

T.C.
Süleyman Demirel Üniversitesi
Tıp Fakültesi
Kalp ve Damar Cerrahisi
Anabilim Dalı

**İLOPROST'UN
DENEYSEL AORTİK İSKEMİ-REPERFÜZYON MODELİNDE
FEMORAL ARTER ENDOTELİ VE GASTROKNEMİUS KASI
HASARI ÜZERİNE ETKİSİ**

Dr. İLKER TEKİN

UZMANLIK TEZİ

**DANIŞMAN
Prof. Dr. Ahmet ÖCAL**

2007-İSPARTA

İÇİNDEKİLER

ÖNSÖZ	4
SİMGELER KISALTMALAR	5
1.GİRİŞ	7
2.GENEL BİLGİLER	10
2.1.İskemi	10
2.1.1.Geri Dönüşümlü Zedelenme	11
2.1.2.Geri Dönüşümsüz Zedelenme	12
2.2.Reperfüzyon	15
2.3.İskemi Reperfüzyon Hasarı Mekanizmaları	19
2.3.1.Serbest Oksijen Radikalleri (SOR)	19
2.3.1.1.SOR Tanımı ve Oluşum Mekanizmaları	19
2.3.1.2.Lipid Peroksidasyonu	20
2.3.1.3.İskemi Reperfüzyon Hasarında SOR	20
2.3.2.Lökosit ve Endotel	21
2.3.2.1.İskemi Reperfüzyon Hasarında Lökosit Endotel Etkileşimi	21
2.3.2.2.Adezyon Molekülleri	24
2.3.2.2.İnflamasyonun Kimyasal Aracıları	29
2.3.3.Mikrodolaşım(“no reflow” fenomeni)	32
2.3.4.Plateletler	32
2.3.4.1.Reaktif Oksijen Türevleri (ROT) ve Platelet Fonksiyonu	32
2.3.4.2.Plateletler ve Mikrodolaşım	37
2.3.5.Nitrik Oksit	43
2.3.6.Mitokondri	44
2.3.7.Kompleman Sistemi	45
2.4.İskemi Reperfüzyon Sonrası Oluşan Vasküler Disfonksiyon	45
2.4.1.İskemi Reperfüzyona Lokal Mikrovasküler Yanıt	45
2.4.2.Nitrik Oksit-Süperoksit Denge Kaybı Teorisi	49
2.5.İskemi Reperfüzyon Sonrası Oluşan İskelet Kası Hasarı	50
2.5.1.Tarihçe	50
2.5.2.Ekstremite İskemi Reperfüzyonu’nun Patofizyolojisi	51
2.6.İskemi Reperfüzyona Bağlı Oluşan Uzak Organ Hasarı (MODS/SIRS)	53

2.7.İskemi Reperfüzyon Hasarında Terapötik Uygulamalar	55
2.7.1.Antioksidan Terapi	55
2.7.2.Lökosit Terapisi	56
2.7.3.İskemik Önkoşullanma	57
2.7.4.Antitrombotik ve Fibrinolitik Terapi	58
2.7.5.Nitrik Oksit Terapisi	59
2.7.6.Hipotermi ve İntraarteryel İnfüzyon	59
2.7.7.Kompleman Terapisi	60
2.8.İlaç – İLOPROST	61
2.8.1.Farmakodinamik Özellikler	61
2.8.2.Farmakokinetik Özellikler	68
2.8.3.Periferik Vasküler Hastalıkta İloprost Kullanımı	70
2.8.3.1.İloprost'un İskemi Reperfüzyon Hasarı'ndaki Klinik Kullanımı	72
2.8.4.Dozaj ve Uygulama Şekli	72
2.8.5.Tolerans	73
3.MATERYAL METOD	74
3.1.Aortik Oklüzyon ve İskemi Reperfüzyon Modeli	74
3.2.Biyokimyasal İşlemler	77
3.3.Femoral Arter ve Gastroknemius Kas Doku Örneklerinin Histopatolojik Olarak Değerlendirilmesi	78
3.4.İstatistiksel Analiz	80
4.BULGULAR	81
4.1.Biyokimyasal Bulgular	81
4.2.Histopatolojik Bulgular	84
5.TARTIŞMA	93
ÖZET	104
SUMMARY	106
KAYNAKLAR	108

ÖNSÖZ

6 yıl süren Kalp ve Damar Cerrahisi uzmanlık eğitimim sırasında, hedeflediğim noktalara ve ideallerime ulaşmak için çıktığım zorlu yolda, bu sürecin ilk gününden itibaren beni yalnız bırakmayan, bilgi, tecrübe ve deneyimleriyle bana destek olan; Prof.Dr. Erdoğan İBRİŞİM'e, Prof.Dr. Ahmet ÖCAL'a, Prof.Dr. Erkan KURALAY'a, Doç.Dr. Turhan YAVUZ'a, Doç.Dr. Hüseyin OKUTAN'a, Yrd.Doç.Dr. Oktay PEKER'e, Yrd.Doç.Dr. İlker KİRİŞ'e ve Yrd.Doç.Dr. Şenol GÜLMEN'e,

Tez çalışmamın hazırlık aşaması ve hayata geçirilmesi sürecinde ihtiyaç duyduğum her an yardımlarını esirgemeyen, yol gösteren, bilgisi ve deneyimini benimle paylaşan, desteğini her zaman yanımda hissettiğim saygıdeğer tez danışmanım Prof. Dr. Ahmet ÖCAL'a,

Tez çalışmamın hazırlanması, tamamlanması ve yazımı aşamalarında, gerek vermiş oldukları destek ve gerekse de değerli yardımlarından dolayı Yrd. Doç. Dr. İlker KİRİŞ'e, Uzm. Dr. Dolunay ODABAŞI'na,

Yaşamımın her anında sevgi ve desteklerini esirgemeyen anne, baba ve kardeşim'e

Bu çalışmanın beraberinde getirdiği zorlukları benimle birlikte paylaşan, her konuda desteğini esirgemeyen ve bugünü yaşamamda en büyük katkısı olan sevgili eşim Aslı ŞAHİN TEKİN'e,

Uzmanlık eğitimim süresince benimle birlikte çalışan, değerli Kalp ve Damar Cerrahisi araştırma görevlisi meslektaşlarıma ve Şevket Demirel Kalp Merkezi'ndeki tüm çalışma arkadaşlarıma sevgilerimi, saygılarımı ve teşekkürlerimi sunarım.

Dr. İlker TEKİN

SİMGELER VE KISALTMALAR

AA: Araşidonik asit
AİR: Aortik iskemi reperfüzyon
ATP: Adenozin trifosfat
Bcl-2: B-cell leukemia/lymphoma-2
bFGF: Basic fibroblast growth factor
BH-4: Tetrahidrobiopterin
β-TG: β-thromboglobulin
C5a: Compleman factor 5a
cAMP: Cyclic adenosine monophosphate
cGMP: Cyclic guanosine monophosphate
cNOS: Constitutive NOS
COX: Siklooksijenaz
CPK: Kreatinfosfokinaz
CTAP-III: Connective tissue activating protein-III
DAB: Diaminobenzidine
DNA: Deoksiribonükleik asit
ECAMs: Endothelial cell adhesion molecules
ECGF: Endothelial cell growth factor
EDRF: Endothelial derived relaxing factor
EGF: Epidemic growth factor
ELAM-1: Endothelial leukocyte adhesion molecule-1
ENA-78: Epithelial neutrophil activating protein-78
eNOS: Endothelial NOS
Fe⁺²: Ferröz demir
Fe⁺³: Ferrik demir
GlyCAM-1: Glycan bearing cell adhesion molecule-1
GPIIb-IIIa: Glycoprotein IIb-IIIa
GSH: Glutatyon (indirgenmiş)
GSSG: Glutatyon (oksitlenmiş)
HBP: Heparin binding protein
HE: Hematoksilen eosin
HIF-1: Hypoxia inducible factor-1
5-HPETE: 5-hydroperoxyeicosatetraenoic acid
HPLC: High Performance Liquid Chromatography
H₂O₂: Hidrojen peroksit
İ-R: İskemi-reperfüzyon
İκB: İnhibitory κB
İAA: İnfrarenal abdominal aorta
ICAM-1: İntercellular adhesion molecule-1
IGF-1: İnsülin like growth factor-1
IHC: İmmünohistokimyasal
IL: İnterleukin
iNOS: İnducible NOS
JAM: Junctional adhesion molecule
LFA: Leukocyte function associated antigen
LPA: Lysophosphatidic acid
LT: Leukotrien

MadCAM-1: Mucosal addressin cell adhesion molecule-1
MAP: Mitogen activating protein
MCP-1: Monocyte chemotactic protein-1
MDA: Malondialdehyde
MODS: Multiple organ dysfunction syndrome
MPO: Myeloperoksidase
NADPH: Nikotinamid adenin dinükleotid fosfat hidrojen
NAP-2: Neutrophil activating protein-2
NF- κ B: Nükleer faktör-kappaB
NK: Natural killer
nNOS: Neuronal NOS
NO: Nitrik Oksit
NOS: Nitrik Oksit Sentaz
O₂⁻: Süperoksit anyonu radikali
OH⁻: Hidroksil iyonu radikali
ONOO⁻: Peroksinitrit radikali
PAF: Platelet activating factor
PAS: per-ARNT-sim
PBP: Platelet basic protein
PBS: Fosfat buffer solüsyonu
PDGF: Platelet derived growth factor
PE-CAM-1: Platelet Endothelial cell adhesion molecule-1
PF-4: Platelet factor-4
PG: Prostoglandin
PMNL: Polimorfonükleer lökosit
PSGL-1: P selectin glycoprotein ligand-1
RNA: Ribonükleik asit
ROT: Reaktif oksijen türevleri
sP-1: Sphingosine-1-phosphate
SIRS: Systemic inflamatuvar response syndrome
SOR: Serbest oksijen radikalleri
TGF- β : Transforming growth factor- β
TNF- α : Tumor necrosis factor- α
TxA2: Thromboxane A2
uPAR: Urokinase-type plasminogen activator receptor
VCAM-1: Vascular cell adhesion molecule-1
VEGF: Vascular endothelial growth factor
VLA: Very late activating
vWF: von Willebrand factor
XD: Ksantin dehidrogenaz
XO: Ksantin oksidoredüktaz

1. GİRİŞ

İskemi, perfüzyon bozukluğuna bağlı olarak, dokunun oksijen ve diğer metabolitlere olan gereksiniminin dolaşım tarafından sağlanamaması ve bu sũreçte oluşan atık őrũnlerin yine dolaşım tarafından uzaklaştırılmaması olarak tanımlanır. Hipoksi ise dokuya yetersiz oksijen sunumu şeklinde tarif edilebilir. Her iki durum da iskemi reperfũzyon hasarının ilk kısmını oluşurmakta olup, metabolizmanın anaerobik yone kaymasıyla karakterizedir (1).

İskemiye bağlı hasarın şiddeti, hipoperfũzyonun sũresi ve miktarı ile orantılı olup, hũcrenin tipi, yaralanmaya karşı hassasiyeti, differansiyasyonu, kan ihtiyacı ve metabolizmasına gore farklılık gosterir. İskemiye bazı dokular (kemik ve deri) dirençliken bazıları (iskelet kası ve barsak mukozası) ise hassastır. Ancak uzun sũreli iskemi hũcrelerde şişme, asidoz, iyon dağılım değişiklikleri (hũcre içi kalsiyum/sodyum oranında artış), artmış hipoksantin seviyesi, adenozin trifosfat (ATP) / fosfokreatin ve glutasyon dũzeylerinde azalma, artmış adenozin sinyal aktivitesi, membran potansiyel değişiklikleri, iskelet bũtœnlũđũ kaybı, nũkleotid fosfohidrolizi (CD39 ve CD73 yoluyla) ve hypoxia inducible factor-1 (HIF-1) çekirdek translokasyonu / stabilizasyonu gibi hũcre metabolizması ve iskelet yapısını ilgilendiren birçok değişime neden olur (2,3). Mitokondriyal disfonksiyon ve hũcre zarı hasarının şiddeti, reperfũzyon sonrası iskemik doku hasarının geri dœnœœmli veya geri dœnœœmsüz olduğunu belirler (4). Dolayısıyla uzun sũreli iskemi reperfũzyonla şiddetlenen ciddi hũcre hasarına neden olarak hũcre œlœmũyle sonuçlanır (5,6).

Reperfũzyon hasarı ilk kez 1975 yılında Cerra tarafından tanımlanmıştır (7). İskemiye bağlı hasarın geri dœndœrœlebilmesinde doku reperfũzyonu mutlak olmakla birlikte paradoksik olarak, reperfũzyon sonrası sağlanan oksijen ve metabolitler doku hasarının artışına neden olur. Hũcre sel şişme, hũcre iskeleti değişiklikleri ve seçici mikrovaskœler geçirgenlik kaybı reperfũzyona bağlı hasarın karakteristik œzellikleridir. Bu mekanizmalar, doku œdemi ve kapiller kan akımında azalmaya neden olur (8).

İskemi reperfũzyon (İ-R) hasarı; birçok hastalık (serebrovaskœler olay, şok, travma) ve medikal / cerrahi girişim (trombolitik tedavi, koroner anjioplasti, transplantasyon, kardiyopulmoner bypass, anevrizma cerrahisi, periferik arter cerrahisi) içi ortak klinik tablodur. İ-R; artmış oksidan oluşumu, kompleman aktivasyonu, lœkosit-endotel-platelet adezyon ve etkileşimi, mikrovaskœler geçirgenlik artışı, endotel

bağımlı vazodilatasyon disfonksiyonu ve inflamatuvar molekül (sitokin, kemokin) artışı ile karakterizedir (1,9). İ-R hasarı sırasında lökosit, endotel, T lenfosit, monosit ve platelet aktivasyon ve hücreler arası etkileşimleri gerçekleşmekte olup, hasarın genişlemesinde lökosit-endotel ve lökosit-platelet etkileşimleri merkezi rol oynar (10).

Reperfüzyon sonrası iskemik doku lökosit göçü ve lökosit-endotel adezyonu; tumor necrosis factor- α (TNF- α), interleukin (IL)-1 β , platelet activating factor (PAF), kompleman sistem ve serbest oksijen radikalleri (SOR) aracılığıyla gerçekleşir. Aktive olmuş lökositlerin endotele yapışıp interstisyel alana geçişleri; lökosit yuvarlanma, adezyon ve diapedezi süreçlerini içerir ve düzenli bir şekilde gerçekleşir. Lökosit yuvarlanması selektin ailesi (lökosit; L selektin, endotel;P/E selektin) aracılığıyla gerçekleşir. Bunu; endotel, platelet ve lökositlerden sentezlenen kemokin ve kemoatraktanların[leukotriene (LT) B4, kompleman faktör5a (C5a), PAF] lökositlerle etkileşimi ve lökosit yüzey β_2 integrin (CD11b/CD18) ifadesi izler. Aynı zamanda makrofaj kaynaklı TNF- α ve IL-1'in endotel hücresi ile etkileşimi, endotel yüzeyi vascular cell adhesion molecule-1 (VCAM-1) ve intercellular adhesion molecule-1 (ICAM-1) ifadesini arttırır. Lökosit yüzey β_2 integrin ve endotel yüzey VCAM-1 / ICAM-1 etkileşimi güçlü adezyonla sonuçlanır. Bunu platelet endothelial cell adhesion molecule-1 (PECAM-1) aracılı lökosit interstisyel göçü izler (6). Reperfüzyon sonrası iskemik dokuya olan sürekli lökosit göçü, İ-R'a bağlı doku hasarının devamını ve genişlemesini sağlar. Lökositler, proteolitik enzim (elastaz) ve serbest oksijen radikalleri sentezi ve kapiller seviyede mikrodolaşım tıkanıklığı ile hasara katkıda bulunurlar (1,10,11). Reperfüzyon sonrası iskemik dokuda biriken ilk hücreler plateletler olup endotel aktivasyonu ve lökosit birikimine katkıda bulunurlar. Nitrik oksit (NO), prostasiklin, adenosin ve reaktif oksijen türevleri (ROT) platelet aktivasyonu ve platelet aracılı hasarı kontrol eder (10,12).

Alt ekstremitte İ-R hasarında lokal ve sistemik etkiler gözlenir. Lokal etkiler iskelet kası ve damar endotelinde gözlenirken, sistemik etkiler başlıca akciğer, kalp, beyin ve böbrekler olmak üzere tüm organlarda gözlenebilir (13).

İskelet kası, hem en büyük kütle olması hemde iskemik hasara en hassas doku olması nedeniyle alt ekstremitte İ-R'nda önemli rol oynar. Alt ekstremitte İ-R'unda mikrovasküler disfonksiyon ve kas değişiklikleri birbirleriyle paralel seyretmekte olup, prognoz kas hasarı miktarına bağlıdır. Reperfüzyonla oluşmuş inflamatuvar yanıt, geri dönüşümlü zedelenme miktarı ile doğru, nekrotik kas miktarı ile ters orantılıdır.

Fasyatomi, antitrombotik ve anti-inflamatuar tedaviyle geri dönüşümlü zedelenmiş bölgedeki mikrovasküler disfonksiyon hedeflenir (13).

İ-R'a bağlı mikrovasküler disfonksiyonda; endotel hücre değişikliklerine ikincil gelişmiş, endotel bariyer disfonksiyonu, vasküler tonus değişikliği ve artmış sitokin / adezyon molekül ifadesi görülür. Özellikle reperfüzyon periyoduyla birlikte; NO biyoyararlanımdaki azalmaya bağlı arteriolar vazodilatasyon bozukluğu, inflamatuvar ve adezyon molekülleri artışına bağlı arteriyel kılcallarda kapanma ("no reflow") ve lökosit birikimine (artmış oksidatif hasar) bağlı venöz kapillerlerde geçirgenlik artışı ve doku ödemi görülür (2).

Reperfüzyonla birlikte sistemik dolaşıma çıkan inflamatuvar araçlar, uzak organ endotel hücre aktivasyonu ve mikrovasküler disfonksiyona neden olurlar. İ-R'a bağlı uzak organ hasarında, ksantin oksidaz, lökosit-endotel etkileşimi ve inflamatuvar araçlar önemli rol oynar. Yaygın uzak organ hasarı durumunda yüksek mortalite ile seyreden multiple organ dysfunction syndrome (MODS) veya systemic inflamatuvar response syndrome (SIRS) gelişebilir (5).

İloprost, primer olarak endotel hücresi tarafından araşidonik asitten sentezlenen epoprostenol [prostaglandin (PG) I₂, prostasiklin]'un sentetik karboksilin analogudur. İloprost; vazodilatör, antiplatelet ve sitoprotektif etkileri dışında fibrinolitik aktivite ve kırmızı küre elastikiyetinde artış, damar düz kas proliferasyonu, lökosit-endotel adezyon molekülleri yüzey ifadesi ve sitokin (TNF- α , IL-1, IL-6) oluşumunda azalma oluşturarak mikrodolaşım fonksiyonunda koruma sağlar (14,15).

İloprost'un İ-R'a bağlı oluşmuş lokal ve uzak organ hasarındaki koruyucu etkinliği klinik ve deneysel olarak gösterilmiş olup, alt ekstremitte İ-R hasarında damar endoteli ve iskelet kası hasarı üzerine etkileri henüz yeterince araştırılmamıştır. Bu çalışmanın amacı, infrarenal abdominal aorta oklüzyon-reperfüzyonu sonrası, femoral arter ve gastroknemius kasında oluşan İ-R hasarına iloprost'un etkisini araştırmaktır. Bu nedenle, rat infrarenal abdominal aortasında oklüzyon-reperfüzyon sonrası, rat kan örneklerinde malondialdehid (MDA), kreatinfosfokinaz (CPK), P selektin, ICAM-1 ve VCAM-1 plazma düzeyleri ölçüldü. Ayrıca ışık mikroskobu ile femoral arter ve gastroknemius kas doku örneklerinin HE ve immunohistokimyasal [P selektin, L selektin, TNF- α , CD11b, CD18, ICAM-1, siklooksijenaz (COX)-2] histopatolojik değerlendirilmesi yapıldı.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. İskemi

İskemi, dokunun oksijen ve diğer metabolitlere olan gereksiniminin perfüzyon bozukluğuna bağlı dolaşım tarafından sağlanamaması ve bu süreçte oluşan atık ürünlerin yine dolaşım tarafından uzaklaştırılamaması olarak tanımlanır. Hipoksi ise dokuya yetersiz oksijen sunumu şeklinde tarif edilebilir. Hipoksinin en sık görülen nedeni iskemidir. Her iki durum da İ-R hasarının ilk kısmını oluşturmakta ve metabolizmanın anaerobik yöne kaymasıyla karakterizedir (1). Ancak iskemide, hem metabolit yetersizliği hem de atık ürün birikimi nedeniyle, glikoliz metabolizması hipoksiye oranla daha erken sonlanır ve hasar çok daha erken oluşur (3).

Oksijen hemostazı insan fizyolojisinde hayati önem taşır. Oksidatif fosforilasyon sırasında ATP sentezi için kullanılan oksijen aynı zamanda hücrel lipid, nükleik asit ve proteinlerdeki oksidatif hasar mekanizmalarında da rol oynar. Dolayısıyla, protein sentezi ve aktivitesini kontrol eden kısa ve uzun dönem mekanizmalarla hücrel ve sistemik oksijen konsantrasyonlarının dengelenmesi oksijen biyoyararlanımı açısından önemlidir (16).

İskemi, akut (akut myokard infarktüsü) veya kronik (periferik arter hastalığı) olabilir. Soğuk iskemi ile vücut dışında oluşan doku iskemisi (donör organ) kastedilir. Sıcak iskemi ise vücut içindeki doku iskemisidir. Dokuların sıcak ve soğuk iskemiye olan yanıtları farklı olup, sıcak iskemide en çok hepatositler, soğuk iskemide ise en çok endotel ve kupffer hücreler etkilenir (11). İskemiye bağlı hasarın şiddeti, hipoperfüzyonun süresi ve miktarı ile orantılı olup, hücrenin tipi, yaralanmaya karşı hassasiyeti, differansiyasyonu, kan ihtiyacı ve metabolizmasına göre farklılık gösterir (3). Sonuç olarak, hücrel enerji depolarındaki azalma ve toksik metabolit birikimi hücre ölümüne yol açar (5,6).

Hipoksik dokunun çeşitli moleküler mekanizmalarla yetersiz oksijenasyona fizyolojik reaksiyonlar oluşturabilmesi, vascular endothelial growth factor(VEGF) sentezini kontrol edebilmesiyle oluşur. VEGF, anjiogeneze önemli rol oynar. Hipokside, yeterli doku perfüzyonu sağlanabilmesi için, hem VEGF sentezi (transkripsiyonel mekanizma) artar hem de VEGF yıkımı (mRNA stabilizasyonu) azalarak doku VEGF mRNA düzeyi artar. Hipoksik doku hasarında diğer tüm protein sentezleri azalırken, VEGF mRNA translokasyonu devam etmektedir (17).VEGF

mRNA transkripsiyonu, HIF-1'in insan VEGF geni 5^I-transkripsiyonel bölümüyle etkileşime girmesi sonucu aktive olur (18). HIF-1, basit bir heliks-halka-heliks per-ARNT-sim (PAS) protein olup, HIF-1 α ve HIF-1 β alt ünitelerinden oluşur. Hipoksi durumunda, HIF-1 protein seviyesi hızlı şekilde artarken, doku iskemisi ortadan kaldırıldığında, hücreler tarafından sentezi baskılanır. Dolayısıyla hipokside, hücre çekirdeği HIF-1 α proteini birikerek HIF-1 β protein ile dimerleşir ve çekirdek deoksiribonükleik asit (DNA) 5^ICGTG-3^I sırasına bağlanarak VEGF transkripsiyonunu aktive eder (19).

Sonuç olarak, uzun süreli doku iskemisinde; hücrel şişme, asidoz, iyon dağılım değişiklikleri (hücre içi kalsiyum/sodyum oranında artış), hipoksantin seviyesi artışı, adenozin trifosfat (ATP) / fosfokreatin ve glutation düzeyi azalması, adenozin sinyal aktivitesi artışı, membran potansiyel değişiklikleri, iskelet bütünlüğü kaybı, nükleotid fosfohidrolizi (CD39 ve CD73 yoluyla) ve hypoxia inducible factor-1 (HIF-1) çekirdek translokasyonu ile stabilizasyonu gibi hücre metabolizması ve iskelet yapısını ilgilendiren birçok değişim meydana gelir (2,3).

2.1.1. Geri Dönüşümlü Zedelenme:

Hipoksi, öncelikle mitokondrilerdeki oksidatif fosforilasyonu etkileyerek, ATP ve fosfokreatin depolarında azalmaya neden olur. Mevcut ATP sırasıyla adenzindifosfat, adenzinmonofosfat, inozin ve hipoksantin'e yıkılır. Oluşan ve biriken bu metabolitler fosfofruktokinaz enzimini uyararak hücrel metabolizmanın anaerobik yöne kaymasına neden olur. Bu metabolik değişim, daha fazla glikojen kullanımı ancak daha az ATP üretimi (aerobik solunumla elde edilen miktarın yaklaşık %7'si) ile sonuçlanır (20). Dolayısıyla doku glikojen depoları hızla tükenir. İskeminin devam etmesi, hipoksantin ve anaerobik glikoliz ürünlerinin (laktik asit, hidrojen iyonu, inorganik fosfatlar) hücre içinde birikimi, asidozda artış ve dolayısıyla enzim ve protein hasarıyla sonuçlanır (21).

ATP depolarındaki azalma, ATP bağımlı hücre zarı pompalarında fonksiyon bozukluğuna neden olarak, hücre dışı potasyum kaybı ve hücre içi ani sodyum-kalsiyum-klorür artışına ikincil hücrel şişmeyle sonuçlanır. Bu hidropik değişiklik, inorganik fosfatlar, laktik asit ve pürin nükleotidleri gibi metabolitlerin birikimi sonucu artan osmotik yükü daha da belirginleşir (22). Hücrel şişme, makroskopik olarak

organ renginde solma ve ağırlığında artışla, mikroskopik olarak ise sitoplazmada berrak vakuoller oluşumuyla (hidropik değişiklik/vakuoler dejenerasyon) kendini gösterir (3).

Sonrasında, ribozomların granüllü endoplazmik retikulumdan ayrılması ve polizomlardan monozomların oluşumu ile protein sentezinde azalma oluşur. Hipoksi düzelmez ise mitokondri fonksiyonunda kötüleşme ve membran geçirgenliğinde artışa bağlı hücresel şişme ve fosfolipidden zengin dansiteler ile karakterize morfolojik bozulma görülür. Hücresel iskelet; mikrovillus gibi yapısal özelliklerin kaybı, hücreler arasındaki bağların gevşemesi ve hücre yüzeyinde kabarcıkların oluşumu ile bozulur. Hücre çekirdeği granüler ve fibriller elemanlarında dağılma meydana gelir. Osmotik regülasyon kaybı sonucunda mitokondri, endoplazmik retikulum ve hemen hemen tüm hücre organellerinde hidropik değişiklikler oluşur (3).

Doku iskemisi sırasında başka birçok mekanizma daha aktive olur. Nükleer faktör-kappaB (NF- κ B) aktivasyonu, iltihabi aracılardan ve adezyon moleküllerinin (özellikle ICAM-1 ve E-selektin) sentezinde artış olur. Adezyon moleküllerindeki bu artış, iltihabi-iskemik alan lökosit adezyonunu artırır. Endotel tarafından sentezlenen NO inaktivasyonu vazokonstriksiyona neden olur. Araşidonik asit kaskadında dengenin prostasiklin aleyhine dönmesi ise hem vazokonstriksiyon hem de platelet aktivasyonu ile sonuçlanır. Oksijen NO sentezi için de gerekli olup, iskemik dokuda NO seviyesinde azalma görülür. Bunlara ek olarak kompleman sistem aktivasyonu ve PAF sentez artışı gerçekleşir. Dolayısıyla iskemi, dokuyu reperfüzyon hasarına karşı daha hassas bir duruma getirir. Eğer doku perfüzyonu düzelirse tüm bu değişimler geri dönüşümlü olup iskeminin devamı durumunda geri dönüşümsüz zedelenme ile sonuçlanır (23).

