hasarına olan etkisinin farklı iskemi sürelerinde araştırılması. Uzmanlık tezi, Afyon Kocatepe Üniversitesi, Afyonkarahisar, **2009**.
76. **Vignaud A, Hourde C, Medja F, Agbulut O, Butler-Browne G, Ferry A.** Impaired skeletal muscle repair after ischemia-reperfusion injury in mice. *J Biomed Biotechnol* **2010**; 2010:724914.
77. **Medical Research Council: Nerve Injuries Research Committee.** Aids to the Investigation of Peripheral Nerve Injuries. *Brain* **2010**; 133:2838-2844.

78. **Chuang DC, Epstein, MD, Yeh, MC, et al.** Functional restoration of elbow flexion in brachial plexus injuries: Results in 167 patients (excluding obstetric brachial plexus injuries). *J Hand Surg (Am.)* **1993**; 18:285.
79. **Barrie K, Steinmann S, et al.** Gracilis free muscle transfer for restoration of function after complete brachial plexus avulsion. *Neurosurg Focus* **2004**; 16(5):1-9.
80. **Terzis JK, Kostopoulos VK.** Free muscle transfer in posttraumatic plexopathies part II: the Elbow. *Hand (N Y)* **2010**; 5(2):160–170.
81. **Tran TP, Tu H, Pipinos II, Muelleman RL, Albadawi H, Li YL.** Tourniquet-induced acute ischemia-reperfusion injury in mouse skeletal muscles: Involvement of superoxide. *Eur J Pharmacol* **2011**; 650:328–334.
82. **Bolcal C, Yildirim V, Doganci S, et al.** Protective effects of antioxidant medications on limb ischemia reperfusion injury. *J Surg Res* **2007**; 139:274–279.
83. **Park JW, Qi WN, Cai Y, et al.** Skeletal muscle reperfusion injury is enhanced in extracellular superoxide dismutase knockout mouse. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* **2005**; 289:H181–H187.
84. **Atahan E, Ergun Y, Belge Kurutas E, Cetinus E, Guney Ergun U.** Ischemia-reperfusion injury in rat skeletal muscle is attenuated by zinc aspartate. *J Surg Res* **2007**; 137:109–116.
85. **Erkanli K, Kayalar N, Erkanli G, Ercan F, Sener G, Kirali K.** Melatonin protects against ischemia/reperfusion injury in skeletal muscle. *J Pineal Res* **2005**; 39:238–242.
86. **Amano M, Fukata Y, Kaibuchi K.** Regulation and function of Rho-associated kinase. *Exp Cell Res* **2000**; 261:44-51.
87. **Barman SA, Zhu S, White RE.** RhoA/Rho-kinase signaling: a therapeutic target in pulmonary hypertension. *Vasc Health Risk Manag* **2009**; 5:663-71.
88. **Boettner B, Van Aelst L.** The role of Rho GTPases in disease development. *Gene* **2002**; 286:155-174.
89. **Calò LA, Pessina AC.** RhoA/Rho-kinase pathway: much more than just a modulation of vascular tone. Evidence from studies in humans. *J Hypertens* **2007**; 25(2):259-264.
90. **Dhanasekaran N, Dermott JM.** Signaling by the G12 class of G proteins. *Cell Signal* **1996**; 8:235-245.
91. **Fukata Y, Amano M and Kaubuchi K.** Rho-Rho-kinase pathway in smooth muscle contraction and cytoskeletal reorganization of non-muscle cells. *Trends Pharmacol Sci* **2001**; 22(1):32-39.

