



**T.C.**  
**MERSİN ÜNİVERSİTESİ TIP FAKÜLTESİ**  
**PLASTİK, REKONSTRÜKTİF VE ESTETİK CERRAHİ**  
**ANABİLİM DALI**

**RAT GROİN FLEBİNDE ERİTROPOETİN VE İSKEMİK**  
**ÖNKOŞULLANDIRMANIN İSKEMİ REPERFÜZYON**  
**HASARINA ETKİLERİ**

**Dr. TOLGA YENER**  
**UZMANLIK TEZİ**

**DANIŞMAN**  
**Doç. Dr. ŞAKİR ÜNAL**

**MERSİN-2010**



**T.C.**  
**MERSİN ÜNİVERSİTESİ TIP FAKÜLTESİ**  
**PLASTİK, REKONSTRÜKTİF VE ESTETİK CERRAHİ**  
**ANABİLİM DALI**

**RAT GROİN FLEBİNDE ERİTROPOETİN VE İSKEMİK**  
**ÖNKOŞULLANDIRMANIN İSKEMİ REPERFÜZYON**  
**HASARINA ETKİLERİ**

**Dr. TOLGA YENER**  
**UZMANLIK TEZİ**

**DANIŞMAN**  
**Doç. Dr. ŞAKİR ÜNAL**

Bu tez, BAP-TF CTB (TY) 2009-8 TU kodlu proje olarak Mersin Üniversitesi  
Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi Tarafından desteklenmiştir.

**MERSİN-2010**

## TEŞEKKÜR

Mersin Üniversitesinde geçirdiğim zaman boyunca yanımda olan herkese hissettiğim Őükran duygularımı arz etmeyi borç bilirim.

Uzmanlık tezimin ortaya çıkmasında ve her aşamasında yol göstericim olan hocam Doç. Dr. Şakir Ünal başta olmak üzere mesleki gelişimime katkılarından dolayı Prof. Dr. Ferit Demirkan, Doç. Dr. Alper Sarı ve Doç. Dr. Yavuz Başterzi'ye,

Asistanlık sürecini birlikte geçirdiğim eş kıdemlim sevgili kardeşim Dr. Atilla Fesli başta olmak üzere birlikte çalışmaktan mutluluk duyduğum arkadaşlarım Uzm. Dr. Remzi Fırıncioğulları, Uzm. Dr. Alper Aksoy, Uzm. Dr. Onur Gürbüz, Uzm. Dr. Necmettin Tütüncü, Uzm. Dr. Volkan Beden, Dr. Mehmet Güşen, Dr. Niyazi Őimdivar, Dr. Selahattin Aslan, Dr. Vasfi Çelik, Dr. Berkant Tunç, Dr. Abdülcabbar Siyar'a,

Tez çalışmalarım sırasında her türlü yardımı ve kolaylığı sağladıkları için Me.Ü.T.F Hayvan Deneyleri Laboratuvarı sorumlu ve çalışanlarına, Biyokimya A.D.'ndan Prof. Dr. Lülüfer Tamer ve asistanlarına, Histoloji A.D.'ndan Doç Dr. Necat Yılmaz ve asistanlarına, Biyoistatistik A.D.'ndan Doç. Dr. Bahar Taşdelen ve asistanlarına teşekkür ederim.

Erken yaşta kaybettiğim rahmetli babam R. Turan Yener'i minnet ve özlemlerle,

Asistanlığımın ilk yıllarını birlikte paylaştığım saygı değer başasistanım R. İbrahim Cin'i rahmetle anıyorum.

Hayatımın her anında desteğini ve şefkatini benden esirgemeyen annem İlhan Yener'e ve varlığının düşüncesiyle dahi huzur bulduğum biricik kızım Begüm Yener'e...

## İÇİNDEKİLER

	<b>Sayfa No</b>
<b>ÖZET</b>	5
<b>İNGİLİZCE ÖZET (ABSTRACT)</b>	6
<b>GİRİŞ ve AMAÇ</b>	7
<b>GENEL BİLGİLER</b>	9
Flep Kan Akımının Düzenlenmesi	
İskemi	
Akut Hücre Zedelenmesinin Nedenleri	
Geri Dönüşümlü Zedelenme	
Geri Dönüşümsüz Zedelenme	
Reperfüzyon Ve Reperfüzyon Hasarı	
Serbest Radikaller ve Reperfüzyon Hasarındaki Roller	
Antioksidanlar	
Endojen Antioksidanlar	
Ekzojen Antioksidanlar	
İskemik Önkoşullama	
İskemik Hasar ve Hücrenin Programlı Ölümü (Apoptozis)	
Yeni Damar Oluşumu	
Eritropoetin	
Eritropoetin ve İskemi Reperfüzyon Hasarı	
<b>GEREÇ ve YÖNTEM</b>	27
<b>BULGULAR</b>	36
<b>TARTIŞMA</b>	54
<b>SONUÇ ve ÖNERİLER</b>	59
<b>KAYNAKLAR</b>	60
<b>SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ</b>	76
<b>ŞEKİLLER DİZİNİ</b>	78
<b>RESİMLER DİZİNİ</b>	79
<b>TABLolar DİZİNİ</b>	80

## ÖZET

Rekombinant insan eritropoetininin (rhEpo) ve iskemik önkoşullandırmanın iskemi/reperfüzyon (I/R) hasarına karşı koruyucu etkileri iyi bilinmektedir. Bu çalışmada rat groin flebinde I/R ve sistemik rhEpo'in beraber ve tek tek etkileri değerlendirilmiş ve karşılaştırılmıştır. Yetmiş dört Wistar tipi rat rastgele beş gruba ayrıldı. Grup 1 (n=10); sham grubundan flep kaldırıldı. Grup 2 (n=16); groin deri flebi kaldırıldı ve 8 saat iskemi uygulandı. Grup 3 (n=16); iskemik önkoşullandırma 3 siklus olmak üzere 10 dakika iskemi, 10 dakika reperfüzyon olarak uygulandı ve ardından aynı iskemi prosedürü uygulandı. Grup 4 (n=16); Aynı iskemi prosedürü uygulandı; reperfüzyondan 30 dakika önce tek doz rhEpo (5000 IU/kg) intraperitoneal yoldan enjekte edildi. Group 5 (n=16); iskemik önkoşullandırma ve rhEpo prosedürleri uygulandı, ardından aynı iskemi prosedürü uygulandı. Ameliyat sonrası 24'üncü saatte dokuda myeloperoksidaz (MPO), malondialdehit (MDA), nitrik oksit (NO) değerleri ölçüldü, inflamasyon bulguları değerlendirildi. Ameliyat sonrası 10'uncu günde flep sağ kalım oranı, anjiyogenezis, apoptoz ve hematokrit (htc) seviyeleri değerlendirildi. Doku MDA seviyeleri karşılaştırıldığında grup 5'in grup 2 (p<0,043) ve grup 3'ten (p<0,042) anlamlı derecede farklı ve düşük olduğu görüldü. Doku NO seviyeleri karşılaştırıldığında grup 3'ün (p<0,040), grup 4'ün (p<0,003) ve grup 5'in (p<0,001) grup 2'den anlamlı derecede yüksek olduğu görüldü. Anjiyogenezis karşılaştırıldığında grup 5'in grup 2 (p=0,001), grup 3 (p=0,001) ve grup 4'ten (p=0,003), grup 4'ün grup 2'den (p=0,045) anlamlı derecede yüksek olduğu görüldü. Grup 5 (p<0,05), ve grup 4'ün (p<0,05), grup 2'den anlamlı derecede düşük apoptotik hücre sayısına sahip oldukları görüldü. Flep sağ kalım oranları değerlendirildiğinde grup 3'ün (p= 0,003), grup 4'ün (p< 0,001) ve grup 5'in (p<0,001) grup 2'den, grup 5'in grup 3'ten (p= 0,001) anlamlı derecede farklı ve yüksek sağ kalım oranına sahip olduğu görüldü. Sonuçlarımız iskemik önkoşullandırma ve sistemik rhEpo'in beraber kullanımının I/R hasarını azaltmada anlamlı derecede efektif olduğunu göstermiştir

**Anahtar kelimler;** eritropoetin, iskemik önkoşullandırma, iskemi-reperfüzyon hasarı, apoptozis

## ABSTRACT

### **The effects of recombinant human erythropoietin and ischemic preconditioning on ischemia-reperfusion injury in the groin flap model in rats**

The tissue protective potentials of recombinant human erythropoietin (rhEpo) and ischemic preconditioning (IP) against ischemia/reperfusion (I/R)-induced injury are well known. In this study, the combined and individual effects of IP and systemic rhEpo on rat groin flaps were evaluated and compared clinically and histologically. Seventy-four Wistar rats were randomly divided into five groups. Group 1 ( $n=10$ ) the sham-operated animals underwent flap elevation. Group 2 ( $n=16$ ); a groin skin flap was elevated and an 8-hour ischemic insult was achieved. Group 3 ( $n=16$ ); IP was performed by 3 episodes of 10 min femoral artery occlusion followed by 10 min reperfusion and then same ischemia procedure was performed. Group 4 ( $n=16$ ) the same ischemia procedure was performed, thirty minutes before reperfusion; single-dose rhEpo (5000 IU/kg) was injected through the intraperitoneal route. Group 5 ( $n=16$ ) the same IP and rhEpo procedures was performed. At 24 hours postoperatively, tissue myeloperoxidase (MPO), malondialdehyde (MDA), nitric oxide (NO) values and histologic finding of inflammation were evaluated. At day 10 postoperatively, flap survival rate, angiogenesis, apoptosis and change in hematocrit (htc) level were evaluated. The flap tissue MDA value in the group 5 was significantly lower compared with the group 2 ( $p<0,043$ ) and group 3 ( $p<0,042$ ). NO value in the group 3 ( $p<0,040$ ), group 4 ( $p<0,003$ ) and group 5 ( $p<0,001$ ) was significantly higher compared with the group 2. Angiogenesis in the group 5 was significantly higher compared with the group 2 ( $p=0,001$ ), group 3 ( $p=0,001$ ), group 4 ( $p=0,003$ ) and group 4 was significantly higher compared with the group 2 ( $p=0,045$ ). The apoptotic cell in the group 5 ( $p<0,05$ ) and group 4 ( $p<0,05$ ) was significantly lower compared with the group 2. In the group group 3 ( $p= 0,003$ ), group 4 ( $p< 0,001$ ) and group 5 ( $p<0,001$ ) the flap survival was significantly higher compared with the group 2, and the group 5 was significantly higher compared with the group 3 ( $p= 0,001$ ). Our results show that combination of IP and rhEpo is significantly effective in reducing I/R injury.

**Key words;** erythropoietin, ischemic preconditioning, ischemia-reperfusion injury, apoptosis

## GİRİŞ ve AMAÇ

Plastik cerrahide doku defektlerinin fleplerle onarılması branşın temel prensiplerindedir. Zaman içinde gelişen teknoloji ve bilgi birikimi, serbest doku aktarımı ve ampute uzuvların replantasyonunu mümkün kılmıştır. Günümüzde vücuttaki hemen her vaskülarize yapının aktarılabilmesi mümkündür<sup>1</sup>. Ancak çok kritik bir konu iskemi süresidir ve özellikle serbest doku aktarımları ve amputasyonlarda doku yaşayabilirliğinin devamı açısından kritik bir önem taşımaktadır. Zaman içinde anlaşılmıştır ki reperfüzyon adı verilen dokunun yeniden kanlanması olayı bir dizi karmaşık mekanizmayla, beklenenin aksine, dokuda zarar verici bir etki yaratmaktadır. İlgi ve çalışmaları üzerine çeken bu konuda sayısız çalışmalar yapılmış, aydınlatılan konuların yanı sıra halen ışık tutulmasına ihtiyaç olan pek çok esrarengiz yön kalmıştır. Pek çok yöntem ve kimyasal ajan bu etkileri azaltmak amacıyla deneysel çalışmalara konu olmuştur. Bu yöntemler arasında dokuyu iskemiye hazırlayıcı önkoşullandırma yöntemi değişik dokularda kullanılmıştır. İlk olarak Murry ve arkadaşları, köpek kalbinde, koroner arter üzerinde klepleme ile oluşturdukları kısa iskemik periyotları ve bunu takiben doku reperfüzyonları ile daha uzun bir iskemik periyoda toleransın arttığını göstererek, iskemik önkoşullama fenomenini ortaya koymuşlardır<sup>2</sup>. Literatürde flep sağkalımını arttırmak için yapılan aksiyel fleplerde iskemik önkoşullama çalışmaları bulunmaktadır<sup>3,4</sup>.

Eritropoetin böbrekte üretilen ve hematopoezisi regüle eden bir glikoproteindir<sup>5</sup>. Hipoksik ortama cevap olarak seviyesi yükselir<sup>6</sup>. Hipoksik ortamda, kemik iliğinde bulunan eritroid progenitor hücrelerdeki eritropoetin reseptörleriyle etkileşerek apoptozisin azalmasına ve diferensiasyona neden olurlar. Rekombinant insan eritropoetini kronik böbrek yetmezliğinde kemoterapiye bağlı anemide, prematüritede, romatoid artrit ve myelodisplaziside kullanılmaktadır<sup>7</sup>. Çeşitli kaynaklar eritropoetin non-hematopoetik etkilerinden bahsetmektedir. Bu etkiler nöronlar, endotel hücreleri, damar düz kas hücreleri ve kardiyak miyositlerde bulunan reseptörler aracılığı ile olmaktadır<sup>7-13</sup>. Literatürde eritropoetin iskemi reperfüzyon hasarında önemli rol oynadığı gösterilmiş ve retina, ince barsak, karaciğer ve böbrekte yapılan çalışmalar yayınlanmıştır. Ayrıca değişik kimyasal ajanlarla iskemik önkoşullandırma metodlarını karşılaştıran çalışmalar mevcuttur<sup>14-20</sup>. Hiçbir çalışma eritropoetin ve iskemik önkoşullandırmayı birlikte kullanmamış dolayısı

ile bu iki etkin yöntemin birlikteliğinin sonuçları hakkında bilimsel bir kaynak bulunmamaktadır.

Planladığımız çalışmada pozitif sonuçlar veren bu iki metodu birleştirerek iskemi reperfüzyon hasarında muhtemel olumlu etkileri klinik ve histolojik olarak göstermeyi amaçladık.



## GENEL BİLGİLER

### Flep Kan Akımının Düzenlenmesi

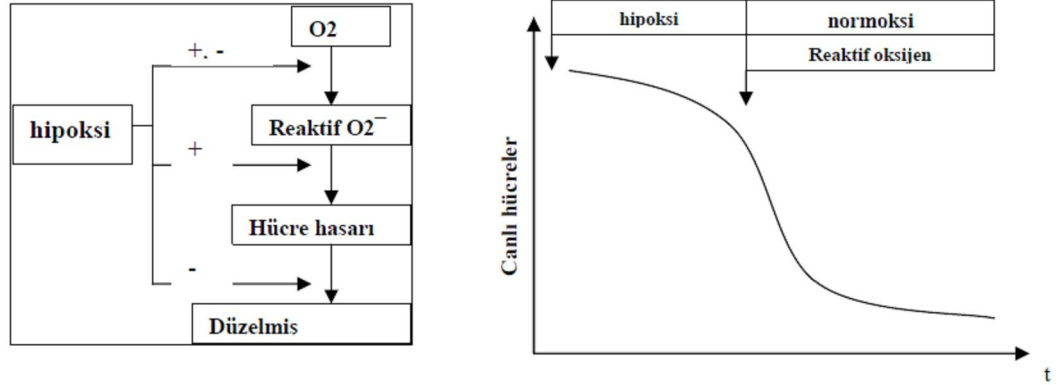
Deri kan akımı, lokal ve sistemik olmak üzere iki seviyede kontrol edilmektedir. Sistemik kontrol; nöral ve hormonal olabilmektedir. Nöral dengeleme daha baskındır ve başlıca; vazokonstrüksiyonu sağlayan sempatik lifler, alfa adrenerjik reseptörler ile vazodilatasyon yapan beta adrenerjik reseptörler aracılığıyla gerçekleşir. Arteriol ve arteriovenoz anastomoz seviyesinde damar düz kas tonusunu düzenlerler<sup>21-23</sup>. Hormonal dengeleme, sistemik vazoaktif maddelerin kendilerine özgün reseptörlerdeki aktiviteleriyle sağlanmaktadır. Sistemik vazokonstriktörler; serotonin, tromboksan A2 ve prostaglandin F2 $\alpha$  yı içerir. Vazodilatatörler ise prostaglandin E1, prostaglandin I2 (prostasiklin), histamin, bradikinin ve lökotrien C4 ve D4'ten oluşur<sup>21,22</sup>.

Hiperkapni, hipoksi ve asidoz gibi metabolik faktörler, lokal düzeyde vazodilatasyona yol açarak deri kan akımını etkilemektedir. Artmış doku perfüzyonu ve hipotermi ise lokal olarak vazokonstrüksiyon ile kan akımını azaltmaktadırlar<sup>21,23</sup>.

### İskemi

Bir dokuya giden kan akımı kesildiğinde, o dokuya ait hücrelerin fonksiyon bozukluğu ile başlayan ve hücre ölümüne kadar ilerleyen bir dizi kimyasal olay gerçekleşir. Hücresel fonksiyonların gerçekleşebilmesi için gerekli temel yakıt oksijendir. Aerobik metabolizma ile normal hücre fonksiyonları için gerekli olan yüksek enerjili fosfat bağları sağlanır. Oksijen yetersizliği durumunda; laktik asit ve toksik metabolitlerin birikimi ile sonuçlanan anaerobik metabolizma devreye girer. Ortaya çıkan asidoz nedeniyle normal enzim kinetiği değişir ve yüksek enerjili fosfat bağlarının yapımı azalmasıyla hücre kendi homeostazı için gerekli olan enerjiden yoksun kalır<sup>24-26</sup>.

Kritik iskemi süresi; kan akımının kesilmesinden sonra, dokunun canlı kalması ve enerji depolarının eşik seviyenin altına inmesine kadar geçen azami süreyi ifade eder. Bu süre aşıldığında doku perfüzyonu yeniden sağlansa dahi doku hasarı kaçınılmazdır<sup>27,28</sup> (Şekil 1).



**Şekil 1.** Hipoksik ortamda serbest radikal oluşumu ve iskemi-reperfüzyon hasarı.

### Akut Hücre Zedelenmesinin Nedenleri

Hipoksi, hücre hasarı ve ölümünün en sık nedenlerinden biridir. Akut hücre zedelenmesi, uyarana karşı oluşur ve hücre morfolojisinde değişimler meydana getirir. İskemide aktive olan serbest oksijen radikalleri (SOR) lipid peroksidasyonuna ve hücre hasarlanmasına neden olur. Akut iskemiye izleyen olaylar şu şekilde gelişir<sup>29</sup>.

#### 1-Geri Dönüşümlü Zedelenme

1. Hücre hasarı ve ölümünün en sık nedenlerinden biri hipoksidir. Hipoksidede, hücre içi oksijen azlığı nedeniyle aerobik solunum aksar ve mitokondrideki oksidatif fosforilasyon engellenir. Adenozin trifosfat (ATP) üretimi azalır ya da tamamen sona erer ve ATP kaybı sonucu ATPaz aktivitesi de azalır. Bunun sonucu olarak hücre zarında bulunan aktif sodyum pompası yetersizliği ve beraberinde hücre içinde sodyum birikimi meydana gelir. Hücre içi potasyum dışarı atılır. Ardından suyun hücre içine girmesiyle hücre sel şişme meydana gelir. Hücre sel şişmenin bir diğer nedeni ise katabolitlerin birikimidir<sup>29,30</sup>.

2. Hücrenin enerji metabolizması bu süreç içerisinde glikoza bağımlı hale gelir ki bunun sonucu olarak glikojen depoları hızla azalır. Glikoliz, laktik asit ve fosfat türevlerinin hidrolizi ile inorganik fosfatların birikimine, bu ise hücre içi pH'nın düşmesi ile asidoza neden olur.

3. Sonrasında granüllü endoplazmik retikulumdan ribozomlar ayrılır ve polizomlar monozomlara parçalanarak protein sentezi azalır. Hipoksinin devam etmesi halinde membran geçirgenliği artar ve mitokondri fonksiyonları yavaşlar. Bu sırada mitokondri normal, hafif yoğunlaşmış ya da şişmiş, endoplazmik

retikulum ise genişlemiş bir görünüm kazanırlar. Sonuçta hücre belirgin biçimde şişer. Buraya kadar olan olaylar geri dönebilir değişikliklerdir. İskemi bu andan sonra da devam ederse, geri dönüşümsüz hücre zedelenmesi başlar. Hücre hasarının yapısal değişiklikleri, bazı kritik biyokimyasal sistemlerin bozulmasından sonra görünür hale gelir. Hücre şişmesi geri dönüşümlü bir hasardır ve dakikalar içinde görülebilir. Hücre ölümünün (örneğin miyokard) bulguları, tam iskemiden 10-12 saat sonrasına kadar ışık mikroskobu ile görülmez. Geri dönüşümsüz hasar bugünkü bilgilerimize göre ilk 20-60 dakika içinde oluşur<sup>29</sup>.

## **2-Geri Dönüşümsüz Zedelenme**

Geri dönüşümsüz hücre zedelenmesinde mitokondri ve kristalarda aşırı vakuolizasyon ile plazma zarında aşırı zedelenme vardır. Hasarlanmış ve ileri derecede geçirgenleşmiş zarlardan hücre için gerekli yaşamsal elemanların kaybolduğu görülür. Hücre içi pH'nın düşmesi, lizozom zarlarının zedelenmesi ve beraberinde enzimlerin sitoplazmaya geçerek asit hidrolazları aktiflemesi sonucu, çekirdek ve sitoplazma yapıları sindirilir. Hücre zedelenmesinde en önemli basamak kuşkusuz membran zedelenmesidir. Hücre membran zedelenmesinde altı neden suçlanmaktadır.

1. Mitokondri fonksiyon bozukluğu
2. Membran fosfolipidlerinin giderek artan kaybı
3. Hücre iskeletindeki değişimler
4. SOR
5. Lipid yıkım ürünleri
6. Hücre içi aminoasitlerin kaybı

Membran zedelenmesiyle hücreler arası mesafeden hücre içine doğru kalsiyum ( $Ca^{+2}$ ) tutulumu gerçekleşir. Dokunun tekrar oksijenlenmesi ile mitokondri tarafından tutulan  $Ca^{+2}$  hücresel enzimleri inhibe ve proteinleri denatüre eder. Böylelikle koagülasyon nekrozuna özgü hücresel değişimler meydana gelir. İskemi sonrasında dokuda dolaşımın yeniden başlaması, reperfüzyon olarak adlandırılmaktadır. İskemi sonucunda artan SOR kan akımı düzeldikten sonra reperfüzyon zedelenmesine yol açar. Reperfüzyon oluşmazsa, öldürücü iskemik zedelenme gelişir fakat toksik SOR oluşmaz. Reperfüzyon sırasında iskemik alanda toplanan nötrofil ve trombositlerin aktivasyonu, hücre içi  $Ca^{+2}$  birikimi ile mikrovasküler hasarın dokudaki

zedelenmenin nedeni olduğu bilinmektedir. İskemik alanda toplanan polimorf nüveli lökositlerin büyük ölçüde toksik oksijen türevlerinin yapımında sorumlu olduğu düşünülmektedir<sup>29-31</sup>.

İskemik dokunun reperfüzyonu, dokuda paradoksal olarak sadece iskemi ile oluşan hasara göre çok daha ciddi bir hasara yol açar. Reperfüzyon döneminde gözlenen hasarda, hücre içine moleküler oksijen girişi ile hızla oluşan serbest oksijen radikal türevleri başta olmak üzere birçok mekanizma rol oynamaktadır. Reperfüzyon hasarına en fazla duyarlı olan hücresel yapılar, zar lipitleri, proteinler, nükleik asitler ve deoksiribonükleik asit molekülleridir<sup>32</sup>.

### **Reperfüzyon ve Reperfüzyon Hasarı**

Reperfüzyon, iskemiye neden olan etkenin ortadan kaldırılarak dokuya kan akımının yeniden düzenlenmesidir. Reperfüzyonun, iskemik dokuda enerji ihtiyacının sağlanması ve toksik metabolitlerin uzaklaştırılması gibi iki olumlu etkisi vardır. Reperfüzyon, iskemik hasarın düzeltilebilmesi için gerekli bir süreçtir. Ancak oksijenlenmiş kanın iskemik dokuya dönüşü dokuyu daha fazla zedeleyen bir reaksiyon sürecini başlatır<sup>24,32,33</sup>.