2.1.2. Geri Dönüşümsüz Zedelenme:

Kritik iskemi zamanı, doku canlılığının sürdürebildiği maksimum iskemi süresi olarak tarif edilir. Ortalama kritik iskemi süresi ise %50 doku kaybına neden olan iskemik zaman dönemidir. Hücrenin metabolik aktivitesi ve adaptasyon mekanizmalarına göre kritik iskemi süresi farklılık göstermekle birlikte uzun süreli iskemide geri dönüşümsüz hasar ve nekroz kaçınılmazdır (1,2). Hipoksi sonucunda gelişen mitokondri fonksiyon bozukluğu (oksidatif fosforilasyon yetersizliğine bağlı ATP depolarında azalma) ve hücre zarı hasarının doku oksijenasyonunun yeniden sağlanmasına rağmen düzeltilememesi geri dönüşümsüz hasarın en önemli göstergesidir (4,24).

Bu dönemde mitokondriyal vakuolizasyon artışı ve matriks içi kalsiyumdan zengin yoğunluk birikimi oluşur. Hücre zarının tümünde gerçekleşen hasar; hücre organelleri ve hücrede şişme, protein, esansiyel koenzim ve ribonükleik asit kaybı, ATP sentezinde kullanılan metabolitlerin depolanamamasına bağlı yüksek enerjili fosfat depolarında azalma ve interstisyel alandaki makromoleküllerin hücre içine geçişiyle sonuçlanır. Lizozomal membran hasarı enzimlerin sitoplazma içine sızmasına yol açar. Asit hidrolazlar, düşük sitoplazmik pH'da, tüm hücresel elemanların enzimatik yıkımına neden olurlar. Lizozomol sindirim, hücre ölümü sonrası, interstisyel alanda dahi devam eder. Sonrasında ölü hücreler fosfolipid kitleler şekline dönerek “myelin şekiller” olarak tanımlanırlar. Bu fosfolipid kitleler yağ asitlerine parçalanır veya fagositoza uğrayarak ortadan uzaklaştırılır. Oluşmuş yağ asitlerinin kalsifikasyonu ise kalsiyum sabunlarının oluşumuyla sonuçlanır (3).

Hücrelere has proteinlerin hücre zarı hasarı veya hücre ölümüyle sistemik dolaşıma geçmesi ve bunların kan serum örneklerinde gösterilmesi spesifik doku hasarı tespitinde önemlidir. Örneğin, myokard infarktüsü tanı ve takibinde myokard dokusuna özgü kreatin kinaz ve troponin izoformu ölçümleri önemlidir (3).

Geri Dönüşümsüz Zedelenme Mekanizmaları:

i)Membran fosfolipid kaybı: Hücre zarı membran fosfolipidleri, hem yıkım artışı (artmış hücre içi kalsiyum ile aktive olmuş fosfolipazlar) hem de sentez azalması (ATP bağımlı reaçilasyon ve sentez azalması) sonucunda azalır.

ii)Hücre iskelet anormallikleri: Hücre zarının iskeletten ayrılıp yırtılması, artmış hücre içi kalsiyum ile aktifleşen proteazlar ve hücre şişmesi sonucu oluşur.

iii)Toksik oksijen radikalleri

iv)Lipid yıkım ürünleri

Bu zedelenme mekanizmalarıyla 4 ana sistem olan hücre zarı bütünlüğü, oksidatif fosforilasyon, protein sentezi ve hücrenin genetik aparatı etkilenir.

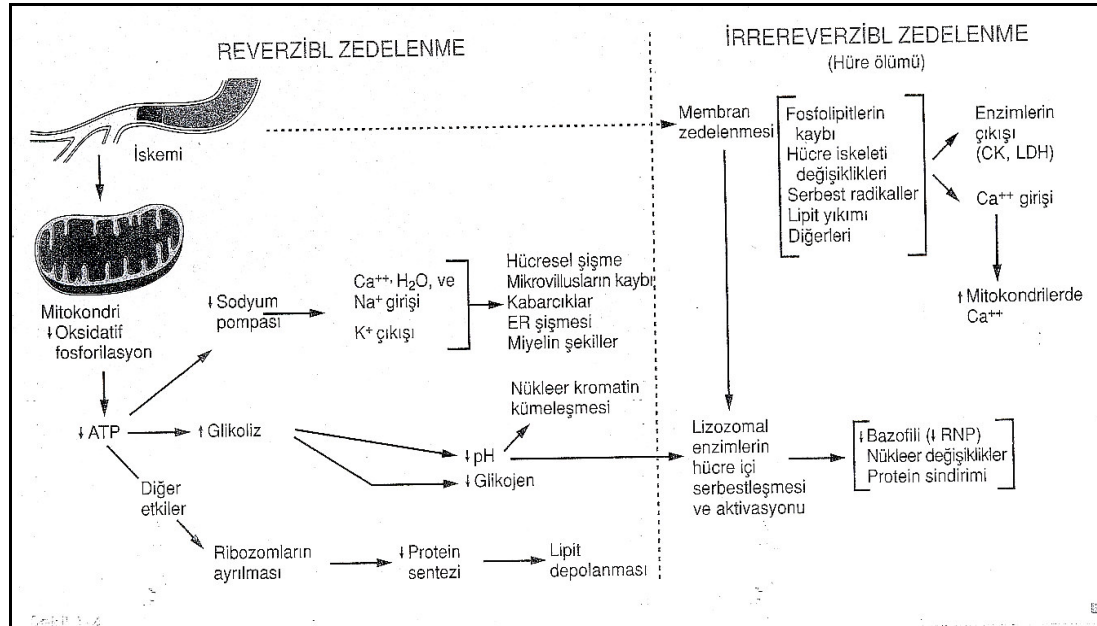
Geri dönüşümsüz hücre zedelenmesinin en önemli unsuru artmış hücre zarı geçirgenliği olup hacim regülasyon bozukluğu, hücre içi ve dışına makromoleküllerin artmış hareketi ve hücre zarı yapısal bozukluğuna neden olur (25). Fosfolipid yıkım ürünleri membran üzerinde deterjan etkisi yaparlar. Bozulmuş oksidatif fosforilasyon ve azalmış hücre içi ATP depolarına bağlı gelişen membran iyon pompa disfonksiyonu hücre içi kalsiyum miktarında ani yükselişe neden olur. Bu yükselişe organellerden salınan kalsiyum da katkıda bulunur. Artmış hücre içi kalsiyum birçok enzimatik

sistemde [fosfolipazlar(membran hasarı), proteazlar(membran ve hücre iskeleti hasarı), ATPazlar(ATP yıkımı) ve endonükleazlar(kromatin yıkımı)] aktivasyon oluşturur (26).

Hüresel fonksiyonlar hücre ölümünden önce kaybolur. Hasarın morfolojik görünümü, kritik biyokimyasal sistemlerde bozukluklar oluşup geri dönüşümsüz hasar oturduktan çok sonra belirgin hale gelir. Hücre şişmesi dakikalar içinde görülebilen geri dönüşümlü bir hasardır. Geri dönüşümsüz hasar 20-60 dakika içinde ışık mikroskopunda görülebilirken, hücre ölümü ancak 10-12 saatte belirgin hale gelir (3).

Özet olarak geri dönüşümsüz zedelenme;

- i)Hücre zarı hasarı sonucu protein, enzim, koenzim, ribonükleik asit ve yüksek enerjili fosfat kaybı,
- ii)Mitokondri matriksinde amorf, düzensiz kalsiyum yoğunluklarının birikimi,
- iii)Lizozomal zarlarda hasar ve lizozomal enzimlerin sitoplazmaya çıkması sonucu organellerin sindirilmesi,
- iv)Ölü hücrelerin fagositozu veya yağ asitlerine dönüşümü,
- v)Yağ asitlerinin kalsifikasyonu ve kalsiyum sabunu oluşumu (27) (Şekil 1) ile karakterizedir.



Şekil 1: İskemik zedelenmede olayların varsayılan dizisi. (ER; endoplazmik retikulum, CK; Kreatin kinaz, LDH;laktik dehidrogenaz, RNP; ribonükleoprotein (3).

2.2.Reperfüzyon :

İlk kez 1975 yılında Cerra ve arkadaşları tarafından tanımlanmıştır (7).

İskemiye bağlı hasarın geri döndürülebilmesinde doku reperfüzyonu mutlak olmakla birlikte paradoksik olarak, reperfüzyon sonrası sağlanan oksijen ve metabolitler doku hasarının artmasına neden olur. Birçok çalışmada, İ-R hasarının iskemik hasara göre çok daha fazla toksik ürün oluşturduğu gözlenmiştir (28). Reperfüzyon sırasında oluşan reaktif oksijen türevlerinin endotel üzerindeki hasarlayıcı etkisi, endotel kaynaklı endotelin sentezinde artış ve NO sentezinde azalma gibi faktörler ciddi endotel disfonksiyonuna neden olur (29).

İskemik dönemde oluşan oksidatif fosforilasyon hasarı, hem ATP depolarında hızlı tükenme ve hipoksantin artışına, hem de azalmış ATP'ye bağlı hücre içi kalsiyumda hızlı artışa neden olur. Dolayısıyla, hücre içi kalsiyumun artış hızı ve miktarı, hasarı etkileyen en önemli ve erken mekanizma olup, hücre nekroz ve apoptozuyla direkt ilgilidir (30,31). Artmış mitokondriyal kalsiyum, oksijenin suya olan dördüncü seviyeden redüksiyonunu engelleyerek birinci derece redüksiyon ve radikal oluşumuna neden olur (32). Ek olarak, iskemik dokuda ATP'yi daha fazla azaltıp hasarı derinleştirir (33). Kalsiyum hücre içi birikimi reperfüzyon süresince artarak devam eder. Dolayısıyla doku iskemisi sonucu gelişen hücre içi kalsiyum artışı ve ATP azalması birbirlerini indükleyerek kısır bir döngüye neden olur. Hücre içi kalsiyum birikiminin engellenmesi bu kısır döngüyü kırarak kalsiyuma bağlı oluşan hasarları azaltır (8).

Artmış hücre içi kalsiyum, bir proteaz enzim olan kalpain aktivasyonunu ve dolayısıyla ksantin dehidrogenaz (XD) enziminin ksantin oksido-redüktaz (XO) enzim formuna dönüşümünü sağlar. Sağlıklı kişide her iki enzim formu da aktif halde bulunur ancak XD hakimiyeti (9/1) mevcut olup hipoksantin'i sırasıyla ksantin ve ürik asite çevirir. XD bu fonksiyonu sırasında elektron taşıyıcı bir molekül olan nikotinamide adenin dinükleotid kullanır ve oksijene ihtiyaç duymaz. Doku iskemisi sırasında ise, enzimin XO formu baskın hale gelir ancak XO aktivitesi oksijen gerektirdiği için iskemik dokuda XO birikimi olur. Dolayısıyla, iskemik dönemde, hipoksiye bağlı, hipoksantin ve XO birikimi söz konusudur. Reperfüzyon döneminde ise, oksijen sunumuyla birlikte XO aktivasyonu ve hipoksantinden toksik oksijen radikalleri oluşur. XO enzim seviyesi ve aktivitesi, türden türe ve dokudan dokuya farklılık gösterir. Endotel ve gastrointestinal sistem mukoza villus yapısı, vücutta diğer dokulara oranla daha fazla XO enzim aktivitesine sahip olup, İ-R hasarına en hassas dokulardır (34).

Reperfüzyon hasarında, reaktif oksijen türevlerinin ilk oluştuğu bölge endotel-kan sınırır ve XO'a bağlı endotel hasarı İ-R hasarının en önemli faktörlerindendir (35).

Doku oksijenasyonu yeniden sağlandığında, oksijen, XO ve hipoksantin'in birbirleriyle olan etkileşimi, ürik asit, süperoksit ($O_2^{\cdot-}$) ve H_2O oluşumuyla sonuçlanır. Dolayısıyla, reperfüzyonun ilk 10-30 saniyesinde, reaktif oksijen radikali patlaması yaşanır (36). Oluşan süperoksit, çok zararlı bir molekül olmayıp, hidrojen peroksit (H_2O_2) için kaynak oluşturur. Süperoksit'in hidrojen peroksit'e dönüşümü SOD enzimi aracılığıyla gerçekleşir. Katalaz enzimi ise oluşan hidrojen peroksiti, su ve oksijene çevirir. Hidrojen peroksit'in geçiş metalleriyle (en sıklıkla serbest demir) reaksiyona girmesi sonucunda hidroksil (OH^{\cdot}) radikali oluşur. Hidrojen peroksitte süperoksit gibi çok zararlı bir molekül olmayıp, en önemli fonksiyonu hidroksil radikali için bir kaynak olmasıdır. Dolayısıyla, süperoksit ve hidrojen peroksit radikallerine bağlı lipid peroksidasyonu ancak bu moleküllerin serbest demir ile reaksiyona girip hidroksil radikali oluşturmalarıyla belirgin hale gelir. Hidroksil radikali güçlü bir oksidan molekül olup, SOD ve katalaz enzimleri bu molekülün temizlenmesinde doğal savunma mekanizmalarını oluştururlar. Buna ek olarak, sağlıklı kişilerde demir; kanda hemoglobin, kasta myoglobin, dolaşımda transferrin ve hücrelerde ferritin şekillerinde depolanarak serbest şekilde bulunmaz. Doku iskemisi sonucu oluşan hücrel asidoz, artmış redüktan madde seviyesi ve SOD aktivitesi, ferritine bağlı hücrel demirin serbestlenmesine neden olur. Aynı zamanda artmış hemoliz ve hidrojen peroksit aktivitesi de hemoglobine bağlı demiri açığa çıkartır (11).

1934 yılında, süperoksit ve hidrojen peroksit etkileşimi sonrası hidroksil radikali oluşumu tanımlanmıştır. Haber-Weiss reaksiyonu olarak adlandırılan sistem ($O_2^{\cdot-} + H_2O_2 \rightarrow OH^{\cdot} + O_2 + OH^-$) bir metal katalizör olmaksızın fonksiyon görmez. Bu nedenle demirle katalize edilmiş Haber-Weiss reaksiyonu (Fenton reaksiyonu) tanımlanmıştır ($Fe^{+2} + H_2O_2 \rightarrow OH^{\cdot} + OH^- + Fe^{+3}$) (39). Demir vücutta en çok Fe^{+3} (ferrik demir) formda bulunur ancak hidroksil radikal oluşumu için Fe^{+2} (ferröz demir) formu gerekir. Ferrik formun ferröz forma dönüşümünde XO, süperoksit radikali ve NO rol oynar. Dolayısıyla, süperoksit toksisitesinde bağlı demiri serbestleyebilmesi ve ferrik formu ferröz forma çevirebilmesi önemli rol oynar (40).

SOR'un diğer kaynakları; aktive olmuş polimorfonükleer lökosit (PMNL), mitokondri Nikotinamidadeninükleotidfosfat (NADPH) dehidrogenaz sistemi, katekolaminlerin otooksidasyonu ve araşidonik asit metabolizmasıdır. Hidroksil

radikali, vücutta hemen hemen tüm moleküllerle reaksiyona girebilen, bilinen en güçlü ve zararlı oksitleyici ajanlardan biridir. Bu serbest radikaller, özellikle de hidroksil radikali, hücre zarı lipid peroksidasyonunu başlatıp, araşidonik asit ve lipidperoksil serbest radikallerin salınımına neden olur. Araşidonik asit, siklooksijenaz [Thromboxane A2 (TxA2), PGE1, PGI2)] veya lipooksijenaz (LT-B4, LT-C4, LT-D4, LT-E4) enzimleriyle metabolize olup eikosanoidlere dönüşürken, lipidperoksil radikali; lipid peroksidasyonuna devam eder (3).

Bu olaylar sonucunda, hücre zarı seçici geçirgenlik kaybı, DNA hasarı, yapısal proteinlerin yıkımı, hücre zarı etkileşimli enzimlerin inaktivasyonu ve sitoliz görülür. Hidroksil radikali başka bir radikal ile birleşip inaktive oluncaya veya tükeninceye dek bu zincirleme reaksiyon devam eder. Deneysel olarak; SOR'u uzaklaştıran sistemler (SOD, desferoxamine, dimethylthiourea), lipidperoksidasyon inhibitörleri (21-aminosteroidler) ve TxA2 / LT-B4 reseptör antogonistlerinin, reperfüzyon hasarına etkileri çeşitli modellerde çalışılmıştır (11).

ROT'un, lipid peroksidasyonuna bağlı oluşturduğu hasarlar; artmış hücre zarı geçirgenliği, endoplazmik retikulum hasarına bağlı negatif inotropi, bozulmuş hücre fonksiyon ve hücre ölümüdür. Kalp ve akciğerler, vücudun herhangi bir bölgesindeki iskemik alan reperfüzyonunda, toksik oksijen radikalleri ile ilk karşılaşan ve etkilenen organlardır (41,42). Yüksek konsantrasyonda doymamış yağ asidi içermesi, düşük demir bağlama kapasitesi, yüksek demir ihtivasi, düşük antioksidan kapasitesi ve rejenerasyon yeteneği olmaması, santral sinir sistemini ROT hasarına en hassas organ haline getirir (43).

Endotel hücresi, hem NO hemde endotelin sentezler. Arteryel yatakta NO (vazodilatasyon) ve endotelin (vazokonstriksiyon) zıt etkide bulunurlarken, venöz yatakta her ikisi de vazokonstriksiyon sağlar (44). İskemik dönemde, bilinen en potent vazokonstriktör ajan olan endotelin sentezi artar (45). NO, nitrik oksit sentaz (NOS) yoluyla sentezlenir ve bu enzimin birçok izoformu [inducible NOS (iNOS), endothelial NOS (eNOS), neuronal NOS (nNOS)] vardır. NO sentezinde arjinin ve moleküler oksijen gerekir. İçinde bulunduğu şartlara bağlı olarak hem toksik hem de yararlı olabilmektedir. Sağlıklı kişilerde düşük doz NO ile cyclic guanosine monophosphate (cGMP) aracılı vazodilatasyon, platelet agregasyon ve lökosit adezyonunda azalma, ROT nötralizasyonu ve apoptozda azalma görülür. Ancak artmış iNOS aktivitesine bağlı oluşan yüksek NO konsantrasyonlarında, medikal tedaviye cevap vermeyen ve şiddetli

vazodilatasyon ile karakterize sitotoksitate yapar (46). Aynı zamanda, süperoksit ile etkileşime girerek, protein, lipid ve DNA gibi yapılarda toksik reaksiyonlar oluşturabilen peroxynitrit (ONOO⁻) oluşumunu sağlar (47). Hipoksi sırasında iNOS aktivitesi artmakla birlikte, NO sentezinde oksijen de gerekli olduğundan, NO seviyesi artmaz. Reperfüzyon döneminde, oksijen sunumuyla birlikte, NO seviyesinde ani artış yaşanır (46). Bu dönemde, artmış süperoksit ve NO etkileşimi, NO seviyesinde azalmaya neden olur. Endotel hücre NO biyoyararlanımının artırılmasının, İ-R'a bağlı hemodinamik problemler ve karaciğer hasarını azalttığı gösterilmiştir (48). NO'in İ-R'daki koruyucu etkisi, endotel ve makrofajlarda sentezlenen endotelin'in etkisini degeleyebilmesine bağlı olabilir (49). Artmış NO biyoyararlanımı, aynı zamanda iltihabi sistemlerin (adezyon molekülleri, sitokinler) aktivasyonunu da azaltır (50,51). iNOS aktivitesinin engellenmesi ile de İ-R'a bağlı hasar azaltılabilmektedir (52). NO'in, karaciğer transplantasyonunda akut doku reddinin bir aracısı olduğu tespit edilmiştir. Dolayısıyla, İ-R hasarında artmış NO seviyesinin doku hasarı için yararlı mı yoksa zararlı mı olduğu hala tartışmalıdır (53).

PMNL ve endotel hücrelerinin aktivasyon ve birbirleriyle olan etkileşimleri reperfüzyon hasarı patofizyolojisinde önemli rol oynar. Dolaşımdaki PMNL'in, LT-B4, C5a ve sitokinler ile aktive olması sonucu PMNL yüzey adezyon molekülü ifadesi artar. Lökositler, diapedez öncesi endotel yüzeyi adezyon molekülleri ile etkileşime girerek, güçlü endotel-lökosit adezyonu oluştururlar. Sonrasında, PMNL'den NADPH bağımlı oksidaz sistemleri ile serbest kalan oksijen radikalleri ve proteaz enzimler doku hasarını artırır. Aktif hale gelmiş nötrofiller, İ-R hasarının en önemli SOR kaynaklarıdır. Nötrofil hareketleri ve marjinasyonu mikrovasküler endotel tarafından kontrol edilir. Normal fizyolojik şartlarda endotel hücrelerinin PMNL'ye olan ilgisi düşüktür ancak direkt veya indirekt (histamin, trombin, sitokinler yoluyla) hasarlayıcı etkiyle, endotelden iltihabi aracı maddeler (LT-B4, TxA2, PAF ,IL-8) salınımı (54) ve endotel yüzeyinde adezyon molekülü (P selektin, E selektin) (55) ifadesi artar. Oluşan adezyon moleküllerinin monoklonal antikörlerle blokağı ile reperfüzyon hasarında azalma sağlanmıştır (56).

Reperfüzyona bağlı hücre hasarının karakteristik özellikleri, hücrel geçirgenlik artışı ve şişme ile hücre iskelet değişiklikleri olup bu durum doku ödemi ve kapiller kan akımı azalmasıyla sonuçlanır (8).

2.3.İskemi Reperfüzyon Hasarı Mekanizmaları:

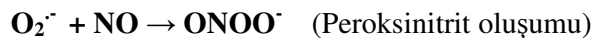
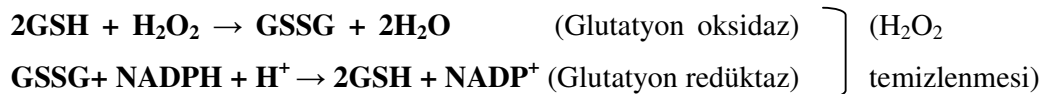
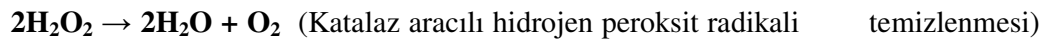
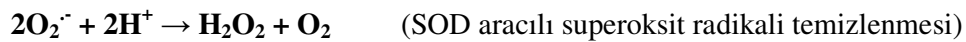
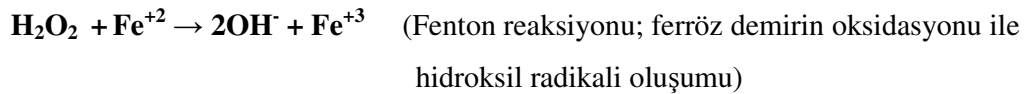
İskemik dokunun reperfüzyonu sırasında dokuya sağlanan oksijen ve metabolitler, hasarı geriletebileceği gibi hasarın ilerlemesine de neden olabilir. Bu ince çizgi, iskemik hasarın geri dönüşümlü olup olmadığına bağlıdır (1).

2.3.1. Serbest Oksijen Radikalleri (SOR):

2.3.1.1. SOR Tanımı ve Oluşum Mekanizmaları:

Serbest oksijen radikali, bir veya daha fazla serbest elektron içeren, bağlı olmayan atom veya molekül olarak tanımlanır. Sahip oldukları serbest elektron nedeniyle reaksiyon kapasiteleri yüksek ve kısa ömürlüdürler. ROT ve oksijen kaynaklı radikaller, normal hücre metabolizmasında az miktarlarda da olsa oluşmakla birlikte, endojen kimyasal mekanizmalarla inaktif hale getirilirler. İlaç intoksikasyonu, radyasyon maruziyeti, otoimmün hastalıklar, dejeneratif hastalıklar ve iskemireperfüzyon hasarı gibi durumlarda endojen inaktivasyon mekanizması yetersiz kalarak doku düzeylerinde ciddi artış meydana gelir. En önemli serbest oksijen radikalleri süperoksit ve hidroksil anyonlarıdır (57).

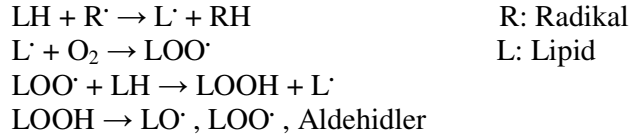
Stabil bir molekülde elektron redüksiyon veya oksidasyonu serbest radikal oluşumu ile sonuçlanır. Mitokondriyal oksidatif fosforilasyonda, oksijen, dört elektron redüksiyona uğrayarak H₂O oluşur ve hücre için gerekli enerji elde edilir. Parodoksik olarak, serbest oksijen radikali oluşumu da aynı şekilde gerçekleşmektedir (58).



} (H₂O₂ temizlenmesi)

2.3.1.2. Lipid Peroksidasyonu:

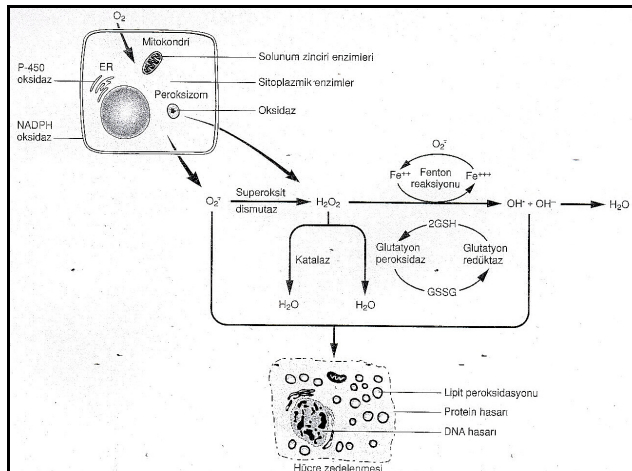
Hücre zarı fosfolipidleri (araşidonik asit, linoleik asit ve linolenik asit gibi çoklu doymamış yağ asitleri), İ-R hasarı sırasında peroksidasyona uğrarlar ve bu süreç kısır döngü şeklinde devam eder (57).



Lipid peroksidasyonu sonucu oluşan malondialdehid gibi stabil ürünlerin ölçümü, serbest oksijen radikali öncülerinin aktiviteleri konusunda fikir verir. Dolayısıyla lipid peroksidasyonu, İ-R hasarının hem tanısında hemde patofizyolojisinde önemli rol oynar (57).

2.3.1.3. İskemi Reperfüzyon Hasarında SOR:

Doku İ-R hasarı SOR kaynakları; XO enzimi, mitokondriyal oksidasyon, siklooksijenaz aracılı doymamış yağ asidi oksidasyonu, katekolamin oksidasyonu, sitokrom p 450 aracılı oksidasyon, lökosit NADPH oksidaz aktivasyonu, demir salınımı ve redoks siklusudur. Baskın SOR oluşum mekanizması hücreden hücreye değişiklik göstermekte olup, akciğerde sitokrom p 450, retina endoteli ve miyokarda XO ve lökositte NADPH oksidaz baskın sistemlerdir. Bununla birlikte sadece baskın sistemin bloklanması ile SOR'a bağlı İ-R hasarı engellenemez. Buna ek olarak iskemi sırasında, oksidatif hasara karşı hücresel defans mekanizmaları (SOD, katalaz ve glutatyon peroksidaz) inhibisyona uğrayarak daha az fonksiyon görürler (1,3) (Şekil 2).