92. **Hirano K.** Current topics in the regulatory mechanism underlying the Ca²⁺ sensitization of the contractile apparatus in vascular smooth muscle. *J Pharmacol Sci* **2007**; (104):109-115.
93. **Kume H.** RhoA/Rho-kinase as a therapeutic target in asthma. *Curr Med Chem* **2008**; 15(27): 2876-2885.
94. **Lee DL, Webb RC, Jin L.** Hypertension and RhoA/Rho-kinase signaling in the vasculature: highlights from the recent literature. *Hypertension* **2004**; 44(6):796-769.
95. **Liao JK, Seto M, Noma K.** Rho kinase (ROCK) inhibitors. *J Cardiovasc Pharmacol* **2007**; 50(1):17-24.
96. **LoGrasso PV, Feng Y.** Rho kinase (ROCK) inhibitors and their application to inflammatory disorders. *Curr Top Med Chem* **2009**; 9(8):704-723.
97. **Loirand G, Guilluy C, Pacaud P.** Regulation of Rho proteins by phosphorylation in the cardiovascular system. *Trends Cardiovasc Med* **2006**; 16(6):199-204.
98. **Nobes C, Hall A.** Regulation and function of the Rho subfamily of small GTPases. *Curr Opin Genet Dev* **1994**; 4:77-81.
99. **Noma K, Oyama N, Liao JK.** Physiological role of ROCKs in the cardiovascular system. *Am J Physiol Cell Physiol* **2006**; 290(3):C661-C668.
100. **Puetz S, Lubomirov LT, Pfitzer G.** Regulation of smooth muscle contraction by small GTPases. *Physiology* **2009**; 24:342-356.
101. **Rikitake Y, Liao JK.** Rho GTPases, statins, and nitric oxide. *Circ Res* **2005**; 97(12):1232-1235.
102. **Seasholtz TM, Brown JH.** Rho signalling in vascular diseases. *Mol Interv* **2004**; 4(6):348-357.
103. **Shimokawa H, Takeshita A.** Rho-kinase is an important therapeutic target in cardiovascular medicine. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* **2005**; 25:1767-1775.
104. **Somlyo AP, Somlyo AV.** Signal transduction by G-proteins, rho-kinase and protein phosphatase to smooth muscle and non-muscle myosin II. *J Physiol* **2000**; 15:177-185.
105. **Somlyo AV.** New roads leading to Ca²⁺ sensitization. *Circ Res* **2002**; 91:83-84.
106. **Takahashi K, Sasaki T, Mammoto A, Takaishi K, Kameyama T, Tsukita S, Takai Y.** Direct interaction of the Rho GDP dissociation inhibitor with ezrin/radixin/moesin initiates the activation of the Rho small G protein. *J Biol Chem* **1997**; 272(37):23371-5.

107. **Zhou Q, Liao JK.** Rho kinase: an important mediator of atherosclerosis and vascular disease. *Curr Pharm Des* **2009**; 15(27):3108-3115.
108. **Madeddu P, Emanuelli C, Spillman F, Meloni M, Bouby N, et al.** Murine models of myocardial and limb ischemia: diagnostic endpoints and relevance to clinical problems. *Vascular Pharmacology* **2006**; 45(5):281-301.
109. **Lee RC, River LP, Pan FS, Ji L, Wollmann RL.** Surfactant induced sealing of electropermeabilized skeletal muscle membranes in vivo. *Proc Natl Acad Sci USA* **1992**; 15;89(10):4524-8.
110. **Küçüker İ, Tuncer S, Şencan A, Bircan F, Caglar E, Elmas C, Ayhan S.** The effect of surgical and chemical denervation on ischaemia/reperfusion injury of skeletal muscle. *J Plast Reconstr Aesthet Surg* **2012**; 65:240-248.
111. **Shboul O, Mustafa A.** Effect of oxidative stress on rho kinase 2 and smooth muscle contraction in rat stomach. *Can J Physiol Pharmacol* **2015**; 93:405-411.
112. **Naraoka M, Munakata A, Matsuda N, Shimamura N, Ohkuma H.** Suppression of the Rho/Rho-kinase pathway and prevention of cerebral vasospasm by combination treatment with statin and fasudil after subarachnoid hemorrhage in rabbit. *Transl Stroke Res* **2013**; 4:368-374.
113. **Shboul O.** The role of RhoA/ROCK pathway in gender-dependent differences in gastric smooth muscle contraction. *J Physiol Sci* DOI 10.1007/s12576-015-0400-9.
114. **Shboul O, Mustafa A, Al-hashim F.** Non-genomic effects of progesterone on Rho kinase 2 in rat gastric smooth muscle cells. *J Smooth Muscle Res* **2013**; 49:55-62.
115. **Eckert P, Schnackerz K.** Ischemic tolerance of human skeletal muscle. *Ann Plast Surg* **1991**; 26(1):77-84.
116. **Petrasek PF, Homer-Vanniasinkam S, Walker PM.** Determinants of ischemic injury to skeletal muscle. *J Vasc Surg* **1994**; 19(4):623-31.
117. **Somlyo AP, Somlyo AV.** Ca²⁺ sensitivity of smooth muscle and nonmuscle myosin II: modulated by G proteins, kinases, and myosin phosphatase. *Physiol Rev* **2003**; 83:1325–58.
118. **Lan C, Das D, Wloskowitz A, Vollrath B.** Endothelin-1 modulates hemoglobin-mediate signaling in cerebrovascular smooth muscle via RhoA/Rho kinase and protein kinase C. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* **2004**; 286:165–73.
119. **Chrissobolis S, Budzyn K, Marley PD, Sobey CG.** Evidence that estrogen suppresses rhokinase function in the cerebral circulation in vivo. *Stroke* **2004**; 35:2200–5.