Reperfüzyon hasarı serbest oksijen radikalleri, endotelial faktörler ve nötrofillerin eşlik ettiği karmaşık bir mekanizmayla gerçekleşir. Hasarı asıl tetikleyen olayın endotel hücrelerindeki zedelenme olduğu düşünülmektedir<sup>26,34,35</sup>. İskemi-reperfüzyon hasarının fizyopatolojisi ile ilgili çeşitli faktörler ileri sürülmüştür. Bunlar birbiriyle ilişkileri karmaşık, hücresel ve humoral olaylar serisidir<sup>36,37</sup>.

Özellikle dört faktör hasarın nedenleri arasında yer almaktadır;

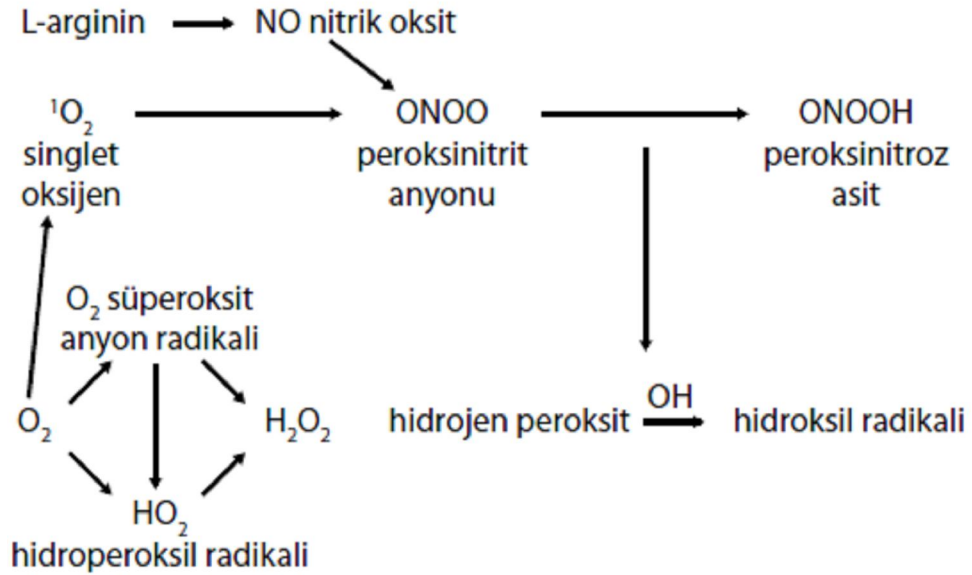
1. Serbest oksijen radikalleri
2. Polimorf nüveli lökositler (PMNL)
3. Kompleman sistemi
4. Endotel hücreleri

Postiskemik dönemde, ksantin oksidaz enzimi, iskemik dokudaki serbest radikallerin en belirgin kaynağıdır. Bu enzim “dehidrojenaz” ve “oksidaz” aktivitesine sahip iki şekilde bulunur. Çalışmalarda iskemi sırasında ksantin dehidrojenaz enziminin kalsiyum aracılı bir proteaz katalizörlüğünde ksantin oksidaza dönüşmesi, intestinal dokuda 10 saniye, kardiyak kasta 8 dakika, karaciğer, dalak, böbrek ve akciğerde 30 dakika sürmektedir. Bu da değişik dokuların iskemi-reperfüzyon hasarına neden farklı oranlarda cevap verdiği

konusunda açıklayıcı olmaktadır. Hipoksantin ve ksantin oksidasyonu serbest radikallerin oluşumuna yol açar<sup>24,34,38</sup>.

### Serbest Radikaller

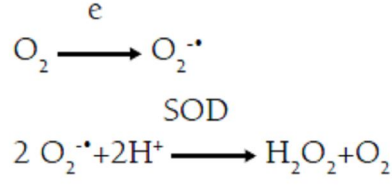
Serbest radikal, eşlenmemiş elektron içeren atom veya moleküldür. Genelde elektronlar atom veya molekülde eşlenik olarak bulunmaları nedeniyle molekül stabildir ve reaktif değildir. Ancak, moleküle bir elektron ilavesi ya da bir elektron kaybı onu reaktif hale getirir<sup>39</sup>. Biyolojik sistemlerde oluşan serbest radikallerin endojen kaynakları oksijen, nitrik oksit, uyarılmış nötrofil, mitokondriyal elektron transport sistemi, endoplazmik retikulum, peroksizom ve plazma membranı olarak sayılabilir. Solunan oksijenin % 95'inden fazlası mitokondrilerde ATP şeklinde enerji oluşumunda kullanılırken, yaklaşık %5 'i de son yörüngelerinde ortaklanmamış elektron içeren ve bu özellikleri nedeniyle de toksik serbest radikallere dönüşmektedir (Şekil 2).



**Şekil 2.** Oksijen paradoksu: moleküler oksijenden serbest radikal oluşumu ve nitrik oksitle ilişkisi<sup>40</sup>.

İnsanda her yıl 2 kg oksijen ( $O_2$ ) oluştuğu bildirilmiştir<sup>40</sup>. Süperoksit radikali, oksijen molekülüne bir elektron ilavesi ile oluşur ve serbest radikal hasarına karşı koruyucu antioksidan bir enzim olan ve oksidan hasar oluşumu ile birlikte artan süperoksit dismutaz (SOD) aracılığı ile hidrojen peroksit

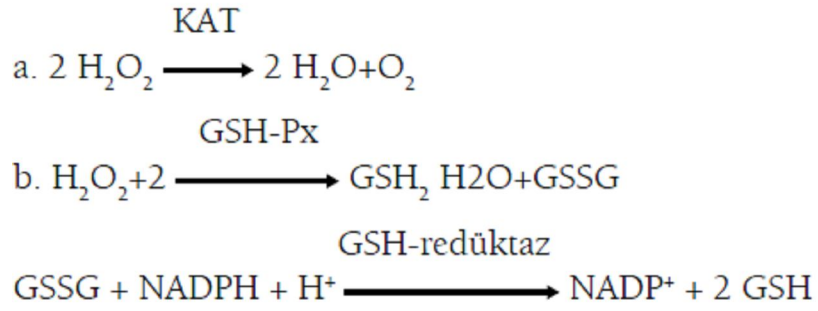
(H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>)'e indirgenir (Şekil 3). Hidrojen peroksit eşlenmemiş elektron içermediği için tek başına radikal değildir<sup>41</sup>.



**Şekil 3.** Süperoksit radikalinin Hidrojen peroksit'e indirgenmesi.

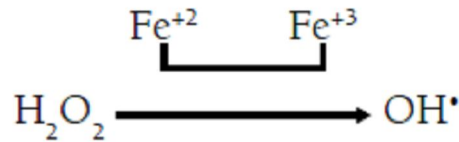
Hidrojen peroksitin hücre içinde metabolizması birkaç şekilde olabilir.

1- H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, katalaz (KAT) veya glutatyon peroksidaz (GSHPx) tarafından toksik olmayan ürünlere dönüşür (Şekil 4):



**Şekil 4.** H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>'nin KAT veya GSHPx tarafından toksik olmayan ürünlere dönüşümü.

2- H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> geçiş metallerinin varlığında toksik OH radikaline dönüşür: Fenton reaksiyonu. Değerlilikleri değiştiği için geçiş metalleri denilen bazı metaller, hücre içi reaksiyonlar ya da Fenton reaksiyonu sırasında yeri geldiğinde serbest elektronları alarak veya vererek serbest radikal oluşumunu katalizler (Şekil 5).



**Şekil 5.** Fenton reaksiyonu <sup>42</sup>.

Reaksiyonun sonucunda demir, çok reaktif ve biyolojik sistemlerde hasara yol açan hidroksil radikali oluşumuna yol açar. Redoks tepkimelerinde de az miktarda toksik ara ürün (süperoksid, hidrojen peroksit ve hidroksil radikalleri) oluşmaktadır. Hidroksil radikali oldukça reaktif ve toksik bir radikaldir; ilk karşılaştığı molekül ile  $10^{-6}$  s içinde,  $14 \text{ A}^\infty$  mesafesinde reaksiyona girer. Hidroksil radikali büyük molekül yapısı ve elektronegativitesi nedeni ile DNA, protein, karbonhidrat ve lipitler gibi makromoleküllerle reaksiyona girerek bu yapılarda oksidatif hasara neden olur.

### **Polimorf Nüveli Lökositler**

Reperfüzyon hasarını önlemeye yönelik antinötrofil serumlarla ya da lökosit adhezyon moleküllerine karşı monoklonal antikörlerle yapılan çalışmalar, reperfüzyonda mikrovasküler permeabilitedeki artıştan başlıca nötrofillerin sorumlu olduğunu göstermiştir<sup>43</sup>. İ/R ile lökosit aktivasyonu, kemotaksis ve lökosit endotel hücre adhezyonu meydana gelir<sup>44</sup>. Diğer taraftan, PMNL yüksek miktarda SOR üretme kapasitesine de sahiptir. İskemi reperfüzyon hasarında PMNL'in rolü ile ilgili bazı mekanizmalar ileri sürülmüştür<sup>45</sup>. Bunlar:

1. Mikrovasküler oklüzyon
2. SOR salınması
3. Sitotoksik enzim salınması
4. Vasküler permeabilite artışı
5. Sitokin salınmasında artışı

Dokuda aktive lökositlerin başlattığı yanıt şu mekanizmalar ile gerçekleştirilir<sup>46,47</sup>:

1. Fosfolipaz A2 aktivasyonu araşidonik asit metabolitleri (prostoglandinler ve lökotrienler) sonucu üretilir.
2. Degranülasyon sonucu lizozomal enzimler salınır.
3. SOR üretimi gerçekleşir.

Bu ürünler endotel hasarı ve doku zedelenmesinin güçlü araçlarıdır ve başlangıçtaki inflamatuvar uyarının etkisini güçlendirirler. İskemik dokunun reperfüzyonu, arteriyollerde endotel bağımlı dilatasyonun bozulmasına, kapillerlerde lökosit tıkaçlarının oluşmasına ve sıvı filtrasyonunun artmasına, post-kapiller venüllerde plazma proteinlerinin damar dışına sızmasına ve böylece mikrovasküler fonksiyonun bozulmasına neden olur. Reperfüzyonun başlangıç döneminde, mikrosirkülasyonun tüm segmentlerinde aktive edilmiş

endotel hücrelerinden fazla miktarda O<sub>2</sub> oluşurken NO oluşumu ise azalır. Süperoksit radikali ile NO arasındaki dengenin bozulması, endotel hücrelerinden PAF, TNF-a gibi inflamatuvar mediyatörlerin salınmasına ve lökosit-endotel hücre adhezyonuna aracılık eden adhezyon moleküllerinin biyosentezinin artmasına neden olur<sup>47,48</sup>. Nötrofillerin aktivasyonu ile nötrofil sekonder granüllerden salıverilen apolaktoferrin, plazminojen aktivatörü, komplemanı aktive eden enzim ve elastaz, kolajenaz ve jelatinaz gibi proteolitik enzimler damar endotelinde hasara neden olmaktadır.

### **Komplemanın Rolü**

Komplemanların arka arkaya aktivasyonu, anaflatoksin C3a ve C5a'nın üretimine yol açar. Nötrofiller üzerindeki etkileri ise kemotaksis, endotele adhezyonun artışı, serbest oksijen radikallerinin üretim ve salınmasını sağlamaktır<sup>24,25</sup>.

### **Endotel Hücreleri**

İ/R hasarının oluşmasında endotel hücreleri önemli role sahiptir. Oksidatif stres endotel hücrelerinin aktivasyonuna ve işlevlerinin bozulmasına neden olur. Endotel hücreleri SOR için potansiyel hedef konumundayken diğer taraftan da SOR üretim kaynağıdır. Endotel, mikrovasküler homeostazdan sorumlu olan endotelin (ET)'i ve NO'ü üretir. NO arteriyel dolaşımında ET'in vazokonstriktör etkisini tersine çevirme eğilimindedir. Venlerde ise bunun tersi söz konusudur. İ/R hasarında endotelin/NO oranı endotelin lehine bozulur. Sonuçta arteriyel vazokonstriksiyon, venlerde vazodilatasyon olur<sup>49</sup>.

Endotel hücrelerinin oksidatif stresi sonucu kompleman aktive edilir; lökosit adhezyon moleküllerinin üretimi artar. SOR etkisi ile endotel hücreleri hasara yanıt olarak İL-1, PAF, prostaglandinler (PG I<sub>2</sub>, PG E<sub>2</sub>), GM-CSF, büyüme faktörleri, endotelin, NO ve tromboksan A<sub>2</sub> (TxA<sub>2</sub>) salgırlar. Aktive olan endotel hücreleri ek olarak kendi bazal membranlarını sindiren kollajenazlar salgılama yeteneğindedir<sup>47</sup>.

### **Serbest Radikaller ve Reperfüzyon Hasarındaki Roller**

Serbest radikaller, en dış yörüngesinde tek sayıda elektron içeren, ileri derecede reaktif, kısa ömürlü ve anstabil moleküllerdir. Moleküler oksijenin indirgenmesi ve eksitasyonu ile çok değişik oksijen serbest radikalleri üretilebilirler<sup>24,25,38</sup>. Oksijenin redüksiyonu ve aerobik hücrelerin enzimatik oksidasyonu sırasında negatif yüklü bir ara ürün olan süperoksit radikali oluşur.



Süperoksit radikalinden enzimatik yolla veya spontan dismutasyonla ikinci bir ara ürün olan hidrojen peroksit radikali ( $H_2O_2$ ) oluşur. Daha sonra özellikle mitokondride diğer bir ürün olan hidroksil radikali (OH) oluşur. Organizmada bu serbest radikaller dışında hidrojen peroksit, hipoklorik asit gibi radikal olmayan, bununla birlikte serbest radikal oluşturma potansiyelinde olan zararlı oksijen türleri de oluşabilmektedir. Diğerleriyle karşılaştırıldığında  $O_2$  radikali yüksek elektron aktivitesine sahiptir ve çok reaktiftir. Ancak oksijen radikallerinden en aktif olanı OH radikalidir<sup>24,38</sup>. Hücreler serbest oksijen radikallerinin hasarına bağışık değildir. Ancak genellikle glutatyon ve katalaz ile oksijen hasarına karşı korunmuşlardır. İskemik dokularda, serbest oksijen radikali üreten intraselüler mekanizmalar tam aktive edilmiş durumdadır. Ancak oksijen sağlanmasındaki eksiklikten dolayı fonksiyon görmezler. Kan akımı ve oksijen sağlanmasının restorasyonu ile büyük miktarlardaki serbest oksijen radikali üretilerek reperfüzyon hasarı indüklenir<sup>25</sup>.

Organizmada serbest oksijen radikalleri ortaya çıktıktan sonra radikal reaksiyon dizileri başlar. Eğer bir serbest radikal, radikal olmayan bir molekülle reaksiyona girerse, binlerce reaksiyondan oluşan reaksiyon zincirlerini başlatır. Serbest oksijen radikalleri paylaşılmamış elektronlarından dolayı lipid, protein, karbonhidrat, nükleik asit gibi çeşitli makromoleküllerin oksidatif hasarına neden olurlar<sup>38</sup>. Bu hasarlanma özetle şu mekanizmalarla olur.

1. Lipid Peroksidasyonu: Serbest radikallerin hücrede başlattığı en önemli ve zararlı etki lipid peroksidasyonudur. Çoklu doymamış yağ asitlerinin serbest radikaller ile oksidasyonu lipid peroksidasyonu olarak tanımlanır. Lipid peroksidasyonu, organizmada oluşan kuvvetli yükseltgen bir radikalın etkisiyle membran yapısındaki çoklu doymamış yağ asidi zincirindeki alfa metilen gruplarından bir hidrojen atomunun uzaklaştırılması ile başlamaktadır. Biyolojik sistemlerde bu radikalın süperoksit ile hidroksil radikalının olduğu kabul edilmektedir. Yağ asidi, zincirinden bir hidrojen atomunun uzaklaştırılması sonucu zincir radikal niteliğini kazanır. Bunun sonucunda oluşan radikal, alkil radikali olup dayanıksız bir tüevdir ve bir dizi değişikliğe uğrar. Özellikle molekül içi çift bağ aktarılması ile dien konjugatları ve daha sonra lipid radikalının moleküler oksijenle etkileşimi sonucunda lipid peroksi radikali (LOO-) oluşur. Lipid peroksi radikali zar yapısındaki diğer çoklu doymamış yağ asitlerini etkileyerek hidroperoksit (ROOH) ve yeni bir alkil radikali oluşturur. Lipid

peroksidasyonu, lipid hidroksiperoksitlerinin aldehit ve diğerkarbonil bileşikleriyle etkileşmesi sonucu etan, pentan gibi uçucu gazlara dönüşür<sup>24,38,50</sup>. Lipid peroksidasyonu biyolojik membranlarda akıcılığın kaybına, membran potansiyelinde azalmaya, hidrojen ve diğeryonlara karşı geçirgenliğin artışı neticesinde hücrenin hasarına ve içeriğinin serbestleşmesine neden olur. Ek olarak lipid peroksidasyonunun son ürünlerinden biri olan malondialdehit membran bileşenlerinin polimerizasyonuna ve çapraz bağ yapmalarına yol açar. Bu da, hücre yüzeyinin durumunu, enzim aktivitesini, iyon transportunu etkileyebilir<sup>38,50</sup>.

2. Protein oksidasyonu: Serbest radikaller ile oluşan protein oksidasyonunun kimyasal sonucu olarak metionin sülfokside, histidin oksihistidine veya asparagine, tirozin ditirozine ve sistein disülfidlere dönüşür. Bu değişiklikler proteinlerin bağlanma özelliklerinde ve enzim aktivitelerinde farklılaşmaya neden olarak hücre fonksiyonlarında bozulmalara yol açabilir<sup>38,50</sup>.

3. DNA: Serbest oksijen radikalleri adenin ve piridin nükleotid durumlarının sürdürülebilmesi için gerekli yollara engel olabilirler. Serbest oksijen radikalleri DNA ile tepkimeye girerek mutajenik olan 8-Hidroksiguanin'in ortaya çıkmasına neden olurlar<sup>51,52</sup>.

4. Kovalen bağlanma: Serbest radikaller polisiklik hidrokarbonlar, aromatik aminler ve nitrozaminler gibi ksenobiyotiklerin çeşitli biyomoleküllere kovalen bağlanmasına neden olabilir. Bu da doğrudan hücre hasarına yol açabilir<sup>52</sup>.

5. Kalsiyum: Hücre yaralanması ile ilgili olduğu düşünülen bir elementtir. Kalsiyumun transportunu engelleyen herhangi bir durum hücre fonksiyonlarını olumsuz etkiler. Kalsiyum ATPaz enzimleri önemli sulfidril gruplarına sahiptir ve serbest oksijen radikalleri tarafından inaktive edilebilir. Sitokinler, hipoksi, endotoksin gibi faktörler SOR aracılı yol kullanarak, hücre enerjisini azaltabilirler<sup>53</sup>.

### **Antioksidanlar**

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

1. Serbest oksijen radikallerini etkileyerek onları tutma, yok etme, “süpürücü etki”. Antioksidan enzimler, küçük moleküller bu yolla etki gösterirler<sup>40,54</sup>.

2. Serbest oksijen radikalleriyle etkileşip onlara bir hidrojen aktararak aktivitelerini azaltma veya “inaktif şekle dönüştürücü etki”. Vitaminler, flavanoidler bu tarz bir etkiye sahiptirler<sup>55</sup>.

3. Serbest oksijen radikallerini bağlayarak zincirlerini kırıp fonksiyonlarını engelleyici etki zincir kırıcı etkidir. Hemoglobin, seruloplazmin ve mineraller “zincir kırıcı etki” gösterirler<sup>56</sup>.

4. Serbest radikallerin oluşturdukları hasarın onarılması şeklinde “onarıcı etki” gösterirler<sup>57</sup>.

Endojen kaynaklı veya eksojen kaynaklı olan antioksidanların tanımlanmasında ve etkinliklerinin ortaya konmasında İ/R hasarı modelleri önemli katkı sağlamıştır. Antioksidan özelliği öne sürülmüş pek çok madde çeşitli İ/R modellerinde test edilerek değerlendirilmiştir. Literatürde antioksidan olarak kullanılan maddelere örnekler Tablo 1’de gösterilmiştir (Tablo 1 ).

### **Endojen Antioksidanlar**

Enzim ve enzim olmayanlar olmak üzere iki sınıfa ayrılırlar.

1.Enzim olan endojen antioksidanlar<sup>58</sup>: Süperoksit dismutaz (SOD), Glutasyon peroksidaz (GSHPx), Glutasyon S-Transferaz (GST), Katalaz, Mitokondriyal sitokrom oksidaz sistemi, Hidroperoksidaz.

2.Enzim olmayan endojen antioksidanlar<sup>59</sup>: Melatonin, Seruloplazmin, Transferin, Miyogloblin, Hemoglobin, Ferritin, Bilirubin, Glutasyon, Sistein, Metiyonin, Ürat, Laktoferrin, Albümin.

### **Eksojen Antioksidanlar**

1. Vitamin eksojen antioksidanlar: a-tokoferol (vitamin E), β-karoten, Askorbik asit (vitamin C), Folik asit (folat).

2. İlaç olarak kullanılan eksojen antioksidanlar<sup>60</sup>:35ksantin oksidaz inhibitörleri (allopürinol, oksipürinol, pterin aldehit, tungsten) NADPH oksidaz inhibitörleri (adenozin, lokal anestezipler, kalsiyum kanal blokerleri, nonsteroid antiinflamatuvar ilaçlar) rekombinant süperoksit dismutaz trolox-C (vitamin E analogu), endojen antioksidan aktiviteyi artıranlar (GSH-Px aktivitesini artıran ebselen ve asetilsistein), nonenzimatik serbest radikal toplayıcılar (mannitol,

albümin), demir redoks döngüsü inhibitörleri (desferroksamin), nötrofil adezyon inhibitörleri, Sitokinler (TNF ve IL-1), Barbitüratlar, Demir şelatörleri

**Tablo 1:** I/R hasarında antioksidan etkili olduğu çeşitli deneysel çalışmalarda gösterilmiş olan ajanlara örnekler.

ANTIÖKSİDAN	I/R MODELİ	ANTIÖKSİDANIN ETKİLİ BULUNDUĞU ORGAN/DOKU	REFERANS
melatonin	böbrek İ/R	böbrek	61
	karaciğer İ/R	karaciğer	62
	femoral arter İ/R	iskelet kası	63
	deride bası ile İ/R	deri, karaciğer, böbrek, akciğer, mide, ince barsak	64
resveratrol	böbrek İ/R	böbrek	65
	abdominal aort İ/R	mesane	66
alfa-lipoik asit	karaciğer İ/R	karaciğer	67
	böbrek İ/R	böbrek	68
N-asetilsistein	karaciğer İ/R	karaciğer	62
	böbrek İ/R	böbrek	69
oksitosin	böbrek İ/R	böbrek	70
beta-glukan	deri İ/R	deri, karaciğer, böbrek, akciğer, mide, ince barsak	71
ginkgo biloba	böbrek İ/R	böbrek	72

### İskemik Önkoşullama

İskemik önkoşullama dokuya letal olmayan kısa iskemik periyot uygulanması işlemidir. Bu işlem dokunun daha sonra karşılaşacağı uzun iskemiye bağlı hasar için direncini sağlar. Erken faz, iskemik önkoşullamanın hemen sonrasında başlayıp 4 saate kadar uzayan etki gösterirken; geç faz, önkoşullamadan takriben 24 saat sonra başlar ve 72 saat süreyle etki gösterir<sup>2,3,73</sup>.

Başlıca önkoşullama yöntemleri;

1. İskemik( flep geciktirilmesi, klemleme)
2. Uzak iskemik (turnike)
3. Farmakolojik ( adenzin, monofosforil lipit A, NO donörü)
4. Isı uygulaması ( HSP 70i/72 ) olarak toplanmıştır<sup>2,74-,77</sup>

İlk olarak Murry ve arkadaşları<sup>2</sup>, subletal dozda iskemiye uğratılan dokunun daha sonraki letal olabilecek iskemik duruma karşı koruyucu etkisini myokard kasında gösterdi. Koruyucu etki adenzin ve opioidler gibi inhibitor G proteinlerinin reseptör bağımlı stimülasyonu sonucu ortaya çıkmaktadır<sup>78</sup>. Adenzin<sup>79</sup>, monofosforil lipid<sup>77</sup> ve dexamethazone<sup>75</sup> kullanılarak gerçekleştirilen iskemik ön koşullamanın plastik cerrahiye uyarlanması ise serbest ve pediküllü fleplerin proksimal pedikülünün geçici klemplenmesi ile flep yaşam oranlarının artırılması şeklinde ortaya çıkmıştır<sup>79</sup>.