Şekil 2: Biyolojik sistemlerde reaktif oksijen türevlerinin ve antioksidan mekanizmaların oluşumu (3).

Normal şartlarda SOR ve oksidan moleküller, düşük düzeylerde dokularda bulunarak, hücre hemostazı, mitoz, differansiasyon ve sinyal iletiminde önemli rol oynarlar. Ancak İ-R durumunda, çok yüksek doku düzeylerine çıkarak, hasara yol açarlar.

SOR hasarı, İ-R hasarı temel mekanizması olup, hemen hemen tüm hasar mekanizmalarında etkin rol oynar:

i-Sarkoplazmik retikulum kalsiyum ATP'az sistemini ve hücre zarı sodyum-potasyum ATP'az sistemini inhibe ederek hücre kalsiyum yükünü artırır.

ii-Hücre zarı fosfolipid yapısında peroksidasyon oluşturarak hücre zarı bütünlüğünün bozulması ve hücrenin şişmesine neden olur.

iii-Lökositler için kemotaktik olup lökosit birikimi ve aktivasyonunu sağlar.

iv-“No reflow” fenomeninde aracı olarak görev yapar

v-NO ile reaksiyon sonucu oluşan peroksinitrit aracılığıyla doku hasarını artırır.

vi-Protein ve enzimlerde, yapısal bozulmaya ve parçalanmaya (sulfidril aracılı protein çapraz bağları oluşumuyla) neden olur.

vii-Genetik yapıda hasarlanma oluşturur (Timin-serbest radikal reaksiyonu sonucu nükleer ve mitokondriyal DNA'da tek iplik kırılması).

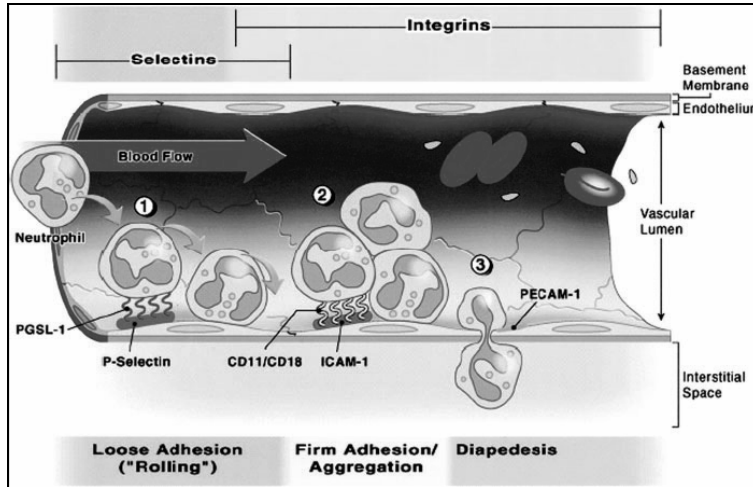
2.3.2. Lökosit ve Endotel:

2.3.2.1 İskemi-Reperfüzyon hasarında Lökosit-Endotel etkileşimi:

İ-R; endotel ve lökosit hücre yüzeyleri adezyon molekül oluşumunu artırarak, lökosit diapediziyle sonuçlanan kaskadın aktivasyonuna neden olur (59). Bu adezyon moleküllerinin hücre yüzeylerindeki oluşumu kimyasal aracı maddelerce sağlanır. İ-R'da aktif hale gelen ilk hücre nötrofil olup, hasarın elzem hücrelerindedir. Önceden nötrofillerin İ-R hasarında tetikleyici oldukları kabul edilmekteyken, artık mikrovasküler ve mukoza hasarının çoğundan sorumlu son mekanizma oldukları düşünülmektedir (1).

Doku iskemisi sonrası, platelet, endotel ve diğer lökositlerden çıkan kemotaktik sinyaller, nötrofil yuvarlanma, adezyon ve diapedez sürecinin çok düzenli şekilde gerçekleşmesine neden olur. Dolaşımda serbest dolaşan nötrofiller aktive olduklarında, iskemik doku endoteline yapışıp, interstisyel alana geçerler. Bu süreç; hem lökosit hem de endotel hücreleri üzerindeki glikoproteinler, hareket eden kanın mikrodolaşıma olan yırtıcı kuvveti, lökosit ve endotel hücrelerinin birbirlerine olan elektrostatik itici kuvveti

ve hücrelerce (endotel, lökosit, platelet) oluşturulan kimyasal maddeler (ROT, NO, PAF) sonucu oluşur (60). PMNL'lerin bu göçü üç aşamalı süreçte tariflenmiştir (61,62). İlk olarak, lökositlerin endotel yüzeyde yuvarlanması ("rolling") selektin ailesi glikoproteinleri (lökosit;L selektin / endotel;E ve P selektin) aracılığıyla oluşur. Bunlara karşılık gelen ligandlar, sialyl Lewis^x ve sialyl Lewis^a grubu antijenleridir. Böylelikle, endotel ve lökosit arasında zayıf bir etkileşim oluşarak, kan akımıyla birlikte endotele yapışıp ayrılan lökositler görülür. Bu yuvarlanma etkisi ("rolling effect"); lökositleri, klasik kemoatraktan (LT-B4, C5a, PAF) ve kemokimlerle yakın temas haline sokar (61,63). Bu moleküller, lökosit hücre yüzey reseptörlerine bağlanarak, G proteinler aracılığıyla, $\beta 2$ integrinleri aktive ederler. Aynı zamanda, TNF- α ve IL-1 molekülleri, endotel hücre yüzeyi VCAM-1 ve ICAM-1 ifadesini uyarırlar. Böylelikle, lökositler üzerindeki $\beta 2$ integrinler (CD11a, CD11b, CD11c/CD18) ile endotel üzerindeki reseptörleri olan immunglobulin süper ailesi (ICAM-1, 2, 3 ve VCAM-1) reaksiyona girerek, endotel-lökosit adezyonu gerçekleşir. Lökosit-endotel adezyonu reperfüzyon döneminin onuncu dakikasında maksimuma çıkar. Reperfüzyona bağlı inflamatuvar cevap, integrin ve reseptör oluşumunu uyararak, lökositlerde hücre iskeleti değişiklikleri ve güçlü endotel-lökosit adezyonuna neden olur (6) (Şekil 3).



Şekil 3: İ-R hasarında gerçekleşen lökosit-endotel adezyonu ve lökosit göçü (2).

İ-R hasarında, lökosit-endotel adezyonunun iki safhalı (erken ve geç) olduğu gözlenmiştir. Erken safha; PAF ve hidrojen peroksit, geç safha ise; PAF ve mitokondriyal oksidanlar aracılığıyla oluşur (64). Nötrofil adezyonu erken safhası; yapısal ICAM-1 hücre yüzey ifadesi, nötrofil yüzeyi artmış $\beta 2$ ifadesi ve P selektin

hücre yüzey mobilizasyonu sonucu gerçekleşir (64). Geç safha ise, transkripsiyonel faktör NF- κ B aktivasyonuna bağlı artmış endotel hücre yüzeyi adezyon molekül (özellikle E selektin) ifadesi sonucu gerçekleşir. Diğer transkripsiyonel faktörlerden farklı olarak, NF- κ B, sitoplazmada bulunur ve etkin olabilmesi için çekirdek translokasyonu gerekir. NF- κ B translokasyonu ve dolayısıyla artmış endotel yüzey E selektin ifadesinin engellenmesiyle geç safha adezyonu azaltılabilmektedir (65).

Sonrasında, endotel hücreleri arasından geçen lökositler hedef dokuya göç (diapedez) ederler. Bu göçte PE-CAM-1 ve kemokinler önemli rol oynar. Lökosit göçü esas olarak venöz kılcallardan olur. Lökositler bu göç sırasında endotel bazal membranında bir süre duraklarlar. Lökositlerden salgılanan kollajenazlar, bazal membran parçalanması ve lökositlerin interstisyel alana geçişlerinde önemli rol oynarlar. Hasarlı dokuya doğru olan lökosit kemotaksisi; kompleman sistem (C5a) unsurları, araşidonik asit lipooksijenaz yolu ürünleri (LT-B₄) ve sitokinler (özellikle kemokin ailesi, IL-8) yoluyla sağlanır. Kemotaktik ajan-lökosit etkileşimi sonrası fosfolipid metabolitleri döngüsü başlayarak hücre içi kalsiyum artar. Artmış kalsiyum, hücre iskeleti kontraktıl elemanlarını tetikler ve psödopodlar harekete geçerek nötrofil spesifik yöne doğru ilerler (3). Lökosit-ekstrasellüler matriks adezyonu ise β_1 integrinler ve CD44 aracılığıyla olur (5).

İ-R sırasında oluşan TNF- α , IL-1 β , PAF ve kompleman sistemi gibi inflamatuvar aracılardan hepsi nötrofil göçü ve birikimini arttırırlar (66). TNF- α ve IL-1 β molekülleri için en önemli kaynaklar mevcut makrofaj ve mast hücreleri olup aktif nötrofiller tarafından da sentezlendikleri gösterilmiştir (67,68) TNF- α ; NADPH oksidaz aktivasyonu ve IL-2 reseptör / ICAM-1 artmış oluşumunu sağlayarak, nötrofil adezyon ve degranülasyonunu uyarır (69). Ksantin oksidaz kaynaklı SOR, hasarlanmış doku nötrofil devamlılığını sağlayarak, doku hasarının genişlemesine neden olur (11).

İ-R hasarı bölgesinde artmış myeloperoksidaz (MPO) aktivitesi, nötrofil birikimi için bir delil oluşturmaktadır. MPO aktivitesi ile MDA konsantrasyonunun korelasyon göstermesi ise, lipid peroksidasyonun nötrofil kaynaklı ROT ile oluştuğunu gösterir. MPO aktivite artışının, hücre zarı fosfolipidlerinin lipoperoksidasyonu sonucu oluşan fosfolipid kaynaklı aracılar (örneğin PAF) bağlı da oluşabileceği gözlenmiştir (70).

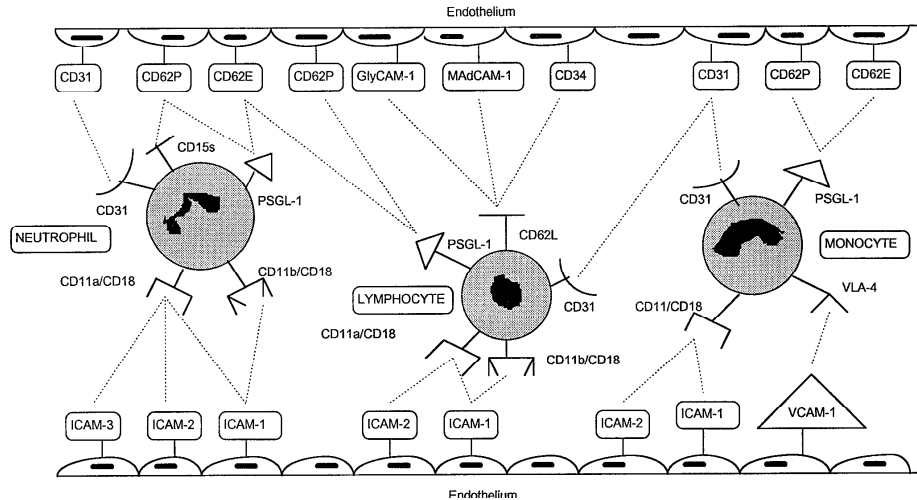
Hasarlanmış bölgede biriken hücre tipi, inflamasyon süresi ve uyarının tipine göre değişir. İ-R hasarına inflamatuvar cevapta ilk 6-24 saat nötrofil hakimiyeti mevcut iken, 24-48'nci saatlerde monositler baskın hale geçerler. Bunun nedeni, nötrofillerin

kanda daha fazla bulunması, daha hızlı aktive olmaları, adezyon moleküllerine yüksek afinite ile bağlanmaları ve yarı ömürlerinin kısa olmasıdır. Dolayısıyla, akut dönemde nötrofil, kronik dönemde ise monosit hakimiyeti vardır (3).

İ-R'da PMNL'e bağlı doku hasarı; sitoplazmik granüllerden salınan elastaz gibi proteolitik enzimler (71), NADPH oksidaz kaynaklı SOR (72) ve kapiller seviyede mikrodolaşım tıkanıklığı (73) sonucunda gerçekleşir. Dolayısıyla PMNL, iskemik dokuda hasarın genişlemesine neden olur (74). Bu durumun klinik yansıması, mikrovasküler tromboz ve disfonksiyon ile karakterize "no-reflow" fenomeni'dir (1). Dolayısıyla doku reperfüzyonu; endotel hasar, kapiller tromboz ve ROT oluşumu ile süregelen nötrofil aktivasyon ve göçü arasında bir kısır döngü oluşturur (75).

2.3.2.2. Adezyon Molekülleri:

Adezyon molekülleri başlıca 4 molekül ailesi içinde yer alır; selektinler, integrinler, immünoglobulin süper ailesi ve kaderinler (Şekil 4).



Şekil 4: Endotel ve inflamatuvar hücreler arasındaki adezyon molekülü-ligand etkileşimleri. [Leukocyte function antigen-1 (CD11aCD18); Mac-1 (CD11bCD18); p150,95 (CD11cCD18); intercellular adhesion molecule (ICAM-1) (CD54); ICAM-2 (CD102); ICAM-3 (CD50); very late activation (VLA)-4 (CD49d); vascular adhesion molecule (VCAM-1) (CD106); platelet-endothelial cell adhesion molecule (PE-CAM-1) (CD31); E-selectin (CD62E); P-selectin(CD62P); tetrasaccharide sialyl Lewis^x (CD15s); P-selectin glycoprotein ligand-1 (PSGL-1); L-selectin (CD62L); glycan bearing cell adhesion molecule-1 (GlyCAM-1) ; mucosal addressin cell adhesion molecule-1 (MAdCAM-1); ve CD34.] (76).

a)Selektinler:

Hücresel dağılımlarına göre üçe ayrılmasına karşın tümü lökosit-endotel adezyonunda rol oynayan bir transmembran glikoprotein ailesidir. Karbonhidrat

bağlayıcı proteinler olan C-tip lektinlerin etkileşime girebileceği N terminal içerirler. Selektin-C tip lektin etkileşimi kalsiyum bağımlı olup, birbirlerine karşı afiniteleri düşüktür ve etkileşim hızlı başlayıp hızlı biter. Bu özelliklerinden dolayı, lökosit başlangıç yuvarlanma ve adezyonunda önemli rol oynarlar (3).

L selektin (CD62L), lenfosit ve diğer lökosit yüzeylerinde ifade edilir. Yüksek endotelial reseptörlere bağlanarak lenfositlerin lenf nodlarını hedefleyebilmesini sağlar. Aynı zamanda, inflamasyon bölgelerinde sitokinle aktive olmuş endotel hücrelerinin nötrofillere bağlanmasını sağlar. Lökosit mikrovilus uzantılarında bulunması, lökosit-endotel etkileşimi açısından kolaylık sağlar. L selektin bağlanma bölgeleri; lenf nodu yüksek venöz kılcal endotel hücresinde bulunan ve bir proteoglikan olan glycan bearing cell adhesion molecule-1 (GlyCAM-1), barsak lenfoid sistem endoteli yerleşimli mucosal addressin cell adhesion molecule-1 (MadCAM-1) ve damar endoteli yerleşimli bir proteoglikan olan CD34'tür. Bu moleküllerin protein iskeleti spesifik karbonhidratlar ile değiştirilerek selektinler tarafından tanınır hale gelir (3).

E selektin (CD62E), sitokinler ile aktive olmuş endotel yüzeyinde ifade edilir. E selektin, Lewis X veya Lewis A ailesine üye kompleks sialyl karbonhidrat gruplarla etkileşime girerek, bu grupların bulunduğu granulosit, monosit ve hafıza T lenfositlerin periferik inflamasyon alanlarında (özellikle deri) birikiminde önemli rol oynar. Dolayısıyla akut sitokin aracılı inflamasyonda, endotel yüzey E selektin ifadesi en belirgin özelliklerden olup, E selektin blokajı ile lökosit birikimi önlenmektedir (3).

P selektin (CD62P), ilk kez platelet sekretuar granüllerde saptanmış olup, endotel hücre sekretuar granüllerinde (Weibel-Palade) de gösterilmiştir. Endotel hücre veya platelet aktivasyonuna P selektin hücre yüzeyi ifadesi eşlik eder ve bu hücrelerin nötrofil, T lenfosit ve monosit hücreleriyle etkileşimlerini kontrol eder. P selektin'in etkileşime girdiği kompleks karbonhidrat ligandlar E selektin'inkilerle benzerlik gösterir. Genetik müdahale ile L selektin yokluğu oluşturulan farelerde, T hücre sayısı ve lenf nodu büyüklüğünde azalma oluşmuştur. P selektin veya L selektin genetik blokajında lökosit birikimi çok az etkilenirken, ikisinin birden blokajında ciddi etkilenme olması P ve L selektinlerin birbirinden bağımsız olduklarını gösterir (3).

b)İntegrinler:

İntegrin süper ailesi; 30 adet, yapısal olarak homolog, protein molekülden oluşup, hücre-hücre ve hücre-matriks etkileşimini sağlar. Ekstraselüler ligandlardan

kaynaklanan işaretlerin koordinasyonunu; iskeletsel hareketlilik, şekil değişikliği ve fagositik değişikliklerle sağlarlar (3). Tüm integrinler heterodinamik hücre yüzey proteinleri olup, kovalen olmayan bağlarla bağlanmış α ve β zincirler içerirler. Bu zincirlerin ekstraselüler yüzeyleri, ekstraselüler matriks glikoproteinler, aktive olmuş kompleman sistem elemanları ve diğer hücre yüzey proteinleri ile bağlanırlar. Birçok integrin, fibronektin ve vitronektin molekülleri Arg-Gly-Asp(RGD) sekansına bağlanırlar. Zincirlerin sitoplazmik yüzeyleri ise hücre iskelet elemanları (vinkulin, talin, aktin, α -aktinin ve tropomyosin) ile etkileşime girer. Saptanmış sekiz heterodimerik β alt üniteye göre sekiz integrin ailesi tariflenmiştir (3).

$\beta 1$ integrinler, aynı zamanda very late activating (VLA) moleküller olarak da adlandırılırlar çünkü T hücre yüzeyi $\alpha_1\beta_1$ ve $\alpha_2\beta_1$ ifadesi ilk uyarıdan yaklaşık 2-4 hafta sonra oluşur. $\beta 1$ integrinlerin diğer adlandırma şekli CD49a-hCD29 olup, CD49a-h değişik α zincirleri (α_1 - α_8), CD29 ise ortak $\beta 1$ zinciri simgeler. $\beta 1$ integrinler, birçok hücre yüzeyinde ifade edilerek onların ekstraselüler matriks ile etkileşimlerini kontrol ederken, VLA-4 ($\alpha_4\beta_1$) sadece lökositlerde bulunur ve VCAM-1 aracılığıyla lökosit-endotel adezyonunu kontrol eder. VLA-4 aynı zamanda, lenfositlerin, inflamatuvar alan periferindeki endotele yapışmasında en önemli yüzey proteinleridir (3).

$\beta 2$ integrinler; leukocyte function-associated antigen (LFA) veya CD11a-cCD18 olarak da adlandırılırlar. CD11a-c, değişik α zincirleri, CD18 ise ortak $\beta 2$ zincirini tanımlar. LFA-1; lenfosit ve diğer lökositlerin, özellikle antijen sunan hücreler ve endotel olmak üzere, diğer hücrelerle olan adezyonunu kontrol eder. Ailenin diğer üyeleri CD11bCD18 (Mac-1 / CR3) ve CD11cCD18 (CR4) olup, lökosit-endotel adezyonu ve lökosit diapedezini kontrol ederler. CD11bCD18 aynı zamanda, fagositler üzerinde fibrinojen ve kompleman reseptörü olarak rol oynar ve Kompleman faktör3b opsonizasyonu öncesi partiküllerin fagositlere bağlanmasını sağlar (3).

Diğer integrinler, platelet ve diğer hücre tiplerinin ekstraselüler matriks proteinlerine (özellikle koagülasyon proteinleri) bağlanmalarında önemli rol oynarlar.

c) İmmunglobulin süper ailesi:

İmmunglobulin süper ailesi; immunglobulin uçlarla karakterize olup, LFA-2 (CD2), LFA-3 (CD58), ICAM (CD54), VCAM-1, PE-CAM-1, MAdCAM-1 ve junctional adhesion molecule (JAM)'ü içerir (76).

LFA-2, 50 kd boyutunda bir antigen olup, timositler, olgun T hücreleri ve natural killer (NK) hücrelerde ifade edilir. T lenfosit-endotel adezyonu; T hücresi yüzey

proteini olan LFA-2 ile endotel yüzey proteini LFA-3 arasında olur. LFA-2 ve LFA-3 etkileşimi, antijen tanınma öncesi veya sonrasında gerçekleşebilir (76).

ICAM, lökositlerin doku hasarı bölgelerinde lokalize olmalarını sağlar. Birçok sitokin (γ interferon, IL-1 β ve TNF- α), endotel hücre yüzeyi ICAM oluşumunu indükler. Böylelikle, lökositlerdeki karşılıkları olan β 2 integrinler (CD11/CD18) ile etkileşime girerek, lökosit-endotel adezyonu gerçekleşir. Şuana kadar, ICAM'ın beş üyesi tespit edilmiştir; ICAM-1 (CD54), ICAM-2 (CD102), ICAM-3 (CD50), ICAM-4 ve ICAM-5. ICAM-1, sitokinle uyarılmış hücre yüzeylerinde (endotel, lökosit, dermal fibroblastlar, melonositler) ve özel tip karsinomlarda oluşur ve nötrofil, T hücre ve makrofaj hücre yüzeyi CD11a/CD18 ve CD11b/CD18'e bağlanır (77). ICAM-1 aynı zamanda, rhinovirüs için önemli bir reseptördür. ICAM-2, nötrofillerin doku hasarı bölgesine olan ilk lokalizasyonunda önemli rol oynar. ICAM-3, pasif haldeki lökositler üzerinde yapısal olarak bulunur ve CD11a/CD18 için en önemli ligandır. ICAM-3, 5 immunglobulin uçtan oluşur ve ICAM-1 ile yakın ilişkilidir. B hücre ve makrofajlar, ICAM-3'ün en fazla bulunduğu hücrelerdir. ICAM-4 eritrositlere, ICAM-5 ise beyine özgüdür. Lökosit spesifik doku birikimi bu ICAM-integrin etkileşimleri (ICAM1-CD11a/CD11b, ICAM2-CD11a, ICAM3-CD11a) aracılığıyla gerçekleşir (76).

VCAM-1, aktive olmuş endotel hücre yüzeyinde oluşur ve VLA-4'e bağlanır. 6 veya 7 adet immunglobulin uç içerir. Lipopolisakkarit, IL-1 ve TNF- α ile aktive olmuş endotel hücrelerinin, monosit, lenfosit, bazofil ve eozinofil adezyonunu kontrol eder (78). Dolayısıyla VCAM-1, birçok inflamatuvar durum (akut doku rejeksiyonu, romatoid artrit, ensefalit, malignansi vb.) patogeneğinde rol oynar (76).

PE-CAM-1 (CD31), endotel hücre interselüler kavşak bölgesinde yoğun olarak bulunurken, platelet ve lökositlerde daha az yoğunlukta bulunur (79). Yapısal olarak ICAM-1 ve VCAM-1 ile benzer olup, komşu hücrelerin sınır yüzlerinde bulunur. PE-CAM-1, nötrofillerin CD18'den bağımsız diapedezinde rol oynar. Bu transendotel göç, endotel ve lökositlerdeki homotipik PE-CAM-1 moleküllerinin birbirleriyle olan adezyonu sonucu oluşur (79).

MAdCAM-1, endotel hücrelerin mukozaya bakan yüzeylerinde bulunur ve $\alpha_4\beta_7$ ile L selektin molekülleri için reseptör olarak görev yapar. Peyer lenf nodu ve mezenterik lenf nodlarında yüksek miktarlarda ifade olmasına karşın periferik lenf nodlarında bulunmaz. Barsak lamina propria venöz kılcalları, laktasyonda olan meme

bezi ve dalak beyaz-kırmızı pulpası marjinal zonda da bulunur. Dolayısıyla MAdCAM-1 ve $\alpha_4\beta_7$ etkileşimi, lenfositlerin mukozal göçünde rol oynar (80).

JAM, endotel hücre hücrelerarası yüzeyinde yapısal olarak bulunan bir moleküldür. JAM'ın monosit göçünde önemli rol oynadığı düşünülmektedir. In-vitro, anti-JAMmAb'ların endotelden monosit göçünü engellediği gösterilmiştir (81).

d)Kaderinler :

Doku bütünlüğünde, kaderinler'in yapısal ve fonksiyonel bütünlüğü önemli rol oynar. Kalsiyum bağımlı hücre-hücre adezyon molekülleri olup, hücreler arası bağlantının sürdürülmesinde görev alırlar. Buldukları dokulara göre isimlendirilmiş 5 kaderin grubu mevcuttur; E kaderinler (epitel), P kaderinler (plasenta), N kaderinler (nöral), V kaderinler (endotel) ve H kaderinler (kalp kası) (81).

E ve P kaderinler, hücreler arası bağlantı noktalarında bulunurlar ve ortak bir yapıya sahiptirler ancak farklı molekül ağırlıkları, bağlanma özellikleri ve doku dağılımları vardır. İmmunohistokimyasal olarak E kaderin birçok epitel hücresinde, P kaderin ise primer olarak plasenta ve çok katlı epitelin bazal katmanında saptanmıştır. N kaderin ise primer olarak sinir, kas, böbrek ve gözün lens bölgesinde yer alır. N kaderin, böbrek için majör hücreler arası adezyon molekülü olup, tübüler hücrelerin bazal yüzeylerinde ve renal korteks epitel hücreleri arasında bulunurlar. E kaderin, lenfosit integrin $\alpha_E\beta_7$ ile etkileşime girer. Bu etkileşim lenfosit trafiği için temel mekanizmalardan biridir. E kaderin bağımlı hücre-hücre adezyon kaybı, differansiasyon kaybı ve epitel hücre invazyonuyla sonuçlanır. Kaderin aracılı hücre-hücre adezyon kaskadı bozukluğu meme kanserlerinin ortak noktasıdır (76).

e)Diğer adezyon molekülleri:

Hermes (CD44); Membran glikoproteinidir. Değişik izoformları, T ve B lenfositler, timositler, granülosit, monosit, epitelyal hücreler ve fibroblastlarda bulunur. Hücre-hücre ve hücre-matriks adezyonundan sorumludur. Yuvarlanma etkisi (lökosit), hücre göçü ve hematopoetik hücre differansiyasyonuna aracılık eder.

CD36; platelet glikoprotein VI ve GPIIb olarak da bilinir. Apoptozise giden hücrelerin fagositoz kapasitesi ile ilgili rolü olabilir.

Laminin; dokular arası geniş dimerler oluşturur. Bazal membran mimarisi için önem taşır. Embryogenez, gelişim ve dokuların yeniden şekillenmesi için gereklidir.

Fibronektin; glikozominoglikan, jelatin, fibrin, heparin ve hücre yüzey integrinlerine bağlanır. Embryogenez, anjiogenez, tromboz, hemostaz, inflamasyon ve yara iyileşmesi sırasında adeziv ve migratuar olaylara aracılık eder.