120. **Seko T, Ito M, Kureishi Y, Okamoto R, Moriki N, Onishi K, et al.** Activation of RhoA and inhibition of myosin phosphatase as important components in hypertension in vascular smooth muscle. *Circ Res* **2003**; 92:4118.
121. **Mukai Y, Shimokawa H, Matoba T, Kandabashi T, Satoh S, Hiroki J, et al.** Involvement of Rho-kinase in hypertensive vascular disease: a novel therapeutic target in hypertension. *FASEB J* **2001**; 15:1062–4.
122. **Katsumata N, Shimokawa H, Seto M, Kozai T, Yamawaki T, Kuwata K, et al.** Enhanced myosin light chain phosphorylations as a central mechanism for coronary artery spasm in a swine model with interleukin-1 β . *Circulation* **1997**; 96:4357–63.
123. **Shimokawa H, Seto M, Katsumata N, Amano M, Kozai T, Yamawaki T, et al.** Rho-kinase-mediated pathway induces enhanced myosin light chain phosphorylations in a swine model of coronary artery spasm. *Cardiovasc Res* **1999**; 43:1029–39.
124. **Sato S, Ikegaki I, Asano T, Shimokawa H.** Antiischemic properties of fasudil in experimental models of vasospastic angina. *Jpn J Pharmacol* **2001**; 87:34–40.
125. **Sato M, Tani E, Fujikawa H, Kaibuchi K.** Involvement of rhokinase-mediated phosphorylation of myosin light chain in enhancement of cerebral vasospasm. *Circ Res* **2000**; 87:195–200.
126. **Teraishi K, Kurata H, Nakajima A, Takaoka M, Matsumura Y.** Preventive effect of Y-27632, a selective Rho-kinase inhibitor, on ischemia/reperfusion-induced acute renal failure in rats. *Eur J Pharmacol* **2004**; 505(1-3):205-211.
127. **Takeda K, Jin MB, Fujita M, Fukai M, Sakurai T, Nakayama M, Taniguchi M, Suzuki T, Shimamura T, Furukawa H, Todo S.** A novel inhibitor of Rho-associated protein kinase, Y-27632, ameliorates hepatic ischemia and reperfusion injury in rats. *Surgery*, **2003**; 133(2):197-206.
128. **Cayan S, Taylan B, Tiftik N, Ünal ND, Apa DD, et al.** Rho-kinase levels in testicular ischemia-reperfusion injury and effects of its inhibitor, Y-27632, on oxidative stress, spermatogenesis, and apoptosis. *Urology* **2014**; 83(3):e13-8.
129. **Prakash J, de Borst MH, Lacombe M, Opdam F, Klok AP, et al.** Inhibition of renal rho kinase attenuates ischemia/reperfusion induced injury. *JASN* **2008**; 19(11):2086-2097.
130. **Kuroda S, Tashiro H, Igarashi Y, Tanimoto Y, Nambu J, et al.** Rho inhibitor prevents ischemia-reperfusion injury in rat steatotic liver. *J Hepatol* **2012**; 56(1):146-152.
131. **Sarı AN, Kacan M, Unsal D, Sahan FS, Kemal CB, et al.** Contribution of RhoA/Rho-kinase/MEK1/ERK1/2/iNOS pathway to ischemia/reperfusion-induced oxidative/nitrosative stress and inflammation leading to distant and target organ injury in rats. *Eur J Pharmacol* **2014**; 723:234-245.