İskemik önkoşullamanın dokuyu koruma mekanizması hala tam olarak anlaşılammıştır. Rees ve arkadaşlarının yaptığı deneysel çalışmalarda random fleplerin distalindeki nötrofil aracılı nekrozun, önkoşullama sonrasında nötrofil birikiminde azalmayla birlikte canlılıkta artış gözlemiştir<sup>78</sup>.

Birçok araştırmacı, K<sup>+</sup>-ATP kanalları gibi proteinlerin fosforilasyonuna neden olan protein kinaz C nin aktivasyonu ile hücrel korunmanın sağlandığını öne sürmektedir. Bu görüş, adenzin uygulanmasıyla iskemik önkoşullama benzeri etkinin oluşması ve adenzin reseptör antagonistlerince etkinin önlenmesini gösteren çalışmalarla desteklenmiştir<sup>79-81</sup>.

Pang ve arkadaşları, domuz latissimus dorsi kasında en az 3 siklus halinde 10 dakika iskemiye takiben 10 dakika reperfüzyon uygulayarak iskemik önkoşullamanın koruyucu etkisini sağlamıştır. Koruyucu etkinin kas flebinde oluşması için gereken süre daha önce kalp kası için yapılmış olan önkoşullamada gerekenden çok daha fazladır<sup>82</sup>.

Önkoşullama için iskemi mevcut tek stres şekli değildir. Isı ve ısı şok proteinlerinin üretimi ile önkoşullama sağlanabilmektedir. Birçok araştırmacı, deneysel olarak ısı şoku uygulayarak flep derisinde ısı şok protein ekspresyonunda artma ile birlikte flep sağkalımında artış sağlanacağını göstermiştir<sup>74,83,84</sup>.

### **İskemik Hasar ve Hücrenin Programlı Ölümü ( Apoptozis )**

Apoptozis birçok gen ile ilişkili aktif bir sistem olup, Yunancada apo (ayrı)

ve ptozis (düşen) kelimelerinin birleştirilmesi ile oluşmuş sonbaharda yaprak dökümünü tanımlayan bir kelimedir<sup>85</sup>.

Tümörlerde sık görülen bir olay olup hücre ölümüne yol açan aktif olarak düzenlenmiş bir hücresel süreçtir. Apoptozise direnç göstermek, hücre kaybını azaltarak tümöre bir avantaj sağlar<sup>86</sup>.

Yüksek organizmalarda hücre ölümü iki farklı mekanizma ile gerçekleşir. Klasik hücre ölümü nekroz olarak adlandırılır. Hücre ölümünün diğer şekli olan apoptozis ise çoğunlukla tek tek hücreleri etkiler, birçok fizyolojik ve patolojik koşullarda ortaya çıkar ve genellikle enflamasyon söz konusu değildir<sup>87</sup>.

Hücrenin yaşam süresi tipine göre değişmektedir. Örneğin; bağırsak hücreleri 3–5 günlük bir yaşam süresini takiben ölürken, derinin epidermal hücreleri 20–25 günlük bir süre sonunda ölmektedir. Kalp kası hücreleri veya nöronlar ise ömür boyu yaşarlar. Tüm bu ölümler fizyolojik şartlarda meydana geldiği için, fizyolojik hücre ölümü olarak da adlandırılır<sup>88</sup>. Apoptozla hücre ölümü; enerji kullanılarak hücresel yaralanma ve enflamasyon olmaksızın, ustaca gerçekleştirilir<sup>89</sup>. Programlı hücre ölümünün, bütün çok hücreli organizmalarda, gelişmede ve homeostazın sürdürülmesinde vazgeçilmez bir rolü vardır<sup>90</sup>.

Apoptozis terimi ilk kez 1972 yılında Kerr ve arkadaşları tarafından kullanılmıştır. Kerr, fizyolojik olarak ölen hücrelerin çekirdeklerinde yoğunlaşmış kromatin parçalarını gözlemlemiş ve organellerin iyi korunduğunu fark ederek bu olayı büzüşme nekrozu olarak adlandırmıştır<sup>91</sup>.

Apoptozisi etkileyen hücre içi uyaranlar arasında sitokinler, hücre içi kalsiyum miktarında artış, tümör nekroz faktör, DNA hasarı nedeniyle bir tümör süpressör gen olan p53'ün aktive olması, viral-bakteriyel enfeksiyonlar, glukokortikoidler ve onkojenlerin (cmyc gibi) yer aldığı bilinmektedir. Ayrıca hipertermi, radyasyon, sitotoksik antikanser ilaçları ve hipoksi gibi nekroz oluşturabilen etkenler hafif dozlarda apoptoz meydana getirirler. Apoptozda hücre ölümü çevreye rahatsızlık vermeksizin gelişse de bazen apoptozis dolaylı olarak çevre dokuda nekrozu başlatabilir ya da tam tersi nekroz apoptozis gelişmesine yol açabilir<sup>92</sup>.

Önkoşullama tarafından uyarılan hipoksinin hücre programlı ölümünü tetiklediği bildirilmiştir. Bir kısım hücrenin programlı ölümü sonrası oksijen

ortaya çıkması ile iskemiye tabi tutulan hücreler sınırlı kaynak halinde sayılarını kısıtlayarak hayatta kalabilmektedir. Diğer olası mekanizma ise protein kinaz C (PKC) aktivasyonu ile inhibitör faktör IκB'nin fosforilasyonu yoluyla gerçekleşir. IκB'nin fosforilasyonu; hücre koruyucu proteinlerin üretimine yol açan NFκB'nin artışına izin verir<sup>93,94</sup>.

Apoptozun regülasyonu Bcl-2 / Bax gen ailesi ile sağlanır. Bu ailenin 20 üyesi tanımlanmıştır; bunlardan bazıları apoptoz inhibitörüdür (antiapoptotik), bazıları ise apoptozu uyarır ve proapoptotik genler olarak tanımlanır<sup>95</sup>. Apoptotik sinyalin alınmasından sonra Bax (proapoptotik) proteinleri, mitokondri zarının iyon geçirgenliğini azaltabilir. Zardaki bu değişiklikler nedeniyle sitokrom C ve Apoptosis Inducing Factor (AIF) gibi mitokondri zarı içinde yer alan faktörler sitoplazmaya geçerler<sup>96</sup>. AIF doğrudan yoğunlaşan kromatine ve parçalanmış çekirdeğe yönelirken, sitoplazmaki sitokrom C apoptozun en son basamağında görev alır. Sitokrom C bir sitoplazma proteini olan Apaf-1'e bağlanarak prokaspaz-9'u aktive eder ve oluşan bu kompleks 'apoptosom' olarak isimlendirilir. Prokaspaz-9'un aktivasyonu, bir seri kaspaz aktivasyonunu başlatır<sup>90,95</sup>.

Apoptoz aşamaları<sup>97</sup>:

- 1- Ölüm sinyali
- 2- Kromatinde sıkışma
- 2- Hücrede parçalanma
- 3- Fagositoz olarak özetlenebilir

Olay biraz daha ayrıntılandırılırsa şunlar görülür:

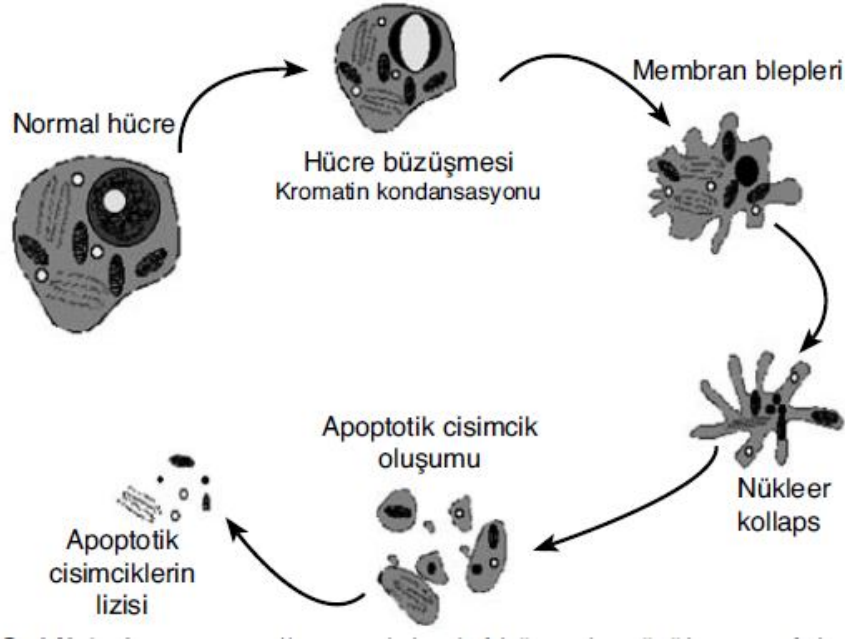
Eksternal olarak

- 1- Hücre hacim kaybeder ve büzülür
- 2- Hücre yüzeylerinde küresel kabarcıklar oluşur (blebbing)
- 3- Phosphatidylserine isimli fosfolipid hücreden dışarı çıkar

İnternal olarak

- 1- Sitoplazma yoğunlaşır (kondanse olur).
- 2- Mitokondrium, sitokrom -C gibi apoptozu uyaran faktörleri serbestleştirerek bütünlüğünü kaybeder ve parçalanır.
- 3- Kaspazlar aktive olur

- 4- Kromozomal DNA'lar kendi içinde 180-200 bp'lik internükleozomal fragmanlara ayrılarak parçalanır
- 5- Hücre sağkalımı ve metabolizmasında çok önemli olduğu düşünülen ve moleküler ağırlığı 100 daltonun üzerinde olan birçok protein de benzer şekilde parçalanır (Şekil 6)



**Şekil 6.** Apoptoza uğrayacak hedef hücrede görülen morfolojik değişiklikler<sup>97</sup>.

### Yeni Damar Oluşumu

Yeni damar oluşumu; angiogenez ve vaskülogenez olarak iki mekanizma ile gerçekleşir. Angiogenez mevcut olan venüllerden endotel hücrelerinin aktivasyonu, göçü ve proliferasyonunu içeren yeni kapiller oluşumudur<sup>98</sup>. Angiogenez; nitrik oksit, VEGF (vascular endothelial growth factor) gibi ürünlerle damar geçirgenliğinde artış ile başlar. Angiogenezin geç fazları da VEGF, PDGF (platelet derived growth factor) ve bFGF (basic fibroblast growth factor) gibi çok sayıda büyüme faktörü ve sitokinler tarafından düzenlenir<sup>98-101</sup>.

VEGF anjiogenik, mitojenik ve vasküler geçirgenliği arttıran proteindir ve endotel hücrelerinde nitrik oksit sentazı uyarma yoluyla vazodilatasyona neden



olduğu ve aynı zamanda hücre göçünü uyarıp, apoptozisi inhibe ettiği belirtilmiştir<sup>102</sup>.

Anjiyojenik büyüme faktörleri lokal olarak sekrete olan proteinlerdir ve embriyogenez, tümör büyümesi, yara iyileşmesi, damar büyümesinin düzenlenmesinde kilit rol oynarlar. PDGF, bFGF, TGF- $\beta$  (transforming growth factor- beta) ve VEGF gibi büyüme faktörleri anjiogenezi aktive edebilir ve iskemik hasara uğramış olan deri fleplerinde fonksiyonel mikro dolaşımı yönlendirmektedirler<sup>98,101,103,104</sup>.

Vaskülogenez endotel öncü hücrelerine dayandırılmaktadır. Bölgesel damar hasarı, iskemi, miyokard enfarktüsü ve yanık yaralanması endotel öncü (progenitör) hücrelerinin hareketlenmesi ve dolaşımdaki bu hücrelerin artışı için güçlü uyanlardır. Bu durumda hücre artışına VEGF seviyelerindeki artış eşlik etmektedir<sup>105</sup>.

Son yıllarda birçok büyüme faktörünün tanımlanması, flebin damarlanması ve canlılığını iyileştiren potansiyel başka yöntemler sağlamıştır. Bulgular neovaskularizasyonun anjiyojenik faktörler aracılığıyla olduğunu düşündürmektedir. Yapılan deneysel çalışmalarda temel fibroblast büyüme faktörü, vasküler endotelyal büyüme faktörü ve vasküler endotelyal büyüme faktör cDNA'sının flep distalinde perfüzyonu iyileştirdiği ve nekrozu önlediği gösterilmiştir<sup>99,101,106-111</sup>.

### **Eritropoetin**

Eritropoezin bir hormon tarafından uyarıldığı ilk kez 1906 yılında Fransız bilim adamları Carnot ve Deflandre tarafından bulunmuştur<sup>112</sup>. Erslev 1953 yılında anemisi olan tavşanlardan aldığı serumun eritropoezi uyardığını göstermiştir<sup>113</sup>. Miyake ve arkadaşları 1977 yılında aplastik anemili hastaların idrarlarından eritropoetin hormonunu ayırtırmayı başardı<sup>114</sup>. 1985 yılında Jacobs aminoasit sıralamasını belirleyerek memeli hücrelerinde eritropoetin geni ve gen ekspresyonu koyarak rekombinant human eritropoetin kullanım alanına girmesini sağladı<sup>115,116</sup>. Eritropoetin (EPO), mitozu uyarıcı faktör ve farklılaştırıcı hormon olarak kaynak hücre bölümünün prekürsörlerinden eritrosit oluşumunu uyaran ve eritrositler için sitokin görevi gören bir glikoprotein hormondur. Hematopoetin ya da hemopoetin olarak da adlandırılır. Başlıca böbreklerde (korteksteki peritubuler hücreler) üretilir ve eritrosit üretiminin kontrolünden sorumludur. Böbrek dışında az miktarda karaciğer, kemik iliği,

dalak, GIS, kalp, akciğer, testis, overler ve santral sinir sisteminde de sentezlenir. Eritropoetini kodlayan gen yedinci kromozom üzerinde yer alır ve 3000 baz çifti içerir. Dört intron ve beş ekzonlu 193 amino asitli bir moleküldür. Salınımı sırasında 28 amino asidini yitirir, matür protein 165 aminoasit içerir. Genin transkripsiyon hızı oksijen bağımlı bir mekanizma ile kontrol edilir. Sentezlendiği hücreden serbestlenirken yapısına karbohidrat zincirleri eklenir, bu glikozilasyon eritropoetinin biyolojik aktivitesi için önem taşır ve antijenitesini sağlar. Molekül ağırlığı 34 kilodaltondur. İnsanda normal EPO serum konsantrasyonu 10-30mu/ml (1-7pmol/l)'dir. Endojen üretim hızı 2-4 u/kg/gündür<sup>117</sup>.

EPO, memeli hücre kültüründe rekombinant DNA teknolojisi ile üretilerek tedavi amaçlı olarak da kullanılmaktadır. Böbrek yetersizliğine ya da kanser kemoterapisine bağlı anemilerin tedavisinde kullanılmaktadır. EPO, primer olarak eritrosit üretimini uyaran bir büyüme faktörüdür<sup>118</sup>.

Bazı deneysel çalışmalar EPO nun eritroid seri hücreleri dışında endotel, miyokard, düz kas ve mezenkim hücreleri gibi hücreleri de etkileyerek mitozu stimüle ettiği, hücre farklılaşmasını indüklediği ve aktive ettiği gösterilmiştir<sup>119</sup>.

### **Eritropoetin ve İskemi Reperfüzyon Hasarı**

Literatürde eritropoetinin iskemi reperfüzyon hasarında önemli rol oynadığı gösterilmiş ve retina, ince barsak, karaciğer ve böbrekte yapılan çalışmalar yayınlanmıştır<sup>14-19</sup>. Eritropoietin, antiapoptotik, antioksidan, anjiyojenik ve noroprotektif etkileri aracılığıyla iskemiye karşı koruyucu etki gösterir<sup>120</sup>. Eritropoetinin iskemi reperfüzyon hasarına karşı olan koruyucu etkisinin antiapoptotik etkisine dayandığını iddia eden çalışmalar olmuştur<sup>15,19,121</sup>. Bu etki mekanizmasının JAK2 (Janus Kinase) –STAT (Signal Transducer and Activator of Transcription)-Bcl-2 yolağına olan etkisiyle olduğu iddia edilmiştir<sup>122</sup>. Bcl-2 'nin aynı zamanda eritropoetinin antioksan etkisiyle ilişkili olabileceğine dair çalışmalar mevcuttur<sup>8</sup>.

Antioksidan etki katalaz, süperoksit dismutaz ve glutatyon peroksidaz gibi antioksidanların seviyesindeki artışla olduğunu söyleyen yazarlar vardır<sup>19,123-128</sup>. Ayrıca iskemi reperfüzyon hasarında önemli olan inflamatuvar hücre infiltrasyonu eritropoetin tarafından baskılanmaktadır<sup>129,130</sup>. İskemi reperfüzyon hasarında koruyucu etkisi olduğu bilinen nitrik oksit Eritropoetin uygulamalarıyla arttığını gösteren pek çok çalışma mevcuttur<sup>131</sup>.

## GEREÇ VE YÖNTEM

Bu tez çalışmasının etik kurallara uygunluğu, Mersin Üniversitesi Tıp Fakültesi Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu (HADYEK) tarafından 2009/32 sayılı karar ile onaylanmıştır. Çalışma Mersin Üniversitesi Tıp Fakültesi Deney Hayvanları Yetiştirme ve Deneysel Tıbbi/ Cerrahi Araştırma Ünitesi Cerrahi Araştırma Laboratuvarı'nda gerçekleştirilmiştir.

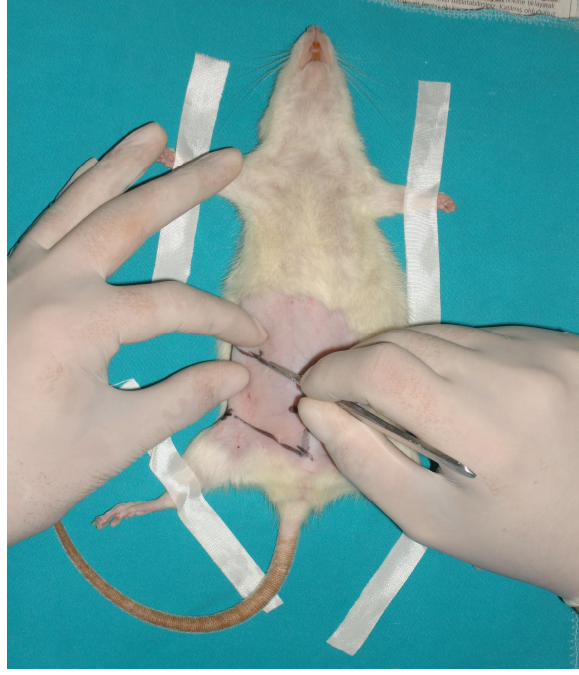
Çalışmada, ortalama  $250\pm 25$  gr ağırlıkları olan Wistar tipi 74 adet erişkin sıçan kullanılmıştır. Tüm sıçanlara Mersin Üniversitesi Tıp Fakültesi Etik Kurul'unun öngördüğü şekilde Deney Hayvanlarının Bakım ve Kullanılmalarına yönelik etik kurallar uyarınca bakılıp muamele edilmiştir. Denekler uygun kafeslerde her kafeste 1 adet olacak şekilde, standart oda ısısında, 12 saatlik karanlık ve aydınlık siklusunda tutulmuştur. Yeterli miktarda kemirgen yemi ile beslenerek yeterli miktarda su verilmiştir.

### Cerrahi Teknik

Tüm sıçanlar ketamin (50-100 mg/kg) ve xylazine (5mg/kg) anestezisi altında cerrahi işlemlere tabi tutuldu. Anestezi indüksiyonunun ardından sıçanların inguinal bölgeleri tıraşlandı, cerrahi alan %10'luk povidon iyodin ile temizlendi.

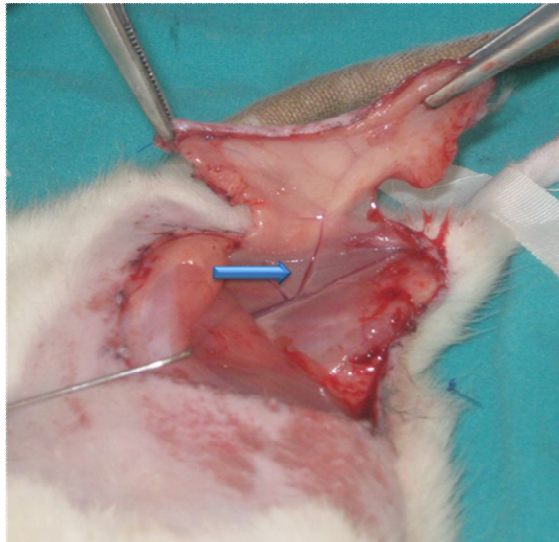
Sıçanda epigastrik arter flebi olarak da isimlendirilen karın flebi; ksifoid üst sınır, pubis alt sınır ve yanlarda her iki aksiler çizgi sınırları içinde kalan alanı içerir. Bu anatomik dayanak noktalarına göre daha küçük sıçanlarda daha küçük boyutlu flepler kullanılabilir<sup>132,133</sup>.

Bu çalışmada da anatomik kriterlere uygun olarak flep hazırlanmıştır. Sıçanlar supin pozisyonda iken ekstremitelemi zemine bant ile tespit edildi. Sıçan karın bölgesi tıraş edildikten sonra povidon iyodin emdirilmiş steril gazlı bez ile temizlendi. Deneklerin tümünde sağ epigastrik arterin medial dalları pedikülü ile karın flebi orta hatttan laterale uzanacak şekilde 6x3 cm boyutlarında epigastrik arter flebi planlandı ve uygun çizimler yapıldı (Resim 1).



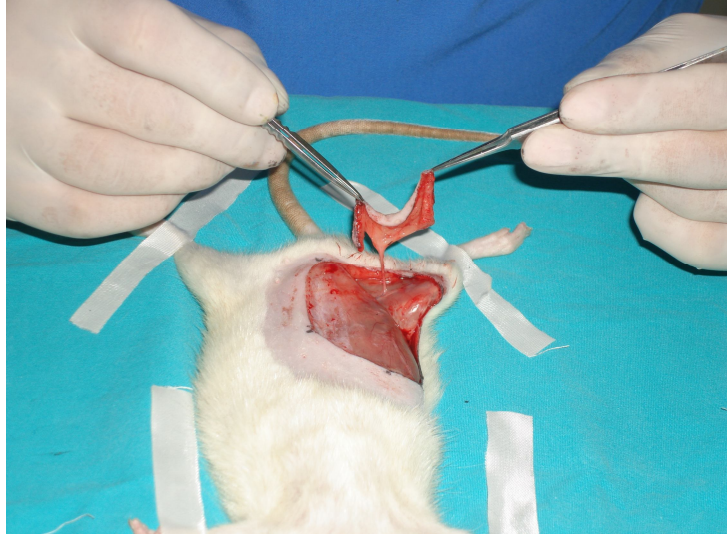
**Resim 1.** Sıçan inguinal flebinin dizaynı.

Anestezi ve çizim sonrasında flebin üst (kranial) sınırı olan ksifoidden geçen yatay hat üzerinden ve her iki yan sınır hattından karın duvarı kasları üzerindeki gevşek plana incek şekilde insizyonlar uygulandı. Flep kranyalden kaudale doğru kas üzeri gevşek planda kaudal bazlı olarak kaldırıldı. İnfierior epigastrik damarın flebe dahil olduğu görüldü (Resim 2).



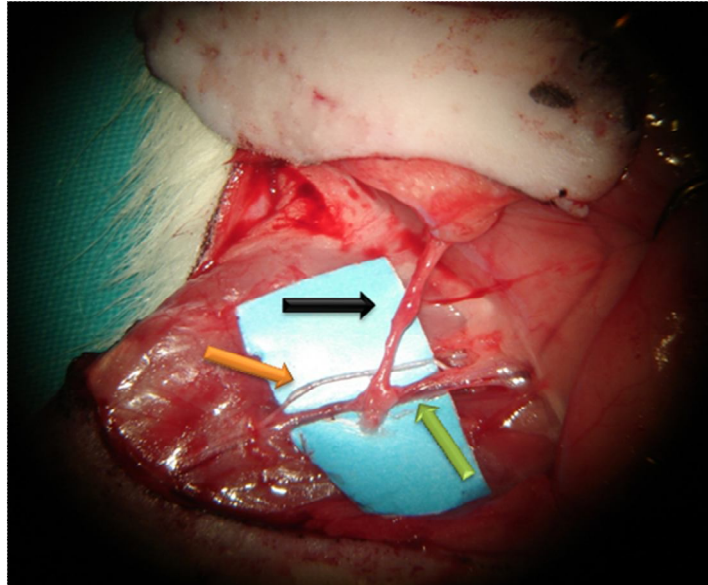
**Resim 2.** İnfierior epigastrik damarın flebe dahil olduğunun görülmesi (mavi ok inferior epigastrik damar)

Epigastrik pedikül, flebe dahil edilen kasık yağ yastığından serbestlendikten sonra kaudal kenar kesisi uygulanarak flep 'ada flebi' haline getirildi (Resim 3).