OX40; aktif T hücrelerinin vasküler endotel hücrelerine, ligandı olan sp34 aracılığı ile, adezyonunda rol alır (81).

f) Adezyon Reseptörleri ile Sinyal İletimi;

Sinyal iletimi en iyi integrinlerde tanımlanmıştır. Rho-ailesi, guanozintrifosfataz aktivasyonu ile hücre iskeleti organizasyonunda değişimlere neden olur. Mitogen activating protein (MAP), kinaz yolunun ve bir grup protein/lipid kinazın aktivasyonuna yol açar. Bu yolların aktivasyonu; hücre adezyon ve siklusunun ilerlemesine, hücre yaşamının devamına ve gen ekspresyonunda etkilenmeye neden olur. Gerçekten de, birçok hücre bir substrata yapışmadığı takdirde çoğalamaz ve yaşayamaz. Büyüme faktörleri ve integrinler arasında önemli oranda karşılıklı yardımlaşma söz konusudur. Büyüme faktörlerinin tek başına bulunması yeterli değildir, integrin sinyalinin varlığına da ihtiyaç vardır. Bu iki reseptör grubu integre bir sistemin parçaları olarak düşünülmelidir. İntegrinlerin kendi başlarına sinyal iletmeyip, bir takım transmembran moleküller (tetrosponinler, CD47, kaveolin, syndekenler) ile birleşerek sinyal kapasitelerinin çeşitliliğini arttırdıkları da bildirilmiştir (81).

2.3.2.2. İnflamasyonun Kimyasal Aracıları:

a) Araşidonik Asit (AA) Metabolitleri (Eikosanoidler; PG ve LT)

AA metabolizmasından kaynaklanan ürünler, inflamasyon ve hemostaz olmak üzere birçok biyolojik olay üzerine etkilidir. Bu ürünler kısa zamanlı hormonlar olarak değerlendirilebilirler. Yapıldıkları yerde lokal olarak etki ederler ve daha sonra çok hızlı olarak spontan veya enzimatik olarak yok edilirler (3).

AA; 20 karbonlu, poliansatüre bir yağasididir (4 çift bağlı) ve primer olarak diyetdeki linoleik asitten türer ve vücutta yalnızca ester şeklinde, hücre membran proteinlerinin bir komponenti olarak bulunur. AA bu fosfolipidlerden hücresel fosfolipazlar yoluyla salınır. Hücresel fosfolipazlar mekanik, kimyasal, fiziksel uyarı veya C5a gibi iltihabi mediatörlerce aktive edilirler. AA metabolizması reaksiyonu başlatan enzimin adıyla anılan iki ana yol boyunca ilerler (3).

Siklooksijenaz (COX): Burada PG E2, PG D2, PG F2, PG I2 (prostasiklin) ve TxA2 bulunur. Bunların her biri spesifik bir enzim etkisi ile meydana gelir. Bu

enzimlerin bazılarının dokulardaki dağılımı sınırlıdır. Örneğin; trombositlerde tromboksan sentetaz enzimi vardır dolayısıyla güçlü bir trombosit agregan ajan ve vazokonstrüktör olan TxA2 ana prostaglandin ürün olarak bu hücrelerde bulunur. Diğer yandan endotel, tromboksan sentetaz içermez ancak PG I₂ oluşumunu sağlayan prostasiklin sentetaz içerir. PG I₂ güçlü bir trombosit agregasyon inhibitörü ve vazodilatördür. PG D₂, COX yolunun mast hücrelerindeki ana metabolitidir; PG E₂ ve PG F₂ (daha yaygın) ile birlikte bulunurlar ve PG D₂ vazodilatasyona neden olur, ödemi artırır. Aspirin ve ibuprofen gibi nonsteroid antiinflamatuvar ajanlar, proksimal COX aktivitesini inhibe ederek prostaglandin sentezini tümüyle inhibe ederler. Bu antiinflamatuvar ajanlar lipooksijenaz yolunu etkilenmez (3).

Son yapılan çalışmalarda COX'un iki formu olduğu gösterilmiştir: COX-1 ve COX-2. İlginç olarak gastrik mukozada COX-1 mevcutken, COX-2 yoktur. Bu bölgede mukozal prostaglandinler COX-1 etkisiyle oluşurlar ve aside bağlı hasarı engellediklerinden koruyucudurlar. Non steroid antiinflamatuvar ilaçlar ve aspirin, COX'u inhibe ederek prostaglandin sentezini bloke edip, enflamasyonu azaltırken, gastrik ülserde de zemin hazırlarlar (3).

Lipooksijenaz: Nötrofillerde baskın olarak bulunan AA metabolizması enzimi 5-lipooksijenaz'dır. 5-hydroperoxyeicosatetraenoic acid (5-HPETE), AA'in 5-hidroperoksi ürünüdür. 5-HPETE oldukça kararsızdır, ya 5-hydroxyeicosatetraenoic acid'ye indirgenir (nötrofil için kemotaktiktir), ya da topluca lökotrienler diye adlandırılan bileşiklere dönüşür. 5-HPETE'den türeyen ilk lökotrien, LT-A₄ olup bu enzimatik hidrolizle LT-B₄ oluşumuna veya glutasyon eklenmesiyle LT-C₄ oluşumuna yol açar. LT-B₄ güçlü kemotaktik bir ajandır ve nötrofillerin agregasyonuna yol açar. LT-C₄ ve onun alt ürünleri LT-D₄ ve LT-E₄ vazokonstrüksiyon, bronkospazm ve vasküler permeabilite artışına neden olurlar (3).

Özet olarak, eikosanoidler akut inflamasyonun her aşamasında yer alırlar. Eikosanoidlerin iltihabi proseslerin merkezinde rol aldıkları gerçeği klinikte COX aktivitesini baskılayan ajanların (aspirin ve NSAID) güçlü anti inflamatuvar ajanlar olarak kullanılmasıyla kendini gösterir. Glukokortikoidler ile oluşan antiinflamatuvar etki kısmen fosfolipaz A₂ inhibisyonuna bağlıdır (3).

b)Platelet Activating Factor (PAF):

PAF, trombosit agregasyonuna ve degranülasyona sebep olması nedeniyle bu şekilde adlandırılan fosfolipid türevi mediatördür. Asetil gliserol eter fosfokolin

yapısındadır. Fosfolipaz A2 etkisiyle nötrofillerin, monositlerin, bazofillerin, endotelin, trombositlerin ve diğer bazı hücrelerin membran fosfolipidlerinden elde edilir. Trombositlerin uyarılmasının yanı sıra; vazokonstriksiyon ve bronkokonstriksiyona sebep olur. Aynı zamanda lökosit adezyonunu (integrinlerde yapısal değişikliklere neden olarak), kemotaksisi, lökosit degranülasyonunu ve oksidatif reaksiyonları artırır. Hedef hücreleri, spesifik reseptörleri üzerinden etkiler. Eikozanoidler başta olmak üzere diğer bazı mediatörlerin sentezini de stimüle eder (3).

c) Sitokinler:

Sitokinler, aktive olmuş lenfositler ve makrofajlar başta olmak üzere birçok hücre tarafından sentezlenen ve hücre fonksiyonlarının düzenlenmesinde rol oynayan polipeptid moleküllerdir. Kendi ürettikleri hücreleri (otokrin etki) ve yakın çevredeki hücreleri (parakrin etki) etkileyebildikleri gibi sistemik etkileride (endokrin etki) vardır. Hücre immün cevap üzerine etkilerinin yanı sıra, IL-1, TNF- α ve TNF- β , interferon- γ ve kemokinler başta olmak üzere, bazı sitokinlerin inflamatuvar yanıtın oluşumunda ilave rolleri de vardır. Sistemik akut-faz reaksiyonlarını stimüle eden bu sitokinlerin; endotel, lökosit ve fibroblastlar üzerine lokal etkileri de bulunmaktadır (3).

IL-1 ve TNF- α , aktive olmuş makrofajlar tarafından sentezlenirken, TNF- β ve interferon- γ , T hücrelerinden sentezlenir. Sitokinlerin sekresyonu; endotoksinler, immün kompleksler, toksinler, fiziksel travma ve bazı inflamasyon mediatörleri tarafından stimüle edilir. IL-1 ve TNF; endotelde “endotelyal aktivasyon” olarak isimlendirilen bir grup değişikliği stimüle eder. Bu değişiklikler; adezyon moleküllerinin artmış yüzey ifadesi, bazı sitokin ve büyüme faktörlerinin sekresyonu, eikozanoidlerin ve NO sentezlenmesi ve endotel trombojenitesinin artmasıdır. TNF ayrıca nötrofillerin agregasyonu ve aktivasyonunu stimüle eder; mezenkimal hücrelerden proteolitik enzimlerin salınımını uyarak doku hasarına neden olur (3).

IL-1 ve TNF enfeksiyonlara ya da yaralanmalara eşlik eden sistemik akut-faz reaksiyonlarını uyarır. Bunun yanı sıra, TNF septik şok da hipotansif etkilerin ortaya çıkmasına neden olan NO (myokard kasılmasında azalma ve damar düz kasındaki gevşetici etkisi ile) sentezini de indükler. IFN- γ , makrofaj ve nötrofiller için güçlü bir aktivatördür; onların oksidatif yıkımdan sorumlu enzimlerini artırarak, fagosite edilmiş mikroorganizmaların öldürülmesini sağlar. Aynı zamanda bir “NOS” uyarıcısıdır (3).

Kemokinler; tekrarlayan sistein çiftleri ve iki internal disülfid körüsü ile bağlanan halkalar içeren bir protein ailesidir. İnflamatuvar hücreler için kemotaktik

moleküller olmaları ve bazı sitokin etkilerini göstermeleri nedeniyle bu şekilde adlandırılmışlardır. İlk tanımlanan kemokinlerden birisi olan IL-8, güçlü bir kemotaktik ajan olup, başlıca nötrofilleri aktive eder. IL-1 ve TNF- α 'a cevap olarak aktive olmuş makrofajlar, endotel ve fibroblastlardan salınır. Platelet factor 4 (PF-4) (nötrofiller, monositler ve eosinofiller için kemotaktik), monocyte chemotactic protein-1 (MCP-1) (monositler için kemotaktik), RANTES (CD4+Bellek T hücreleri ve monositler için kemotaktik), ve eotaksin (eosinofiller için kemotaktik) diğer kemokinlerdir. Son araştırmalar, belirli bir hücre grubunun inflamatuvar bölgede toplanmasında kemokin kombinasyonlarının rol oynadığı görüşünü desteklemektedir (3).

2.3.3. Mikrodolaşım (“no reflow” fenomeni):

Mikrodolaşım, en uç kan dolaşımı sistemidir. Arteriol, venül, arteryel ve venöz kılcalların boyutu 7-100 μ m arasında değişir. İskemi sonrası reperfüzyon sağlandığında lökosit aktivasyonu ve iltihabi cevap gelişir. Aktive olmuş lökositler mikrodolaşımında birikerek kollaps ve tıkanıklığa neden olurlar. Dolayısıyla lökosit-platelet ve lökosit-endotel hücre etkileşimleri ana mekanizma olup, interstisyel sıvı birikimi ve azalmış endotel bağımlı vazodilatasyon bu duruma katkıda bulunur (82). Bu durum ilk kez 1967 yılında Majno tarafından “no reflow” fenomeni olarak tanımlanmıştır (83).

Lökosit-endotel adezyonu, endotelde şişme ve daha fazla lökosit adezyonuyla sonuçlanır. Lökosit-platelet adezyonu ise plateletlerin subendotel alanda birikerek, endotel ayrılmasına neden olur. Bu yapışmış plateletler, selektin ve integrinler yoluyla, daha fazla lökositin plateletlere yapışmasını sağlarlar (84). Nötropeni ve trombositopeni modellerinde “no reflow” oluşumunun azaldığı gözlenmiştir (85). Sonuç olarak endotel-lökosit-platelet etkileşimleriyle, fibrin birikimini takiben, trombüs oluşumu gözlenir.

2.3.4. Plateletler:

2.3.4.1. Reaktif Oksijen Türevleri ve Platelet Fonksiyonu:

Hücre zarı fosfolipidlerinin peroksidasyonu sonucu; hücre zarı bütünlüğü, geçirgenliği ve hücre yüzey reseptör fonksiyonları etkilenir. Yapılan çalışmalarda, araşidonik asit ve çoklu doymamış yağ asitlerden oluşan izoprostan isimli serbest radikal saptanmıştır. Prostaglandinlere benzerliği nedeniyle bu şekilde isimlendirilen molekül, TxA2 gibi, platelet ve damar düz kas aktivasyonuna neden olur (86).

Reperfüzyon periyoduyla birlikte şiddetli platelet aktivasyonu oluşur. Artmış bu aktivite, reperfüzyon döneminde artmış trombojenite ve yeniden tıkanıklık risklerindeki beraberinde getirir. Trombosit aktivasyonunun primer etkeni tam olarak bilinmemekle birlikte, reperfüzyonla birlikte oluşan SOR patlaması suçlanmaktadır (87).

Hidrojen peroksit'in platelet aktivasyonunu tetikleyici etkisi bilinmektedir. Dolayısıyla hidrojen peroksit oluşumuna neden olan SOD'da platelet aktivasyonu sağlar. Fosfolipaz A2 ile uyarılmış araşidonik asit oluşumu ve son ürün TxA2'de platelet aktivasyonu sağlarlar. Dolayısıyla; aspirin, mepaerine (fosfolipaz A2 inhibitörü), hidroksil radikali temizleyicileri ve demir şelazyonu, trombosit aktivasyonunu azaltırlar. Reperfüzyon periyodunda artan NADPH oksidaz ve fosfolipaz A2 platelet aktivasyonuna katkıda bulunur (87).

SOR, indirekt yollarla da platelet fonksiyonunu etkiler. NO normalde, vazodilatasyon ve antiplatelet etki sağlar ancak reperfüzyon döneminde süperoksit anyon ile etkileşime girerek peroksinitrit oluşumu gerçekleşir. Peroksinitrit anyonu ise, prostasiklin ile oluşan antiplatelet etkiyi yok ederek, kümeleşmeye eğilim yaratır. Aynı zamanda, reperfüzyon periyodunda SOR'un endotel üzerindeki hasarına bağlı siklooksijenaz yolu inaktive olarak PG I2 (prostasiklin) sentezi de azalır. Dolayısıyla İ-R hasarı sırasında NO, PG I2'nin inhibisyon ve sentezlerinin azalması, platelet aktivasyonuna neden olur (86). İ-R hasarı sırasında, endotel hücre trombin sentezinde artış ve antitrombin etkinliği olan trombomodulin'de ise artan SOR'a ikincil azalma görülür. Dolayısıyla, platelet aktivasyonu oluşturan trombin düzeyinde ciddi artış oluşur (86). PAF, trombosit aktivasyonu ve inflamasyon için güçlü bir mediatör olup, reperfüzyon sonrası oluşan SOR, hem endotel PAF sentezini arttırır hem de PAF yıkımını sağlayan PAF-asetilhidrolaz enzim aktivitesini inhibe ederler (86).

Dolayısıyla, reperfüzyona eşlik eden SOR oluşumu platelet aktivasyonu sağlayarak tromboz ve yeniden tıkanmaya eğilim oluşturlar (86).

a)Ekzojen ROT'un Platelet Fonksiyonu Üzerine Etkisi:

Süperoksit anyonu, diğer reaktif oksijen türlerine çevrilebilmesi nedeniyle ROT sisteminin merkezinde yer alır. SOD, katalaz ve glutatyon peroksidaz, serbest oksijen radikallerine karşı vücudun doğal savunma mekanizmalarını oluşturlar (12).

Hidrojen peroksit, stabil bir molekül olup, plateletler üzerine uygulandığında, adenindinükleotid aracılı platelet aktivasyonunu engellediği ancak kollajen ve araşidonik asit aracılı aktivasyonu uyardığı görülmüştür (88). Süperoksit-platelet

etkileşiminde ise, trombin, kollajen, adenindinükleotid ve araşidonik asitle plateletlerin daha kolay aktive oldukları saptanmıştır. Dolayısıyla, sadece süperoksitin plateletleri her durumda aktive edebilme yetisi vardır (89).

Süperoksit anyonu, platelet veya endotel kaynaklı NO'i peroksinitrit anyonuna çevirir. Dolayısıyla süperoksit anyonu varlığında, NO'in antitrombotik etkinliği azalır. Ancak peroksinitrit, plateletler üzerinde direkt etkiyle, adenindinükleotid, kollajen ve trombin aracılı kümeleşmeyi engeller. Peroksinitritin plateletler üzerindeki etkisi dual olup, plazmada inhibisyon, tampon solüsyonunda ise aktivasyon yapar (90).

Yüksek hidrojen peroksit ve ROT konsantrasyonlarında, hücre zarı hasarına bağlı hücre içeriği hücre dışına sızar. ROT'un bu hücre zarı bozucu etkisi platelet inhibisyonuyla sonuçlanır (91).

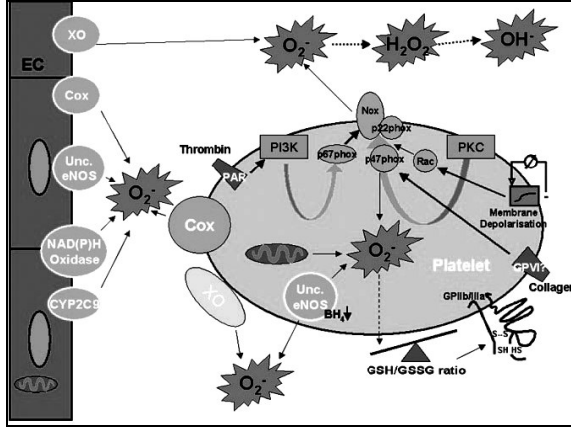
b)Platelet Kaynaklı ROT'un Rolü:

Plateletlerde ROT oluşumu ilk kez 1977'de bildirilmiştir (92). ROT'un, hem pasif hemde çeşitli uyaranlarla (kollajen,trombin) aktif hale gelmiş plateletler tarafından sentezlenmesi, platelet aktivasyonunda ROT'un otokrin rol oynadığını gösterir (12).

Platelet kaynaklı ROT oluşumunda, NADPH oksidazın platelet izoformu önemli rol oynar, çünkü platelet aktivasyonu sağlayan her uyaran bu enzimi de uyarır (93). Platelet NADPH oksidaz varlığı, direkt olarak, ilk kez, enzim alt üniteleri olan p22^{phox} ve p67^{phox} 'un gösterilmesiyle ispatlanmıştır (94). Bunun plateletlere özgü bir izoform olduğu ise, gp91^{phox} ve p47^{phox} alt ünitelerinin saptanmasıyla anlaşılmıştır (93,95). Platelet NADPH oksidaz kaynaklı endojen süperoksit, platelet ektonükleotidaz aktivitesini azaltarak, adenindinükleotid biyoyararlanımını arttırdığı ve trombüs üzerinde platelet birikimine eğilim oluşturduğu saptanmıştır (93). Süperoksit anyon endotel ve platelet hücre sentezleri birbirlerine benzer miktarlarda olup, nötrofillerce sentezlenen süperoksit anyonu miktarının %1'inden azdır (93). Plateletlerde süperoksit oluşumunun diğer mekanizmaları eNOS, XO ve fosfolipaz A2'dir (12) (Şekil 5).

Yapılan yeni çalışmalarda, platelet aktivasyonu sonucu oluşan phosphotidylinositol 3 kinaz aktivitesinin, p67^{phox}'un hücre zarı translokasyonunu uyardığı dolayısıyla, endojen süperoksit oluşumunu kontrol ettiği görülmüştür (96). Phosphotidylinositol 3 kinaz ve proteinkinaz C enzimleri aktivasyon ve inhibisyonu sonucu platelet süperoksit oluşumunda artış ve azalış gözlenmiştir (97). Endotel hücre zarında olduğu gibi, platelet hücre zarı depolarizasyonu da süperoksit oluşumunu

arttırır. Dolayısıyla platelet hiperpolarizasyonu ile ROT salınımı ve platelet-endotel adezyonu önlenir (12)(Şekil 5).



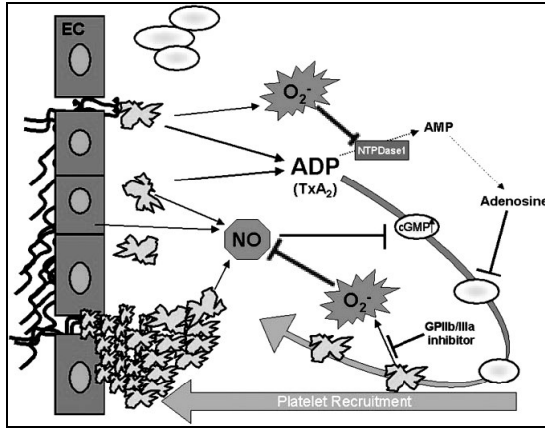
Şekil 5: Damar endotel hücreleri ve plateletlerdeki enzimatik ROT kaynakları (12).

c)Platelet Sinyal İletiminde ROT'un Rolü:

Reperfüzyon sağlanmış dokuda, kollajen ile etkileşen plateletlerin 1-2 dakika içinde kümeleştiği ancak endojen ROT oluşumunun 3-5 dakika sonra gerçekleştiği görülmüştür. Dolayısıyla ROT; erken safha platelet kümeleşmesinde etkin olmayıp, geç safha adenindinükleotid biyoyararlanım artışı oluşturarak, platelet toplanması ve trombüs büyümesine katkıda bulunur (93). Aynı durum trombin reseptör aktive edici peptidde de görülmüş ve oluşan ROT'un, NO aracılı platelet çözülmesini engellediği gözlenmiştir (96). Dolayısıyla platelet kaynaklı süperoksit radikali ve NO, birbirleriyle fonksiyonel antagonizma oluştururlar. Bu duruma uygun olarak, glycoprotein IIb-IIIa (GPIIb-IIIa) inhibisyonu, süperoksit anyonunu azaltırken NO miktarını arttırır. Süperoksit anyonuna bağlı artmış platelet kümeleşmesi, NO'deki azalma ve platelet-endotel hücre zarları redoks duyarlı ekzonükleotidazların inaktivasyonu aracılığıyla gerçekleşir. ROT ile tetiklenen platelet aktivasyonu, uyarıcı molekülle ilişkili olarak antioksidan enzimlerce engellenir (93). Nötrofil NADPH oksidaz'dan kaynaklanan ekzojen hidrojen peroksit kümeleşmeyi arttırır (12)(Şekil 6).

ROT metabolizmasında yer alan antioksidan enzimler ROT'a bağlı sitotoksik etkiyi azaltırken bir yandan da oksidasyona duyarlı sinyal yollarını kontrol ederler. Bu enzimlerden biri olan glutatyon peroksidaz, hem antioksidan etki hem de NO biyoyararlanımı arttırıcı etkiyle, antiplatelet etkinlik sağlar. Süperoksit anyonu, glutatyon ile direkt reaksiyona girerek, glutatyonun indirgenmiş (GSH) ve oksitlenmiş

(GSSG) formları arasındaki dengeyi GSSG lehine kaydırır. Bu denge, protein thiol gruplarının redoks kontrolünde önemli olup, normalde GSH lehinedir ($\approx 100/1$). Dengenin GSSG lehine kayması durumunda, plateletlerde hücre içi kalsiyum artarak, uyarılara karşı olan hassasiyetin arttığı gözlenmiştir (98). GSH veya Nasetil-L sistein tatbiki ile sağlanan glutasyon takviyesinin, platelet kümeleşmesini engellediği ve NO aktivitesini güçlendirdiği gözlenmiştir (12)(Şekil 6).



Şekil 6: ROT, platelet kümeleşmesini uyararak, oluşan trombüse katkıda bulunurlar (12).

Platelet kümeleşmesinde önemli rol oynayan integrin $\alpha_{11b}\beta_3$ 'de ROT aktivitesinden etkilenir. $\alpha_{11b}\beta_3$ 'ün dış yüz uçları disülfid bağlarından zengin olup, redüksiyonla birlikte aktive olurlar. $\alpha_{11b}\beta_3$ içindeki serbest thiol grupları ekstraselüler GSH / GSSG oranıyla kontrol edilir. Bu oran 5/1 olduğunda, maksimum kümeleşme eğilimi oluşur. Plateletlerde glutasyon redüktaz benzeri bir mekanizma tanımlanmış olup, ekstraselüler GSH / GSSG dengesinin kontrolü ve platelet aktivasyonu için uygun redoks potansiyeli oluşumunda rol aldığı düşünülmektedir (99). Hücre içi β_3 kuyruğun, hidrojen peroksitle tirozin fosforilasyonu da platelet aktivasyona neden olur. Bu tirozin kinaz aktivitesi spontan platelet kümeleşmesiyle sonuçlanır (100)(Şekil 6).

Vitamin E ve C, platelet süperoksit biyoyararlanımını azaltarak, kümeleşme ve salınım reaksiyonlarında düşüş sağlarlar. Ancak bu durum insanlarda randomize klinik çalışmalarda gösterilememiştir (101).

d)In vivo platelet aktivasyonunda ROT'un rolü:

Ateroskleroz ve kardiyovasküler tromboz'a neden olan birçok risk faktörü (hipertansiyon, hiperlipidemi, hiperglisemi, sigara kullanımı, hiperhomosisteinemi), ROT aracılı endotel disfonksiyonu yapar. Plateletler, kan akımı sırasında, özgül

ağırlıklarından dolayı, egzantrik düzlemde hareket ederler ve endotel ile sürekli temas halinde bulunurlar. Bu yakın temas, endotel disfonksiyonu veya oksidan hasar durumunda platelet aktivasyonu için yüksek risk oluşturur (12). ROT; platelet aktivasyonunun yanı sıra, endotel glikokaliks yıkımı, transkripsiyonel mekanizmaların aktivasyonu ve endotel ektonükleotidazların inaktivasyonunu sağlayarak platelet-endotel adezyonunu artırırlar (102). İntravenöz SOD ve katalaz tedavisi ile periyodik akım değişiklikleri ve platelet birikiminin azaltılabilmesi, trombüs oluşumunda ROT'un direkt katılımını göstermiştir (103). Aynı şekilde XO, NADPH oksidaz ve eNOS'un da periyodik akım değişikliklerine katkıda bulunduğu gözlenmiştir. Ancak, plateletlerde kümeleşme eğilimi oluşturan redoks değişikliklerinin tümünden ROT'un sorumlu olduğunu söylemekte yanlıştır (12).

2.3.4.2. Plateletler ve Mikrodolaşım:

a) Platelet sekresyonu ve inflamasyon:

Plateletler, trombotik etkileri dışında kemotaktik fonksiyonlarıyla da inflamatuvar cevapta kritik rol oynarlar (104). Adezyon sonrası aktive olmuş plateletler, hem salgıladıkları kemotaktik faktörlerle direkt olarak etki ederler hemde bağlandıkları hücrelerin (endotel / lökosit) kemotaktik özelliklerini değiştirerek etki ederler (105).

Plateletlerde yoğun, alfa (α) ve lizozomal olmak üzere üç çeşit granül tanımlanmıştır. Platelet aktivasyonu sonrası, bu granüllerden sistemik dolaşıma bırakılan vazoaktif, inflamatuvar ve mitojenik öğeler:

i) Yoğun granüller; Serotonin, adenin nükleotidler, guanin nükleotidler, histamin

ii) Alfa granüller; β thromboglobulin (β -TG), PF-4, platelet basic protein (PBP), connective tissue activating protein-III (CTAP-III), neutrophil activating protein-2 (NAP-2), epithelial neutrophil activating protein-78 (ENA-78), platelet derived growth factor (PDGF), transforming growth factor β (TGF- β), endothelial cell growth factor (ECGF), epidermic growth factor (EGF), VEGF, insulin like growth factor-1 (IGF-1), basic fibroblast growth factor (bFGF).

iii) Lizozom; Asit proteazlar, Glikohidrolazlar.

iv) Sitoplazma; IL-1 β , CD40 Ligand

v) Lipid araçlar; PAF, TxA₂, PG E₂, lysophosphatidic acid (LPA), sphingosine-1-phosphate (sP-1), mikropartiküller

Yoğun granüller; optik yoğunlukları nedeniyle bu şekilde adlandırılmış olup, yüksek seviyede adenin-guanin nükleotidler, bipolar katyonlar ve seratonin içerirler. Dolayısıyla, degranülasyonu sonrası diğer plateletlerde bağlanma ve kümeleşme uyarılır. Seratonin'in vazokonstriktör, inflamatuvar ve özellikle lökositler için kemotaktik etkileri olup, aynı zamanda monosit aktivasyonuna neden olarak IL-16 salgılanması ve T lenfositlerin iltihabi alana göçüne neden olur. Histamin ve ATP ise platelet adezyonuna ikincil oluşan inflamatuvar süreçte rol oynarlar (105).