132. **Hamid SA, Bower HS, Baxter GF.** Rho kinase activation plays a major role as a mediator of irreversible injury in reperfused myocardium. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* **2007**; 292:H2598–H2606.
133. **Manintveld OC, Verdouw PD, Duncker DJ.** The RISK of ROCK. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* **2007**; 292:H2563–H2565.
134. **Takeda K, Ichiki T, Tokunou T, Iino N, Fujii S, Kitabatake A, Shimokawa H, Takeshita A.** Critical role of Rho-kinase and MEK/ERK pathways for angiotensin II-induced plasminogen activator inhibitor type-1 gene expression. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* **2001**; 21: 868–873.
135. **Bailly K, Ridley AJ, Hall SM, Haworth SG.** RhoA activation by hypoxia in pulmonary arterial smooth muscle cells is age and site specific. *Circ Res* **2004**; 94:1383–1391.
136. **Loirand G, Guerin P, Pacaud P.** Rho kinases in cardiovascular physiology and pathophysiology. *Circ Res* **2006**; 98:322-334.
137. **Zhang HY, Shirasawa Y, Chen X, Yu H, Benoit JN.** Impaired agonist-dependent myosin phosphorylation and decreased RhoA in rat portal hypertensive mesenteric vasculature. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* **2005**; 288:G603-608.
138. **Howe AK.** Regulation of actin-based cell migration by cAMP/PKA. *Biochimica et Biophysica Acta* **2004**; 1692:159-174.
139. **Tamma G, Klussmann E, Procino G, Svelto M, Rosenthal W et al.** cAMP induced AQP2 translocation is associated with RhoA inhibition through RhoA phosphorylation and interaction with Rho-GDI. *J Cell Sci* **2003**; 116(8):1519-1525.
140. **Shumay E, Tao J, Wang HY, Malbon CC.** Lysophosphatidic Acid Regulates Trafficking of beta2-Adrenergic Receptors. *J Biol Chem* **2007**; 282:21529-21541.
141. **Chen B, Zhang Y, Chen L, Huang S, Li S, Yao J.** Dose-Effects of Aorta-Infused Clenbuterol on Spinal Cord Ischemia-Reperfusion Injury in Rabbits. *Plos One* **2013**; 8(12):e84095.
142. **Bartels L, Clifton GD, Szabo TS.** Influence of myocardial ischemia and reperfusion on beta-adrenoceptor subtype expression. *J Cardiovasc Pharmacol* **1998**; (4):484-487.
143. **de Jong W, Lukovic L, Jones CR, Petty MA.** Receptor density in the rat heart following ischemia and prolonged reperfusion. *Clin Exp Pharmacol Physiol Suppl* **1995**; 22:279-80.
144. **Strasser RH, Krimmer J, et al.** Dual sensitization of the adrenergic system in early myocardial ischemia: independent regulation of the beta-adrenoceptors and the adenylyl cyclase. *J Mol Cell Cardiol* **1990**; 22:1405-23.