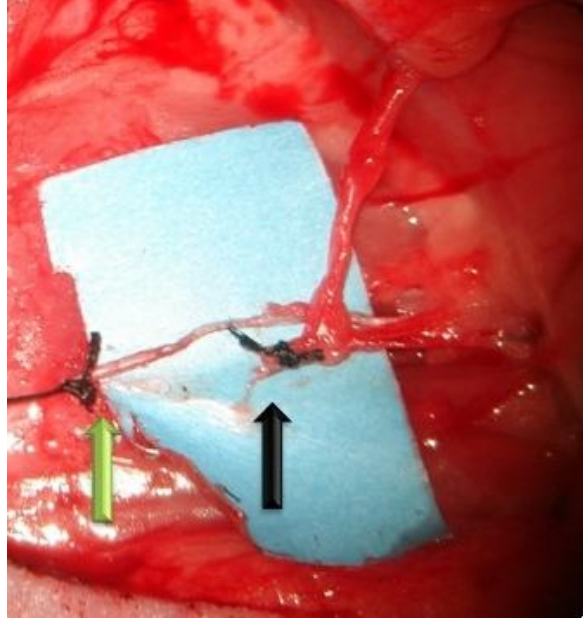
**Resim 3.** Flebin epigastrik arter üzerinde ada flebi haline getirilmesi.

Diseksiyon ile femoral arter, epigastrik dalı ve femoral sinir ortaya kondu (Resim 4).



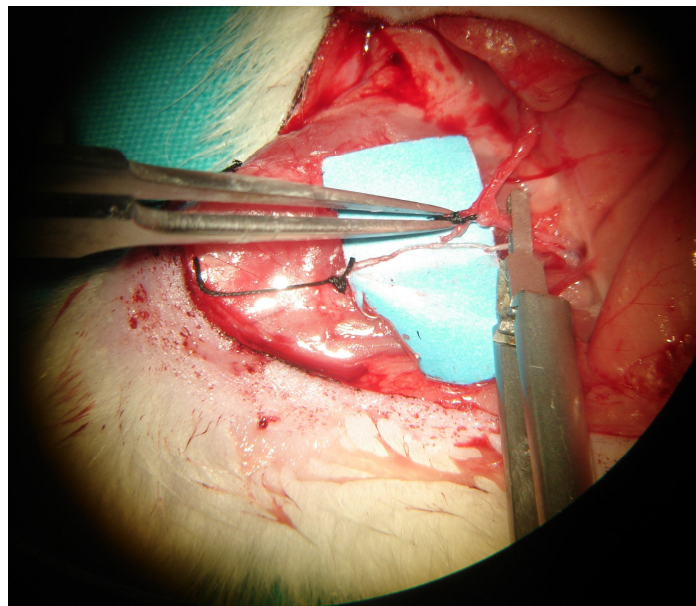
**Resim 4.** Diseksiyon ile femoral arter, epigastrik dalı ve femoral sinir ortaya konması (siyah ok epigastrik arter, sarı ok femoral sinir, yeşil ok femoral arter).

Femoral arter, epigastrik dalının distalinden bağlanarak kesildi, femoral sinir korundu (Resim 5).



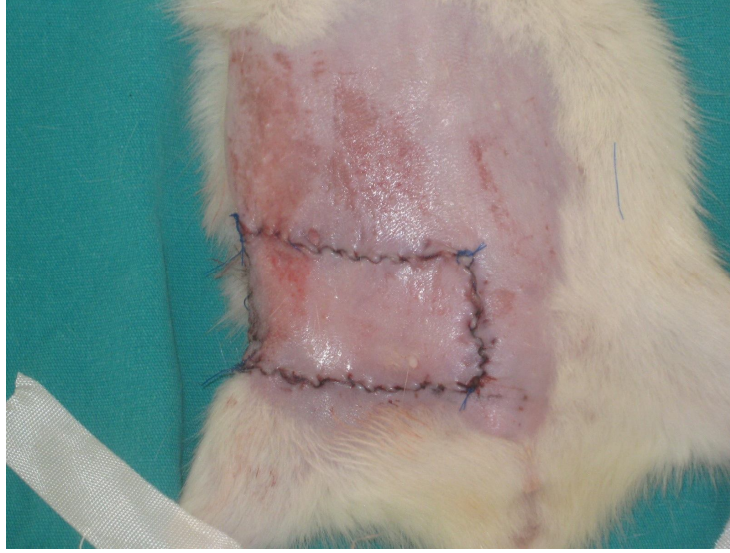
**Resim 5.** Femoral arterin epigastrik dalının distalinden bağlanarak kesilmesi ve korunan femoral sinir (yeşil ok femoral arterin distal ucu, siyah ok proksimal ucu).

Femoral arter klemlenerek grupların iskemi reperfüzyon protokolleri uygulandı (Resim 6).



**Resim 6.** Femoral arter klemlenerek iskemi oluşturulması.

Flep yerine 5/0 monofilament sütür ile kontinü sütüre edildi (Resim 7). 8 saatlik iskemi periyodu sonrası fleplerin alt sınırlarındaki sütürler alındı. Klemp açılarak reperfüzyon sağlandı. Damarlarda pulsasyon olduğu gözlendi ve flep tekrar sütüre edildi.



**Resim 7.** Deneğin post op görüntüsü

Tüm deneklerde bu flep standardize edildi. Operasyon bitiminde, deneklerin birbirlerinin fleplerine zarar vermelerini önlemek için, her bir denek ayrı bir kafese yerleştirilerek A alt grupları için 10 gün, B alt grupları için 24 saat boyunca takibe alındı.

#### **Deney grupları**

Çalışmada ağırlıkları  $250\pm 25$  gram olan Wistar tipi 74 adet erişkin sıçan 5 gruba ayrılarak kullanıldı (Tablo 2). Grup 1 haricindeki gruplar rastgele seçimle 24. Saatte ve 10. Günde değerlendirilmek üzere 2 ayrı gruba bölündü. 10 gün takip edilen alt grup "A", 24 saat takip edilen alt grup "B" olarak adlandırıldı.

Çalışmada rhEpo olarak NeoRecormon, Roche 10000 IU/0,6 ml kullanılmıştır.

**Tablo 2.** Uygulanan prosedüre göre grupların ayrılması.

<b>Grup 1</b>	Sham grubu
<b>Grup 2</b>	İskemi-reperfüzyon hasarı
<b>Grup 3</b>	İskemik önkoşullandırma
<b>Grup 4</b>	Eritropoetin
<b>Grup 5</b>	Eritropoetin birlikteliğinde iskemik önkoşullandırma

Grup 1 (n=10): (Sham grubu). Anesteziyi takiben sadece inguinal flep insize edildi ve ek işlem yapılmadı,

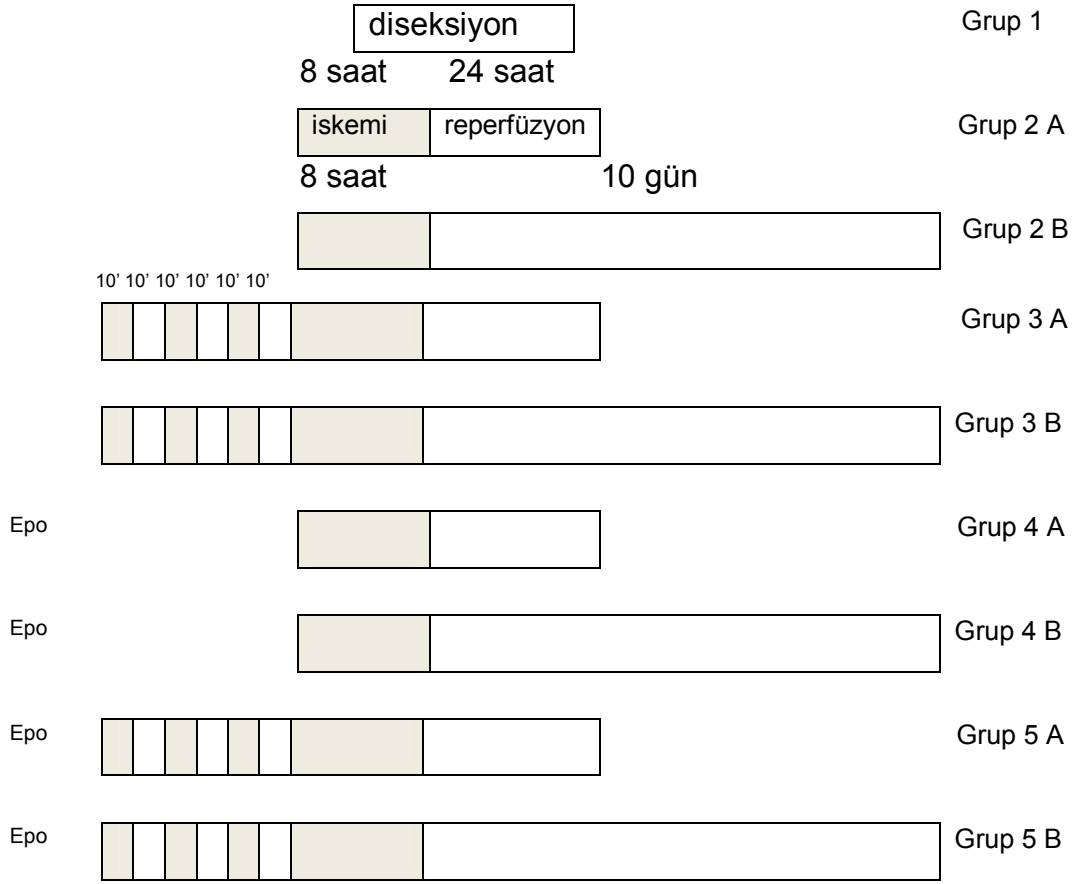
Grup 2 (n=16): (İskemi-reperfüzyon hasarı): Flep elevasyonunu takiben femoral artere konan klemp ile 8 saatlik iskemi sağlandı, 8 saatin sonunda klemp açılarak reperfüzyona izin verildi ve flep yerine iade edildi

Grup 3 (n=16): (İskemik önkoşullandırma) Flep elevasyonunu takiben femoral artere konan klemp ile 10 dakika iskemi, 10 dakika reperfüzyon 3 siklus olarak uygulandı, ardından Grup 2'ye uygulanan iskemi reperfüzyon protokolü uygulandı

Grup 4 (n=16): (Eritropoetin) Grup 2'ye uygulanan iskemi reperfüzyon protokolü uygulandı ve reperfüzyondan 30 dakika önce 5000 IU/kg eritropoetin intraperitoneal olarak verildi

Grup 5 (n=16): (Eritropoetin birlikteliğinde iskemik önkoşullandırma ) Flep elevasyonunu takiben femoral artere konan klemp ile 10 dakika iskemi, 10 dakika reperfüzyon 3 siklus olarak uygulandı, ardından Grup 2'ye uygulanan iskemi reperfüzyon protokolü uygulandı, reperfüzyondan 30 dakika önce 5000 IU/kg eritropoetin intraperitoneal olarak verildi ( Şekil 7).





**Şekil 7.** Deney prosedürü.

### Değerlendirme Parametreleri

Sham grubundaki deneklerin tamamından ve bu grubun dışındaki tüm gruplardaki sıçanların 8 adetinden cerrahi sonrasındaki 24. saatte hemoglobin ve beyaz küre sayımı yapıldı. Aynı işlem her gruptaki kalan 8 denek için çalışmanın 10. gününde yapıldı. Tam kan sayımı, Sysmex XT 2000İ cihazı ile yapıldı.

Cerrahi sonrası 24. saatte her gruptan 8 sıçan sakrifiye edilerek flep distalinden alınan 100 mg dokuda Myeloperoksidaz aktivitesi, Melondialdehit seviyesi, Nitrik oksit düzeyi bakıldı. Nitrit/nitrat düzeylerinin ölçümü; nitrit ve nitrat seviyeleri fotometrik endpoint yöntemi ile belirlendi. Prensipte, nitratın nitrite nitrat redüktaz varlığında nikotinamid adenine dinükleotid fosfatce (NADPH) redüklenmesine dayanmaktadır. Oluşan nitrit sulfanilamide ve n-(naftil)-etilendiamin dihidroklorid ile reaksiyona girerek kırmızı-viole diazo boyasını verir. Diazo boyası da görünür alandaki absorbansından faydalanılarak (550 nm) ölçülür.

Myeloperoksidaz ölçümü, Serum ve doku örneklerindeki MPO düzeyleri Golowich ve ark. nın geliştirdikleri yöntemle göre saptandı. Yöntem hidrojen peroksidin homojenat tarafından oksitlenerek o-dianozidini redüklemesi ve redükte o-dianozidinin 410 nm'de ölçülmesi prensibine dayanmaktadır.

MDA ölçümü; doku örneklerindeki MDA düzeyleri Yagi ve ark. nın geliştirdikleri yöntemle göre saptandı. Yöntem, lipid peroksidasyon ürünü olan MDA'nın tiyobarbitirik asit ile reaksiyonu sonucu oluşan pembe rengin, 532 nm dalga boyunda spektrofotometrik ölçülmesi prensibine dayanmaktadır<sup>134</sup>.

Histolojik incelemelerde, post op 10. gün sham grubu dışındaki her grubun kalan 8 deneği kurban edilerek doku örnekleri alındı ve örneklemeler yapılarak dokulardaki apoptotik hücreler sayıldı. Apoptozun gösterilebilmesi için aktif kaspaz-3 antikoru kullanıldı. Yeni damar oluşumu (anjiojenesis) için endotel belirteci olan VEGF ile immünohistokimyasal işaretleme yapıldı. Post-op 24'üncü saatte alınan kesitlerde inflamasyon değerlendirildi. Elde edilen dokular %10 nötral formalin ile 48 saat tespit edildikten sonra rutin yöntemle takip edildi ve parafin bloklara gömüldü. Parafin bloklardan mikrotom yardımıyla 5 µm'lik kesitlerin immünohistokimyasal olarak işaretlenecek olanları poly-L lysine kaplı lamlar üzerine, hematoksilin-eozin ile boyanacaklar ise normal lamlar üzerine alındı. Tüm ışık mikroskopik görüntülemeler Olympus BX50<sup>TM</sup> ışık mikroskopuna takılı Nikon CoolPix 5000<sup>TM</sup> dijital fotoğraf makinesi ile gerçekleştirildi.

İnflamasyon değerlendirmesi yapılacak olan kesitler hematoksilin-eozin ile boyandıktan sonra ışık mikroskopunda X400 büyütmede her bir kesitte birbirinden bağımsız 10'ar alanda sayım yapıldı. Sonuçlar aşağıdaki şekilde değerlendirildi:

- 0: İncelenen alanda hiç ekstrasvasküler inflamatuvar hücre bulunmaması
- 1: İncelenen alanda 10'dan az inflamatuvar hücre
- 2: İncelenen alanda 10-45 arası inflamatuvar hücre
- 3: İncelenen alanda 45'den fazla inflamatuvar hücre

İmmünohistokimyasal yöntemle dokularda VEGF ve aktif kaspaz-3 işaretlemesi yapıldı. Bu işaretlemeler için fare anti-VEGF monoklonal antikoru 1/200 dilüsyonda, tavşan anti aktif kaspaz-3 poliklonal antikoru ise 1/50 dilüsyonda kullanıldı. VEGF antikoru ile yapılan işaretlemenin değerlendirilmesi için boyanan her preparattan X200 büyütme ile 2'şer alanda

dermiste bulunan pozitif hücre ve damar yapıları sayılarak değerlendirildi. Elde edilen pozitif hücre ve damar sayıları istatistiksel anlamlılık için gruplar arasında karşılaştırıldı. Aktif kaspaz-3 ile apoptozu değerlendirmek için ise her kesitte X200 büyütmede iki farklı alanda pozitif hücreler sayılarak kaydedildi ve bunların sonuçları da istatistiksel anlamlılık için gruplar arasında karşılaştırıldı.

Flep canlı kalma oranlarının değerlendirilmesinde post op 10. gün sakrifiye edilen fareler kullanıldı. Nekroza uğrayan flep bölümünde oluşacak ileri düzeyde kontraksiyon göz önünde bulundurularak, tüm flep boyutu ile sağ kalan flep bölümü arasındaki ölçüm değerlerinin karşılaştırılması yapıldı. Yapılan gözlemlerde fleplerin canlı kısımları ile nekroza uğrayan kısımları arasında net bir demarkasyon hattı olduğu makroskopik olarak gözlemlendi. Canon A 470™ marka ve model kompakt dijital fotoğraf makinesi ile çekilen fotoğraflar ImageTool (version 3.00; University of Texas Health Science Center at San Antonio, San Antonio, Tex.) programı kullanılarak değerlendirildi.

### **İstatistiksel Değerlendirme**

Benzeri çalışmalar dikkate alınarak %95 güç ve %5 tip 1 hata ile güç (power) analizi yapıldığında gruplar arasındaki farkın anlamlı olduğunu söyleyebilmek için her grupta en az  $3+3=6$  hayvanla çalışılması uygun olduğu belirlenmiştir. Ancak deneklerde sonradan meydana gelebilecek eksilmeler dikkate alınarak ve ölçümlerdeki değişimin daha iyi gözlenebilmesi amacıyla  $8+8=16$  hayvanla çalışılması Biyoistatik AD danışılarak uygun görülmüştür.

Verilerin istatistiksel incelenmesinde SPSS for Windows 11.5.1 yazılımı kullanıldı. Veriler girildikten sonra ölçümlerin normallik kontrolleri Shapiro-Wilk testi ile test edildi. Gruplar arasındaki farklılıkları değerlendirmek için One-Way ANOVA testi ve Tukey HSD çoklu karşılaştırma testleri kullanıldı. Kontrol grubunu diğer gruplarla karşılaştırmak için Dunnett t testi kullanıldı.

Normal dağılımı uyumluluk göstermeyen ölçümleri karşılaştırmak için Krushal-Wallis ve Dunn testleri kullanıldı.

## BULGULAR

### Kan Sayım Sonuçları

Tüm sıçanlardan cerrahi sonrasındaki 24. Saatte ve 10. Günde hemoglobin ve beyaz küre sayımı yapıldı. Hematokrit ve beyaz küre miktarları Dunnet t test ile değerlendirildiğinde hiçbir grupta kontrol grubuna göre artış bulunmadı. Post-op 24 saat ve 10 günlük hematokrit ve beyaz küre değerleri Tablo 3'te verilmiştir.

**Tablo 3.** Post-op 24 saat ve 10 günlük hematokrit ve beyaz küre değerleri.

	wbc	htc		wbc	htc		wbc	htc		wbc	htc
G1-1	2,83	47,8									
G1-2	3,7	42,2									
G1-3	3,66	42,5									
G1-4	2,67	41,1									
G1-5	*	*									
G1-6	2,94	37,5									
G1-7	3,05	37,8									
G1-8	0,79	22,1									
G1-9	2,7	41,9									
G1-10	1,45	40,4									
G2-B1	0,53	39	G2-a1	0,09	2,4	G4-B1	2,36	33,5	G4-a1	2,28	36
G2-B2	0,71	36,8	G2-a2	*	*	G4-B2	1,61	9,7	G4-a2	2,34	36,1
G2-B3	0,84	32,5	G2-a3	2,27	24,4	G4-B3	*	*	G4-a3	6,37	39,8
G2-B4	1,95	27,2	G2-a4	1,89	25,5	G4-B4	8,95	4,6	G4-a4	4,86	36
G2-B5	0,98	39,3	G2-a5	0,79	15,6	G4-B5	1,09	39,5	G4-a5	3,03	39,5
G2-B6	1,43	37,3	G2-a6	0,06	1,4	G4-B6	0,07	3,3	G4-a6	5,1	40,7
G2-B7	1,53	38	G2-a7	2,2	25,3	G4-B7	0,48	21,8	G4-a7	*	*
G2-B8	1,61	33,8	G2-a8	1,61	16,4	G4-B8	1,75	36,8	G4-a8	3,96	42,6
G3-B1	2,21	32,8	G3-a1	3,2	35,5	G5-B1	1,24	14,1	G5-a1	4,7	44
G3-B2	2,19	38,6	G3-a2	4,06	35,4	G5-B2	1,54	41,2	G5-a2	4,01	31,7
G3-B3	0,82	29,4	G3-a3	2,16	36,2	G5-B3	1,92	40	G5-a3	3,92	32,1
G3-B4	2,64	41,5	G3-a4	2,13	34	G5-B4	2,09	37,2	G5-a4	3,64	35,9
G3-B5	2,15	41,7	G3-a5	3,34	33,9	G5-B5	1,72	37,2	G5-a5	3,75	37,4
G3-B6	1,36	29,9	G3-a6	1,75	39	G5-B6	1,54	29,6	G5-a6	3,84	37,8
G3-B7	2,22	38,2	G3-a7	2,5	36,9	G5-B7	2,89	32	G5-a7	*	*
G3-B8	0,7	24,2	G3-a8	2,66	36,8	G5-B8	2,75	32,5	G5-a8	*	*

\* simgesi cihaz tarafından okunamayan örneklerle aittir.

Post-op 24 saat ve 10 günlük hematokrit ve beyaz küre ölçümlerinin ortalamaları ve standart sapmaları Tablo 4'te gösterilmiştir.

**Tablo 4.** Post-op 24 saat ve 10 günlük hematokrit ve beyaz küre ölçümlerinin ortalamaları ve standart sapmaları

wbc	Gruplar	N	Ortalama	Std. Sapma
	grup_1	9	2,6433	,95533
	grup_2_B	8	1,1975	,50133
	grup_3_B	8	1,7863	,72577
	grup_4_B	7	2,3300	3,02070
	grup_5_B	8	1,9613	,58995
	grup_2_A	7	1,2729	,95322
	grup_3_A	8	2,7250	,76203
	grup_4_A	7	3,9914	1,53961
	grup_5_A	6	3,9767	,37708
htc	grup_1	9	39,2556	7,10125
	grup_2_B	8	35,4875	4,11702
	grup_3_B	8	34,5375	6,40846
	grup_4_B	7	21,3143	15,58861
	grup_5_B	8	32,9750	8,63163
	grup_2_A	7	15,8571	10,37302
	grup_3_A	8	35,9625	1,66899
	grup_4_A	7	38,6714	2,65814
	grup_5_A	6	36,4833	4,50574

#### **Doku MPO, MDA, NO Sonuçları**

Doku MPO, MDA, NO değerleri Tablo 5 'te verilmiştir.

**Tablo 5.** Doku MPO, MDA, NO değerleri.

	<b>DOKU MPO</b> <b>U/grdoku</b>	<b>DOKU MDA</b> <b>nmol/ml</b>	<b>doku nitrit+nitrat mg/gr</b> <b>doku,</b>
<b>G1-1</b>	0,512	72,96	32,22
<b>G1-2</b>	0,495	62,50	27,82
<b>G1-3</b>	0,275	92,44	39,23
<b>G1-4</b>	0,550	68,49	48,75
<b>G1-5</b>	0,803	75,19	92,53
<b>G1-6</b>	0,787	59,51	46,45
<b>G1-7</b>	0,633	65,25	64,18
<b>G1-8</b>	0,710	98,77	82,99
<b>G1-9</b>	0,572	60,68	71,29
<b>G1-10</b>	3,190	106,63	79,68
<b>G2-B1</b>	0,583	82,13	64,02
<b>G2-B2</b>	0,666	90,33	83,22
<b>G2-B3</b>	0,550	71,37	48,88
<b>G2-B4</b>	0,660	82,35	19,47
<b>G2-B5</b>	0,710	88,09	42,5
<b>G2-B6</b>	0,594	83,18	30,62
<b>G2-B7</b>	0,765	86,92	21,82
<b>G2-B8</b>	0,572	67,91	66,22
<b>G3-B1</b>	0,550	98,36	94,59
<b>G3-B2</b>	0,567	110,88	47,84
<b>G3-B3</b>	0,594	83,64	55,68
<b>G3-B4</b>	0,473	74,61	103,66
<b>G3-B5</b>	0,754	75,36	65,9
<b>G3-B6</b>	0,671	83,18	58,8
<b>G3-B8</b>	0,638	50,28	157,66
<b>G4-B1</b>	0,589	61,18	102,63
<b>G4-B2</b>	0,589	71,08	83,14
<b>G4-B3</b>	0,446	76,11	118,14
<b>G4-B4</b>	0,710	78,15	71,29
<b>G4-B5</b>	0,858	70,87	79,68
<b>G4-B6</b>	0,671	73,65	75,78
<b>G4-B7</b>	0,314	66,08	113,16
<b>G4-B8</b>	0,550	72,91	103,38
<b>G5-B1</b>	0,605	60,35	124,89
<b>G5-B2</b>	0,644	81,85	101,25
<b>G5-B3</b>	0,605	56,73	120,47
<b>G5-B4</b>	0,616	49,18	119,46
<b>G5-B5</b>	0,501	63,03	109,25
<b>G5-B6</b>	0,468	75,78	108,71
<b>G5-B7</b>	0,627	57,85	106,34
<b>G5-B8</b>	0,688	51,50	101,62

Doku MPO ölçümlerinin ortalamaları ve standart sapmaları Tablo 6'da gösterilmiştir.