Alfa granüller sayı ve büyüklük olarak en önemli granül popülasyonunu oluştururlar. Hücre yüzeyine protein taşıyan tipik, salgılayıcı veziküllerdir. Spesifik platelet proteinleri olan β -TG ve PF-4, proteoglikanlar ile birlikte, alfa granüllerde bulunurlar. PF-4 tek başına lökosit kemotaksisini sağlayamazken, TNF- α ile birlikte, lökositlerin başka yüzeylere olan adezyonunda rol oynar. PF-4 aynı zamanda histamin salınımı ve eozinofil adezyonunu da sağlar. β -TG; nötrofiller, monositler ve lenfositler için kemokin görevi görür. ENA-78 ise nötrofil aktivasyonu sağlar. PDGF ve TGF- β ; büyüme faktörleri olup, makrofajlar, monositler, fibroblastlar ve düz kas hücreleri için kemotaktik fonksiyon görürler. Aynı zamanda bu büyüme faktörleri, endotel hücre oluşum ve göçünü sağlayan VEGF oluşumunu uyarırlar (106).

Lizozomlar, sitotoksik ve proteolitik enzimler (asit proteazlar, glukohidrolazlar) içerirler. Dolayısıyla, inflamasyon alanlarında oluşan platelet kümelerden bu enzimlerin salınımı, lökosit diapedezine katkıda bulunarak, inflamasyonu genişletir (107).

Sitoplazmik IL-1 β ve CD40Ligand, platelet aktivasyonu sonrası mRNA aracılığıyla sentezlenirler. IL-1 β , sitokin kaskadınının önemli araçlarından biri olup damarsal sitokin yapımını güçlü bir şekilde aktive eder. CD40Ligand ise, ICAM-1, VCAM-1 ve E selektin'in endotel yüzeyinde oluşumunu uyararak, lökosit-endotel etkileşimini kontrol eder. Aynı zamanda CD40Ligand, GPIIb-IIIa ile etkileşime girerek platelet salınımı uyarır ve kümeleşmeyi dengeler (105).

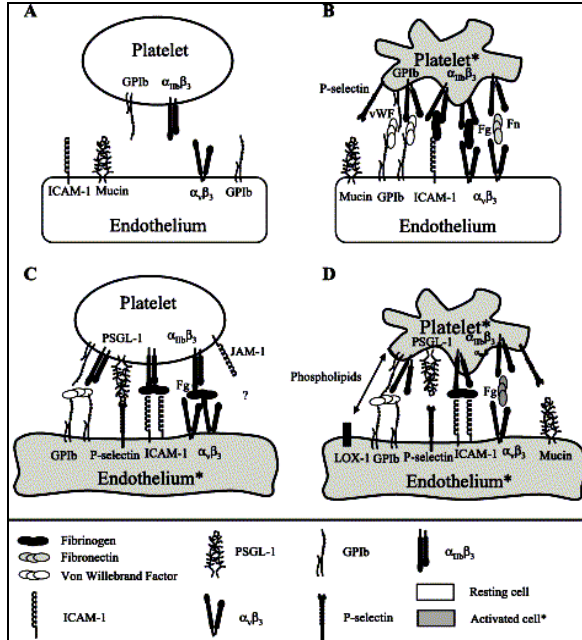
PAF, hücre zarı fosfolipidlerinden oluşan bir fosfoliserit olup, lökosit-endotel etkileşimini arttırarak lökosit diapedezini kolaylaştırır (108). TxA2, platelet hücre zarında bulunan COX-1 aktivasyonu ile araşidonik asitten oluşur ve platelet kümeleşmesi, lökosit adezyon ve diapedezini arttırır (109). Bir diğer araşidonik asit metabolizması ürünü olan mikropartiküller de güçlü inflamatuvar etki gösterirler. Bunlar, hücre zarından veziküler tarzda koparak, monosit-endotel adezyonunu arttırırlar. Dolayısıyla, endotel yüzeyinde ICAM-1 oluşumunu, monosit yüzeyinde ise

endotel ve platelet yüzeylerinde oluşan P selektin sorumludur (112). P selectin glycoprotein ligand-1 (PSGL-1), lökositler üzerinde bulunan ve lökosit-endotel, lökosit-platelet adezyonunda önemli rol oynayan bir moleküldür. Ancak PSGL-1'in platelet yuvarlanmasında etkin olmadığı düşünülmektedir. Selektinlerle oluşan platelet-endotel bağı zayıf olup, kan akımıyla birlikte yuvarlanma etkisi oluşur. Bu iki hücre arasındaki güçlü bağ ise; von Willebrand Factor (vWF) reseptör kompleksi, integrin ve immonoglobulin süper ailesi üyelerince gerçekleştirilir (105)(Şekil 8).

vWF reseptör kompleksi, platelet yüzey P selektinine karşılık gelen bir reseptördür. Bu reseptör kompleksi, hem platelet-matriks hem de platelet-endotel adezyonunu kontrol eder (113). Plateletlerin matriks proteinlerine (kollajen, vitronektin, fibronektin, laminin) olan adezyonunda vWF reseptör kompleksi ve integrinler en önemli moleküllerdir (Şekil 8).

GPIIb-IIIa ($\alpha_{11b}\beta_3$), aktif endotel yüzeyinde platelet birikimini sağlayan en önemli platelet yüzey integrinidir. Fibrinojen çözeltilisinde $\alpha_{11b}\beta_3$, plateletlerin $\alpha_v\beta_3$ içeren heterotipik hücrelerle (endotel de dahil) olan adezyonunu kontrol eder. Selektinlerden farklı olarak bu adezyon güçlü olup, kan akımından etkilenmez. Dolayısıyla $\alpha_{11b}\beta_3$, hem platelet-endotel adezyonunu hem de platelet kümeleşmesini sağlar (114). Endotel hücre lümen yüzeyinde ise çok az sayıda integrin tariflenmiştir. Bunlardan biri vitronektin reseptörü ($\alpha_v\beta_3$) olup, platelet adezyonunu uyardığında önemli rol oynar. IL-1 β ve trombinle uyarılmış endotel hücresinde oluşumu artar. Yokluğunda ise platelet-endotel adezyonu gerçekleşemez. Dolayısıyla, hem platelet $\alpha_{11b}\beta_3$ hem de endotel $\alpha_v\beta_3$ reseptörleri platelet-endotel adezyonu için elzemdir. Ancak bu iki reseptör arasında direkt etkileşim olmayıp fibrinojen köprü fonksiyonu görür (114). Sadece platelet aktivasyonunda $\alpha_{11b}\beta_3$ reseptör aktivitesi oluşur. Pasif haldeki $\alpha_{11b}\beta_3$ reseptör, sabit fibrinojene bağlanabilmekteyse de, platelet-endotel adezyonunu sağlayamaz (105)(Şekil 8)

Bir diğer adezyon molekülü ICAM-1 olup, endotel fibrinojen reseptörü olarak görev yaparak, iltihabi bölgede fibrinojen birikimi sağlar. Oluşan ICAM-1-fibrinojen kompleksi, hem lökosit-endotel hem de platelet-endotel adezyonunu uyarır. Dolayısıyla, inflamasyon bölgesi platelet birikiminde, aktif endotel yüzey vitronektin reseptörü ve ICAM-1 elzemdir (105). Platelet yüzeyinde tespit edilen JAM-1 ve JAM-3 adezyon molekülleri de platelet-endotel adezyonunda etkin rol oynarlar (115)(Şekil 8).



Şekil 8: Platelet-endothel adezyonunda rol oynayan adezyon molekülleri ve reseptörler (105).

ii) Platelet ile oluşmuş endothel aktivasyonu:

Adezyon sırasında uyarılmış plateletlerden salgılanan inflamatuvar ve mitojen maddeler, endothel hücrenin adezyon, proteoliz ve kemotaksis özelliklerini değiştirir. Platelet adezyonu sonrası oluşan fenotipik endothel değişiklikleri, monositlerin inflamatuvar alan adezyon ve göçüne neden olur (105).

Endotel aktivasyonu sağlayan platelet kaynaklı inflamatuvar proteinler arasında en önemlisi IL-1β olup, aktif endothel hücrenden IL-6, IL-8 ve MCP-1 gibi kemotaktan maddelerin salınımına neden olur. IL-1β aynı zamanda, endothel hücre yüzeyi adezyon molekülleri olan ICAM-1 ve α_vβ₃ oluşumunu güçlü şekilde uyarır. Dolayısıyla, platelet IL-1β aktivitesi sonucu endothel hücre kemokin ve adezyon molekülleri oluşumu artarak monosit ve nötrofillerin endotele bağlanması uyarılır. IL-1β'ya bağlı endothel ICAM-1 ve MCP-1 oluşumu NF-κB üzerinden olmaktadır. IL-1β, endothel hücre inhibitory κB (IκB) aktivitesini azaltarak, NF-κB'nin aktif hale dönmesini sağlar. Dolayısıyla IL-1β, transkripsiyon faktör NF-κB'nin platelet bağımlı aktivasyonunun moleküler belirleyicisidir (105). RANTES, bir diğer platelet kaynaklı kemokin olup, inflamatuvar ve aterosklerotik bölgelerde monosit birikimini tetikler. RANTES bu birikimi P seletin aracılığıyla gerçekleştirir (105). CD40Ligand, 30-33-kDa protein olup, sitokinlerin TNF ailesi içinde yer alır. Önceleri, CD40Ligand'ın sadece T lenfositler, mast hücreleri ve bazofillerde yer aldığı düşünülmekteyken,

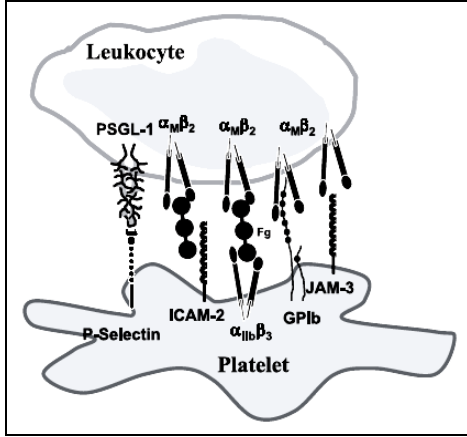
platelet sitoplazmasında da yoğun miktarda buldukları saptanmıştır. Platelet aktivasyonu sonrası yüzeyde oluşan CD40Ligand ile endotel yüzey CD40 molekülü etkileşimi, endotelden nötrofil ve monosit kemotaksisinin en önemli araçları olan MCP-1 ve IL-8 salınımına neden olur. Aynı zamanda bu etkileşim endotel yüzeyinde adezyon molekülleri (E selektin, VCAM-1, ICAM-1) oluşumunu da artırır. Dolayısıyla, IL-1 β gibi CD40Ligand da endotel hücre kemokin ve adezyon molekül sentezini artırarak nötrofillerin iltihabi alanda toplanmasını sağlar (105).

Endotel hücre, düz kas hücresi ve makrofaj yüzey CD40 aktivasyonu sonucu matriks yıkım enzimleri olan metalloproteinazların yapım ve salınımının arttığı gözlenmiştir. Bu enzimler inflamatuvar alanda yıkım ve yeniden şekillenmeyi sağlarlar. Endotel CD40 aktivasyonu, metalloproteinaz-9 ve urokinase-type plasminogen activator receptor (uPAR) oluşum ve salınımı artırır. Platelet CD40Ligand oluşum ve aktivasyonu GPIIb-IIIa ile kontrol edildiğinden dolayı CD40Ligand'a bağlı inflamatuvar etkiler GPIIb-IIIa adezyonu sonrası gerçekleşir. Dolayısıyla GPIIb-IIIa blokajı aynı zamanda CD40Ligand ile oluşan iltihabi olayları da baskılayabilir (116).

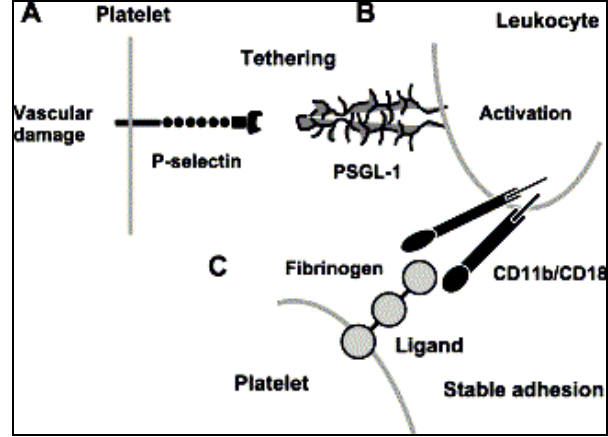
c)Platelet-lökosit etkileşimi:

Platelet-endotel ve platelet-matriks adezyonu, platelet aktivasyon ve kemokin salınımına neden olarak lökositlerin platelet birikim alanlarına göçünü sağlar. Platelet adezyon bölgelerinde platelet-lökosit ve lökosit-fibrin etkileşimi ile lökosit infiltrasyonu gerçekleşir (105). Platelet-lökosit adezyonu da; zayıf bağlanma, yuvarlanma ve adezyon aşamalarını içermekte olup, sırasıyla; platelet P selektin ve ICAM-2 molekülleri ile lökosit PSGL-1 ve CD11b/CD18 molekülleri arasında etkileşimi gerektirir (117). Bu etkileşimde, fibrinojen köprü rolü oynar. Yapılan son çalışmalarda platelet GPIIb ve JAM-3 molekülleri ile lökosit CD11b/CD18 moleküllerinin de bu etkileşiminde rol oynadıkları gösterilmiştir (118)(Şekil 9).

P selektin-PSGL1 adezyonu sonrası lökositlerde tirozin artıklarının fosforilasyonu ve MAP-kinaz aktivasyonu oluşarak, β 2 integrin aracılı ICAM-1 hücre adezyonu gerçekleşir. Buna ek olarak, platelet aktivasyonu sonucu monosit kaynaklı sitokin ve kemokin (IL-1 β , MCP-1, IL-8) oluşumu artar. Bu olay, platelet P selektinin monosit hücre yüzeyi etkileşimiyle gerçekleşir. Endotel hücre yüzey proteini olan P selektin ve platelet hücre zarı kaynaklı PAF ortaklaşa etkiyle myeloid β 2 integrin aktivitesinde değişiklik oluştururlar (105)(Şekil 10).



Şekil 9: Platelet-lökosit adezyonu (105).



Şekil 10: Platelet P seletin aracılı lökosit aktivasyonu (105).

Dolayısıyla plateletler; lökositlerin iltihabi alanda toplanmasında ve aktivasyonunda önemli rol oynarlar.

2.3.5. Nitrik Oksit:

Bir diatomik serbest radikal olan NO, L-arginine guanidinium grubundan olan NOS aktivitesiyle endotel mitokondrisinde sentezlenir (119). Üç NOS izoformu tariflenmiştir ve hepsi NO sentezi sırasında NADPH ve O₂ kullanır. NOS izoformları da constitutive NOS (cNOS) ve iNOS olarak iki gruba ayrılır. Ancak bazı hücrelerde cNOS'un indüklendiği, bazı hücrelerde ise iNOS'un yapısal olarak bulunduğu gözlenmiştir. İlk tariflendiği hücre tipi ve tam aktivasyon için kalsiyuma bağımlı olup olmadığına göre daha ileri bir NOS sınıflaması da vardır. Böylelikle cNOS denildiğinde, kalsiyum bağımlı, eNOS (endotel hücresi) ve nNOS (sinir hücresi) izoformları kastedilir (120).

NO'ye bağlı direkt ve indirekt etkiler mevcut olup, doku NO yoğunluğuna göre farklılık gösterir. Direkt etkiler düşük doku yoğunluklarında, indirekt etkiler ise yüksek doku yoğunluklarında gözlenir. NO'ye bağlı indirekt etkiler, NO'in oksijen ve süperoksit ile etkileşimi sonucu ortaya çıkan reaktif nitrik asit türleri (dinitrite dioksit, peroxy nitrite) aracılığıyla gerçekleşir. NO'in direkt etkinliği cNOS izoformu tarafından tayin edilirken, indirekt etkinlik iNOS izoformuna bağlıdır (121).

NO'in doku koruyucu özellikleri; vasküler tonus kontrolü, platelet agregasyonunun engellenmesi, lökosit-endotel etkileşiminin azaltılması, dolaşımdan serbest radikallerin temizlenmesi, seçici damarsal geçirgenliğin düzenlenmesi, düz kas

hücre proliferasyonunun engellenmesi, bağışıklık sisteminin aktivasyonu ve endotel hücre rejenerasyonunun uyarılmasıdır. Aynı zamanda iskemik dokularda SOD aktivitesini etkileyerek hidrojen peroksit birikimini azaltır (121).

İ-R hasarına bağlı gelişen endotel hücre disfonksiyonunda, NO sentezinde azalma oluşarak İ-R hasarı derinleşir. Endotel disfonksiyonuna bağlı NO azalma mekanizması hala tam olarak gösterilememiştir (6).

Doku reperfüzyonuyla birlikte; SOR oluşumunda patlama, NO seviyesinde azalma ve SOD / katalaz enzim aktivitesinde düşme gerçekleşir. Böylelikle, süperoksit ve NO arasındaki denge süperoksit lehine kayar. Bu denge kaybı; NO bağımlı vazodilatasyonda azalma ve nötrofil-endotel adezyonu ile platelet agregasyonunda artışa ikincil “no reflow” fenomenine eğilim oluşturur. Buna ek olarak, NO yokluğunda süperoksit-hidrojen peroksit dönüşümü kolaylaşarak inflamatuvar aracılardan (PAF ve LT-B4) sentezinde artış oluşur (6).

NO aynı zamanda, transkripsiyonel faktörleri kontrol ederek de proinflamatuvar proteinlerin sentezini etkiler. Bu transkripsiyonel faktörlerden biri de NF- κ B olup, İ-R hasarına katkıda bulunan TNF- α , TNF- β , interleükinler (IL-1 β , IL-2, IL-6, IL-11, IL-12, IL-17), kemotaktik moleküller (IL-8, MAP-I, MCP-I, RANTES), enzimler (iNOS, indüklenebilen COX) ve adezyon molekülleri (ICAM-1, VCAM-1, P selektin, E selektin)’nin sentezinde rol oynar. NF- κ B’yi birçok faktör kontrol etmekteyse de en önemli faktör iskemik dokunun reperfüzyonudur (122). NO, inhibitör protein I κ B α ’nın fosforilasyonunu ve dolayısıyla NF- κ B’e bağlanmasını artırarak NF- κ B inhibisyonu sağlar (6). SOR ise protein kinaz C üzerinden NF- κ B’i aktive eder (123). Dolayısıyla NO; SOR inaktivasyonu yoluyla NF- κ B aktivasyonunu engellerken, inhibitör protein I κ B α fosforilasyonu yoluyla da NF- κ B inhibisyonunu güçlendirmektedir. Reperfüzyon döneminde NO azalması ile I κ B α - NF- κ B etkileşimi ve I κ B α sentezinde azalma ve dolayısıyla NF- κ B aktivasyonu oluşur. Sonuç olarak NO azalması endotel disfonksiyonu ve nötrofil aracılı doku hasarıyla birliktelik gösterir (6).

2.3.6. Mitokondri:

Mitokondri, oksidatif fosforilasyon yoluyla hücreye ATP sağlar. Çift zar yapısına sahip olup, iç zar elektron taşıma zinciri öğelerini içerir. Uzun süreli iskemi, elektron taşıma komplekslerinin tüm alt ünitelerinde fonksiyonel ve yapısal hasara yol açmakla birlikte, iskemik hasara en hassas olan alt üniteler NADPH dehidrogenaz ve

ubiquinol cytochrome c reductase sistemleridir. Doku reperfüzyonuyla birlikte, elektron taşıyıcı komplekslerde hasar artarak hücre içi ve dışına elektron sızıntısı oluşur. Mitokondri aynı zamanda, hidrojen peroksit için önemli bir kaynak oluşturur (1).

2.3.7. Kompleman sistemi:

İ-R'a bağlı kompleman aktivasyonu, damarsal hemostazı etkileyen inflamatuvar aracı maddelerin oluşumuyla sonuçlanır. Bu aracı maddelerden en önemlileri; Kompleman3a ve Kompleman5a gibi anafilotoksinler ile inaktifKompleman3b ve Kompleman5b-9 gibi kompleman sistem unsurlarıdır (2). Kompleman5a; Kompleman3a'ya oranla 20 kat daha güçlü olup, hem lökosit aktivasyon ve kemotaksisini hem de IL-1, IL-6, MCP1 ve TNF α gibi inflamatuvar araçların sentezini artırır. Kompleman5b-9 ve inaktifKompleman3b, endotel fonksiyon değişikliklerine neden olurlar. Kompleman3b parçalanması sonucu oluşan inaktifKompleman3b, lökosit CD11b/CD18 (MAC-1) yüzey molekülü için endotel üzerinde bir adezyon alanı oluşturur. Kompleman5b-9 ise; transkripsiyonel faktör NF- κ B aktivasyonu aracılığıyla VCAM-1, ICAM-1, E selektin ve P selektin adezyon moleküllerinde artış, endotel hücre kaynaklı IL-8 ve MCP-1 salınım artışı ile lökosit aktivasyonu ve endotel hücre cyclic guanosinemonophosphate düzeyinde düşüş ile endotel bağımlı vazodilatasyonda inhibisyon oluşturur (124). Dolayısıyla İ-R'a bağlı kompleman sistem aktivasyonu, vasküler hemostaz değişiklikleri ve lökosit-endotel adezyon eğilimi oluşturarak, doku iskemisini derinleştirir (2).

2.4. İskemi-Reperfüzyon Sonrası Oluşan Vasküler Disfonksiyon:

2.4.1. İskemi-Reperfüzyona Lokal Mikrovasküler Yanıt:

Endotel hücreleri, damarsal hemostazın (akım, seçici geçirgenlik ve hücre trafiği) sağlanmasında hayati ve dinamik bir görev üstlenir. Bu hücreler hem iskemi hem de reperfüzyona çok hassastırlar. Uzun süreli hipoksi; hücre zarı potansiyel değişiklikleri, iyon dağılımı bozuklukları ve akışkanlıkta azalma ile hücre içi hacim artışı ve hücre iskeleti organizasyon bozuklukları oluşturur (5). Hipoksi, endotel hücresi bazı genlerinde (adezyon molekülleri, sitokinler) aktivasyon, bazılarında (NOS, trombomodulin) ise baskılanmaya neden olur (125). Doku reperfüzyonu ile birlikte,

iskemik endotel değişiklikleri belirginleşerek, İ-R alanına lokalize endotel disfonksiyonu gelişir (126).

Uzun süren iskemi ve sonrasındaki reperfüzyonu takiben oluşan morfolojik değişimler; hücresel şişme, membran depolarizasyonu, pinositotik vezikül kaybı, endotel hücre bazal membran ayrılması ve aktive olmuş lökositlerin (özellikle nötrofiller) endotel hücre yüzeyine yapışmalarıdır (127). Hücresel şişme, etkenden bağımsız tüm hücresel hasar modellerinin ortak patolojik görüntüsü olup, İ-R sonrası tüm endotel hücrelerinde gelişir. Patofizyolojisinde; oksidatif hücre zarı hasarı, iyon hemostaz bozukluğu ve osmotik stres suçlanmaktadır. Yapılan son çalışmalar; İ-R hasarına bağlı hücresel şişmede, hacim hemostazı sağlayan hacim kontrollü anyon kanalları disfonksiyonunun en önemli etken olduğu yönündedir (128). İ-R hasarına bağlı gözlenen bir diğer öncelikli değişiklik hücre zarı depolarizasyonu olup, etiolojisinde ATP bağımlı sodyum-potasyum kanal inaktivasyonu sorumlu tutulmakla birlikte, yapılan son çalışmalar akım kontrollü potasyum kanal disfonksiyonunu işaret etmektedir (129). Dolayısıyla, hücre zarı ve iskeleti değişikliklerinde ROT'un ATP yetersizliğine göre daha etkin rol oynadığı düşünülmektedir (9).

ROT ile oluşan İ-R hasarı; etkilenen dokuya, antioksidan mekanizmaların etkinliğine ve İ-R'un süre-şiddetine göre farklılık gösterir. ROT, şiddetli İ-R hasarında, B-cell leukemia/lymphoma-2 (Bcl-2) gibi antiapoptoz genlerinde inhibisyona neden olarak hücre apoptozuna eğilim oluşturur (9).

a)İ-R'un arteriol üzerine etkisi:

İ-R hasarının arteriollerdeki primer göstergesi endotel bağımlı vazodilatasyonda bozulma ve hiperreaktivitedir. Endotel bağımlı vazodilatasyon NO aracılığıyla oluşur. NOS enzimi; NADPH ve tetrahidrobiopterin (BH4) varlığında, L arginin'i NO ve sitrulin'e çevirir. NOS ve arginaz enzimleri, endotel hücrelerinde L arginin substratı için yarışır. İ-R'u takiben arginaz aktivitesindeki artış L arginin depolarında azalmaya neden olur. İ-R hasarında BH4'de azalır. Dolayısıyla bu iki durum NO sentezinde azalma ile sonuçlanır. İ-R erken döneminde, direkt düz kas üzerinden etki eden endotelden bağımsız vazodilatasyon sistemleri etkilenmez. Endotel bağımlı vazodilatasyon azalmasının en çok reperfüzyon döneminde gerçekleşmesi, ROT'un önemli bir faktör olduğunu gösterir. Dolayısıyla antioksidan tedavi, arteriol vazodilatasyon cevabın korunmasında önemli rol oynar. Lökositler, arteriol fonksiyon bozukluğunda, venöz kapiller hasarında olduğu kadar önemli rol oynamazlar. Ancak

süreğen lökosit aktivasyon ve birikimi, ROT oluşumuna katkıda bulunarak, arteriol hasarı artışına neden olur (9).

İ-R hasarı sonrası endotel bağımlı arteriolar vazodilatasyonun erken dönemde, düz kas fonksiyonunun ise geç dönemde kaybolduğu gözlenmiştir. Dolayısıyla uzamış iskemide dokuların reperfüzyonu zordur (130). Aynı zamanda arteriol boyutunun İ-R'a olan cevabı etkilediği, çap arttıkça etkilenme miktarının arttığı gözlenmiştir (131). İ-R'a olan arteriol cevabı aynı zamanda dokudan dokuya da değişiklik gösterir, örneğin; sinir sistemi çok hassas iken böbrek dokusu arteriollerini oldukça dirençlidir (9).

Sonuç olarak, İ-R'a bağımlı arteriol disfonksiyonundan tek bir mekanizma sorumlu olmayıp, bazılarında göre pH bağımlı denaturasyon ve proteolize ikincil gelişen eNOS inhibisyonu (132), bazılarında göre ise azalmış yırtıcı kuvvetler (133) arteriol disfonksiyonundan sorumlu temel mekanizma olarak kabul edilmektedir (Tablo 1)

b)İ-R'un arteryel kılcallar üzerine etkisi:

Arteryel kılcal endotelinde İ-R hasarının klinik yansıması; interstisyel dokuya artmış sıvı filtrasyonu ve doku perfüzyonunu sağlayan kılcal damar sayısında azalma şeklinde olur (9). Artmış interstisyel sıvı filtrasyonu, intrakapiller basınç artışından çok endotel bariyer hidrolik geçirgenlik artışına bağlıdır. İ-R hasarı sırasındaki azalmış NO biyoyararlanımı, kapiller sıvı filtrasyonunu açıklar (134).