145. **Persad S, Paragiou U, Dhella NS.** Role of H₂O₂ in changing beta-adrenoceptor and adenylyl cyclase in ischemia-reperfused hearts. *Moll Cell Biochem* **1998**; 186:99-106.
146. **Wang WZ, Fang XH, Stephenson LL, Khiabani KT, Zamboni WA.** Ischemia/reperfusion-induced necrosis and apoptosis in the cells isolated from rat skeletal muscle. *J Orthop Res* **2008**; 26:351–356.
147. **Fischer PJ, Elliott MR, Kozin HS, Levin SL.** Free function muscle transfers for upper extremity reconstruction: a review of indications, techniques and outcomes. *J Hand Surg Am* **2013**; 38(12):2485–2490.
148. **Iwata A, Morgan-Stevenson V, Schwartz B, et al.** Extracellular BCL2 proteins are danger-associated molecular patterns that reduce tissue damage in murine models of ischemia-reperfusion injury. *PLoS One* **2010**; 5:e9103.
149. **Loerakker S, Oomens CW, Manders E, et al.** Ischemia-reperfusion injury in rat skeletal muscle assessed with T(2)-weighted and dynamic contrast-enhanced MRI. *Magn Reson Med* **2011**; 66:528–537.
150. **Hsieh YH, Huang SS, Wei FC, Hung LM.** Resveratrol attenuates ischemia-reperfusion–induced leukocyte– endothelial cell adhesive interactions and prolongs allograft survival across the MHC barrier. *Circ J* **2007**; 71:423–428.
151. **Arato E, Kurthy M, Snay L, et al.** Effect of vitamin E on reperfusion injuries during reconstructive vascular operations on lower limbs. *Clin Hemorheol Microcirc* **2010**; 44:125–136.
152. **Tamura M, Nakao H, et al.** Development of specific Rho-kinase inhibitors and their clinical application. *Biochimica et Biophysica Acta* **2005**; 1754:245-252.
153. **Ono-Saito N, Niki I, Hidaka H.** H-series protein kinase inhibitors and potential clinical applications. *Pharmacol Ther* **1999**; 82:123-131.
154. **Shimokawa H, Iinuma H, Kishida H, Nakamura M, Kato K.** Antianginal effect of fasudil, a Rho-kinase inhibitor, in patients with stable effort angina: a multicenter study. *Circulation* **2001**; 104:2843.
155. **Ishikura K, Yamada N, et al.** Beneficial acute effects of Rho-kinase inhibitor in patients with pulmonary arterial hypertension. *Circ J* **2006**; 70:174- 178.
156. **Liu H, Chen X, et al.** Rho kinase inhibition by fasudil suppresses lipopolysaccharide induced apoptosis of rat pulmonary microvascular endothelial cells via JNK and p38 MAPK pathway. *Biomed Pharmacother* **2014**; 68(3):267-75.

157. **Thorlacius K, Slotta JE, et al.** Protective effect of fasudil, a Rho-kinase inhibitor, on chemokine expression, leucocyte recruitment and, hepatocellular apoptosis in septic liver injury. *J Leukoc Biol* **2006**; 79(5):923-31.
158. **Wolfrum S, Dendorfer A, Rikitake Y, Stalker TJ, et al.** Inhibition of Rho-kinase leads to rapid activation of phosphatidylinositol 3-kinase/protein kinase Akt and cardiovascular protection. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* **2004**; 24:1842-1847.
159. **Demiryürek S, Kara AF, Celik A, Babül A, Tarakçıoğlu M, Demiryürek AT.** Effects of fasudil, a Rho-kinase inhibitor, on myocardial preconditioning in anesthetized rats. *Eur J Pharmacol* **2005**; 527: 129-140.
160. **LI WN, Wu N, Shu WQ, et al.** The protective effect of fasudil pretreatment combined with ischemia preconditioning on myocardial ischemia/reperfusion injury. *European Review for Medical and Pharmacological Sciences* **2014**; 18:2748-2758.

ÖZGEÇMİŞ

Adı Soyadı : Anıl Arif OLGUNER
Doğum Tarih ve Yeri : 1982/ADANA
Medeni Durumu : Evli
Adres : Cemalpaşa Mah. 63012 Sok. Özdemir Apt. 5/9
Seyhan ADANA
Telefon : 0532 484 84 30
E.posta : olgunermd@yahoo.com
Mezun Olduğu Tıp Fakültesi : Hacettepe Üniversitesi Tıp Fakültesi
Görev Yerleri : Çukurova Üniversitesi Tıp Fakültesi Farmakoloji
Anabilim Dalı
Çukurova Üniversitesi Tıp Fakültesi Plastik
Rekonstrüktif ve Estetik Cerrahi AD
Yabancı Dil : İngilizce