**Tablo 6.** Doku MPO ölçümlerinin ortalamaları ve standart sapmaları.

<b>MPO</b>	<b>Gruplar</b>	<b>N</b>	<b>Ortalama</b>	<b>Std. Sapma</b>
	1	10	,8527	,83577
	2	8	,6375	,07525
	3	7	,6067	,09096
	4	8	,5909	,16531
	5	8	,5943	,07336

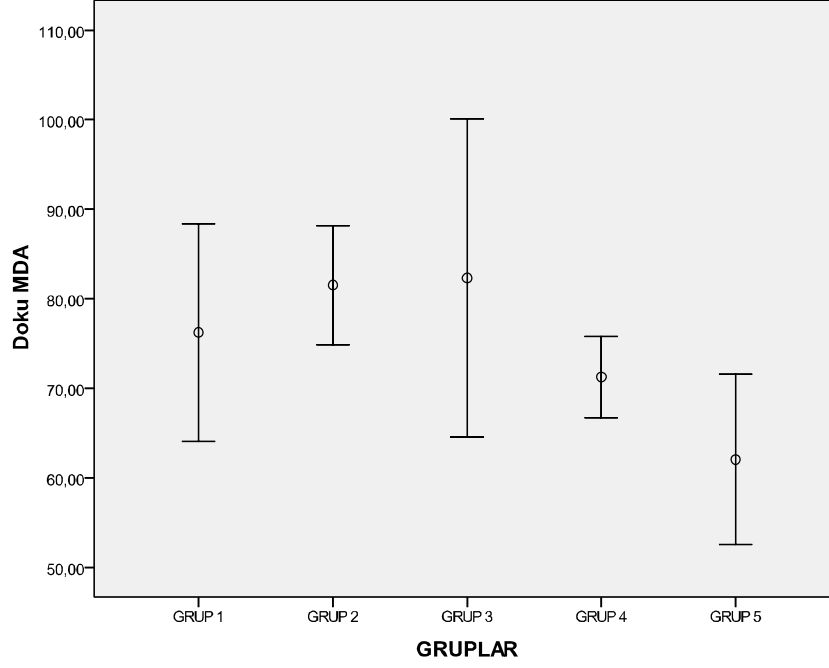
Nötrofil infiltrasyon ve aktivasyon parametresi olarak MPO konsantrasyonu ölçüldü<sup>135,136</sup>. Doku MPO seviyeleri açısından gruplar arasında anlamlı fark görülmedi.

Doku MDA ölçümlerinin ortalamaları ve standart sapmaları Tablo 7'de gösterilmiştir.

**Tablo 7.** Doku MDA ölçümlerinin ortalamaları ve standart sapmaları.

<b>MDA</b>	<b>Gruplar</b>	<b>N</b>	<b>Ortalama</b>	<b>Std. Sapma</b>
	1	10	76,2420	16,98722
	2	8	81,5350	7,94634
	3	7	82,3300	19,19151
	4	8	71,2538	5,45176
	5	8	62,0338	11,38472

Doku MDA seviyeleri karşılaştırıldığında grup 5'in grup 2 ( $p < 0,043$ ) ve grup 3'ten ( $p < 0,042$ ) anlamlı derecede farklı ve düşük olduğu görüldü (Şekil 8).



**Şekil 8.** Doku MDA ölçümlerinin en yüksek ve en düşük değerler ile ortalama değerleri (çizgilerin ortasındaki kareler) gösterilmiştir.

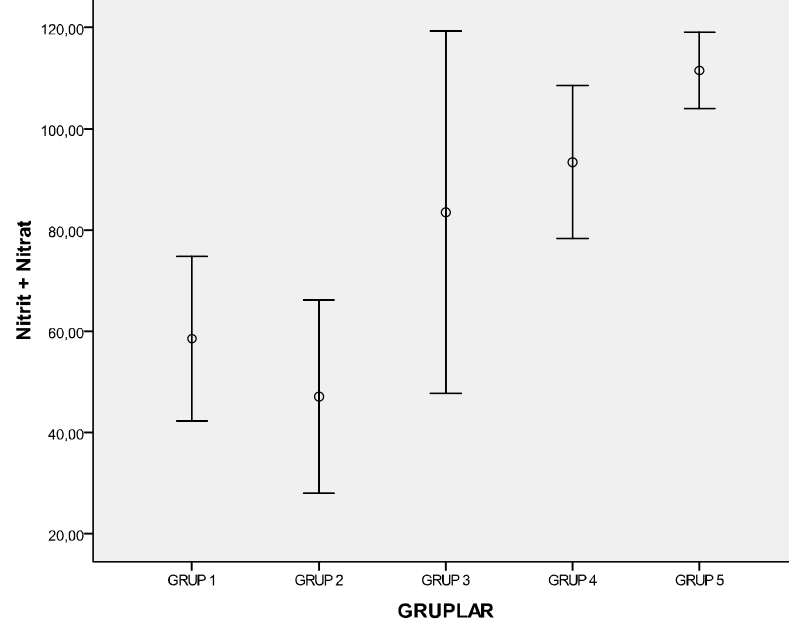
Doku NO ölçümlerinin ortalamaları ve standart sapmaları tablo 8’de gösterilmiştir.

**Tablo 8.** Doku NO ölçümlerinin ortalamaları ve standart sapmaları.

NO	Gruplar	N	Ortalama	Std. Sapma
	1	10	58,5140	22,71988
	2	8	47,0938	22,85022
	3	7	83,4471	38,71808
	4	8	93,4000	18,04811
	5	8	111,4988	8,98621

Doku NO seviyeleri karşılaştırıldığında grup3’ün( $p < 0,040$ ), grup 4’ün ( $p < 0,003$ ) ve grup 5’in( $p < 0,001$ ) grup 2’den anlamlı derecede yüksek olduğu görüldü (Şekil 9).

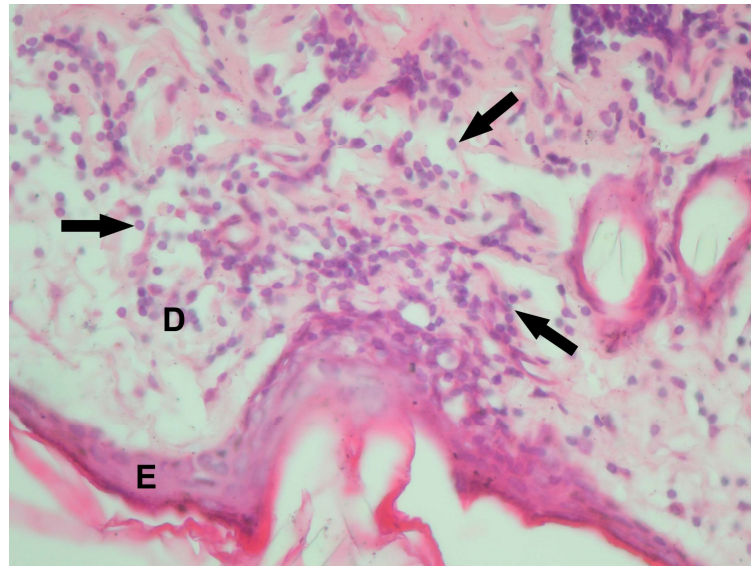




**Şekil 9.** Doku NO ölçümlerinin en yüksek ve en düşük değerler ile ortalama değerleri (çizgilerin ortasındaki kareler) gösterilmiştir.

### İnflamasyon

İnflamasyon değerlendirilmesi yapılacak olan kesitler hematoxilen eozin ile boyandıktan sonra ışık mikroskopunda X400 büyütmede her bir kesitte birbirinden bağımsız 10'ar alanda sayım yapılarak skorlandı (Resim 8). Dokulardaki inflamatuvar hücrelerin skorlama sonuçları Tablo 9'de gösterilmiştir.



**Resim 8.** Dermiste inflamatuvar hücreler (ok). Epidermis (E), dermis (D). H+E X1200.

**Tablo 9.** Dokulardaki inflammatuar hücrelerin skorumu sonuçları.

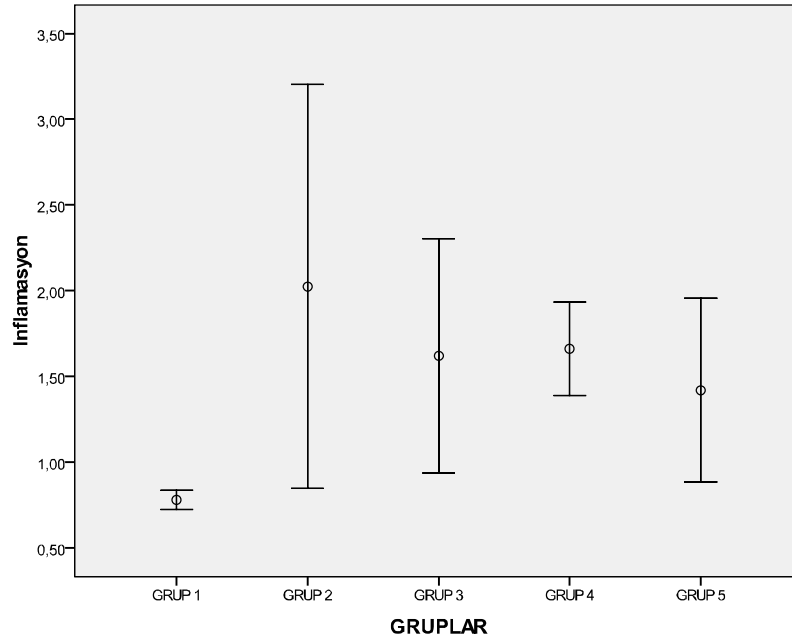
<b>G1</b>	<b>I</b>	<b>II</b>	<b>III</b>	<b>IV</b>	<b>V</b>	<b>VI</b>	<b>VII</b>	<b>VII</b>	<b>IX</b>	<b>X</b>
	1	1	1	0	1	1	0	1	1	1
	1	1	1	1	1	1	1	1	0	0
	1	1	0	1	0	1	1	1	1	1
	1	0	1	1	1	1	0	1	1	1
	0	0	1	1	1	1	1	1	0	1
<b>G2-B</b>	<b>I</b>	<b>II</b>	<b>III</b>	<b>IV</b>	<b>V</b>	<b>VI</b>	<b>VII</b>	<b>VIII</b>	<b>IX</b>	<b>X</b>
	3	3	3	3	2	3	3	3	2	2
	3	3	2	2	2	3	2	2	3	2
	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2
	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
<b>G3-B</b>	<b>I</b>	<b>II</b>	<b>III</b>	<b>IV</b>	<b>V</b>	<b>VI</b>	<b>VII</b>	<b>VIII</b>	<b>IX</b>	<b>X</b>
	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2
	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2
	1	1	1	1	1	0	1	0	1	1
	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2
	1	1	1	2	1	2	2	1	1	1
<b>G4-B</b>	<b>I</b>	<b>II</b>	<b>III</b>	<b>IV</b>	<b>V</b>	<b>VI</b>	<b>VII</b>	<b>VIII</b>	<b>IX</b>	<b>X</b>
	2	2	1	2	2	1	1	1	1	1
	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2
	2	2	1	2	2	1	2	2	1	2
	2	1	2	2	1	2	1	1	2	2
	1	2	2	1	1	2	2	1	2	2
<b>G5-B</b>	<b>I</b>	<b>II</b>	<b>III</b>	<b>IV</b>	<b>V</b>	<b>VI</b>	<b>VII</b>	<b>VIII</b>	<b>IX</b>	<b>X</b>
	2	2	2	2	1	2	1	1	2	2
	1	1	2	1	3	2	2	1	1	1
	1	1	1	1	1	0	1	0	1	1
	1	1	1	2	1	2	1	1	1	1
	2	2	2	2	2	2	2	2	1	2

İnflammatuar hücre sayımı sonuçlarının ortalamaları ve standart sapmaları Tablo 10'de gösterilmiştir.

**Tablo 10.** İnflamatuar hücre sayımı sonuçlarının ortalamaları ve standart sapmaları.

Gruplar	N	Ortalama	Std. Sapma
1	5	,7800	,04472
2	4	2,0250	,74106
3	5	1,6200	,54955
4	5	1,6600	,21909
5	5	1,4200	,43243

Doku inflamasyonu değerlendirmesi sonucunda grup 1'in, grup 2, grup 3 ve grup 4'ten istatistiksel olarak farklı olduğu ( $p < 0,05$ ), ancak grup 5'ten farklı olmadığı ( $p > 0,05$ ) görüldü (Şekil 10).

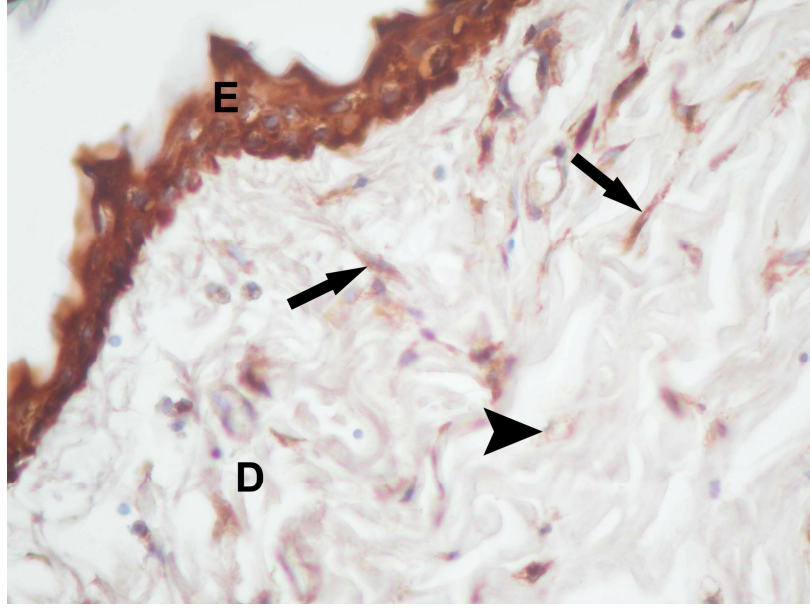


**Şekil 10.** Doku inflamasyonu değerlendirmesi sonucunda en az inflamatuvar hücrenin grup 5'te olduğu görülmektedir.

### Anjiyogenezis

VEGF antikoru ile yapılan işaretlenmenin değerlendirilmesi için boyanan her preparattan X200 büyütme ile 2'şer alanda dermiste bulunan pozitif hücre ve damar yapıları sayılarak değerlendirildi (Resim 9). Sonuçlar Tablo 11'de

gösterilmiştir.



**Resim 9.** VEGF antikoruna ile işaretlenmiş kesitte dermiste pozitif hücre (ok) ve damarlar (ok başı). X600.

**Tablo 11.** VEGF antikoru ile yapılan işaretlede dermiste bulunan pozitif hücre ve damar yapıları sayılar.

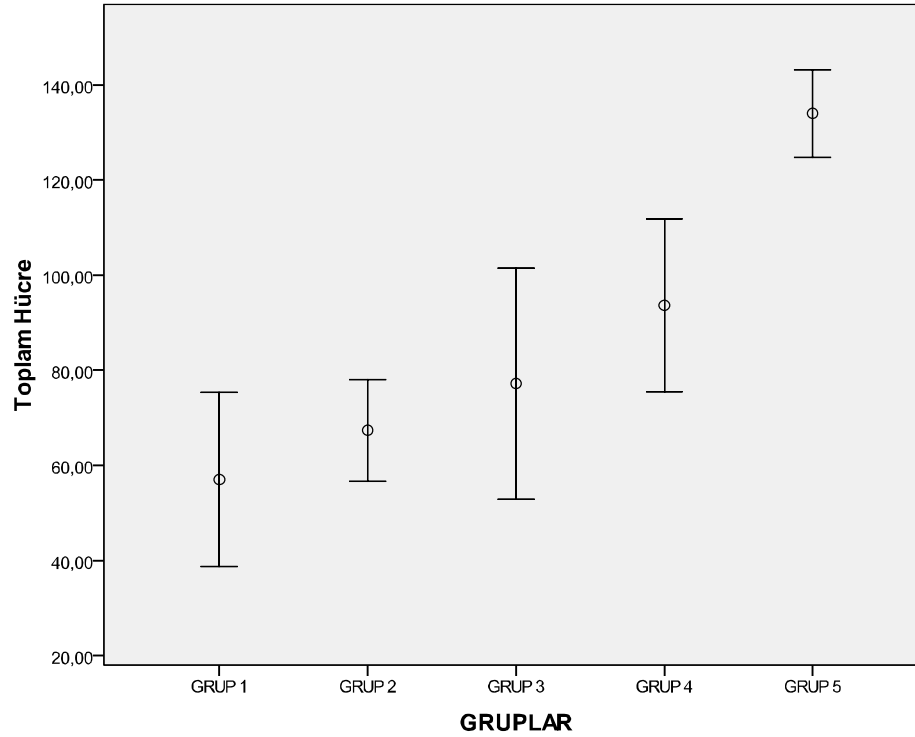
<b>G1</b>	<b>1. alan</b>	<b>2. alan</b>
<b>1</b>	30	21
<b>2</b>	25	29
<b>3</b>	22	27
<b>4</b>	33	41
<b>G2</b>	<b>1. alan</b>	<b>2. alan</b>
<b>1</b>	39	22
<b>2</b>	35	44
<b>3</b>	30	43
<b>4</b>	28	38
<b>5</b>	21	37
<b>G3</b>	<b>1. alan</b>	<b>2. alan</b>
<b>1</b>	40	51
<b>2</b>	57	47
<b>3</b>	33	30
<b>4</b>	30	28
<b>5</b>	32	38
<b>G4</b>	<b>1. alan</b>	<b>2. alan</b>
<b>1</b>	35	43
<b>2</b>	40	48
<b>3</b>	42	51
<b>4</b>	47	46
<b>5</b>	46	37
<b>6</b>	69	58
<b>G5</b>	<b>1. alan</b>	<b>2. alan</b>
<b>1</b>	60	67
<b>2</b>	69	72
<b>3</b>	65	68
<b>4</b>	61	74

VGEF ile boyanan hücre sayımı sonuçlarının ortalamaları ve standart sapmaları Tablo 12'de gösterilmiştir.

**Tablo 12.** VGEF ile boyanan hücre sayımı sonuçlarının ortalamaları ve standart sapmaları.

Gruplar	N	Mean	Std. Deviation
1	4	57,0000	11,51810
2	5	67,4000	8,61974
3	5	77,2000	19,56272
4	6	93,6667	17,33974
5	4	134,0000	5,77350

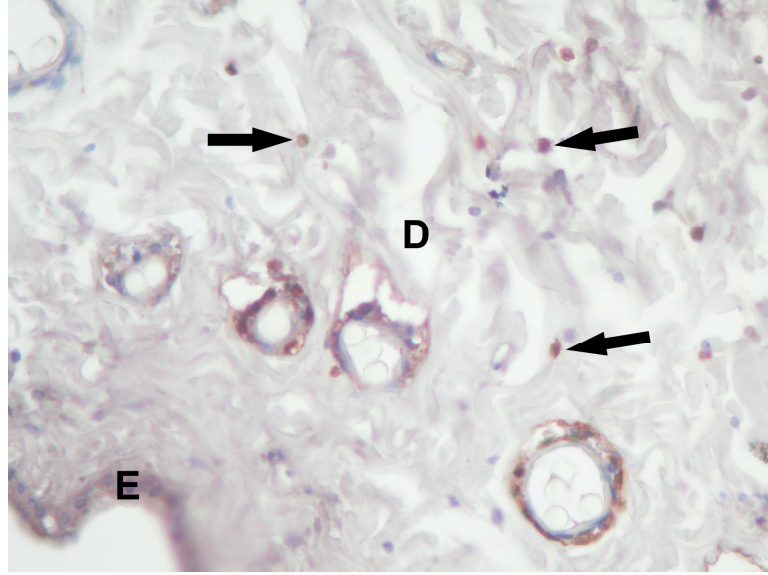
VGEF ile boyanan damar sayıları karşılaştırıldığında grup 5'in grup 2 ( $p=0,001$ ), grup 3 ( $p=0,001$ ) ve grup 4'ten ( $p=0,003$ ), grup 4'ün grup 2'den ( $p=0,045$ ) anlamlı derecede yüksek olduğu görüldü (Şekil 11).



**Şekil 11.** VGEF ile boyanan damar sayıları karşılaştırıldığında en yüksek değerin grup 5'e ait olduğu görülmektedir.

### **Apoptoz**

Aktif kaspaz-3 ile apoptozu değerlendirmek için ise her kesitte X200 büyütmede iki farklı alanda pozitif hücreler sayılarak kaydedildi (Resim 10). Sonuçlar Tablo 13'te gösterilmiştir



**Resim 10.** Aktif kaspaz-3 ile işaretlenmiş kesitte dermiste pozitif hücreler (ok). X600.

**Tablo 13.** Apoptotik hücre sayım sonuçları.

<b>G1</b>	<b>1. alan</b>	<b>2. alan</b>	<b>toplam</b>
1	4	3	7
2	-	-	-
3	-	-	-
4			
5	-	-	-
<b>G2-A</b>	<b>1. alan</b>	<b>2. alan</b>	<b>toplam</b>
1	16	13	29
2	6	5	11
3	6	5	11
4	7	6	13
5	9	16	25
<b>G3-A</b>	<b>1. alan</b>	<b>2. alan</b>	<b>toplam</b>
1	1	1	2
2	6	4	10
3	6	3	9
4	6	7	13
<b>G4-A</b>	<b>1. alan</b>	<b>2. alan</b>	<b>toplam</b>
1	3	2	5
2	2	2	4
3	2	3	5
4	3	4	7
<b>G5-A</b>	<b>1. alan</b>	<b>2. alan</b>	<b>toplam</b>
1	4	3	7
2	-	-	-
3	2	1	3
4	1	1	2

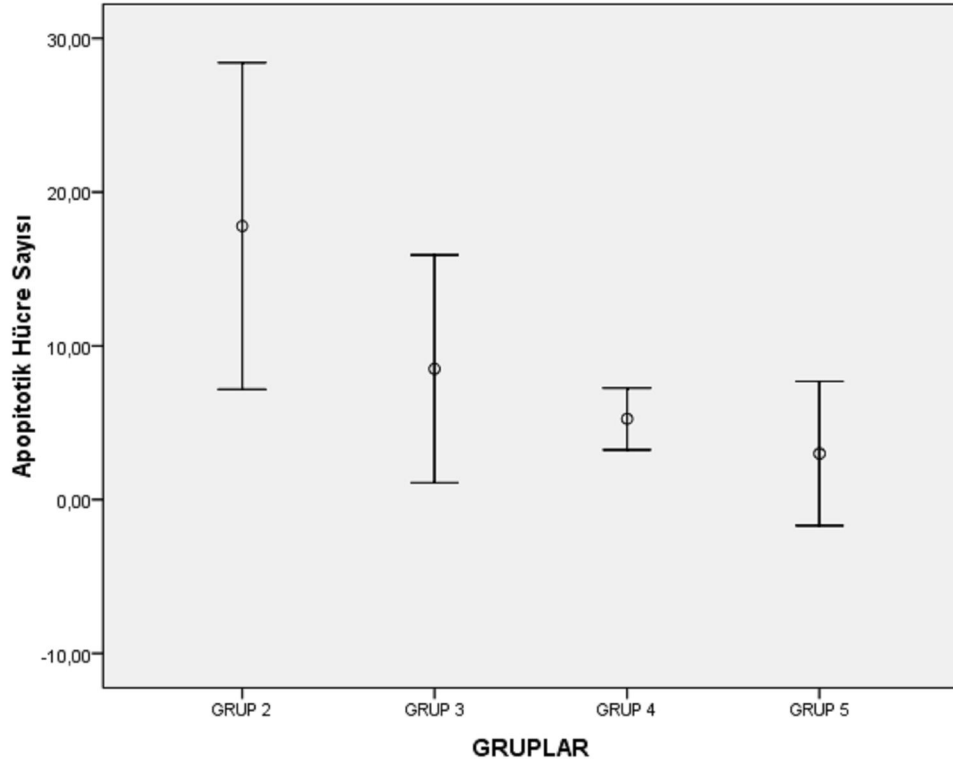
Aktif kaspaz-3 ile boyanan hücre sayımı sonuçlarının ortalamaları ve standart sapmaları Tablo 14'te gösterilmiştir.