Doku reperfüzyonu sonrası, tıkanmaya bağlı, arteryel kılcallardaki azalma, doku perfüzyonunu daha da bozarak İ-R hasarı artışına neden olur. Bu arteryel kılcal tıkanlıklar; karaciğer İ-R hasarında olduğu gibi, lökosit-endotel etkileşimi sonrası gelişen hücresel şişme, iskelet değişiklikleri (elastikiyet azalması), bazal membran ayrılması ve lökosit rijiditesi ile karakterize intraluminal konjesyon sonucu oluşur. Diğer dokulardaki arteryel kılcal tıkanlıklarından ise; venöz kılcallardaki geçirgenlik artışına ikincil gelişmiş interstisyel ödem ve hidrostatik basınç artışı ile oluşmuş arteryel kılcal mekanik basısı (interstisyel ödem ve vasküler kompresyon) sorumludur. Dolayısıyla reperfüzyon sonrası arteryel kılcal tıkanlıklardan intraluminal konjesyon ve interstisyel ödeme bağlı vasküler kompresyon sorumludur (135). Her iki mikrovasküler disfonksiyon mekanizması lökosit-endotel adezyonu temelinde gerçekleşir. Aynı zamanda lökosit kaynaklı ROT da bu disfonksiyona katkıda bulunur. Dolayısıyla lökosit-endotel adezyonunun engellenmesi (136) ve antioksidan tedaviyle (130) mikrovasküler disfonksiyonda azalma sağlanabilir (Tablo 1)

İ-R hasarına bağlı artmış kapiller endotel geçirgenliği, moleküler seviyede, kavşak adezyon molekülleri (kaderinler) disfonksiyonu ve hücre iskelet değişikliklerine bağlıdır (137). Reperfüzyon periyoduyla birlikte belirginleşen lökosit-endotel etkileşimi ve sonrasında gerçekleşen lökosit diapedezi, kavşak adezyon moleküllerinde çözülme ve endotel bariyer disfonksiyonu oluşturur (138). Akciğer İ-R hasarında, endotel bariyer disfonksiyonuna bağlı pulmoner ödem gelişir. NO tedavisiyle endotel bariyer fonksiyonlarında korunma sağlandığı gösterilmişse de, NO ve ROT etkileşiminin (peroksinitrit) kendisi de endotel bariyer disfonksiyonu oluşturur (139). Aynı şekilde PG E2, PG I2 ve antikompleman tedavisiyle İ-R'a bağlı endotel bariyer disfonksiyonu azaltılabilmektedir (140).

Heparin binding protein (HBP) (CAP37); nötrofil granül proteinlerinden olup, kalsiyum bağımlı hücre iskelet değişiklikleri ve makromolekül sızıntısına neden olur. İlginç olarak endotel hücrelerinin de HBP sentezlemeleri, bunun bir tür otoregülasyon mekanizması olduğunu düşündürür (141).

Doku iskemisi sırasında birçok endojen koruyucu mekanizma endotel bariyerini onarmaya çalışır. Aktive olmuş nötrofillerden salgılanan glutamat ve adenin nükleotidler (endotel yüzeyinde adenezine çevrilir) damarsal geçirgenliği kontrol eder. Adenozin endotel hücreleri arasındaki bağı kuvvetlendirip geçirgenliği azaltır. Dolayısıyla nötrofil kaynaklı koruyucu adenozin salınımı ve hipoksiyle indüklenmiş ekstraselüler ATP metabolizma ve transkripsiyonu (apyraz, 5'-ektonükleotidaz ve adenozin A_{2B} reseptörleri) ekstraselüler adenozin miktarını arttırarak, hipoksik hasara karşı hücre geçirgenliğinde kontrollü bir koruma sağlar (2).

c)İ-R'un venöz kılcallar üzerine etkisi:

İ-R hasarına bağlı venöz kapiller değişiklikleri; genel olarak, lökosit lokalizasyonu, adezyon, diapedez ve ROT salınımıyla ilgilidir. Venöz kılcalların iskemiye olan cevabında nötrofiller baskın lökosit sınıfı olup, hasarı direkt etkileri (göç sırasında kavşak adezyon moleküllerinde ayrılma) ve diğer hücrelerle olan etkileşimlerine ikincil indirekt etkileri aracılığıyla oluştururlar. Bu etkiler sonucunda hücre zarı makromolekül geçirgenliği artar. Artmış endotel geçirgenliği ve azalmış intravasküler hacim, yaygın doku ödemi ve hemodinamik instabilite gibi lokal/sistemik sonuçlar doğurur (9). Lökosit yuvarlanma, adezyon ve diapedezinde mevcut mekanizmaların blokajıyla, endotel bariyer fonksiyonunda düzelme ve doku ödeminde azalma saptanmıştır (142). Yapılan çalışmalarda, lökositlerin endotel üzerinde

yuvarlanmasının kan akım hızı azaldıkça arttığı ancak lökosit-endotel adezyonunun kan akım hızından etkilenmediği saptanmıştır (143). Aynı şekilde heme-oksijenaz enzim blokajıyla, lökosit yuvarlanması ve dolayısıyla lökosit aracılı mikrovasküler hasarda azalma gözlenmiştir (144). Lökositler aynı zamanda platelet adezyonu oluşturarak, mikrodolaşımda platelet birikimi ve konjesyona neden olurlar. Bu sırada oluşan trombüs de lökosit yuvarlanma-adezyonunu artırarak İ-R hasarına katkıda bulunur dolayısıyla antitrombotik ajanlar terapötik etkinliğe sahiptirler (145)(Tablo 1).

İ-R'da NO oluşumundaki azalma, lökosit adezyon ve hücre zarı makromolekül geçirgenliğini artırır. Dolayısıyla, NO takviyesi (sodyum nitroprusside) ile İ-R'a karşı endotel koruyuculuğu oluşturulabilir. Mevcut NO ile süperoksit anyonu reaksiyonu peroksinitrit oluşumuyla sonuçlanır. Bu molekül sitotoksik olup oksidan hasarın önemli araçlarından. Ancak, peroksinitrit aynı zamanda P selektin oluşumunu azaltarak reperfüzyon hasarından koruyucu etki de sağlar (9).

Venöz kılcallar, eklenmiş nötrofil ROT oluşumu nedeniyle, oksidan stresin en yoğun görüldüğü vasküler kompartmandır. Venöz kılcallardaki endotel, lökosit ve plateletlere bağlı oksidan hasar hücre zarı geçirgenliğini maksimum hale çıkartır (9).

	ARTERİOL	ARTERYEL KILCALLAR	VENÖZ KILCALLAR
Primer Patoloji	Yetersiz vazodilatasyon	Azalmış doku perfüzyonu İnterstisyel alana sıvı kaçıışı	Artmış hücre zarı geçirgenliği
Mekanizma	→Değişken doku cevabı: .damar çapı .doku türü →Azalmış NO sentezi: .substrat ve kofaktör yetersizliği .ROT direkt etkileri	→“No reflow” fenomeni: .platelet ve lökosit adezyonu →Kompresyon: .artmış hidrolik geçirgenlik .interstisyel ödem	→Lökosit adezyonu: .endotel hücre yüzeyi adezyon molekülü oluşumu →Bariyer disfonksiyonu: .lökosit göçü →Oksidan hasar: .ROT patlaması
Sonuç	Artmış vasküler rezistans	Bozulmuş doku perfüzyonu ve ödem	Hemodinamik dengesizlik

Tablo 1: İ-R hasarında damarsal değişiklikler (9)

2.4.2. Nitrik Oksit-Süperoksit Denge Kaybı Teorisi:

İ-R hasarına bağlı oluşan mikrovasküler disfonksiyonun çoğundan süperoksit anyonu ve NO'e olan değişmiş endotel cevabı sorumludur. İ-R hasarı; NO-süperoksit

denge-sizliği oluşturarak, arteriollerde endotel bağımlı vazodilatasyon, venöz kılcallarda ise inflamatuvar cevap oluşturur. Normal şartlarda NO üretimi süperoksit üretimine göre çok daha fazladır. Bu durum; hücre içi süperoksit anyonlarının NO ile rahat bir şekilde temizlenmesini, düz kas guanilat siklaz aktivitesi ile arterial tonus azalmasını, platelet kümeleşme ve trombüs oluşumunun engellenmesini ve lökosit-endotel etkileşiminin minimuma indirgenmesini sağlar. Reperfüzyon dönemiyle birlikte NO/süperoksit dengesi süperoksit lehine kayar. Bu durum, hem artmış endotel/lökosit süperoksit sentezi hem de azalmış endotel NO sentezi sonucunda gerçeleşir. NO ve süperoksit etkileşimi, biyoaktif NO seviyesini iyice azaltarak, optimal doku perfüzyonu ve NO bağımlı vazodilatasyonun daha da bozulmasına neden olur. Süperoksit, NO ile SOD'a göre çok daha hızlı etkileşime girer (9).

Süperoksit birikimi artmış hidrojen peroksit oluşumuyla sonuçlanır. Her iki reaktif oksijen metaboliti de venöz kılcallarda inflamatuvar cevabın oluşması ve devamında önemli rol oynar. Bu etkiyi, fosfolipaz yollu PAF oluşumu, endotel hücre yüzeyinde kompleman birikim ve aktivasyonu ile P selektin'in endotel yüzey ifadesinde artışla oluştururlar. Aynı zamanda ROT, E selektin ve ICAM-1 gibi adezyon moleküllerinin genetik kodlanmasını arttırarak lökosit-endotel adezyonunun sürdürülmesinde önemli rol oynarlar. Bu genetik kodlama artışını NF-κB ve Activator protein-1 gibi transkripsiyonel faktörler aracılığıyla sağlarlar (9).

2.5. İskemi Reperfüzyon Sonrası Oluşan İskelet Kası Hasarı:

2.5.1. Tarihçe:

1881 yılında Volkman tarafından tariflenen ve kemik kırığı takiben oluşmuş iskemik kontraktür, muhtemelen belirlenmiş ilk kas iskemisi komplikasyonudur. Yapılan hayvan deneylerinde; 1926'da Jepson, alt ekstremiteye turnike uygulanımı sonrası ödem oluştuğunu, 1945'de ise Dennis, oluşan bu ödeme fasyatomi ile müdahalenin klinik düzelme sağladığını göstermişlerdir. Ancak fasyatomi popülerliğini, 1964'de Patven, Pavlos ve Shires tarafından 76 iskemik alt ekstremite hastasında kas ödeminin çözmek için kullanıldığında elde etmiştir (13).

şok sonrası toksik molekül oluşumunun, ilk kez 1920 yılında Cannon tarafından tariflenmesi, reperfüzyon hasarında ilk adım olmuştur. 1937'de ise Husveldt ve Bjerling tarafından travmatik şoku takiben böbrek hasarı tariflenmiştir. İkinci dünya savaşı

sonrası Bywaters tarafından yayınlanan geniş bir seride ekstremite ezilmesini takiben oluşan böbrek yetmezliği tablosu ile reperfüzyon hasarı üzerinde durulmuştur (13).

İskemik ekstremite revaskülarizasyonu ile oluşabilecek risk, ilk kez 1960 yılında Haimovici tarafından “myonefropatik-metabolik sendrom” olarak tariflenmiştir (146). 1969 yılında, iskemik ekstremite revaskülarizasyonunu takiben %85’lik mortalite tariflenmiş olup Haimovici’den farklı olarak mortalitenin kardiyopulmoner nedenlere bağlı olduğu gözlenmiştir (147).

2.5.2. Ekstremitte İskemi Reperfüzyonu’nun Patofizyolojisi:

İskemiye karşı olan tolerans dokunun türüne ve kollateral dolaşım varlığına göre değişir. Normotermik doku iskemisinde geri dönüşümsüz hasar; kasta 4.saatte, sinirde 8.saatte, yağ dokusunda 24.saatte ve kemikte yaklaşık 4.günde oluşur (13).

a)Kas değişiklikleri:

İskelet kası, ekstremitayı oluşturan primer kütle olup aynı zamanda iskemik hasara en hassas dokudur. Dolayısıyla iskelet kası hasarı ekstremita reperfüzyon hasarının en önemli bölümünü oluşturur (13). Kas ölümü sonrası makroskopik ve mikroskopik değişiklikler minimal olduğundan kas ölüm zamanını belirtmek zordur. İskemiye takiben yaklaşık üçüncü saatte ciddi kas hasarı ve altıncı saatte yaklaşık %97’lik fonksiyonel doku kaybı olduğu spektrofotometrik (triphenyltetrazolium chloride) yöntemlerle gösterilmiştir. Dolayısıyla geri dönüşümsüz zedelenme zamanının tayininde spektrofotometre önemlidir (148). Kas nekrozu ve ATP deposu azalması arasında yakın ilişki saptanmıştır. İskemik kas dokusunda öncelikle glikojen ve kreatin fosfat azalırken bu safhada çok fazla myonekroz oluşmaz. Sonrasında, ATP azalmasıyla birlikte, kas nekrozu hızla artar. 6 saatlik kas iskemisi sonucu, normal kas dokusu ATP deposunda %80 azalma ve kas dokusunun tümünde nekroz oluşur (149).

Kas fiberleri, içerdikleri myogloblin miktarına bağlı olarak, kırmızı (tip 1) ve beyaz (tip 2) olarak sınıflandırılır. Çoğu kas her iki türü de içermekteyse de bir tip daha baskın bulunur. Örneğin bacağın ön kompartmanında daha çok tip 1 veya yavaş kasılan fiberler baskın olup, enerji üretiminde aerobik metabolizmayı kullanmaları bu kas grubunu iskemiye daha hassas kılar. Bacağın arka kompartmanında ise tip 2 veya hızlı kasılan fiberler baskın olup, enerji üretiminde anaerobik metabolizma ön plandadır (13). İskeminin süresi ve etkilenen fiber tipi iskemik hasarda önemli olmakla birlikte

dokunun vücuttaki konumu da önemlidir. Örneğin, çabuk soğuma nedeniyle, distal ekstremite kas dokusu proksimal kas dokusuna göre iskemiye daha dirençlidir (13).

b) Mikrodolaşım Değişiklikleri:

Mikrodolaşım değişiklikleri, iskemik dönemde gerçekleşir ve iskemi süresi ile uyum gösterir. İskemi, ilk olarak kapiller endotel hücreleri etkileyerek, hem lümen hem de sitoplazmaya doğru uzanan parmaksı çıkıntılar oluşturur. İskeminin devamıyla birlikte endotel veziküllerinde artış oluşur. Bu arada, hücreler arası bağlar zayıflar ve geçit genişler. Heterojen dağılımlı endotel hücre ödemi oluşarak kırmızı küre sıkışmasını arttırır. İskeminin dördüncü saatinden sonra mikrosirkülasyonda hücrel etkileşimler(eritrositik, trombositik ve lökositik) başlar. Venöz ve arteryel kılcallar, reperfüzyon öncesinde, sıkışmış eritrositlerle kapanmış görünümde idirler. Rulo halindeki eritrosit kümeleri, erken reperfüzyon döneminde, endotel yüzeyde hasarlanma oluştururlar. Endotel hücre sitoplazmasındaki parçalanma sonucu hücreler arası büyük geçitler oluşur. Reperfüzyonla birlikte, özellikle venöz kılcallarda, lumen içi platelet ve fibrin kümeleri ile karakterize trombotik komplikasyonlar oluşur. Bu platelet kümeleri, endotel yüzde olan geniş defektleri kapatır. Venlerde lökosit diapedezi oluşurken, venöz kılcallarda lökositlerin lenfosit ve monositlerle olan kümeleşmesi oluşur (13).

İskemi süresi uzadıkça damarsal geçirgenlik artışı ve ilerleyici interstisyel ödem oluşur. Yapılan bir çalışmada, 4 saatlik iskemi sonrası kas ağırlığının arttığı ve bu ağırlığın reperfüzyonun üçüncü saatinde maksimuma çıktığı belirtilmiştir (150).

c) “No reflow” fenomeni:

İlk kez Brooks ve arkadaşları tarafından 1922’de, hayvan deneyinde, bu durum gözlenmiş ve patofizyolojik olarak tarif edilmiştir (151). Ancak, “no reflow” teriminin ilk kez kullanımı, Ames tarafından, 1968’de iskemik beyin hasarında olmuştur (152).

Kas iskemisi ilerlediğinde kası besleyen damarda kalıcı tıkanıklık oluşur. Dolayısıyla “no reflow” fenomeninin myonekroza ikincil mi olduğu, yoksa “no reflow” fenomeni sonucunda mı myonekroz olduğu çelişkili bir konu olup, ilk durumun geçerli olduğu düşünülmektedir. Çünkü miyosit ve endotel hücrelerin iskemiye karşı toleransları farklıdır. Dört saatlik iskemi ciddi kas hasarı oluşturabilirken, bu durum endotelde 6 saatte oluşur. Bu nedenle, dokunun iskemiye karşı olan toleransını endotel değil doku hücresi belirler (13).

“No reflow” fenomeni patofizyolojisinde, hemokonsantrasyon ve tromboz, kapiller endotel hücrelerde şişme, kapillerlerde lökosit kümeleşmesi ve doku ödeme

ikincil artmış ekstravasküler doku basıncı vardır. Kapiller endotel şişmesi enerji depolarındaki azalmaya bağlıdır. Bu şişme erken reperfüzyon döneminde maksimum düzeyde olup kapiller kan akımına karşı rezistansı artırır. Lökositler, kapiller endotelle adezyon oluşturmadan lümen içerisinde kümeleşerek “no reflow” oluşumunda önemli rol oynarlar. Dolayısıyla kümeleşmiş lökosit hareketi endotel hasarını artırır (13).

d) Lokal inflamatuvar cevap:

İskemik doku reperfüzyonu inflamatuvar bir cevap doğurur. Ancak doku nekrozundan reperfüzyon döneminden çok iskemik dönem sorumludur (13).

Damar tıkanıklıklarında, hayvan turnike modellerinin aksine, tıkanıklığın bir miktar distaline kadar, kollateral dolaşıma bağlı, normal doku izlenir. Dolayısıyla reperfüzyonla amaç, distaldeki nekrotik alanın değil bu alanın kanlandırılmasıdır. Bu bölge; nekrotik ve ciddi hasarlanmış hücrelerin iç içe olduğu ve inflamatuvar aracılardan sentezlendiği yerdir. Dolayısıyla, reperfüzyon sağlanmış hasarlı veya nekrotik alan miktarı morbiditeyi belirler. İnflamatuvar cevabın tetikleyicileri; asit fosfataz, inorganik fosfat, laktik asit, myogloblin, nükleotidler, potasyum, proteolitik enzimler ve pürin bazları gibi kas yıkım ürünleridir. Bu yıkım ürünleri; prokoagulan özellikte olup, intrinsek pıhtılaşma sistemini aktive ederek venöz kılcal trombozu ve kollateral arteriollerde vazospazm oluştururlar. İnflamatuvar cevabın en belirgin olduğu geçiş alanındaki bu tarz bir aktivite, nekrotik alanda genişlemeye neden olur. Dolayısıyla, antitrombotik ve antiplatelet tedaviyle geri dönüşümlü hasar bölgelerine olan kollateral akım ve mikrodolaşım korunarak nekrotik genişleme engellenebilir (13).

2.6. İskemi Reperfüzyona Bağlı Oluşan Uzak Organ Hasarı (MODS/SIRS):

İskemi reperfüzyonun önemli sonuçlarından biri uzak organ hasarı olup, yüksek mortaliteyle seyreden MODS’la sonuçlanabilir. Barsak, karaciğer, iskelet kası ve aortik iskemik reperfüzyon modellerinde MODS gelişimi gözlenmiştir (5).

MODS oluşumunda, hayati organların kanlandırılması amaçlı, refleksif gelişen mezenterik vazokonstriksiyon ve relatif mezenterik iskemik rol oynar. Bu kısa dönemli mezenterik iskemik, barsak mukozal bütünlüğü ve bariyer fonksiyonunda bozulma ve bakteri/lipopolisakkarit translokasyonu ile sonuçlanır. Mezenterik lenf nodları ve karaciğer makrofajlarının bu etkenlerle aktivasyonu, inflamatuvar sitokinlerin (TNF- α)

dolaşımında artışına neden olur. Dolayısıyla, sistemik olarak, lökosit ve endotel aktivasyonu gerçekleşir (5).

MODS'da oluşan sistemik inflamasyon hemen her organda hasar oluştururken ilk gözlenen, genelde 24-72 saat içinde oluşan, akciğer yetmezliğidir. MODS'a bağlı oluşan akciğer hasarı, hafiften (akut akciğer hasarı) şiddetliye (akut respiratuar distres sendromu) doğru seyreden bir klinik spektruma sahip olup, patogeneğinde mikrovasküler geçirgenlik artışı ve alveol sıvısı nötrofil birikimi suçlanmaktadır. MODS'a bağlı aynı zamanda karaciğer, böbrek, santral sinir sistemi, gastrointestinal sistem ve myokard disfonksiyonu görülebilir (5).

a)Ksantin oksidaz

Ksantin oksidaz (XO), süperoksit ve hidrojen peroksit oluşumunda önemli rol oynar. Tüm iskemi reperfüzyon modellerinde, plazma XO artışı ile uzak organ hasarı arasında korelasyon saptanmıştır. Artmış sistemik XO enzim aktivitesi ile vasküler sistemin tümünde ROT maruziyeti ve yaygın endotel aktivasyonu oluşur. Aynı zamanda XO, endotel hücre yüzeyi glikozaminoglikanlarına bağlanarak hücre yüzeyinde yoğunlaşır ve sitotoksik etkiye bulunur. Dolayısıyla XO, hem direkt sitotoksik etki hem de ROT oluşumuna ikincil endotel ve lökosit aktivasyonu ile, uzak organ hasarına katkıda bulunur (5).

b)Lökositler

Lökositlerden, ROT ve myeloperoksidaz enzim sentezi gerçekleşir. Aynı zamanda, aktif lökosit kaynaklı proteazlar, endotel bazal membran ve kavşak proteinlerinin yıkımında rol oynarlar. İskemik dokuda biriken aktif lökositler ancak reperfüzyon periyoduyla birlikte sistemik dolaşıma geçip uzak organ hasarında rol oynarlar. Reperfüzyonla oluşmuş sistemik lökosit aktivasyonu ve uzak organ hasarı, endothelial cell adhesion molecules (ECAMs) kontrolüyle azaltılabilir. Reperfüzyon aynı zamanda, iskemik doku kaynaklı inflamatuvar sitokinler ve adezyon moleküllerinin sistemik artışına da neden olur. Dolayısıyla reperfüzyon döneminde, aktif lökositlerde ve adezyon molekülleri yüzey ifadelerinde sistemik bir artış söz konusudur (5).

c)İnflamatuvar araçlar

Septik şok ve MODS/SIRS klinikleri birbirlerine çok benzemekte olup, hepsi inflamatuvar araçlar yoluyla gerçekleşir. Herhangi bir dokudaki İ-R, inflamatuvar araçların sistemik düzeylerinde artış ve lökosit-endotel-platelet etkileşimine neden olarak uzak organ vasküler disfonksiyonuyla sonuçlanır. Reperfüzyon, aynı zamanda

kompleman sistem aktivasyonuna ikincil uzak organda artmış lökosit trafiği ve vasküler disfonksiyon oluşturur. NO biyoyararlanımındaki sistemik azalma ve PAF, İ-R'a bağlı uzak organ hasarının diğer araçlarıdır (5). İ-R'a bağlı MODS'da görülen akciğer hasarının heme oksijenaz etkisiyle azaldığı bildirilmiştir (153).

2.7. İskemi Reperfüzyon Hasarında Terapötik Uygulamalar:

2.7.1. Antioksidan Terapi:

Ubiquinon (Koenzim Q10) bir antioksidan molekül olup, etki mekanizması hala tam olarak anlaşılamamıştır. Ancak yapılan son çalışmalarda, reperfüzyon dönemi serbest oksijen radikali patlamasını direkt antioksidan etkiyle engellediği ve endotel bağımlı vazodilatasyon üzerinde olumlu etkilerde bulunduğu bildirilmiştir (154).

L-2-oxothiazolidine-4-carboxylate (OTC); doku GSH seviyelerinde artış oluşturarak, asetaminofen ile oluşmuş karaciğer hasarı ve hidrojen peroksit'e bağlı endotel hasarında azalma sağlar (155). Aynı şekilde, malik asit diethyl ester veya L-Buthionine-sulfoximine ile glutatyondan fakir hale getirilmiş dokuların İ-R hasarı etkilerine daha hassas oldukları gözlenmiştir (156). Dolayısıyla, doku GSH seviyelerinde artış oluşturan moleküller İ-R hasarı için koruyucudurlar. Ancak glutatyon metabolizmasının bizzat kendisi de toksik moleküller oluşturabilmektedir (157).

E vitamini, en önemli serbest oksijen radikali temizleyicilerindendir. Bu işlem sırasında kendi de bir serbest radikal haline gelir ancak askorbik asit (vitamin C) gibi moleküllerin yardımıyla yeniden stabil hale dönüştürülür (α -tokoferol \cdot + askorbik asit \rightarrow α -tokoferol + askorbik asit \cdot) (157). İ-R sürecinde doku Vit E seviyesinin düştüğü, Vit E tatbikiyle ROT ve lipid peroksitlerin oluşumunun azaltılabildiği gözlenmiştir (158). Vit E; antioksidan etkisi dışında, endotel hücre yüzeyinde E selektin ve ICAM-1 ifadesini azaltarak endotel-nötrofil etkileşimini ve dolayısıyla nötrofil aktivasyon ve birikimini engeller. Bu etki mikrodolaşım devamlılığının sağlanmasında önemlidir (159). A, C ve E vitaminlerinin birlikte veya diğer farmakolojik ajanlarla (mannitol) kullanımı ile elde edilen antioksidan etki, monoterapileri sırasında elde edilen antioksidan etkiye göre daha güçlüdür (160). Vitamin E ve ilopost'un birlikte kullanımı ile, lipid peroksidasyonunda azalmaya bağlı, İ-R hasarında düzelmeye saptanmıştır (161). Bir vitamin E analogu olan Lazaroid bileşikler (U83836E)'in de oksidatif stresi azaltarak İ-R'a karşı koruyucu oldukları gösterilmiştir (162).

Karvedilol ve onun vücuttaki metaboliti olan SB211475'in, endotel fonksiyonlarını koruyucu (vasodilatasyon) ve XO aracılı superoksit radikal oluşumunu azaltıcı etkileriyle İ-R hasarında azalma sağladıkları bildirilmiştir (163).

Allopurinol (XO inhibitörü), SOD, katalaz ve dimetil sulfoksit, İ-R hasarında düzelme sağlar. Aynı zamanda, bu moleküllerin birlikte kullanımları tek tek kullanımlarına göre daha etkindir (164).

Quercetin (FB277); sentetik bir flavenoid olup, ksantin oksidaz inhibisyonu, SOR uzaklaştırıcı etki ve NOS artışı oluşturarak İ-R hasarını azaltır (165).

Bunların dışında; nikaravan, α lipoik asit, thioredoxin (166), N asetilsistenin, angiotensin converting enzyme inhibitor ve kalsiyum kanal blokörleri (167) ile İ-R hasarında azalma tespit edilmiştir.