**Tablo 14.** Aktif kaspaz-3 ile boyanan hücre sayımı sonuçlarının ortalamaları ve standart sapmaları.

Gruplar	N	Ortalama	Std. Sapma
2	5	17,8000	8,55570
3	4	8,5000	4,65475
4	4	5,2500	1,25831
5	4	3,0000	2,94392

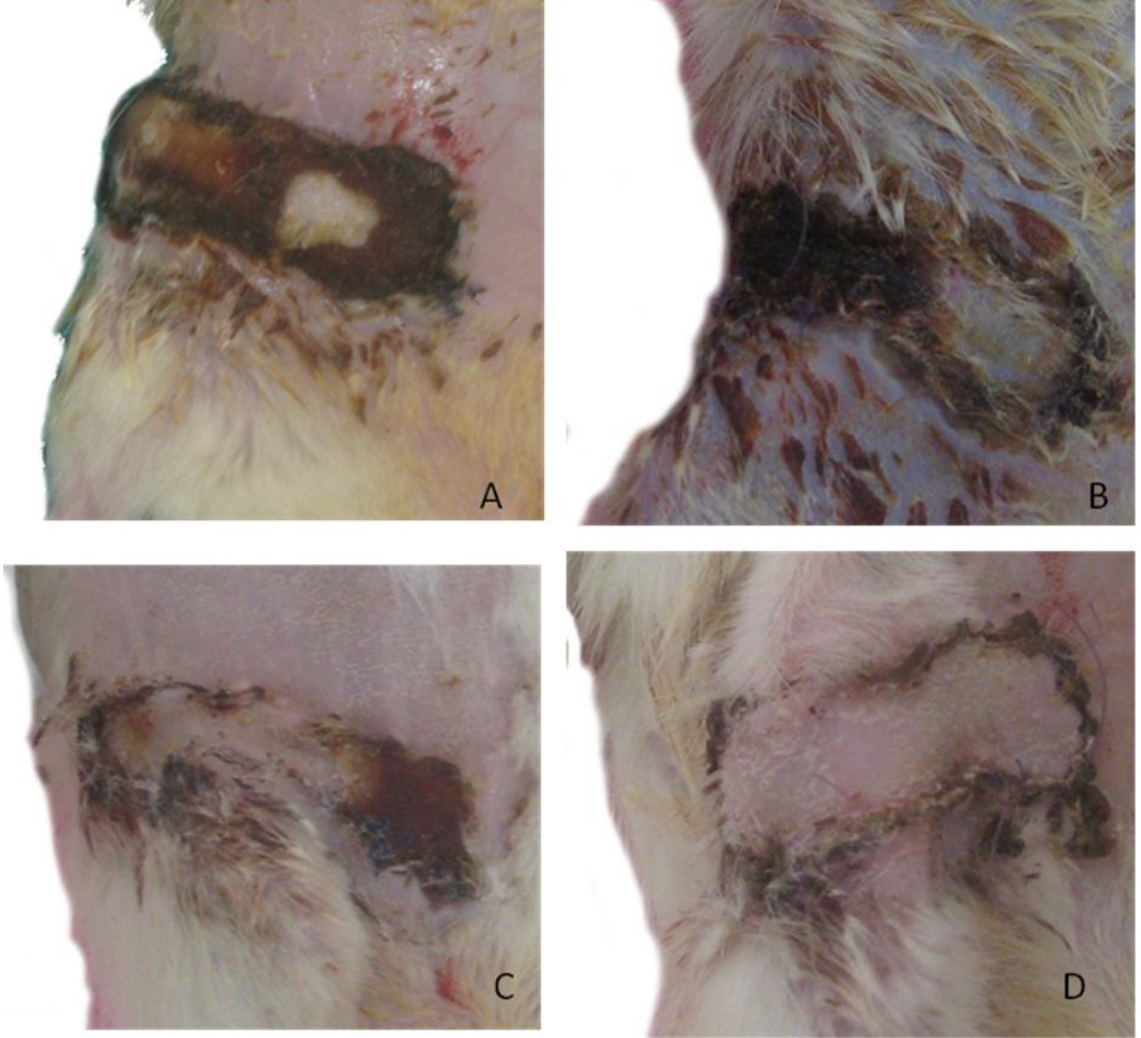
Post op 10. Günde alınan doku materyallerinde yapılan incelemede rastgele seçilerek yapılan örneklemede gruplar karşılaştırıldığında grup 5 ( $p<0,05$ ), ve grup 4'ün ( $p<0,05$ ), grup 2'den anlamlı derecede düşük apoptotik hücre sayısına sahip oldukları görüldü (Şekil 12).



**Şekil12.** Grup 4 ve Grup 5'in iskemi grubuna oranla istatistiksel olarak anlamlı derecede az apoptotik hücreye sahip olduğu görünmektedir.

### Flep Canlı Kalma Oranları

Post op 10. Gün yapılan makroskopik ölçümlerin (Resim 11) sonuçları Tablo 15'te verilmiştir



**Resim 11.** Fleplerin post op 10. Gün makroskopik görüntüleri(A Grup 2, B Grup 3, C Grup 4, D Grup 5 )

**Tablo 15.** Flep ölçüm değerleri (“ilk ölçüm” post-op flep ölçümü,”son ölçüm” post-op 10’uncu günde canlı kalan flep” ölçümüdür).

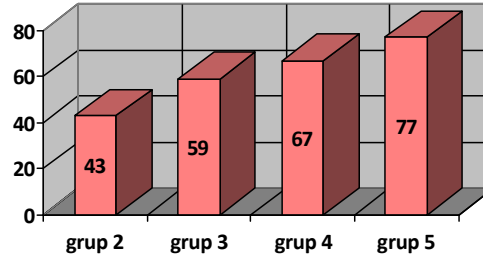
	<b>İlk ölçüm(cm<sup>2</sup>)</b>	<b>Son ölçüm(cm<sup>2</sup>)</b>
<b>G2-a1</b>	17,5	8,03
<b>G2-a2</b>	16,5	6,9
<b>G2-a3</b>	17,6	9,3
<b>G2-a4</b>	15,5	6,5
<b>G2-a5</b>	16,9	8,2
<b>G2-a6</b>	18,7	6,5
<b>G2-a7</b>	18,2	7,7
<b>G2-a8</b>	16,8	6,4
<b>G3-a1</b>	17,4	9,3
<b>G3-a2</b>	14,8	8,8
<b>G3-a3</b>	18,4	6,1
<b>G3-a4</b>	19,3	11,9
<b>G3-a5</b>	13,5	8,6
<b>G3-a6</b>	16,1	10,6
<b>G3-a7</b>	15,8	9,3
<b>G3-a8</b>	17,5	13,5
<b>G4-a1</b>	18,52	14,5
<b>G4-a2</b>	16,5	12,3
<b>G4-a3</b>	17,5	11,6
<b>G4-a4</b>	17,9	13,5
<b>G4-a5</b>	16,9	9,3
<b>G4-a6</b>	16,6	10,4
<b>G4-a7</b>	17,8	11,6
<b>G4-a8</b>	17,3	10,8
<b>G5-a1</b>	18,2	12,2
<b>G5-a2</b>	18,5	14,6
<b>G5-a3</b>	17,6	15,5
<b>G5-a4</b>	16,8	11,9
<b>G5-a5</b>	14,8	10,8
<b>G5-a6</b>	16,6	12,3
<b>G5-a7</b>	18	15,8
<b>G5-a8</b>	17,7	14,4

Flep canlı kalma oranlarının ortalamaları ve standart sapmaları Tablo 16’te gösterilmiştir.

**Tablo 16.** Flep canlı kalma oranlarının ortalamaları ve standart sapmaları.

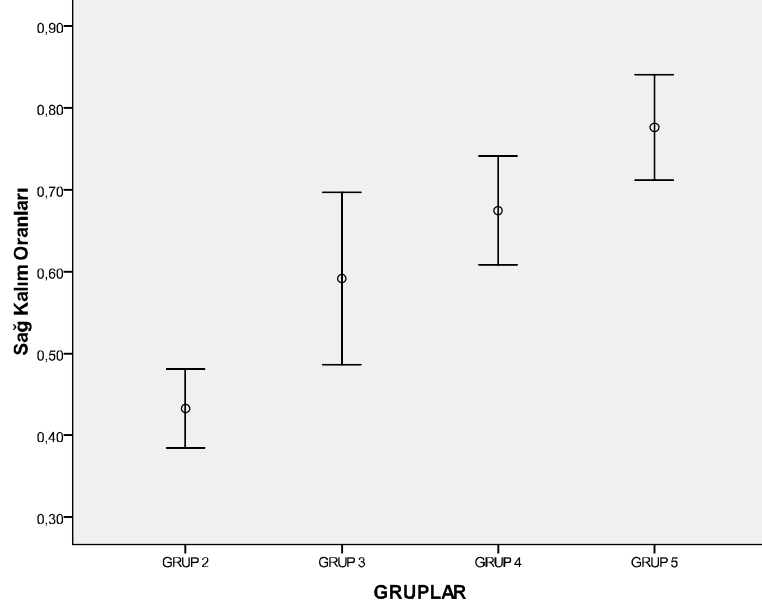
Gruplar	N	Ortalama	Std. Sapma
2	8	,4327	,05733
3	8	,5916	,12559
4	8	,6748	,07933
5	8	,7763	,07747

Flep canlı kalma oranları; iskemi grubu (grup 2) için %43, önkoşullandırma grubu (grup 3) için % 59, eritropoetin grubu (grup 4) için % 67 ve eritropoetinle beraber iskemik önkoşullandırma grubu (grup 5) için % 77 olarak tespit edildi. Şekil 13' de grupların flep sağ kalım oranlarının ortalamaları grafiksel olarak gösterilmiştir.



**Şekil 13.** Grupların flep sağ kalım oranlarının ortalamaları grafiksel olarak gösterilmiştir.

Flep sağ kalım oranları istatistiksel olarak değerlendirildiğinde önkoşullandırma grubunun (grup 3) ( $p= 0,003$ ), eritropoetin grubunun (grup 4) ( $p< 0,001$ ) ve eritropoetinle beraber iskemik önkoşullandırma grubunun (grup 5) ( $p<0,001$ ) iskemi grubundan (grup 2), eritropoetinle beraber iskemik önkoşullandırma grubunun (grup 5) önkoşullandırma grubundan (grup 3) ( $p= 0,001$ ) anlamlı derecede farklı ve yüksek sağ kalım oranına sahip olduğu görüldü (Şekil 14).



**Şekil 14.** İstatistiksel olarak flap sağ kalma oranları tüm gruplarda iskemi grubundan yüksektir. Grup 5'in Grup 3'ten anlamlı olarak yüksek değere sahip olması dikkat çekicidir.

## TARTIŞMA

Kusursuz bir cerrahi tekniğe rağmen uzamış iskemik bir periyodun sonrasındaki reperfüzyon istenmeyen sonuçlara neden olabilir<sup>137</sup>. İskemi, dokuların hipoksik kalması nedeniyle ortaya çıkan ve laktik asit ile toksik metabolitlerin birikimi nedeniyle bir dizi reaksiyon sonucunda hücre ölümüne kadar giden bir süreçtir. Reperfüzyon bir doku yeniden oksijene edildiğinde oluşan iskemik sürecin zarar verici etkilerini ortadan kaldırmak için gereklidir. Ancak iskeminin uzun sürdüğü hallerde, reperfüzyon hasarı serbest oksijen radikalleri, endotelial faktörler ve nötrofillerin eşlik ettiği karmaşık bir mekanizmayla ortaya çıkabilir. Literatürde bu hasarı önlemek üzere pek çok yöntem ve ajan kullanılmıştır ve halen araştırmalar devam etmektedir.

Eritropoietinin hematopoetik etkilerinin ötesinde başka sistemleri korumaya yönelik geniş bir etki yelpazesi vardır<sup>138-141</sup>. Eritropoetin reseptörlerinin (Epo-R) endotel hücresi sinir hücresi, kardiyak miyositler, damar düz kas hücreleri<sup>12,13,142,143</sup> gibi pek çok farklı dokuda tespit edilmesi, eritropoetin doku iskemisinde potansiyel olarak kullanılabilmesi amacıyla non-hematopoetik etkilerinin araştırılmasına neden olmuştur.

Genel bilgi rekombinant insan eritropoietinin eritrosit sayısını arttırarak kanın oksijen taşıma kapasitesini arttırdığıdır. Ancak eritropoetin ile yapılan ve non-hematopoetik sistemle ilgili çalışmalarda kullanılan dozların hematokrit üzerine anlamlı bir değişiklik yapmadığı görülmüştür. Saray ve arkadaşları random paternli flepler üzerinde yaptıkları çalışmalarda flep yaşayabilirliğinin anlamlı bir hematokrit değişikliği olmadan yükseldiğini göstermişlerdir<sup>144</sup>. Bu eritropoetine hematopoetik farmakolojik cevabın doz ile ilişkisini göstermektedir. Tek veya akut yüksek doz eritropoetin, düşük ve intermittan dozlar kadar hematopoezise etkili olmamaktadır<sup>145</sup>. Saray ve arkadaşları aynı çalışmada düşük ve kronik doz kullanılan eritropoetin hematokrit seviyesini arttırıp, flep yaşayabilirliğini azalttığını da göstermişlerdir ve bunu direk veya prostoglandin bağımlı vazokonstrüksiyon, endotelin bağımlı yüksek tansiyon, periferik vasküler direncin artması, yüksek viskozite ve yükselen trombosit sayısı ile açıklamışlardır<sup>144</sup>. Bizim çalışmamızda hematokrit değerinde anlamlı bir yükselme görülmemiştir. Bu sonucu literatürdeki örnekleri gibi eritropoetini tek ve yüksek doz kullanmamıza bağlıyoruz.

Serbest radikaller güçlü reaktif özellikleri olan moleküllerdir. Hücrenin savunma mekanizmaları ile ortadan kaldırılamazlarsa hücre hasarıyla sonuçlanan bir dizi reaksiyon başlatırlar<sup>31</sup>. Reperfüzyonla ATP yıkım ürünü hipoksantin, oksijen sayesinde ve ksantin oksidaz varlığında ürik aside dönüşür. Bu dönüşüm sırasında ciddi miktarda SOR oluşur. SOR hücre membranındaki lipidlerle reaksiyona girerek lipid peroksidleri oluşturmakta, bunlar da membran geçirgenliğinde değişim yaratmaktadır. SOR oluşumu mikrovasküler disfonksiyonun patogeneğinde önemli rol oynayabilir. Yine oluşan serbest radikaller mikrosirkülasyonu durdurarak dolaylı hasara sebep olabilir<sup>146</sup>. Tüm bunlar reperfüzyon hasarı olarak adlandırılmaktadır. Doku lipid peroksid içeriği iskemi reperfüzyonun en önemli belirteçidir<sup>147</sup>. Doku lipid peroksid içeriği çeşitli yöntemlerle ölçülmektedir. Çalışmamızda reperfüzyon hasarını lipid peroksidasyon ürünleri ile değerlendirmek amacıyla etkinliği birçok yayında ortaya konmuş<sup>148,149</sup> önemli bir belirteç olan MDA düzeyleri araştırıldı.

Eritopoetin uygulanan grubun (Grup 4) ve eritropoetin ile iskemik önkoşullandırmanın kombine kullanıldığı grubun (Grup 5) MDA düzeylerinin iskemi grubundan anlamlı derecede farklı ve düşük olduğu görüldü ve bu sonuç bize, literatürdeki örnekleri gibi, eritropoetin dokuyu lipid peroksidi oluşumundan koruduğunu düşündürdü. İstatistiksel olarak bu iki grup arasında fark olmasa da ortalamalara bakıldığında kombine yöntemin en düşük MDA seviyesine sahip olduğu görüldü.

Nitrik oksit'in flep modellerinde yaşayabilirliği artırıcı etkisinden mikrovasküler yataktaki düz kas hücrelerini gevşetmesi sorumlu tutulur. Hayvan modellerinde flep yaşamasını arttırmaktadır<sup>150-153</sup>. Aynı zamanda VEGF'i artırarak da flep yaşayabilirliğini arttırabilmektedir<sup>150</sup>. Fakat hipotansif etkinliği nedeniyle klinik kullanım sınırlıdır. NO kaynağı olan *L-Arginin* de benzer etkinliği olan bir ajan olarak hayvanlarda cilt flep modellerinde iskemik nekrozu azaltmaktadır<sup>154-155</sup>.

Literatürde eritropoetin akut miyokardial inflamasyonu nuclear transcription factor activation protein-1 'i indükleyerek azalttığı gösterilmiştir<sup>131</sup>. Bu proteinin antiinflamatuvar etkisinin NO miktarını arttırmasına bağlı olduğu kabul edilir. NO artması ile de nötrofiller için gereken kemotaktik faktörlerin yapım ve aktivasyonu azalır<sup>156</sup>. İnflamatuvar fazda makrofajlar ve nötrofiller yara iyileşmesinin baskın hücrelerdir. Lenfositler ise ilerleyen günlerde ön plana

çıkar. Galeno ve arkadaşları yanık modeli uyguladıkları EPO'nun etkinliğini araştırdıkları çalışmada, tedavi verilmeyen sıçanlarda inflamatuvar hücre sayılarının daha fazla olduğunu bulmuşlardır<sup>157</sup>.

Çalışmamızda, iskemik önkoşullama ve eritropetin gruplarında inflamatuvar hücrelerin iskemi grubuna göre az olduğu görülmektedir. İki yöntemin kombine kullandığı grupta ise bu azalma kontrol grubundan istatistiksel olarak farkı olmayacak kadar şiddetlidir. Bu sonuç bize kombine yöntemin etkinliği hakkında ciddi fikir vermektedir. Her ne kadar inflamasyon belirteci olarak kullandığımız MPO değerlerinde istatistiksel bir anlam bulunamasa da aritmetiksel ortalamalar inflamatuvar hücre sayımını destekler sonuçlara sahiptir.

Çalışmamızda iskemik önkoşullama, eritropoetin ve ikisinin beraber uygulandığı yöntemlerin, doku NO miktarını istatistiksel olarak arttırdığını gördük. Her iki yöntemin tek tek veya beraber kullanılmasının kıyaslaması yapıldığında, istatistiksel bir anlamlılık yaratmadığını ancak aritmetiksel olarak artış olduğunu gördük.

Eritropoetin'in vazodilatör etkisi literatürde gösterilmiş ancak bu etkinin kendi etkisi mi olduğu yoksa bu etkiyi NO üzerinden mi gösterdiği açıklığa kavuşturulamamıştır<sup>158</sup>.

Nitrik oksit son yıllarda yapılan çalışmalarda anjiyogenez regülasyonunda çok önemli bir molekül olarak karşımıza çıkmaktadır. Nitroprussid gibi NO donörleri<sup>159</sup> endotelial hücre proliferasyonunu ve migrasyonunu artırırken nitrik oksit sentetaz (NOS) inhibitörleri yara iyileşmesini bozmaktadır<sup>159,160</sup>. Ayrıca Morbidelli ve ark. ve Ziche ve ark. anjiyogenezin temelini oluşturan vasküler endotelial hücrelerin mitozunda önemli role sahip olan VEGF'in NO ürünleri endotelial nitrik oksit sentetaz (eNOS) proteini tarafından artırıldığını göstermişlerdir<sup>159-162</sup>.

Eritropoetin'in flep sağ kalımındaki anjiyogenez potansiyeline ilişkin pek çok çalışma yapılmış ve eritropoetin'in endotel hücrelerinde mitozu uyararak neovaskülarizasyon yaptığı gösterilmiştir<sup>163</sup>. Jaquet ve arkadaşlarına göre eritropoetin'in flep histolojisi üzerine etkisi VEGF ile eşit potansiyeldedir<sup>164</sup> ve ekzojen eritropoetin uygulamasının üçüncü gününde, genetik olarak diyabetli farelerde VEGF mRNA'yı yükselterek ve protein ekspresyonu yaparak bu etkisini göstermektedir<sup>165</sup>.



Bizim çalışmamızda iskemik önkoşullama yöntemi ile eritropetin beraber kullanıldığı yöntemin, iskemi grubuna göre anlamlı derecede yüksek angiogenesis oranına sahip olduğu görüldü. Tek başına eritropetin kullanılan grupta da yüksek angiogenesis olmasına rağmen fark istatistiksel olarak anlamlı değildi.

Apoptozisi saptamak için çok çeşitli yöntemler geliştirilmiştir. 1972 yılında apoptozis terimi ilk kez kullanıldığında hücrenin morfolojik görünümüne göre karar verilmişti. Oysa günümüzde morfolojik değerlendirmenin yanı sıra apoptozise özgü olduğu bilinen bazı aktivasyonların (örneğin, aktif kaspaz-3 tayini) moleküler düzeyde belirlenmesiyle de saptanabilmektedir. İlk kez morfolojik kriterlere göre belirlenen apoptozis, 80'li yılların sonuna doğru DNA kırıklarının oluştuğunun ortaya çıkarılmasıyla birlikte bu kırıkların saptanmasına yönelik yöntemlerle belirlenmeye başlanmıştır. 90'lı yılların ortalarında ise apoptotik hücrelerde kaspazların aktifleştiği bulunmuştur. Böylece kaspaz aktivasyonlarının belirlenmesine yönelik metotlarla saptanabilen apoptozis, 90'ların sonuna doğru fosfotidilserin translokasyonunu belirleyen yöntemlerle de saptanmaya başlanmıştır. Bunu 2000'li yılların başlarında apoptotik epitelyal hücrelerde olmak üzere kaspaz aktivitesiyle kırılan bir protein olan keratin 18'in, kırıldıktan sonraki özgün formunu saptayan antikörlerin kullanılarak daha spesifik olarak saptanması takip etmiştir<sup>166-170</sup>.

Önceki çalışmalar eritropetin I/R hasarına karşı anti apoptotik etkisi olduğunu göstermiştir. Brimes ve Gerami'ye göre bu etki JAK2-STAT-Bcl-2 yollarıyla olmaktadır. Aynı zamanda Bcl-2'nin eritropetin antioksidan etkisinden de sorumlu olduğu düşünülmektedir. Eritropetin antioksidan etkisinin katalaz, süperoksit dismutaz ve glutatyon peroksidaz enzimlerinin aktivasyonu ile olduğuna inanılmaktadır<sup>171</sup>.

Çalışmamızda aktif kaspaz 3 ile yapılan apoptotik hücre sayımı sonrası eritropetin uygulanan grup ile iskemik önkoşullandırma eşliğinde eritropetin uygulanan grupların iskemi grubundan anlamlı derecede az apoptotik hücreye sahip olduklarını gördük. İki grubun arasında iki yöntemin birlikteliği lehine aritmetiksel fark olmasına rağmen istatistiksel bir anlam farkı yoktu.

Önkoşullamanın hangi mekanizma üzerinden koruyucu etkisi olduğunu ortaya koymak için pek çok araştırma yapılmıştır. Gösterilmiştir ki önkoşullama iskemi sırasında adenosin trifosfat kullanımını azaltmakta ve reperfüzyon

sırasında yüksek enerjili fosfatların üretim kapasitesini korumaktadır<sup>172</sup>. Birçok otör, K<sup>+</sup>-ATP kanalları gibi proteinlerin fosforilasyonuna neden olan protein kinaz C nin aktivasyonu ile hücrel korunmanın sağlandığını öne sürmektedir. Bu görüş, adenosin uygulanmasıyla iskemik önkoşullama benzeri etkinin oluşması ve adenosin reseptör antagonistlerince etkinin önlenmesini gösteren çalışmalarla desteklenmiştir<sup>79-81</sup>.

Daha önceki çalışmalarda iskemik önkoşullandırma prosedürünün kalp koruyucu etkisinin JAK/STAT<sup>173,174</sup>, phosphatidylinositol-3-kinase (PI-3 Kinase)<sup>175</sup> ve PKC aktivasyonu ile olduğu gösterilmiştir. Benzer şekilde Eritropotinin I/R hasarına karşı kalp koruyucu etkisinin JAK/STAT<sup>176</sup>, PI-3K/Akt<sup>177</sup> ve PKC<sup>178</sup> yolları ile olduğu bildirilmiştir. Glycogen synthase kinase-3 $\beta$  (GSK-3 $\beta$ ), PI-3K, PKC ve JAK/STAT yollarının ortak ürünüdür ve fosforilasyonunun kalp koruyucu etkideki rolü önemlidir<sup>179,180</sup>. Nishihara ve arkadaşları Eritropoetin ve iskemik önkoşullamanın GSK-3 $\beta$ 'nin fosforilasyonunu arttırdığı için kalp koruyucu etkinin arttığını iddia etmekte ve eritropoetin aracılı primer yolağın iskemik ön koşullama ile indüklenenden farklı bir yolakla olduğunu iddia etmektedirler<sup>181</sup>. Aynı konu üzerine yapılan başka çalışmalarda yolağın farklı olduğuna dair sonuçlar alınmadığı bildirilmiştir<sup>182</sup>.

Çalışmamızda flep sağ kalım oranları değerlendirildiğinde önkoşullandırma grubunun, eritropoetin grubunun ve eritropoetinle beraber iskemik önkoşullandırma grubunun iskemi grubundan yüksek sağ kalım oranına sahip olduğu görüldü. Bu üç grubun kıyaslaması yapıldığında ise eritropoetinle beraber iskemik önkoşullandırma grubunun önkoşullandırma grubundan anlamlı derecede farklı ve yüksek sağ kalım oranına sahip olduğu görüldü. Eritropoetin grubunun ise iskemik önkoşullandırma ve eritropoetinle beraber iskemik önkoşullandırma grubundan anlamlı bir değer farkı olmamakla beraber aritmetiksel olarak, iskemik önkoşullandırma grubundan yüksek, eritropoetinle beraber iskemik önkoşullandırma grubundan düşük değerlere sahip olduğu görüldü.

## SONUÇ VE ÖNERİLER

Deri flepleri, plastik cerrahinin vazgeçilmez bir parçası ve bir plastik cerrahın meslek hayatındaki en güçlü silahıdır. Meslek hayatı boyunca her plastik cerrah deri flebi uygulamaları sırasında iskemi ve reperfüzyon hasarı ile karşılaşmak ve bu sorunla yüzleşmek zorunda kalmıştır ve kalacaktır. Bu nedendir ki deri flepleri üzerine yapılan çalışmalar plastik cerrahi literatüründe çok geniş bir yer tutmaktadır. İskemi reperfüzyon hasarı çok sık karşılaşılan sorunlardan biridir. Reperfüze edilen dokuda gelişen hasar hem hasta hem sağlık ekibi için olumsuz sonuçlar doğurmakta ve ciddi maddi külfete neden olmaktadır.

Çalışmamız bahsedilen yaygın probleme yönelik yapılmıştır. Elde edilen sonuçlar ışığında bir değerlendirme yapılacak olursa etkinliği bilinen ve literatürde kabul gören iskemik önkoşullandırma ve eritropotin uygulamalarının bir arada kullanılması lipid peroksidasyonunu, inflamatuvar reaksiyonu, apoptozu azaltmakta, anjiyogenezisi, doku NO miktarını arttırmakta ve sonuç olarak flep sağ kalırlığını yükseltmektedir. Özellikle flep sağ kalım oranlarının iki yöntemin birlikte kullanılması durumunda tek başına iskemik önkoşullama yapılmasından yüksek olması dikkat çekicidir. İskemik önkoşullama yapmaya uygun durumlarda kolay uygulanabilir, güvenilir, intraoperatif olarak kullanılabilen ve ulaşılması kolay olan eritropoetinin uygulanmasının yararlı olduğunu düşünmekteyiz. Böylelikle flep yaşam oranlarındaki artışla ek operasyon ihtiyacının, morbiditenin, hastane kalış sürelerinin azalmasıyla sosyal ve ekonomik yönden olumlu sonuçlar elde edileceğini ve hasta psikolojisi üzerinde olumlu etkilere ulaşılacağı inancını taşımakla birlikte bu konuda daha ileri çalışmalara ihtiyaç olduğu kanısındayız.

## KAYNAKLAR

1. Daniel RK, Kerrigan L. Principle and physiology of skin flap surgery. In McCarthy JG. ed: Plastic Surgery. Philadelphia: W.B. Saunders, 1990:275-328.
2. Murry CE, Jennings RB, Reimer KA. Preconditioning with ischemia : a delay of lethal cell injury in ischemic myocardium. Circulation 1986; 74:1124-1136.
3. Mounsey RA, Pang CY Forrest C. Preconditioning: a new technique for improved muscle flap survival. Otolaryngol Head Neck Surgery 1992; 107:549-552.
4. Zahir KS, Syed SA, Zink JR, et al. Ischemic preconditioning improves the survival of skin and myocutaneous flap in a rat model. Plast Reconstr Surg 1998; 102(1):140-150.
5. Genc S, Koroglu TF, Genc K. Erythropoietin and the nervous system. Brain Res 2004; 1000:19–31
6. Daghman NA, Elder GE, Savage GA, et al. Erythropoietin production: evidence for multiple oxygen sensing pathways. Ann Hematol. 1999;78: 275–278.
7. Kim EK, Hong JP. Effect of Recombinant Human Erythropoietin on Ischemia-Reperfusion Injury: An Experimental Study in a Rat TRAM Flap Model. Plast Reconstr Surg 2007;120: 1774-81.
8. Digicaylioglu M, Lipton SA. Erythropoietin mediated neuroprotection involves cross-talk between Jak2 and NFkappaB signaling cascades. Nature 2001; 412: 641.
9. Akimoto T, Kusano, E, Inaba T, et al. Erythropoietin regulates vascular smooth muscle cell apoptosis by a hosphatidylinositol 3 kinase-dependent pathway. Kidney Int 2000; 58: 269.
10. Ammarguella F, Llovera, M, Kelly, PA, Goffin, B. Low doses of EPO activate MAP kinases but not JAK2-STAT5 in rat vascular smooth muscle cells. Biochem Biophys Res Commun 2001; 284: 1031.

11. Tramontano AF, Muniyappa R, Black AD, et al. Erythropoietin protects cardiac myocytes from hypoxia-induced apoptosis through an Akt-dependent pathway. *Biochem Biophys Res Commun* 2003; 308: 990.
12. Anagnostou A, Liu Z, Steiner M, et al. Erythropoietin receptor mRNA expression in human endothelial cells. *Proc Natl AcadSci USA* 1994;91: 3974–8.
13. Ogilvie M, Yu X, Nicolas-Metral V, et al. Erythropoietin stimulates proliferation and interferes with differentiation of myoblasts. *J Biol Chem* 2000;275: 39754-61.
14. Lipsic E, Van der Meer P, Henning RH, et al. Timing of erythropoietin treatment for cardioprotection in ischemia/ reperfusion. *J Cardiovasc Pharmacol* 2004;44:473-9.
15. Sharples EJ, Patel N, Brown P, et al. Erythropoietin protects the kidney against the injury and dysfunction caused by ischemia- reperfusion. *J Am Soc Nephrol* 2004;15:2115-24.
16. Solaroglu A, Dede FS, Okutan E, et al. A single dose of erythropoietin attenuates lipid peroxidation in experimental liver ischemia-reperfusion injury in the rat fetus. *J Matern Fetal Neonatal Med* 2004;16:231-4.
17. Wu H, Ren B, Zhu J, et al. Pretreatment with recombinant human erythropoietin attenuates ischemia-reperfusion-induced lung injury in rats. *Eur J Cardiothorac Surg* 2006;29:902-7.
18. Junk AK, Mammis A, Savitz SI, et al. Erythropoietin administration protects retinal neurons from acute ischemia-reperfusion injury. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2002;99:10659-64.
19. Guneli E, Cavdar Z, Islekel H, et al. Erythropoietin protects the intestine against ischemia/ reperfusion injury in rats. *Mol Med* 2007;13:509-17.
20. Unal S, Demirkan F, Arslan E, et al. Comparison of ischemic and chemical preconditioning in jejunal flaps *Plast Reconstr Surg* 2003;112: 1024-1031
21. Daniel RK, Kerrigan CL. Principle and physiology of skin flap surgery. In McCarthy JG (eds). *Plastic Surgery*. Philadelphia: W.B. Saunders, 1990: 275-328.
22. Kerrigan CL. Skin flap failure: pathophysiology. *Plast Reconstr Surg* 1983;72(6):766-777.

23. Padubidri AN, Browne E, Banbury J. Arteriovenous cross-flow flap in rat: a novel skin flap. *Plast Reconstr Surg* 1997; 100(5):1218-1226.
24. Grace PA. Ischaemia-reperfusion injury. *British J of Surgery* 1994; 81: 637-647.
25. Lin E, Lowry SF, Calvano SE. The systemic response to injury. In Schwartz SI (ed), *Principles of Surgery* 7th ed. Mc Graw-Hill 1999; I: 13-32.
26. Semenza GL. Cellular and molecular dissection of reperfusion injury ROS within and without. *Circ Res* 2000;86: 117-118.
27. Blaisdell FW. The pathophysiology of skeletal muscle ischemia and the reperfusion syndrome: a review. *Cardiovasc Surg*, 2002; 10(6):620-30.
28. Zahir KS, Syed A, Zink JR, et al. Ischemic preconditioning improves the survival of skin and myocutaneous flap in a rat model. *Plast Reconstr Surg* 1998;102(1):140-150.
29. Siesjö BK. Mechanisms of ischemic brain damage. *Crit. Care Med* 1988;16:954-63.
30. Mitchell RN, Cotran RS. Hücre zedelenmesi, ölümü ve adaptasyonu. In Kumar V, Cotran RS, Robbins SL (Eds.). Çevikbaş U (çev ed) *Temel Patoloji*. (WB Saunders Co. izniyle) 6. Baskı. İstanbul: Nobel Tıp Kitabevi; 2000: 3-24.
31. Türkyılmaz Z. Karaciğer İskemi-Reperfüzyon Zedelenmesinde Pentoksifilin, Dimetilsülfoksit ve Eksojen Melatoninin Koruyucu Etkilerinin Karşılaştırılması: Trakya Üniversitesi Tıp Fak; Edirne, Uzmanlık Tezi 2003.
32. Zimmerman BJ, Granger DN. Reperfusion injury. *Surg Clin North Am* 1992; 72: 65-83.
33. Kuzu MA, Koksoy C, Kale İT, Tanık A, Terzi C, Elhan AH. Reperfusion injury delays healing of intestinal anastomosis in a rat. *Am J of Surgery* 1998; 176: 348-351.
34. Terzi C, Kuzu A, Tanık A, Kale T, Aşlar K, Elhan A. Sıçanlarda intestinal iskemi modelinde proflaktik kısa ve uzun süreli yüksek doz Allopurinol kullanımının mortaliteye etkisi. *Klinik ve Deneysel Cerrahi* 2000, 8;1: 10-16.

35. Bathe OF, Chow AWC, Phang PT. Splachnic origin of cytokines in a porcine model of mesenteric ischemia-reperfusion. *Surgery* 1998, 123;1: 79-88.
36. Homer-Vanniasinkam S, Crinnion JN, Gough MJ. Post-ischaemic organ dysfunction: a review. *Eur J Vasc Endovasc Surg* 1997 ;14: 195-203.
37. Monsinjon T, Richard V, Fontaine M. Complement and its implications in cardiac ischemia/reperfusion: strategies to inhibit complement. *Fundam Clin Pharmacol* 2001; 15: 293-306.
38. Ertan T, Soran A, Kılıc M, Aşlar AK, Koc M, Cengiz O. Kan Malondialdehid ve Total Antioksidan Seviyesinin(TAS) önemi. *Cerrahi Tıp Bulteni* 2001,2;4: 154-167.
39. Acworth IN, Bailey B. Reactive Oxygen Species. In: *The handbook of oxidative metabolism*. Massachusetts: ESA Inc 1997: 1-4.
40. Reiter RJ. Oxidative processes and antioxidant defense mechanisms in the aging brain. *FASEB J* 1995; 9: 526-533.
41. Davies SJ, Reichardt-Pascal SY, Vaughan D, Russel GI. Differential effect of ischemia-reperfusion injury on anti-oxidant enzyme activity in the rat kidney. *Exp Nephrol* 1995; 3: 348-354.
42. Cuzzocrea S, Reiter RJ. Pharmacological action of melatonin in shock, inflammation and ischemia/reperfusion injury. *Eur J Pharmacol* 2001; 426:1-10.
43. Lopez-Neblina F, Paez-Rollys AJ, Toledo-Pereyra LH. Mechanism of Protection of Verapamil by Preventing Neutrophil Infiltration in the Ischemic Rat Kidney. *J SurgRes* 1996; 61: 469-472.
44. Frangogiannis NG. Chemokines in ischemia and reperfusion. *Thromb Haemost* 2007; 97: 738-747.
45. Eltzschig HK, Collard CD. Vascular ischaemia and reperfusion injury. *Br Med Bull* 2004; 70: 71-86.
46. Schoenberg MH, Beger HG. Reperfusion injury after intestinal ischemia. *Crit Care Med* 1993; 21: 1376-1386.
47. Weight SC, Bell PR, Nicholson ML. Renal ischaemia-reperfusion injury. *Br J Surg* 1996; 83: 162-170.

48. Chatterjee PK. Novel pharmacological approaches to the treatment of renal ischemia-reperfusion injury: a comprehensive review. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol* 2007; 376: 1-43.
49. García-Villalón AL, Amezcua YM, Monge L, Fernández N, Salcedo A, Diéguez G. Endothelin-1 potentiation of coronary artery contraction after ischemia-reperfusion. *Vascul Pharmacol* 2008; 48:109-114.
50. Girotti AW. Lipid hydroperoxide generation, turnover, and effector action in biological systems. *J Lipid Res* 2000; 39:1529-1542.
51. Huang HY, Helzlsouer KJ, Appel LJ. The effects of vitamin C and vitamin E on oxidative DNA damage: Results from a randomized controlled trial. *Cancer Epidemiology, Biomarkers & Prevention* 2000; 9: 647-652.
52. Marnett LJ. Oxyradicals and DNA damage. *Carcinogenesis* 2000, 21;3:361-370.
53. Unno N, Fink MP. Nutritional, physiologic, and pathophysiologic considerations of the gastrointestinal tract. Intestinal epithelial hyperpermeability. Mechanisms and relevance to disease. *Gastroenterology Clinics* 1998,27;2: 289-307.
54. Karihtala P, Soini Y. Reactive oxygen species and antioxidant mechanisms in human tissues and their relation to malignancies. *APMIS* 2007; 115:81-103.
55. Cherubini A, Ruggiero C, Morand C, et al. Dietary antioxidants as potential pharmacological agents for ischemic stroke. *Curr Med Chem.* 2008; 15: 1236-1248.
56. Mickle DA, Weisel RD. Future directions of vitamin E and its analogues in minimizing myocardial ischemia-reperfusion injury. *Can J Cardiol* 1993; 9: 89-93.
57. Virág L, Szabó C. The therapeutic potential of poly(ADP-ribose) polymerase inhibitors. *Pharmacol Rev* 2002; 54: 375-429.
58. Valko M, Leibfritz D, Moncol J, Cronin MT, Mazur M, Telser J. Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease. *Int J Biochem Cell Biol* 2007; 39: 44-84.
59. Şehirli AO. Renal İskemi/Reperfüzyon Hasarında Melatonin'in Koruyucu Etkisi. T.C. Marmara Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Enstitüsü, İstanbul, Yüksek Lisans Tezi. 2001.



60. Akkuş İ. Serbest Radikaller ve Fizyopatolojik Etkileri. 1. Baskı, Mimoza Yayınları, 1995: 1-60.
61. Sener G, Sehirli AO, Keyer-Uysal M, Arbak S, Ersoy Y, Yeğen BC. The protective effect of melatonin on renal ischemia-reperfusion injury in the rat. *J Pineal Res* 2002; 32: 120-126.
62. Sener G, Tosun O, Sehirli AO, et al. Melatonin and N-acetylcysteine have beneficial effects during hepatic ischemia and reperfusion. *Life Sci* 2003; 72: 2707-2718.
63. 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.
64. Sener G, Sert G, Ozer SA, Arbak S, Gedik N, Dülger AG. Melatonin protects against pressure ulcer-induced oxidative injury of the skin and remote organs in rats. *J Pineal Res* 2006; 40: 280-287.
65. Sener G, Tuğtepe H, Yüksel M, Cetinel S, Gedik N, Yeğen BC. Resveratrol improves ischemia/reperfusion-induced oxidative renal injury in rats. *Arch Med Res* 2006; 37: 822-829.
66. Toklu H, Alican I, Ercan F, Sener G. The beneficial effect of resveratrol on rat bladder contractility and oxidant damage following ischemia/reperfusion. *Pharmacology* 2006; 78: 44-50.
67. Dulundu E, Ozel Y, Topaloglu U, et al. Alpha-lipoic acid protects against hepatic ischemia-reperfusion injury in rats. *Pharmacology* 2007; 79: 163-170.
68. Sehirli O, Sener E, Cetinel S, Yüksel M, Gedik N, Sener G. Alpha-lipoic acid protects against renal ischaemia-reperfusion injury in rats. *Clin Exp Pharmacol Physiol* 2008; 35: 249-255.
69. Sehirli AO, Sener G, Satiroglu H, Dülger AG. Protective effect of N-acetylcysteine on renal ischemia/reperfusion injury in the rat. *J Nephrol* 2003; 16: 75-80.
70. Tuğtepe H, Sener G, Biyikli NK, et al. The protective effect of oxytocin on renal ischemia/reperfusion injury in rats. *Regul Pept* 2007; 140: 101-108.
71. Sener G, Sert G, Ozer Sehirli A, et al. Pressure ulcer-induced oxidative organ injury is ameliorated by beta-glucan treatment in rats. *Int Immunopharmacol* 2006; 6: 724-732.

- 72.**Sener G, Sener E, Sehirli O, et al. Ginkgo biloba extract ameliorates ischemia reperfusion-induced renal injury in rats. *Pharmacol Res* 2005; 52: 216-22.
- 73.**Adanalı G, Özer K, Siemonow M. Early and late effects of ischemic preconditioning on microcirculation of skeletal muscle flaps. *Plast Reconstr Surg* 2002; 109(4):1344-52.
- 74.**Baumeister S, Ofer N, Kleist C, et al. Reduction of skeletal muscle injury in composite tissue allotransplantation by heat stress preconditioning. *Plast Reconstr Surg* 2004; 114(7):1832-1840.
- 75.**Hoşnüter M, Babuççu O, Kargı, Altinyazar C. Dual preconditioning: effects of pharmacological plus ischemic preconditioning on skin flap survival. *Ann Plast Surg* 2003; 50(4):398-402.
- 76.**Küntscher MV, Kastel T, Sauerbier M, et al. Acute remote ischemic preconditioning on a rat cremasteric muscle flap model. *Microsurgery*, 2002; 2(6):221-226.
- 77.**Maldonado C, Stadelmann WK, Ramirez S, et al. Preconditioning of latissimus dorsi muscle flaps with monophosphoryl lipid A. *Plast Reconstr Surg* 2003; 111(1):267-274.
- 78.**Rees R, Punch J, Shaheen K, et al. The stress response in skin: the role of neutrophil products in preconditioning. *Plast Reconstr Surg* 1993; 92: 110-117.
- 79.**Addison P, Neligan P, Forrest C, Pang CY et al. Acute adenosine treatment is effective in augmentation of ischemic tolerance in muscle flaps in the pig: an update. *Plast Reconstr Surg* 2003; 111(2):842-45.
- 80.**Carroll SM, Overgoor M, Barker JH. Acute ischemic preconditioning of skeletal muscle prior to flap elevation augments muscle-flap survival. *Plast Reconstr Surg* 1997; 100:58-65.
- 81.**Zhang WJ, Shi ZX, Cui YJ et al. Allitridum mimics effect of ischemic preconditioning by activation of protein kinase C. *Acta Pharmacol Sin* 2001; 22(2):132-136.
- 82.**Pang CY, Yang R, Zhong A et al. Acute ischaemic preconditioning protects against skeletal muscle infarction in the pig. *Cardiovasc Res* 1995; 29:782-788.

- 83.**Currie RW. Effects of ischemia and perfusion temperature on the synthesis of stressinduced (heat shock) proteins in isolated and perfused rat hearts. *J Mol Cell Cardiol* 1987; 19(8):795-808.
- 84.**Marber MS, Mestril R, Chi S, et al. Overexpression of the rat inducible 70-kD heat stress protein in a transgenic mouse increases the resistance of the heart to ischemic injury. *J Clin Invest* 1995; 95(4):1446-56.
- 85.**Özvaran MK. Malign mezotelyomada gen tedavisi. *Toraks Dergisi* 2004; 5 (2): 110-115.
- 86.**Rashed MM, Ragab NM. The pattern of expression of the apoptotic inducer fas and the apoptotic inhibitor bcl-2 oncogenes immunohistochemically in bone-marrow invaded by the non-hodgkin lymphomas. *Turk J Haematol* 2004; 21 (3): 141-147.
- 87.**Öztürk F. Apoptoz. *İnönü Üniversitesi Tıp Fakültesi Dergisi*, 2002; 9 (2): 143-148.
- 88.**Altunkaynak B Z, Özbek E. Programlanmış Hücre Ölümü: Apoptoz Nedir? *Tıp Araştırmaları Dergisi*: 2008; 6 (2) :93 -104.
- 89.**Guimaraes CA, Linden R. Programmed cell death; apoptosis and alternative deathstyles. *Eur J Biochem* 2004; 271: 1638–1650.
- 90.**Tomatır A G. Apoptoz; programlı hücre ölümü. *T Klin J Med Sci* 2003; 23: 499-508.
- 91.**Yılmaz İ. Erişkin ratlarda deneysel varikosel oluşturulması sonrası testislerde germ hücrelerinde apoptozis düzeylerinin yükselmesi ve yükselmiş olan apoptozisin varikoselektomi sonrası gerileme düzeyi ve süresinin TUNEL yöntemi ile değerlendirilmesi. Sağlık Bakanlığı Taksim Eğitim ve Araştırma Hastanesi Üroloji Kliniği, İstanbul. Uzmanlık Tezi, 2005
- 92.**Öktem S, Özhan MH, Özol D. Apoptozisin önemi. *Toraks Dergisi* 2001; 2 (1): 91-95.
- 93.**Blank V, Kourilsky P, Israel A. NF-κB and related proteins: Rel/dorsal homologies meet ankyrin-like repeats. *Trends Biochem Sci* 1992; 17:135-140.

94. Gastman BR, Futrell JW, Manders EK. Apoptosis and plastic surgery. *Plast Reconstr Surg* 2003; 111(4):1481-1495.
95. Nagata S. Apoptosis by death factor. *Cell* 1997; 88: 355-365.
96. Kaneda K, Kashii S, Kurosawa T et al. Apoptotic DNA fragmentation and upregulation of Bax induced by transient ischemia of the rat retina. *Brain Research* 1999; 815: 11-20.
97. Gültekin N, Karaoğlu K, Küçükateş E. Hücrede apoptoz ve sağkalım mekanizmalarının keşfedilmesi ve yeni potansiyel tedavi stratejileri. *Arch Turk Soc Cardiol* 2008;36(2):120-130
98. Colwell AS, Beames SR, Soo C, et al. Increased angiogenesis and expression of vascular endothelial growth factor during scarless repair. *Plast Reconstr Surg* 2005;115(1):204- 212.
99. Wong MS, Erdman D, Sweis R, et al. Basic fibroblast growth factor expression following surgical delay of rat transverse rectus abdominis myocutaneous flaps. *Plast Reconstr Surg* 2004;113(7):2030-2036.
100. Zhang F, Waller W, Lineaweaver WC. Growth factor and flap survival. *Microsurgery* 2004;162-167.
101. Zhang F, Yang F, Hu EC, et al. Vascular endothelial growth factor gene therapy in improvement of skin paddle survival in rat TRAM flap model. *J Reconstr Microsurg* 2005;21(6):391-396.
102. Kryger Z, Zhang F, Dogan T et al. The effects of VEGF on survival of a random flap in the rat: examination of various routes of administration. *Br J Plast Surg* 2000; 53: 234-239.
103. Machens H, Morgan JR, Bertiaume F, et al. Platelet-derived growth factor-AA mediated functional angiogenesis in the rat epigastric island flap after genetic modification of fibroblasts is ischemic dependent. *Surg* 2002; 131:393-400.
104. Zhang F, Oswald T, Lineaweaver WC, et al. Regulation of inducible nitric oxide synthase in ischemic preconditioning of muscle flap in a rat model. *Ann Plast Surg* 2004; 52: 609- 613.
105. Park S, Teper OM, Galiano RD, et al. Selective recruitment of endothelial progenitor cells to ischemic tissue with increased neovascularization. *Plast Reconstr Surg* 2004;113(1):284-293.