2.7.2. Lökosit terapisi:

Lökosit aracılı İ-R hasarı azaltılmasında; inflamatuvar aracı maddeler, adezyon molekülleri ve lökosit-endotel adezyonuna yönelik terapötik yaklaşımlar kullanılmaktadır (2).

PAF, histamin, LT-B4 ve TNF- α gibi aracı inflamatuvar maddelerin sentez veya reseptör etkileşimlerinin engellenmesi ile İ-R hasarında fayda sağlanmıştır (56). Ek olarak, aspirin kullanımıyla bir grup biyoaktif eikosanoid(15-epi-lipoksinler) sentezinin indüklendiği gözlenmiştir. Lipoksinler; inflamatuvar sistemlere karşı bir çeşit doğal koruyucu sistem olup, lökotrienler ve diğer inflamatuvar aracı maddelerle oluşan lökosit kemotoksisi, adezyon ve göçünü engellerler. Lipoksin analoglarının PMNL aracılı vasküler bariyer disfonksiyonu ve uzak organ hasarını azalttığı gösterilmiştir (168).

Lökosit adezyon molekülü sentezi azaltılması bir diğer yaklaşım şeklidir. Aspirin, glukokortikoidler, altın tuzları ve D-penisilamin gibi anti-inflamatuvar ilaçlar; NF- κ B ve activator protein-1 gibi transkripsiyon faktörlerinin aktivasyonunu engelleyerek, lökosit adezyon molekülü sentezi veya sitokin oluşumunu azaltırlar. Tek zincir DNA molekülleri olan oligodeoksinükleotidler de, tamamlayıcı nükleik asit sırasına spesifik olarak bağlanarak, translasyonel veya transkripsiyonel seviyede gen ürünü oluşumunu engelleyip aynı etkide bulunurlar (56).

Lökosit endotel etkileşiminin engellenmesi bir diğer yaklaşım şeklidir. Lökosit adezyon moleküllerine yönelmiş monoklonal antikorlar veya çözülebilir serbest adezyon molekülleri (PSGL-1, sialyl-Lewis^x, ICAMI), lökosit-endotel adezyonunda

etkin yapıların blokajı ve inaktivasyonunu sağlarlar. Bu modeller hayvan deneylerinde etkin olmakla birlikte, insanlardaki klinik kullanımına ait bilgiler yetersizdir (56).

2.7.3. İskemik Önkoşullanma:

İskemik önkoşullanma ilk kez 1986 yılında Murry tarafından kalpte tariflenmiş olup, dokunun, ciddi İ-R hasarı öncesi, kısa süreli İ-R periyodlarına maruz bırakılmasıdır (169). Böylelikle doku, uzun süreli İ-R'a daha dirençli hale gelir. İskemik önkoşullanma sikluslarının sayısı ve süresi arttıkça koruyuculuğu da artar (170).

İskemik önkoşullanmanın iki ögesi mevcuttur. Akut(erken) önkoşullanmada etki reperfüzyonun ilk dakikalarında başlayıp 2-3 saat sürerken, gecikmiş önkoşullanmada etki reperfüzyonun 12-24'ncü saatinde başlar ve 2-3 gün devam eder (171).

Akut (erken) iskemik önkoşullanma; adenosin veya α_1 -adrenerjik reseptör aracılı, pertussis duyarlı G protein aktivasyonuna neden olur. Bunun sonucunda fosfolipaz C veya D aktivasyonu oluşarak, protein kinaz C üzerinden ATP duyarlı potasyum kanallarının fosforilasyonu ve 5'-nükleotidaz yapının endotel hücre düzeyinde translokasyonu gerçekleşir. Sonuç olarak, adenosin oluşumu ve hücresel enerji depolarında artış ile lökosit yapışkanlığında azalmaya neden olur (172). İskemik önkoşullanma aynı zamanda artmış interstisyel adenosin oluşumuyla birliktelik göstermekte olup, bu adenosinin CD73 aracılı adenosinmonofosfat defosforilasyonu sonucu oluştuğu düşünülmektedir (173). Artmış interstisyel adenosin seviyesi; nötrofil adezyonu, mikrovasküler geçirgenlik ve nötrofil yuvarlanma hızına olumlu etkilerde bulunurken nötrofil akış hızını etkilemediği gözlenmiştir (174) (Şekil 11).

Kısa süreli ve uzamış iskemik şartlandırmalar arasındaki sürenin 2 saati geçmesi durumunda akut önkoşullanma ile elde edilen faydalı etkilerin azaldığı, bu sürenin 24 saatin üzerine çıkması durumunda ise gecikmiş önkoşullanmanın oluştuğu gözlenmiştir. Gecikmiş önkoşullanmada; gen ifadesindeki değişime bağlı, antioksidan enzim, NOS ve ısı şok proteinlerinde artış gözlenir (5). Erken iskemik önkoşullanmada hem akım hemodinamiği hem de lökosit aktivasyonu olumlu yönde etkilenirken, gecikmiş önkoşullanmada sadece lökosit aktivasyonu açısından olumlu fayda elde edilmiştir. Dolayısıyla iskemi, akım dinamiğini daha erken safhada etkilemektedir (1)(Şekil 11).

İskemik önkoşullanmada NO'in rolü detaylı bir şekilde çalışılmıştır. NO her iki önkoşullanma türünde de koruma sağlar. Erken iskemik önkoşullanmada oluşan NO eNOS aktivasyonuna bağlı olup, gecikmiş önkoşullanmada saptanan NO ise iNOS

aktivasyonu ile oluşur. Erken iskemik önkoşullanmada eNOS'un tetikleyici, gecikmiş önkoşullanmada ise iNOS ve COX-2'nin aracı olarak rol oynadığı otörlerce kabul edilmiştir (175).

Uzun süreli düşük-orta doz etanol maruziyetinin, iskemik önkoşullanma yoluyla, İ-R hasarına karşı kardiyoprotektif etki sağladığı belirtilmiştir. Etanolün her iki safhada inflamasyona karşı koruyucu olduğu, geç safha koruyuculuğunun adenozin A2 reseptör bağımlı NOS aktivasyonu ile gerçekleştiği gözlenmiştir (176). Kullanılan diğer farmakolojik ajan bir potasyum kanal açıcı olan kromakalim'dir. Gastroknemius kas mikrodolaşımında iskemik önkoşullanmaya kromakalim'in etkileri çalışılmış ve İ-R hasarında azalma oluşturduğu gözlenmiştir (177).

İnsanlarda klinik uygulanımı konusunda bilgiler yetersiz olup yapılan son çalışmalarda koroner bypass cerrahisi sonrası aritmi (178) ve karaciğer rezeksiyonu sonrası doku hasarında (179) azalma sağladığı bildirilmiştir.



Şekil 11: İskemik önkoşullanma mekanizmaları (9)

2.7.4. Antitrombotik ve Fibrinolitik Terapi:

Heparin; antitrombotik etkinliğinin yanısıra anti-inflamatuar etkinliğe de sahiptir. Anti-inflamatuar etkileri; P ve L selektine bağlanarak lökosit-endotel etkileşiminin engellenmesi, NF-κB inhibisyonu sağlayarak inflamatuvar kaskadın bozulması ve lökositlerden ROT oluşumunun engellenmesidir. Venöz kılcallarda; endotel-lökosit etkileşimi, trombosit kümeleşmesi ve mikrotrombüs oluşumunu engelleyerek "no reflow" fenomeni etkinliğini azaltır. Rekombinan insan doku faktörü'nün de heparin kadar etkili olduğu gözlenmiştir (180).

Etkin bir fibrinolitik olan tissue plasminogen activator'ün İ-R'da uygulanımı sonrası, lökosit adezyon ve diapedezinde azalmaya bağlı, doku inflamasyon ve ödeminde azalma saptanmıştır (181).

Platelet-lökosit ve platelet-endotel adezyonu sağlayan moleküllerin monoklonal antikorlarla bloklanması reperfüzyon hasarına karşı bir diğer tedavi modalitesidir. En çok araştırılan adezyon molekülleri; P selektin (platelet ve endotel), CD11b/CD18 (lökosit) ve fibrinojen reseptör GPIIb-IIIa (platelet)'dir (105). Akut myokard infarktüsülü 200 hastada, başarılı anjioplasti sonrası, GPIIb-IIIa reseptör antagonisti olan abciximab uygulanmış ve myokard perfüzyonu ile LV fonksiyonlarında kontrol grubuna göre anlamlı düzelme saptanmış (182).

Sonuç olarak, platelet aktivasyonunun kontrolü; trombüs oluşumu, vasküler tonus kontrolü, anjiogenez ve inflamasyon patogenezinde önemli rol oynar (105).

2.7.5. Nitrik Oksit Terapisi:

İnhaler veya serum fizyolojikte çözülmüş olarak tatbik edilen NO gazın, hayvan deneylerinde, İ-R hasarını (183) ve lökosit adezyonunu (184) azalttığı saptanmıştır.

Nitrik oksit donörleri olan organik nitratların; birçok İ-R modelinde, lökosit-endotel adezyonu, lökosit-platelet adezyonu, mast hücresi degranülasyonu ve artmış vasküler geçirgenliği azalttığı gösterilmiştir (185). L-arjinin uygulanımı ile, İ-R'a bağlı, NOS inhibisyonunun mukozal bariyer üzerindeki zararlı etkileri kaldırılabilmiştir (186).

L-arjinin; myokard infarktüsü sonrası, sistemik uygulanmasıyla nekrotik hasarda azalma sağlanırken, intrakoroner uygulanımıyla endotel fonksiyonunda düzelme ve nekrotik alanda küçülme sağlanmıştır (187). Aynı zamanda, hayvan İ-R modellerinde (iskelet kası, karaciğer, deri), doku hasarında azalma sağlamıştır (6).

NOS inhibitörü kullanımı bir başka yaklaşım şeklidir. Ancak, selektif olmayan bir NOS inhibitör kullanımı veya eNOS geni yokluğunda reperfüzyon hasarı artarken, selektif iNOS inhibisyonu ile I-R hasarında azalma elde edilmiştir (188).

2.7.6. Hipotermi ve İntraarteryel İnfüzyon:

Hipotermi, reperfüzyon sürecine eşlik eden doku lökosit infiltrasyonu ve artmış ROT oluşumunu azaltır (189). Hızlı ve etkin hipotermiyle, ampute olmuş ekstremitelere korunması ve reimplantasyon sonrası canlılığı artırılabilmiştir (190). Birçok hayvan modelinde, lokal hipotermi donör organ canlılığını arttırdığı gözlemlenmiştir. Bu tarz bir

koruma sadece kas fleplerinde uygulanabilmekte olup deri dokusu içeren (myokutanöz, fasyokutanöz) fleplerde, soğukta deri perfüzyonu bozulacağı için, kullanılamaz (180).

Ampute ekstremiteler için 4 °C'lik lokal hipotermi koruma amaçlı yeterlidir. Bununla birlikte, soğukta saklanmış iskelet kası soğuk İ-R hasarına yatkındır ancak dokunun öncesinde University of Wisconsin solüsyonu ile reperfüzyonu bu durumu engeller. İntraarteryel infüzyon, İ-R hasarını azaltmada kullanılan bir diğer tedavi modalitesidir. Birçok solüsyon ve farmakolojik ajan tek tek veya birlikte uygulanmıştır. University of Wisconsin ve Euro-collins solüsyonları, en fazla incelemeye tabi tutulmuş olanlarıdır. University of Wisconsin solüsyonu; modifiye edilerek, reperfüzyon periyodunu da içine alacak şekilde, lipid peroksidasyon inhibitörleri, serbest oksijen radikali temizleyicileri, anti-inflamatuar düzenleyiciler ve nitrik oksit donörleri ile zenginleştirilmiştir. Hayvan deneylerinden anlaşıldığı kadarıyla, soğuk solüsyonların intraarteryel infüzyonu dokuda daha muntazam bir soğuma sağlar. Bu amaçla modifiye University of Wisconsin solüsyon infüzyonu, organ transplantasyonları öncesi kullanılmaktadır (180).

2.7.7. Kompleman Terapisi:

Kompleman sistem aktivasyonu engellenmesi ile İ-R hasarının azaldığı birçok hayvan modelinde gösterilmiştir (124). Kompleman sistem blokajı; lektin yol inhibisyonu (Mannose Binding lectin antikoru), lektin ve klasik yol inhibisyonu (Kompleman1 esteraz inhibitörü ve Kompleman1 antagonisti) ve her üç yolun birlikte inhibisyonu (rekombinan kompleman reseptör-1 ve anti Kompleman5) ile sağlanabilir. Kompleman1 inhibisyonu, Kompleman3 inhibisyonu oluşturarak alternatif yolu kontrol eder (1).

Kompleman3 konvertaz inhibitörü olan rekombinan kompleman reseptör-1'in hayvan İ-R modellerinde (myokard, bağırsak, sinir sistemi, iskelet kası) doku hasarını ciddi düzeyde azalttığı saptanmıştır (191). Benzer şekilde, koroner bypass cerrahisi geçiren kişilerde, anti Kompleman5 rekombinan tek zincir antikor olan pexelizumab uygulaması ile myokard hasarı, erken postoperatif mortalite ve kompleman/lökosit aktivasyonunda azalma tespit edilmiştir (192). Kompleman inhibisyonunun bir başka yolu Kompleman1 esteraz inhibitörü olup, myokard İ-R hasarında endotel hücre adezyon molekül ifadesini azalttığı gösterilmiştir (193). Kompleman5a ve

Kompleman5'in antikor aracılı bloklanması ile nekroz, apoptoz ve nötrofil infiltrasyonunda belirgin azalma sağlanmıştır (194).

Sonuç olarak, kompleman yollar birbirleriyle içiçe olup, sistemin herhangi bir bölgesindeki blokaj İ-R hasarında fayda sağlar ancak tüm bu anti-kompleman sistemlerin insanlarda kullanımı konusunda yeterli klinik veri yoktur.

2.8. İlaç - İLOPROST

Ticari takdim şekli **İlomedin® 20 mcg/ml 1 ml** (İlomedin®, Bayer Schering Pharma AG, Berlin, Germany) olup, sulu solüsyon içinde 0,027 mg iloprost trometamol (0,020 mg iloprost'a eşdeğer) içerir.

2.8.1. Farmakodinamik Özellikler:

a) Platelet üzerine etkileri:

i) İn vitro antiplatelet etkinlik:

Platelet kümeleşme ve degranülasyonunu arttıran adenindinükleotid, araşidonik asit, kollajen, epinefrin ve U 46619 gibi maddelerin etkilerini, dozla orantılı olarak, engellediği in vitro olarak gösterilmiştir (195). Diabet, hiperlipidemi (196) ve periferik arter hastalığında (197) artmış platelet aktivitesi ve azalmış iloprost cevabı gözlenmiştir. Diabetik hastalarda kan şekeri kontrolü (198), hiperlipidemik hastalarda ise LDL düzeyi kontrolüyle (199) iloprost platelet etkinliğinin normale yaklaştığı gözlenmiştir.

ii) İn vivo anti-platelet etkinlik:

İntravenöz iloprost'un, platelet hiperaktivitesi (200) ve travma sonrası hemostazda (201) antiplatelet etkinliğinin doz bağımlı olduğu hayvan deneylerinde gösterilmiştir. İloprost'un klinik kullanımında, antiplatelet etkinin yine doz bağımlı (0,5-2 ng/kg/dk) olduğu görülmüş, yaklaşık 2 ng/kg/dk dozda yan etkilerinin belirginleştiği ve infüzyonun kesilmesini takiben 1 saat içinde antiplatelet etkilerinin yok olduğu gösterilmiştir (202,203).

Akut anterior myokard infarktüsü tanısı ile izlenen erken dönemdeki 14 hastalık bir grupta (204) ve Fontaine II hastalarda (205), iloprost tedavisi ile platelet aktivitesinin düştüğü ancak tedavi bitiminde bu etkinin normale döndüğü gözlenmiştir. İloprost tedavisi sonrasında aterosklerotik alanlardaki platelet kümeleşme azalması gama kamera ile gösterilmiştir (205).

iii) Trombosit salınım reaksiyonları:

Trombosit aktivasyonunun son safhası olan degranülasyon da, aynı kümeleşmede olduğu gibi, iloprost tarafından benzer dozlarda engellenir (206). İloprost tedavisi almış hastalardan alınan kanların, in vitro, trombojenik maddelerle teması sonrası platelet serotonin (203) ve β -TG (202) salınımlarının azaldığı gözlenmiştir. Bununla birlikte, α granül salınımının belirginleştiği akut myokard infarktüsü hastalarında 24 saatlik iloprost tedavisine aynı β -TG ve platelet faktör cevabı alınmamıştır (204). Aynı şekilde, heparinizasyon sonrası platelet aktivasyonuna bağlı spesifik protein yükselişi iloprost ile engellenememiştir (207). Dolayısıyla fizyolojik olarak aktive olmuş platelet salınım reaksiyonları iloprost ile azaltılamamaktadır (15).

iv) Eklenmiş antiplatelet etki mekanizması:

Plateletler, yüksek sensitivite ve spesifitede epoprostenol (iloprost) reseptörü içerir. İloprost-reseptör etkileşimi, ilaç kan düzeyi ile orantılı ve geri dönüşümlüdür (208). Reseptör aktivasyonu, adenilat siklaz aracılığıyla cyclic adenosine monophosphate (cAMP) oluşumuna neden olur. Adenilat siklaz enzim aktivitesi Gi ve Gs ile kontrol edilir. Dolayısıyla iloprost, Gs üzerinden etki ederek, enzim aktivasyonu sağlar. cAMP ise plateletler içinde fosfolipaz ve sitozolik kalsiyum seviyesi regulasyonu sağlar (209). İloprost'un; adenzindifosfat, epinefrin ve trombin'e bağlı platelet aktivasyonunu engelleyebilmesi, %90 oranında, cAMP artışı sonucu oluşmaktadır (195). Sigara kullanımı (210), diabetes mellitus (208), hiperlipidemi (196), myokard infarktüsü (211) ve uzun süre iloprost maruziyeti (212) durumlarında; iloprost'un, reseptör afinitesi değişmeksizin bağlanma kapasitesinde düşüklük saptanmıştır. Reseptör durumu (sayı ve affinite) ile iloprost aktivitesi arasında tam bir korelasyon yoktur (212). Aynı zamanda cAMP cevabı olmadan da iloprost'a bağlı antiplatelet etki oluşabilmektedir (195). Bu iki durum, iloprost'un, plateletler üzerinde cAMP dışındaki yollarla da etki ettiğini düşündürmektedir (15).

v) Platelet hiperaktivitesi:

İloprost tedavisi verilen periferik arter hastalarında platelet hiperaktivitesine ait yayınlar vardır (213,214). Bu duruma, Fontaine IV hastalarında iloprost uygulanımı sonrası rastlanmış ve "iloprost rebound" olarak rapor edilmiştir (214). Yapılan çalışmalarda; bu etkinin, düşük plasma konsantrasyonlarında çıktığı, yüksek konsantrasyonlarda (1,6-8 μ /L) ise antiplatelet etkinliğin olduğu bildirilmiştir (213).

Araşidonik asit kaskadında TxA2 ve PGI2 birbirlerine yakın yollarla sentezlenir. İloprost, bu yakın sentez yolu nedeniyle, PG I2 üzerinden araşidonik asit kaskadını ve TxA2 seviyesini değiştiriyor olabilir. Yapılan klinik çalışmalarda, iloprost'un epoprostenol ve TxA2 metabolit seviyelerinde azalmaya neden olduğu gösterilmiştir (202). Ancak, uzun süreli iloprost tedavisi (212) veya iloprost'un ani kesildiği durumlarda (215) thromboxaneB2'de artış bildirilmiştir. Bu durum hiperkoagulopatıyı bir miktar açıklamaktadır. Aynı şekilde TxA2 sentezini (aspirin, indometazin) veya aktivitesini (sulotroban) bozan durumlarda da iloprost etkinliği belirginleşir. Dolayısıyla, TxA2 ve PG I2/İloprost fonksiyonel antagonizma içindedir (15).

b) Kan akımı üzerine etkisi:

Kan akışkanlığı artışı ve kırmızı hücre deformasyonuna 1-2 ng/kg/dk dozunda neden olmadığı (202), ancak doz aralığı yükseltildiğinde (2-4 ng/kg/dk) akışkanlığı ve ekstrasvazas-yonu arttırdığı bildirilmiştir (216). Ancak, periferik arter hastalarında yapılan klinik bir çalışmada; 6 saat 0,5-2 ng/kg/dk iloprost infüzyonuyla, mikrodolaşım fonksiyonlarında düzelme saptanmıştır (217).

c) Fibrinolitik aktivite üzerine etkisi:

İloprost tedavisiyle; fibrinolitik aktivitede artış, öglobulin pıhtı lizis süresinde azalma, değişik oranlarda tissue plasminogen activator düzeyi artışı (218) saptanmış ancak fibrinojen ve plasminojen düzeylerinde değişiklik saptanmamıştır (202,216).

Bertek ve arkadaşları; iloprost infüzyonuyla, fibrinolitik aktivitesi baskılanmış bir grupta aktivitenin normale döndüğünü gözlemlemişlerdir (219). Tissue plasminogen activator düzeylerinde ki artış istatistiksel olarak anlamlı olmayıp bu durum, iloprost'un hem endotel tissue plasminogen activator sentezini hemde platelet tissue plasminogen activator inhibitör oluşumunu arttırmasına bağlanmıştır (218).

c) Nötrofiller üzerine etkisi:

İn vitro ortamda, kalsiyum ionofor A23187 veya N-formyl-L-methionyl-L-phenylalanine karşı olan nötrojenik cevabı engellediği gösterilmiştir (220). Aktive olmuş PMNL'lerin kordon veni endoteline adezyonu da iloprost infüzyonuyla azaltılabilmektedir (221). Hayvan deneylerinde, 100 ng/kg/dk iloprost infüzyonuyla, iltihabi veya hasarlanmış dokulardaki nötrofil birikimi azaltılabilmektedir (222).

i) İloprost ve Adezyon Molekülleri:

Periferik arter hastalığı ve sistemik skleroz hastalarında; iloprost'un, lökosit hücre yüzeyi α M β 2 integrin (CD11b/CD18) ifadesini azalttığı gösterilmiştir. Bu

adezyon molekülü; lökosit-endoel arasındaki geri dönüşümsüz bağlanmadan sorumlu olup, lökosit diapedezi ve sonrasında gelişen doku hasarında önemli rol oynar. Bu $\alpha M\beta 2$ integrin reseptörün endotel karşılığı ICAM-1'dir. Adezyon molekülleri; yapısal olarak endotel hücre zarında mevcut olup, IL-1, TNF- α ve IFN- α gibi inflamatuvar sitokinler aracılığıyla oluşan endotel disfonksiyonunda yüzey ifadeleri artar. İloprost infüzyonuyla periferik arter hastalığı ve sistemik skleroz hastalarında, $\alpha M\beta 2$ integrinde olduğu gibi, ICAM-1 düzeyinde de düşüş saptanmıştır. Aynı şekilde iloprost'un, Romatoid Artrit (224) ve sistemik skleroz'da (225) ICAM-1, VCAM-1 ve E selektin hücre yüzey ifadelerini azalttığı gösterilmiştir. Dolayısıyla iloprost; lökosit-endoel etkileşiminde, hem endotel (ICAM-1) hem de lökosit ($\alpha M\beta 2$) üzerine etki eder (223).

İloprost'un, P selektin aracılı lökosit-platelet adezyonunu önemli ölçüde azalttığı (226) ancak uzun süreli iloprost tedavisinde, iloprost desensitizasyonuna bağlı, lökosit-platelet adezyonunun arttığı (227) bildirilmiştir. Yapılan bir başka in vitro çalışmada; iloprost'un, fibrinojen reseptörü olan ve platelet adezyonunda önemli rol oynayan GP IIb/IIIa'yı azalttığı gösterilmiştir (228).

İn vitro olarak, iloprostun; lenfosit-endoel adezyonu ve sitokinle uyarılmış endotel hücre yüzey ICAM-1 / endothelial leukocyte adhesion molecule-1 (ELAM-1) ifadelerini azalttığı gösterilmiştir. İloprost'un adezyon molekülleri üzerindeki bu azaltıcı etkisinin adenilat siklaz aktivasyonu ile oluştuğu düşünülmektedir (14).

d) Hemodinamik Etkiler:

i) İn vitro ortamda damar üzerine etkileri:

İn vitro olarak, İloprost'un, cAMP aracılı arteryel vazodilatasyon oluşturduğu gösterilmiştir (229,230). Aortada epoprostenol/iloprost reseptörleri mevcut olup (231), İloprost ve epoprostenol'un arteryel vazodilatör özellik bakımından benzerlik gösterdikleri görülmüştür. Ancak, venöz dilatasyon konusundaki veriler yetersizdir. Her iki ajan, in vitro olarak, safen ven ve pulmoner ven de vazodilatasyon yapar. Koroner venlerde, epoprostenol doz bağımlı kontraksiyon oluştururken, iloprost tek başına yetersizdir. Ancak, birlikte kullanıldıklarında, iloprost epoprostenolün etkisini yok eder. İloprost'a ait arteryel vazodilatör etki özellikle sağlam endotelde daha belirgindir. Ancak, iloprost'a ait bu etkinin endojen epoprostenol veya endothelial derived relaxing factor (EDRF) ile ilgili olmadığı gözlenmiştir (15).

İloprost; araziidonik asit (232), TxA2 analogu U46619 (233) ve angiotensin II (234) gibi vazokonstriktör maddelerin etkilerini yok eder. Bunun dışında, TxA2-

epoprostenol arasındaki dengeye etki ederek, arteryel dilatasyon sağlar (232,234). Örneğin; Angiotensin II ile oluşturulan vazokonstriksiyon ve ödem, İloprost'un düşük dozlarıyla (1 nmol/L) UK38485 (TxA2 sentez inhibitörü) ve BM13177 (TxA2 reseptör blokörü)'e benzer şekilde azaltılabilmektedir (235). Ancak iloprost, TxA2 ile oluşturulan vazokonstriksiyona çok etkili değildir (236).

İloprost, aynı zamanda, sempatik sinir sistemi üzerinden de arteryel dilatasyon sağlar. Hayvan deneylerinde, iloprost'un; transmural sinir uyarımı ve phenylephrine'e olan vazokonstriktör yanıtı engellediği gösterilmiştir (15). Yine hayvan deneylerinde, düşük doz iloprost ile norepinefrin/epinefrin'ine olan β reseptör etkileşimli vazokonstriksiyon yanıtı baskılanmıştır (237). Hayvan myokard iskemi modellerinde, iloprost'un, adrenerjik sinir uçlarından katekolamin kaybını engellediği gösterilmiştir (238). Bu bulgular iloprost'un, pre-post sinaptik etkin olduğunu gösterir, ancak vazomotor tonus üzerindeki etki mekanizması hala tam aydınlatılamamıştır (15).

ii) İn vivo ortamda damar üzerine etkileri:

Hayvan deneylerinde, iloprost'un antiplatelet etkinliğinin hipotansif etkisine göre 2-7 kat fazla olduğu gösterilmiştir (239). Buna benzer sonuçlar insanlar üzerinde de saptanmıştır (240). İloprost'un bu antiplatelet etkinliği epoprostenole karşı üstünlüğünü oluşturur ve terapötik kullanımını arttırır (15). İloprost'un doz bağımlı ve geri dönüşümlü hipotansif etkisi hayvan deneylerinde gösterilmiştir (241). Hipertansif hayvanlarda oral uygulama sonrası uzun süreli normotansiyon elde edilmiştir (242). Hipotansiyon veya taşikardiye neden olmayan düşük dozlarda bile mezenterik / alt ekstremite vasküler rezistansında azalma (241) ve kan akımında artış (242) saptanmıştır.