106. Asim K, Ashrafpour H, Huang N, et al. Acute local subcutaneous VEGF165 injection for augmentation of skin flap viability: efficacy and mechanism. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 2004; 287:219-229.
107. Huang N, Khan A, Ashrafpour H, et al. Efficacy and mechanism of adenovirus-mediated VEGF-165 gene therapy for augmentation of skin flap viability. *Am J Physiol* 2006; 291:127-147.
108. Neumeister MW, Song YH, Mowlavi A, et al. Effects of liposome mediated gene transfer of vegf in ischemic rat gracilis muscle. *Microsurgery* 2001;21: 58-62.
109. Taub PJ, Marmur JD, Zhang WX, et al. Locally administered vascular endothelial growth factor cDNA increases survival of ischaemic experimental skin flaps. *Plast Reconstr Surg* 1998;102(6):2033-2039.
110. Zhang FZ, Fischer K, Timek EK, et al. Improvement of skin paddle survival by application of vascular endothelial growth factor in a rat TRAM flap model. *Ann Plast Surg* 2001; 46(3):314-319.
111. Zhang F, Oswald T, Lin S, et al. Vascular endothelial growth factor (VEGF) expression and the effect of exogenous VEGF on survival of a random flap in the rat. *Br J Plast Surg* 2003; 56(7):653-659.
112. Bahlmann FH, de Groot K, Haller H, Fliser D. Erythropoietin: is it more than correcting anaemia? *Nephrol Dial Transplant* 2004;19(1):20-2.
113. Erslev AJ, Laviates PH. Observations on the nature of the erythropoietic serum factor. *Blood* 1954;9(11):1055-61.
114. Miyake T, Kung CK, Goldwasser E. Purification of human erythropoietin. *J Biol Chem* 1977 10;252(15):5558-64.
115. Jacobs K, Shoemaker C, Rudersdorf R, Neill SD. Isolation and characterization of genomic and cDNA clones of human erythropoietin. *Nature* 1985 ;313(6005):806-10.
116. Beru N, McDonald J, Lacombe C, Goldwasser E. Expression of the erythropoietin gene. *Mol Cell Biol*. 1986; 6(7): 2571–2575.
117. Macdougall IC, Eckardt KU. Haematological disorders. In: Davison AM, Cameron JS, Grünfeld JP, Kerr DNS, Ritz E, Winearls CG(eds). *Textbook of Clinical Nephrology*. Oxford: Oxford Medical Publications, 1998:1935-1954.

- 118.**Krantz SB, Erythropoietin. *Blood*, 1991; 77(3): 419-434
- 119.**Quirinia A, Taagehoj JF, Viidik A. Ischemia in wound healing I. Design of a flap model: Changes in blood flow. *Scand J Plast Reconstr Surg Hand Surg* 1992;26:21.
- 120.**Ateş E, Yalcin AU, Yılmaz S, Koken T, Tokyol C. Protective effect of erythropoietin on renal ischemia and reperfusion injury. *ANZ J Surg* 2005;75:1100-5.
- 121.**Parsa CJ, Kim J, Riel RU, et al. Cardioprotective effects of erythropoietin in the reperfused ischemic heart: a potential role for cardiac fibroblasts. *J Biol Chem* 2004;279:20655-62.
- 122.**Brines M, Cerami A. Discovering erythropoietin's extra- hematopoietic functions: biology and clinical promise. *Kidney Int* 2006; 70:246-50.
- 123.**Chattopadhyay A, Choudhury TD, Bandyopadhyay D, et al. Protective effect of erythropoietin on the oxidative damage of erythrocyte membrane by hydroxyl radical. *Biochem Pharmacol* 2000; 59:419-25.
- 124.**Chakraborty M, Ghosal J, Biswas T, et al. Effect of erythropoietin on membrane lipid peroxidation, superoxide dismutase, catalase, and glutathione peroxidase of rat RBC. *Biochem Med Metab Biol* 1988; 40:8-18.
- 125.**Genc S, Akhisaroglu M, Kuralay F, et al. Erythropoietin restores glutathione peroxidase activity in 1-methyl-4-phenyl-1,2,5,6-tetrahydropyridine-induced neurotoxicity in C57BL mice and stimulates murine astroglial glutathione peroxidase production in vitro. *Neurosci Lett* 2002; 321:73-6.
- 126.**Kumral A, Tugyan K, Gonenc S, et al. Protective effects of erythropoietin against ethanol-induced apoptotic neurodegeneration and oxidative stress in the developing C57BL/6 mouse brain. *Brain Res Dev Brain Res* 2005;160:146-56.
- 127.**Sakanaka M, Wen TC, Matsuda S, et al. In vivo evidence that erythropoietin protects neurons from ischemic damage. *Proc Natl Acad Sci USA* 1998;95:4635-40.
- 128.**Túri S, Németh I, Varga I, et al. The effect of erythropoietin on the cellular defence mechanism of red blood cells in children with chronic renal failure. *Pediatr Nephrol* 1992; 6:536-41.

- 129.**Contaldo C, Meier C, Elsherbiny A, et al. Human recombinant erythropoietin protects the striated muscle microcirculation of the dorsal skinfold from postischemic injury in mice. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2007;293:H274-83.
- 130.**Liu X, Xie W, Liu P, et al. Mechanism of the cardioprotection of rhEPO pretreatment on suppressing the inflammatory response in ischemia-reperfusion. *Life Sci* 2006; 78:2255-64.
- 131.**Rui T, Feng Q, Lei M, et al. Erythropoietin prevents the acute myocardial inflammatory response induced by ischemia/reperfusion via induction of AP-1. *Cardiovasc Res* 2005; 65:719-27.
- 132.**Dunn RM, Mancoll J. Flap models in the rat: a review and reappraisal. *Plast Reconstr Surg* 1992;90(2):319-328,
- 133.**Petry JJ, Wortham KA. The anatomy of the epigastric flap in the experimental rat. *Plast Reconstr Surg* 1984;74(3):410-414.
- 134.**Yagi K. Lipid peroxides and related radicals in clinical medicine. In D.Armstrong (ed) *Free Radicals in Diagnostic Medicine*. New York: Plenum Press,1994 :1-15
- 135.**Colletti LM, Remick DG, Burtch GD, Kunkel SL, Strieter RM, Campbell DAJ. Role of tumor necrosis factor- $\alpha$  in the pathophysiological alterations after hepatic ischemia/reperfusion injury in rat. *J Clin Invest* 1990, 85: 1936-1943.
- 136.**Schmekel B, Karlsson SE, Linden M, Sundstrom C, Tegner H, Venge P. Myeloperoxidase in human lung lavage: a marker of local neutrophil activity, *Inflammation* 1990, 14: 447-454.
- 137.**Ünal Ş, Özmen S, Demir Y, Yavuzer R, Latlıfoğlu O, Atabay K. Gradually increased blood flow on ischemia–reperfusion injury. *Ann Plast Surg* 2000; 47(4): 412-6.
- 138.**Erbayraktar S, de Lanerolle N, de Lotbinière A, et al. Carbamylated erythropoietin reduces radiosurgically-induced brain injury. *Mol Med* 2006;12:74-80.
- 139.**Sirén AL, Ehrenreich H. Erythropoietin—a novel concept for neuroprotection. *Eur Arch Psychiatry Clin Neurosci* 2001;251:179-84.
- 140.**Celik M, Gokmen N, Erbayraktar S, et al. Erythropoietin prevents motor neuron apoptosis and neurologic disability in experimental

- spinal cord ischemic injury. *Proc Natl Acad Sci USA* 2002; 99:2258–63.
- 141.** Erbayraktar S, Grasso G, Sfacteria A, et al. Asialoerythropoietin is a nonerythropoietic cytokine with broad neuroprotective activity in vivo. *Proc Natl Acad Sci USA* 2003;100:6741-6.
- 142.** Jelkmann W, Wagner K. Beneficial and ominous aspects of the pleiotropic action of erythropoietin. *Ann Hematol.* 2004; 83:673–86.
- 143.** Marti HH. Erythropoietin and the hypoxic brain. *J Exp Biol* 2004;207:3233–42.
- 144.** Saray A, Ozakpinar R, Koc C, Serel S, Sen Z, Can Z. Effect of chronic and short-term erythropoietin treatment on random flap survival in rats: An experimental study. *Laryngoscope* 2003;113: 85.
- 145.** Cheung WK, Goon BL, Guilfoyle MC, Wacholtz MC. Pharmacokinetics and pharmacodynamics of recombinant human erythropoietin after single and multiple subcutaneous doses to healthy subjects. *Clin Pharmacol Ther* 1998; 64:412.
- 146.** Savas C, Dindar H, Bilgehan A, Ataoglu O, Yucesan S. Pentoxifylline attenuates reperfusion injury in testicular torsion. *Scand J Urol Nephrol* 2002; 36:65-70.
- 147.** Zar HA, Tanigawa K, Young-Myeong K, Lancaster JR Jr. Rat liver postischemic lipid peroxidation and vasoconstriction depend on ischemia time. *Free Radic Biol Med* 1998; 25:255-64.
- 148.** Ohkawa H, Ohishi N, Yagi K. Assay for lipid peroxides in animal tissues by thiobarbituric acid reaction. *Anal Biochem* 1979; 95(2):351-8.
- 149.** Oh SJ, Kwak C, Baek M, Kim CS, Kim KS, Choi H. Histologic and molecular changes in the ipsilateral and contralateral epididymides of the rat in response to unilateral testicular torsion followed by detorsion. *Fertil Steril* 2004; 81(1):882-7.
- 150.** Khan A, Ashrafpour H, Huang N, et al. Acute local subcutaneous VEGF165 injection for augmentation of skin flap viability: efficacy and Mechanism. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 2004;287:1219–1229.



151. Um SC, Suzuki S, Toyokuni S, et al. Involvement of nitric oxide in survival of random pattern skin flap. *Plast Reconstr Surg* 1998;101:785–792.
152. Cordeiro PG, Santamaria E, Hu QY. Use of a nitric oxide precursor to protect pig myocutaneous flaps from ischemia–reperfusion injury. *Plast Reconstr Surg* 1998; 102:2040–2048.
153. Mittermayr R, Valentini D, Fitzal F, Hallstrom S, Gasser H, Redl H. Protective effect of a novel NO-donor on ischemia/ reperfusion injury in a rat epigastric flap model. *Wound Repair Regen* 2003; 11:3–10.
154. Khiabani KT, Kerrigan CL. Presence and activity of nitric oxide synthase isoforms in ischemia–reperfusion-injured flaps. *Plast Reconstr Surg* 2002; 109:1638–1645.
155. Knox LK, Stewart AG, Hayward PG, Morrison WA. Nitric oxide synthase inhibitors improve skin flap survival in the rat. *Microsurgery* 1994;15:708–711
156. Bogdan C. Nitric oxide and the immune response. *Nat Immunol* 2001; 2: 907.
157. Galeano M, Altavilla D, Bitto A, Minutoli L ve ark. Recombinant human erythropoietin improves angiogenesis and wound healing in experimental burn wounds. *Crit Care Med* 2006; 34 (4): 1139-1146.
158. Santhanam A, Smith LA, Akiyama M, Rosales AG, Bailey KR, Katusic ZS. Role of endothelial NO synthase phosphorylation in cerebrovascular protective effect of recombinant erythropoietin during subarachnoid hemorrhage-induced cerebral vasospasm. *Stroke* 2005; 36: 2731.
159. Ziche M, Morbidelli L, Choudhuri R, Zhang HT. Nitric oxide synthase lies downstream from vascular endothelial growth factor-induced but not basic fibroblast growth factor-induced angiogenesis. *J Clin Invest* 1997 1;99(11):2625-34.
160. Ziche M, Morbidelli L, Masini E, Amerini S, Nitric oxide mediates angiogenesis in vivo and endothelial cell growth and migration in vitro promoted by substance P. *J Clin Invest* 1994;94(5):2036-44.
161. Ziche M, Morbidelli L. Nitric oxide and angiogenesis. *J Neurooncol* 2000; 50(1-2):139-48.

162. Parenti A, Morbidelli L, Cui XL, Douglas JG, et al. Nitric oxide is an upstream signal of vascular endothelial growth factor-induced extracellular signal-regulated kinase1/2 activation in postcapillary endothelium. *J Biol Chem* 1998 13;273(7):4220-6.
163. Buemi M, Vaccaro M, Sturiale A, et al. Recombinant human erythropoietin influences revascularization and healing in a rat model of random ischaemic flaps. *Acta Derm Venereol* 2002; 82:411-7.
164. Jaquet K, Krause K, Tawakol-Khodai M, et al. Erythropoietin and VEGF exhibit equal angiogenic potential. *Microvasc Res* 2002; 64:326-33.
165. Galeano M, Altavilla D, Cucinotta D, et al. Recombinant human erythropoietin stimulates angiogenesis and wound healing in the genetically diabetic mouse. *Diabetes* 2004; 53:2509-17.
166. Kanoh M, Takemura G, Misao J, et al. Significance of myocytes with positive DNA in situ nick end-labeling (TUNEL) in hearts with dilated cardiomyopathy not apoptosis but DNA repair. *Circulation* 1999; 99: 2757-2764.
167. Kültürsay H, Kayıkçıoğlu M. Apoptozis ve kardiyovasküler hastalıklar. *Anadolu Kardiyoloji Dergisi* 2002; 4: 323-329.
168. Mehmet H. Detection of mitochondrial events in apoptosis, Apoptozis, Hastalıklarla İlişkisi ve Güncel Belirleme Yöntemleri Kursu. Dokuz Eylül Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, İzmir. 2006
169. Vairetti M, Ferrigno A, Bertone R, Richelmi P, Berte F, Freitas I. Apoptosis vs. necrosis: glutathione-mediated cell death during rewarming of rat hepatocytes. *Biochimica et Biophysica Acta*, 2005; 1740: 367- 374.
170. Watanabe I, Toyoda M, Okuda J, et al. Detection of apoptotic cells in human colorectal cancer by two different in situ methods; antibody against single-stranded DNA and terminal deoxynucleotidyl transferase-mediated dUTP-biotin nick end-labeling (TUNEL) methods. *Jpn. J Cancer Res* 1999; 90: 188-193.
171. Paschos N, Lykissas MG, Beris AE. The Role of Erythropoietin as an Inhibitor of Tissue Ischemia. *Int J Biol Sci* 2008; 4 161-8

172. Steenbergen C, Perlman ME, London RE, Murphy E. Mechanism of preconditioning: Ionic alterations. *Circ Res* 1993; 72:112.
173. Bolli R, Dawn B, Xun YT. Emerging role of the JAK/STAT pathway as a mechanism of protection against ischemia-reperfusion injury. *J Mol Cell Cardiol* 2001; 33:1893–6.
174. Bolli R, Dawan B, Xuan YT. Role of the JAK/STAT pathway in protection against myocardial ischemia-reperfusion injury. *Trends Cardiovasc Med* 2003; 13:72–9.
175. Tong H, Imahashi K, Steenbergen C, Murphy E. Phosphorylation of glycogen synthase kinase-3 $\beta$  during preconditioning through a phosphatidylinositol-3-kinase-dependent pathway is cardioprotective. *Circ Res* 2002; 90:377–9.
176. Baker JE. EPO mimics ischemic preconditioning. *Vascul Pharmacol* 2005; 42:233–41.
177. Rafiee P, Shi Y, Su J, Pritchard KA, Jr Tweddell JS, Baker JE. Erythropoietin protects the infant heart against ischemia-reperfusion injury by triggering multiple signaling pathways. *Basic Res Cardiol* 2005;100:187–97.
178. Hanlon PR, Fu P, Wright GL, Steenbergen C, Arcasoy MO, Murphy E. Mechanisms of EPO-mediated cardioprotection during ischemia-reperfusion injury: Role of protein kinase C and phosphatidylinositol 3-kinase signaling. *Faseb J* 2005; 19:1323–5.
179. Downey JM, Davis AM, Cohen MV. Signalling pathways in ischemic preconditioning. *Heart Fail Rev* 2007; 12:181–8.
180. Gross ER, Gross GJ. Ischemic preconditioning and myocardial infarction: An update and perspective. *Drug Discovery Today: Disease Mechanisms* 2007; 4:159–63.
181. Nishihara M, Miura T, Miki T, et al. EPO affords additional cardioprotection to preconditioned hearts by enhanced phosphorylation of glycogen synthase kinase-3 $\beta$ . *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2006;291:748–55.
182. Garg K, Yadav HN, Singh M, Sharma PL. Mechanism of cardioprotective effect of erythropoietin-induced preconditioning in rat heart. *Sharma Indian J Pharmacol* 2010; 42(4): 219–223

## SİMGE VE KISALTMALAR DİZİNİ

<b>AIF</b>	: Apoptozis Inducing Factor
<b>ATP</b>	: Adenozin trifosfat
<b>bFGF</b>	: Basic fibroblast growth factor
<b>Ca<sup>+2</sup></b>	: Kalsiyum
<b>DNA</b>	: Deoksiribonükleik asit
<b>D</b>	: Dermis
<b>E</b>	: Epidermis
<b>eNOS</b>	: Endotelial nitrik oksit sentetaz
<b>EPO</b>	: Eritropoetin
<b>Epo-R</b>	: Eritropoetin reseptörleri
<b>ET</b>	: Endotelin
<b>GM-CSF</b>	: Granulocyte monocyte colony stimulating factor
<b>GSHPx</b>	: Glutasyon peroksidaz
<b>GSK-3<math>\beta</math></b>	: Glycogen synthase kinase-3 $\beta$
<b>GST</b>	: Glutasyon S-Transferaz
<b>H<sub>2</sub>O<sub>2</sub></b>	: Hidrojen peroksit
<b>Htc</b>	: Hematocrit, hematokrit
<b>I/R</b>	: Ischemia/reperfusion, iskemi/reperfüzyon
<b>IL</b>	: İnterleukin
<b>IP</b>	: Ischemic preconditioning
<b>JAK</b>	: Janus kinase
<b>KAT</b>	: Katalaz
<b>LOO</b>	: Lipid peroksi radikali
<b>MDA</b>	: Malondialdehyde, malondialdehit
<b>MPO</b>	: Myeloperoksidase, myeloperoksidaz
<b>NADPH</b>	: Nicotinamide adenine dinucleotide phosphate
<b>NO</b>	: Nitric oxide, nitrik oksit
<b>O<sub>2</sub></b>	: Oksijen
<b>OH</b>	: Hidroksil radikali
<b>PAF</b>	: Platelet-activating factor

<b>PI-3Kinase</b>	: Phosphatidylinositol-3-kinase
<b>PDGF</b>	: Platelet-derived growth factor Platelet-derived growth factor
<b>PKC</b>	: Protein kinaz C, protein kinase-C
<b>PMNL</b>	: Polimorf nüveli lökositler
<b>RhEpo</b>	: Recombinant human erythropoietin, rekombinant insan eritropoetini
<b>ROOH</b>	: Hidroperoksit
<b>SOD</b>	: Süperoksit dismutaz
<b>SOR</b>	: Serbest oksijen radikalleri
<b>STAT</b>	: Signal transducer and activator of transcription
<b>TGF-<math>\beta</math></b>	: Transforming growth factor- beta
<b>TNF</b>	: Tümör nekrozis faktör
<b>TxA2</b>	: Tromboksan A2

## ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekiller	Sayfa No
<b>Şekil 1.</b> (Hipoksik ortamda serbest radikal oluşumu ve iskemi/reperfüzyon hasarı)	10
<b>Şekil 2.</b> (Oksijen paradoksu: moleküler oksijenden serbest radikal oluşumu ve nitrik oksitle ilişkisi)	13
<b>Şekil 3.</b> (Süperoksit radikalının Hidrojen peroksit'e İndirgenmesi)	14
<b>Şekil 4.</b> (H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> 'nin KAT veya GSHPx tarafından toksik olmayan ürünlere dönüşümü)	14
<b>Şekil 5.</b> (Fenton reaksiyonu)	14
<b>Şekil 6.</b> (Apoptoza uğrayacak hedef hücrede görülen morfolojik değişiklikler)	24
<b>Şekil 7.</b> (Deney prosedürü)	32
<b>Şekil 8.</b> (Doku MDA ölçümlerinin istatistiksel grafikleri)	40
<b>Şekil 9.</b> (Doku NO ölçümlerinin istatistiksel grafikleri)	41
<b>Şekil 10.</b> (Doku inflamasyonu değerlendirme skorlarının istatistiksel grafikleri)	43
<b>Şekil 11.</b> (VGEF ile boyanan dokuların istatistiksel grafikleri )	46
<b>Şekil12.</b> (Aptotik hücre değerlendirmesinin istatistiksel grafikleri)	49
<b>Şekil 13.</b> (Grupların flep sağ kalım oranlarının ortalamaları grafiksel olarak gösterilmiştir.)	52
<b>Şekil 14.</b> (Flep sağ kalma oranlarının istatistiksel grafikleri)	53

## RESİMLER DİZİNİ

Resimler	Sayfa No
<b>Resim 1.</b> (Sıçan inguinal flebinin dizaynı)	28
<b>Resim 2.</b> (İnferior epigastrik damarın flebe dahil olduğunun görülmesi)	28
<b>Resim 3.</b> (Flebin epigastrik arter üzerinde ada flebi haline getirilmesi)	29
<b>Resim 4.</b> (Diseksiyon ile femoral arter, epigastrik dalı ve femoral sinir ortaya konması)	29
<b>Resim 5.</b> (Femoral arterin epigastrik dalının distalinden bağlanarak kesilmesi ve korunan femoral sinir)	30
<b>Resim 6.</b> (Femoral arter klemlenerek iskemi oluşturulması)	30
<b>Resim 7.</b> (Deneğin post op görüntüsü.)	31
<b>Resim 8.</b> (Dermiste inflamatuvar hücreler)	41
<b>Resim 9.</b> (VEGF antikoru ile işaretlenmiş kesitte dermiste pozitif hücre ve damarlar)	44
<b>Resim 10.</b> (Aktif kaspaz-3 ile işaretlenmiş kesitte dermiste pozitif hücreler)	47
<b>Resim 11.</b> (Fleplerin post op 10. Gün makroskopik görüntüleri)	50

## TABLolar DİZİNİ

Tablolar	Sayfa No
<b>Tablo 1.</b> (I/R hasarında antioksidan etkili olduğu çeşitli deneysel çalışmalarda gösterilmiş olan ajanlara örnekler.)	20
<b>Tablo 2.</b> (Uygulanan prosedüre göre grupların ayrılması )	32
<b>Tablo 3.</b> (Post-op 24 saat ve 10 günlük hematokrit ve beyaz küre değerleri)	36
<b>Tablo 4.</b> (Post-op 24 saat ve 10 günlük hematokrit ve beyaz küre ölçümlerinin ortalamaları ve standart sapmaları)	37
<b>Tablo 5.</b> (Doku MPO, MDA, NO değerleri)	38
<b>Tablo 6.</b> (Doku MPO ölçümlerinin ortalamaları ve standart sapmaları)	39
<b>Tablo 7.</b> (Doku MDA ölçümlerinin ortalamaları ve standart sapmaları)	39
<b>Tablo 8.</b> (Doku NO ölçümlerinin ortalamaları ve standart sapmaları)	40
<b>Tablo 9.</b> (Dokulardaki inflamatuvar hücrelerin skorlama sonuçları)	42
<b>Tablo 10.</b> (İnflamatuvar hücre sayımı sonuçlarının ortalamaları ve standart sapmaları)	43
<b>Tablo 11.</b> (VEGF antikoru ile yapılan işaretlerde dermiste bulunan pozitif hücre ve damar yapıları sayılar)	45
<b>Tablo 12.</b> (VGEF ile boyanan hücre sayımı sonuçlarının ortalamaları ve standart sapmaları)	46
<b>Tablo 13.</b> (Apoptotik hücre sayım sonuçları)	48
<b>Tablo 14.</b> (Aktif kaspaz-3 ile boyanan hücre sayımı sonuçlarının ortalamaları ve standart sapmaları)	49
<b>Tablo 15.</b> (Flep ölçüm değerleri)	51
<b>Tablo 16.</b> (Flep canlı kalma oranlarının ortalamaları ve standart sapmaları)	52