Arteryel dilatasyon etkisi, teorik olarak iloprost'un koroner arter hastalığı, primer pulmoner hipertansiyon ve serebrovasküler hastalıkta kullanılabilirliğini destekler. Buna yönelik hayvan deneylerinde, iloprost'un, 60 dakikalık bilateral karotis arter oklüzyonu sonrasında, ödem, kalsiyum birikimi ve öğrenme kapasitesi verileri açısından kontrol grubuna göre etkin olduğu gösterilmiştir (243). Yine hayvan pulmoner hipertansiyon modelinde 0,4 $\mu\text{g}/\text{kg}/\text{dk}$ iloprost infüzyonuyla, pulmoner arter basıncı ve pulmoner vasküler rezistans da, kardiyak indeks ve kan gazı değişikliği yapmaksızın, belirgin düzelme sağlar (244).

iii) Klinik kullanımında saptanan hemodinamik etkiler:

0,5-4 $\text{ng}/\text{kg}/\text{dk}$ iloprost infüzyonuyla; vazodilatasyona bağlı, periferik vasküler rezistans ve ortalama kan basıncında doz bağımlı azalma olurken, kalp hızı ve kardiyak

indekste artış oluşur (245). Primer pulmoner hipertansiyonlu hastalarda; iloprost infüzyonuyla, pulmoner vasküler rezistansda doz bağımlı azalma, kardiyak indeks ve pulmoner arter oksijen saturasyonunda ise artış gözlenmiştir (246). Tüm hasta gruplarında, iloprost infüzyonu; böbrek kan akımında doz bağımlı artış ve diüretik etki sağlamıştır (247,248). İloprost, periferik arter hastalarında RAS sistem aktivasyonu oluşturmazken, tuz kısıtlaması olan sağlıklı kişiler (248) ve primer hipertansiyonlu kişilerde (247) renin aktivitesinde belirgin artış oluşturur.

e) Sitoprotektif etki:

Doku perfüzyon artışı ve antiplatelet etkiyle, direkt sitoprotektif etkinlik sağlar.

i) Kardiyak koruma:

Birçok in vitro myokard İ-R modelinde, iloprost'un myokard fonksiyonunu koruduğu gösterilmiştir (249,250). Hipotermik arrest oluşturulan rat kalbinde, iloprost ve diltiazem'in myokardial korumada benzer etkinlik gösterdiği rapor edilmiştir (250). İloprost'un; İ-R oluşturulmuş myokardda, adrenerjik sinir uçları katekolamin kaybını azaltarak uyarılabilme durumunu koruduğu (238), mitokondrial disfonksiyon (251) ve oksidatif stresi (249,252) azalttığı saptanmıştır. 0,1 µg/kg/dk iloprost infüzyonuyla; hayvan myokardiyal iskemi modelinde, hücre zarı fosfolipid kaybının ve dolayısıyla hücre zarı hasarının azaldığı gösterilmiştir (253). Aynı modelde; 1,2 µg/kg/dk iloprost infüzyonu ile, iskemik alan kan akımı değişmeksizin, sağlıklı myokard dokusu kan akımının arttığı ve infarkt alanının küçüldüğü gözlenmiştir (254).

Deneysel koroner arter trombozu (255) ve mikroemboli (256) modellerinde; iloprost'un, tıkanma süresini %50 uzattığı, ST segment değişiklikleri ve iskemik alanlardan inosine salınımını azalttığı gösterilmiştir. İloprost infüzyonuyla, TxA2 ile indüklenmiş infarkt alanında küçülme gözlenmiştir (15). İloprost infüzyonunun en fazla iskemik periyod öncesi başlatıldığında miyokardiyal koruma sağladığı gözlenmiştir (257). Reperfüzyon oluşturulmadan sadece iskemik hasar oluşturulan hayvan deneylerinde iloprost'un iskemi başlangıcından bağımsız olarak miyokardial koruyucu etki gösterdiği biyokimyasal olarak tespit edilmiştir. Reperfüzyon dönemi iloprost uygulama süresi uzadıkça infarkt alanının daha çok küçüldüğü saptanmıştır (258). İloprost'un düşük dozlarıyla da miyokardiyal korunma sağlanması, bu etkinin hipotansif etkiden bağımsız olduğunu gösterir (238). İloprost infüzyonu sonrası, infarkt alanı küçültücü etki ile nötrofil birikimini azaltıcı etki arasında korelasyon saptanmıştır (259).

ii)Antiaritmik etki:

Reperfüzyon aritmilerinde epoprostenol-TxA2 oranının önemli olduğu, iloprost'un bu oranı epoprostenol lehine çevirdiği bildirilmiştir (260). In vitro olarak, iloprost'un, aritmojenik maddelerle oluşturulmuş ektopik atım ve fibrilasyonu durdurduğu ancak yüksek dozlarda kendisinin de aritmojenik olduğu gözlenmiştir (261). 24 saatlik hipotermik arrest modelinde, iloprost ve diltiazem'in reperfüzyon aritmisi kontrolünde benzer etkinlikte olduğu saptanmıştır (250). İloprost'a bağlı atrial ve ventriküler transmembran aksiyon potansiyel değişikliği saptanmamış olup antiaritmik etkinin elektrofizyolojik temeli çözülememiştir. Reperfüzyon aritmisinde, iloprost'un düşük doz (0,1 µg/kg/dk) infüzyonu yüksek doz (1 µg/kg/dk) infüzyon'a göre daha etkindir. Yüksek dozla oluşan hipotansiyon aritmeye katkıda bulunur (260).

Hayvan koroner mikroemboli modelinde; 0,18 µg/kg/dk iloprost infüzyonuyla, spontan ventriküler fibrilasyon insidansının azaldığı ancak uyarılmış fibrilasyon insidansının değişmediği gözlenmiştir (256).

iii)Diğer doku hasarı modelleri:

Bromobenzen ve karbon tetraklorid ile oluşturulmuş hepatoselüler hasar ve LDH artışının iloprost infüzyonuyla önlendiği gösterilmiştir. İloprost bu etkiyi, lipid peroksidasyonunu azaltıp aldehid eliminasyonunu arttırarak gerçekleştirir (262). Iloprost'un, hayvan travmatik şok modellerinde, plasma Katepsin D aktivitesinde azalma ve hücre zarı stabilizasyonu sağladığı bildirilmiştir (263). İloprost'un pankreatik homojenatta belirgin proteolitik aktivite düşüşü oluşturması lizozomal stabilizasyon artışının göstergesidir (264).

f)Cerrahi uygulamalar:

i)Transplantasyon:

İloprost, donör organ nakli sırasında oluşabilecek doku hasarını antiplatelet ve sitoprotektif etkiler aracılığıyla azaltır (265). Donör akciğer korunmasında etkinliği belirgin olmayıp, Eurocollins solüsyonu öncesi ek olarak iloprost tatbiki ile postoperatif 1'inci saat oksijenasyonun iyileştiği ancak hemodinami, tidal hacim, geç dönem oksijenasyon ve doku ödemi açılarından kontrol grubu ile fark oluşturmadığı gözlenmiştir (266). İloprost'un, transplantasyon cerrahisinde kullanımı konusu tam netlik kazanmamıştır (15). Siklosporin ve iloprost monoterapilerinin her ikisi de yaşam beklentisinde uzama sağlar ancak birlikte kullanımlarının monoterapiye göre üstün

olduğu gözlenmiştir. Bununla birlikte azothioprine ve iloprost kombine tedavisinin azothioprine monoterapisine üstün olmadığı görülmüştür (266).

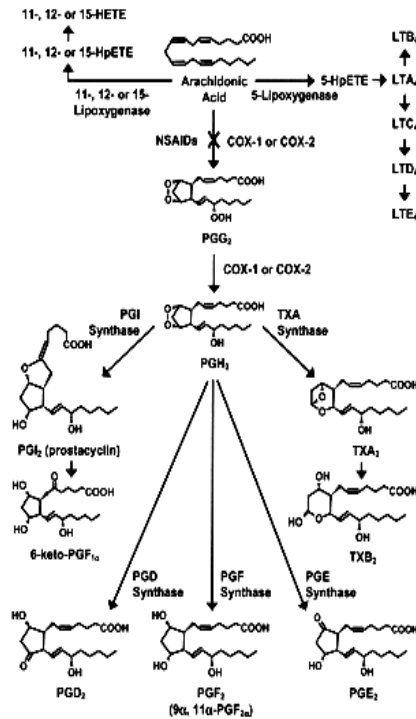
ii) Anastomoz açıklığına etkisi:

0,5 mm çaptan küçük damarlarda, vazospasm ve tromboz nedeniyle, anastomoz açıklık oranı düşüktür. Hayvan arteryel rekonstrüksiyon modelinde, anastomoz açıklığının topikal 25 µg/cm iloprost ile belirgin arttığı ancak i.v. iloprost ile değişiklik oluşmadığı bildirilmiştir (267).

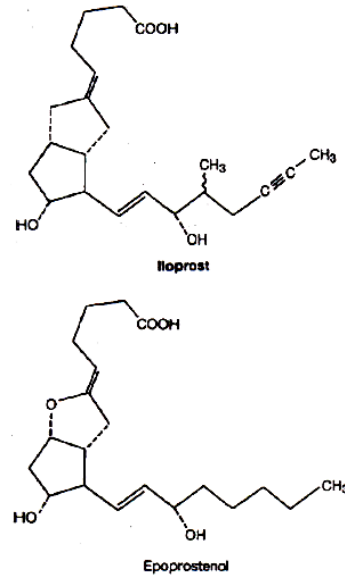
2.8.2 Farmakokinetik Özellikler:

İloprost; araşidonic asitten sentezlenen, endojen bir prostaglandin olan epoprostenol (PG I₂, prostasiklin)'ün sentetik karboksilin analogudur. Epoprostenol, en fazla damar endoteli tarafından sentezlenir (Şekil 12).

İloprost; epoprostenolden farklı olarak C18, C19'da üçlü bağ, C16'da methyl grubu ve heterosiklik oksijen atomu yerinde metilen grubu içerir (Şekil 13). Bu moleküler farklılık, iloprost'un daha stabil bir molekül olmasını sağlar ve intravenöz / oral kullanımına olanak verir.



Şekil 12: Araşidonic asit metabolizması



Şekil 13: İloprost ve epoprostenol'ün moleküler formülleri (15).

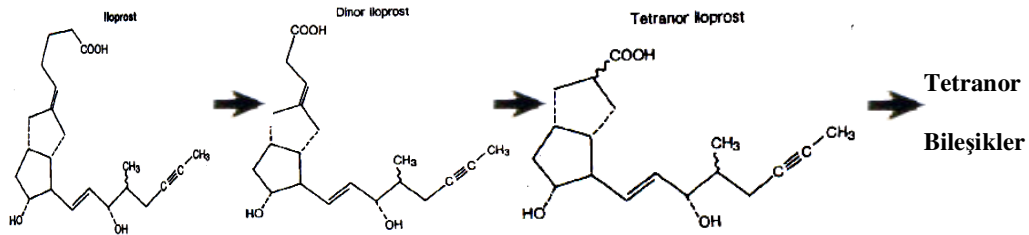
a)Emilim ve dağılım;

1, 2 ve 3 ng/kg/dk i.v. infüzyon dozlarıyla sırasıyla 46, 85 ve 135 ng/L sabit plazma konsantrasyonlarına ulaşılır (268). Oral alındığında, çok hızlı emilime uğrayarak maksimum plazma konsantrasyonuna 10 dakika içinde ulaşır ancak karaciğer ve barsaklarda çok fazla biyotransformasyona uğrayarak sadece %20'si sistemik dolaşıma geçer (oral 1µg/kg iloprost → 251 ng/L maksimum plazma konsantrasyonu) (268).

İntravenöz uygulama sonrası, son safha dağılım hacmi; yaklaşık 0,7 L/kg'dır (268). Hayvan deneylerinde maksimum santral sinir sistemi seviyesine (eş zamanlı plazma konsantrasyonunun % 10'undan azdır) yaklaşık 5 dakikada ulaşır (268).

b)Metabolizma ve eliminasyon:

Tamamı β oksidasyon ile tetranor türev ve onun bileşiklerine metabolize olur (Şekil 14) ve metabolitlerin yaklaşık % 70'i ilaç alımını takiben ilk 14 saat içinde böbreklerden atılır. Uygulanan ilaç dozunun %12 – 17'si ise feçesle atılır (15).



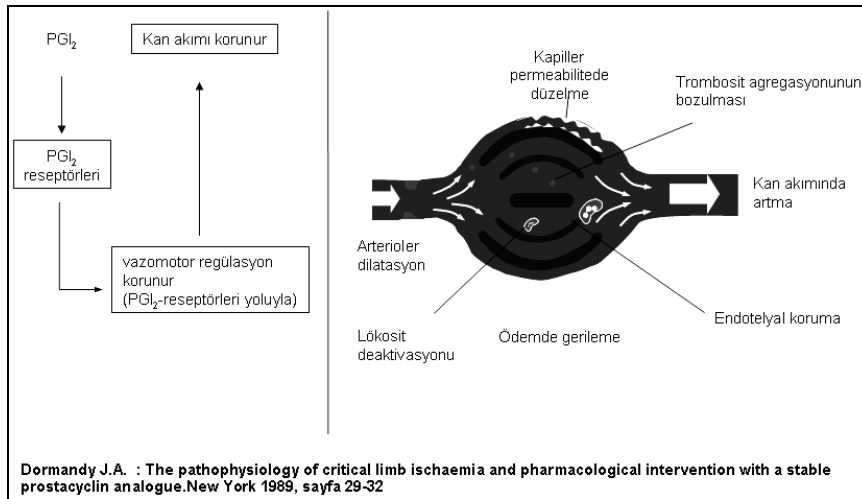
Şekil 14: İloprost Metabolizması (15)

Eliminasyonu bifazik olup; önce organ doku dağılımı ($t_{1/2}$: 4dk), sonrasında ise biyotransformasyon ve eliminasyon [$t_{1/2}$: sağlıklı kişilerde 30 dakika (268), kritik bacak iskemili kişilerde 37 dakika (269)] safhalarını içerir. Epoprostenol için bu ikinci safha yarılanma ömrü yaklaşık 3 dk'dır. Böbreklerden temizleme hızı; normal populasyonda 20 ml/dk/kg, kritik bacak iskemili hastalarda 16 ml/dk/kg (269), ciddi karaciğer yetmezliğinde ise 10 ml/dk/kg (86)'dır. Dolayısıyla karaciğer yetmezliğinde, aynı dozla, iki kat yüksek plazma konsantrasyonlarına ulaşılır (270). Böbrek yetmezliğinde ise, ilginç olarak, diyaliz gereksinimi olan grupta temizlenme hızı normalin üçte biriyken, diyaliz gerektirmeyen grupta bu normale yakındır. Her iki grupta yarılanma ömrü aynıdır ancak maksimal plazma konsantrasyonu; diyaliz ihtiyacı olan grupta yaklaşık 2-2,5 kattır (271). Bu bulgular ışığında özellikle üreminin iloprost temizlenme hızında etkin olduğu düşünülmektedir (271).

2.8.3. Periferik Vasküler Hastalıkta İloprost Kullanımı:

Periferik dokuların besin ihtiyaçları mikrosirkülasyon ile sağlanır. Epoprostenol; mikrovasküler kan akımı hacim ve dağılımının kontrolünde ve mikrovasküler defans sistemi aktivasyonunun sınırlandırılmasında rol oynar. Özellikle ülsere aterom plakları, kümeleşme ve hücre salınımı tetikleyerek, şiddetli mikrovasküler defans reaksiyonları oluşturabilir. Çoğu mikrodolaşım tıkanıklığı geri dönüşümsüz olmakla birlikte, iloprost infüzyonuyla; aktive olmuş trombosit - lökosit ve hasarlı endotel arasındaki kısır döngü geçici olarak kırılabilen ancak kronik semptomatik rahatlama sağlamamaktadır (222)(Şekil15). İloprost bu kısır döngüde; dengeyi epoprostenol lehine çevirerek, hücre salınımı engeller (222).

İlomedin® antiagregan, vazodilatör, trombosit inhibisyonu yapıcı etkisi, lökosit adezyonu inhibisyonu ve mikrovasküler kan akımında artış nedeniyle periferik tıkaçıcı damar hastalıklarında terapötik etki gösterir (222).



Şekil 15: İloprost kullanımı, primer hastalığa bağlı olmaksızın, mikrodolaşımı düzeltmektedir ve böylece trofik lezyonların iyileşmesi veya dinlenme durumunda ağrının giderilmesi sağlanmaktadır (222).

a)Terapötik Endikasyonlar:

i)Arteriosklerozis obliterans: Diyabetik (272)

Non diyabetik (273)

Temelinde arter tıkaçıcı hastalık bulunan, kritik ekstremite iskemisi olgularında; cerrahi ve kateter müdahalesinden(vasküler rekonstrüksiyon açısından) sonuç alınmadığında ya da yararsız oldukları kanıtlandığında, iloprost tedavisi denir.

Fontaine III. ve IV. evredeki tıkaçıcı arter hastalığı olan hastaların katıldığı randomize, plasebo kontrollü çalışmalarda intravenöz iloprost kullanımında, ağrının azalması, ülser iyileşmesi ve amputasyon oranlarında plaseboyla karşılaştırıldığında belirgin bir üstünlük elde edilmiştir (273,274).

Oniki uluslararası uzmanlar birliğinden(Tıkaçıcı Arter Hastalığı Tedavisinde Trans-Atlantik Dernekler-Arası Görüş Birliği) oluşan TASC çalışma grubunun açıkladığı aşağıdaki bildiri iloprost'un terapötik sınıflandırılması konusunda oluşturdukları görüş birliği belgesidir: "İloprost kontrollü, randomize çalışmalarda bugüne kadar en fazla sayıdaki, ilerlemiş kronik ekstremitte iskemili hastada incelenmiş olan prostanoiddir. Eldeki veriler damarlarının yeniden açma girişimleri için uygun olmadığı ya da revaskülarizasyon girişimlerinin başarısız kaldığı kritik ekstremitte iskemili hastalarda iloprost kullanımını haklı çıkarmaktadır. Tedaviye yanıt verecek hastaları öngörmek açısından herhangi bir teknik geliştirilmiş değildir, ancak ilacın oldukça yüksek düzeydeki terapötik güvenilirliği; erken bir amputasyon endikasyonunun kaçınılmaz olması dışında, bütün bu hastalarda iloprost'un denenmesini gündeme getirmektedir." (275).

ii)Buerger hastalığı (276)

iii)Bağ dokusu hastalıkları (Raynaud fenomeni): Çocuk (277)

Erişkin (278,279)]

iv)Akut arter tıkanıklığı (280)

v)Perioperatif greft açıklığını arttırmak için kullanımı (281,282)

vi)Deneysel çalışmalar; Greft iç yüzüne kaplanması (283)

Medulla spinalis korunması (284,285,286)

İskemi/reperfüzyon hasarı önlenmesi (287,161)

vii)Nadir uygulamalar

Mikrovasküler tromboz (288)

Eritromelalji (292)

Kolesterol embolisi(distal ve/veya renal) (289)

Kokain kullanımı (293)

Hypothenar hammer sendromu (290)

Ergotizm (294)

İntraarteriyel ilaç enjeksiyonu (291)

Donma (295)

2.8.3.1. İloprost'un İskemi Reperfüzyon Hasarı'ndaki klinik kullanımı:

İloprost'un, iskemi-reperfüzyonla oluşmuş lokal organ hasarında etkin olduğu; böbrek (296), akciğer (297), kalp (249,251,252,254,255,298), spinal kord (285,286), mezenterik (299), karaciğer (300) ve iskelet kası (161) iskemi reperfüzyon modellerinde gösterilmiştir. Aynı zamanda, iskemi reperfüzyona bağlı gelişen böbrek (301) ve akciğer (302) uzak organ hasarlarında da; iloprost'un hasarı azaltmada etkin olduğu gösterilmiştir. Dolayısıyla iloprost; İ-R'a bağlı lokal ve uzak organ hasarlarında etkin bir tedavi modalitesidir

2.8.4. Dozaj ve uygulama şekli:

Pulmoner hipertansiyonda 2,5 µg inhaler doz önerilen başlangıç tedavidir. Bu doz hasta tarafından tolere edilmişse günde 6-9 kez 5 µg şeklinde tatbik edilebilir (303).

İntravenöz tedaviye 0,5 ng/kg/dk dozuyla başlanır ve hasta toleransına uygun olarak her seferinde 0,5 ng/kg/dk artırılarak maksimum doza ulaşılır. Yapılan; çift kör, doz bağımlı etkinlik çalışmasında (DAWİD, Dosis Abhängigkeit der Wirksamkeit von İlomedin® Doppelblind); dozaj yükseldikçe ilaç etkinliğinde artış olmaksızın yan etkilerin belirgin arttığı, dolayısıyla kar/zarar oranı bakımından ilacın maksimum tolere edilen dozda değil optimal dozda verilmesi gerektiği kanaatine varıldı (304).

Periferik vasküler hastalık ve diyabetik anjiopati'de, 14-28 gün boyunca, günde 6 saat 2 ng/kg/dk dozunda infüzyon tedavisi önerilmektedir. Diyabetik anjiopatide bu protokolün ikinci bir kere tekrar edilmesiyle klinik başarının arttığı görülmüştür. Raynaud hastalarında ise 3 günlük, günde 5-8 saat, 0,5-3 ng/kg/dk infüzyon tedavisi uygulanmakta ve 6-8 hafta klinik rahatlama sağlanabilmektedir (15).

3-36 ng/kg/dk i.v. iloprost tedavisiyle heparine bağlı trombositopenide kardiyovasküler cerrahi prosedürlerin uygulanmasına olanak sağlamıştır (207).

Gebelik, laktasyon, aktif kanama veya kanama diyatezi, ciddi koroner arter hastalığı veya son 6 ay içinde geçirilmiş myokard infarktüsü durumlarında kullanımı kontraindikedir. Antihipertansifler (beta blokörler, kalsiyum kanal blokörler, angiotensin converting enzyme inhibitors) ve kanama eğilimini arttıran (heparin, coumadin, asetil salisilik asit) ilaçlar ile etkileşime girerek sinerjik etkide bulunabilir. Hamilelerde kullanımında Kategori C ilaçlar (Food and Drug Administration) içinde sınıflandırılmıştır. Özellikle diyalize giren kronik böbrek yetmezliği hastaları ve

karaciğer fonksiyon bozukluğunda dozaj ayarlaması yapılmalıdır. İntoksikasyonunda antidotu yoktur, ilaç kesilmesi yeterlidir (15).

2.8.5.Tolerans:

Hastalar arasında toleransta belirgin değişiklik olup, kişinin iloprost'a olan toleransı dozun kademeli olarak artırılmasıyla sağlanabilir. İlaça bağlı yan etkiler, doz yükseldikçe artar, ilaç kesildiğinde ise kaybolur (15).

Yüzde kızarma ve baş ağrısı en sık görülen yan etki olup; % 70 oranında rastlanır, sonrasında sırasıyla bulantı (%30) ve kusma (%16) gelir. Gastrointestinal yan etkiler (kramp, diyare) kullanılan dozlar yükseldikçe artış gösterir. Bu rahatsız edici gastrointestinal yan etkilerden iloprost dozu kademeli olarak artırılarak kurtulabilir. Ciddi koroner arter hastalarında, iloprost infüzyonu sonrası anjina olduğu gözlenmiştir. Bu durum, artmış adenosin seviyesine ikincil gelişim taşikardi veya azalmış aortik / poststenotik kan basıncına bağlı gelişmiş olabilir. Tedavisinde iloprost infüzyonu kesilir, adenosin antagonisti olan aminofilin tatbik edilir. Periferik arter hastalığı tedavisinde, ≤ 2 ng/kg/dk aralıklı iloprost infüzyonu sırasında ciddi hipotansiyon nadir olup, az da olsa postural hipotansiyon bildirilmiştir. Hemodiyaliz sırasında 2 ng/kg/dk iloprost tedavisi birçok hastada semptomatik hipotansiyon yapmıştır. Bu durum hemodiyalize bağlı yükselmiş prostanooidlerin iloprost'a olan artmış hassasiyetine bağlanmıştır. Ekstrakorporeal dolaşımda, heparinle indüklenmiş platelet aktivasyonunu engellemek amaçlı yüksek doz (≈ 24 ng/kg/dk) iloprost kullanımı da ciddi hipotansiyona neden olabilir. Bu durum ilacın kesilip norepinefrin uygulanmasıyla düzeltilebilir (207). Diğer nadir yan etkiler; huzursuzluk, sedasyon, halsizlik, uykusuzluk, ani terleme, lokal eritem, kas ağrıları ve krampları, ağız kuruluğu ve iştahta azalmadır (15).

3. MATERYAL METOD

Bu çalışmada Süleyman Demirel Üniversitesi ‘Deney hayvanı Üretim Laboratuvarı’ ndan temin edilen, her iki cinsten ve ortalama ağırlıkları 200-250 gr olan 24 adet Wistar-Albino cinsi rat kullanıldı. Ratlar rast gele ve eşit sayıda (n = 8) olarak üç gruba ayrıldı. Ratlar deney öncesi bir hafta süre ile, tel kafeslerde, 12 saat gece 12 saat gündüz sirkadiyan ritm de, ortam sıcaklığı 24-26 °C ve nem oranı %50-60 olacak şekilde tutuldu. Ratların beslenmesin de standart ticari pellet yemi ve şehir içme suyu kullanıldı. Ratların çalışmadan 12 saat öncesinden yemleri kesildi ancak bu dönemde su içmelerine izin verildi. Tüm ratların bakımları; Tıbbi Araştırmalar Ulusal Derneği tarafından biçimlendirilen ‘Deney Hayvanlarının Bakım Prensipleri’ne ve Laboratuvar Hayvanı Kaynakları Enstitüsü tarafından hazırlanıp Ulusal Sağlık Enstitüsü tarafından yayınlanan (NIH basım no. 85 – 23 , 1985 revize edildi) ‘Laboratuvar Hayvanlarının Bakım ve Kullanımı için Kılavuz’una uygun olarak yapıldı. Çalışma protokolü ve deneysel metod Süleyman Demirel Üniversitesi Etik Kurulu tarafından onaylandı. (29.09.2005 tarih ve 10/05 sayılı Etik Kurul kararı)

3.1 Aortik Oklüzyon ve İskemi Reperfüzyon Modeli

Deney başlangıcında; intramusküler enjeksiyonla, 50 mg/kg dozda ketamine hydrochloride (Ketalar® flakon, Parke-Davis, USA) verilerek anestezi sağlandı (Resim 1). İşlem, bir ısıtma lambası altında, ratlar supin pozisyonda iken gerçekleştirildi. Ciltleri aseptik olarak hazırlanan ratlara orta hat laparotomi yapıldı (Resim 2). Barsakların ıslak gazlı bez yardımıyla uzaklaştırılması ardından, infrarenal abdominal aorta (IAA), dikkatli bir şekilde explore edildi (Resim 3). İAA’ya, travmatik olmayan bir mikrovasküler klemp (vascu-statts II®, midi straight 1001-532; Scanlan Int., St. Paul, MN, USA) konuldu (Resim 4). 120 dakika sonra İAA’ daki mikrovasküler klemp kaldırıldı ve 120 dakika süreyle reperfüzyon sağlandı. Aortik iskemi; klemeleme işlemi sırasında distal aortada pulsasyonun kaybolmasıyla (Resim 5), aortik reperfüzyon ise; klempin kaldırılması sonrası distal aortada pulsasyonun geri gelmesiyle onaylandı (Resim 6). Kontrol grubunu oluşturacak ratlarda laparotomi ve abdominal aort diseksiyonu eşit sürede (240 dakika) uygulandı ancak bu grupta İ-R oluşturulmadı. İ-R dönemlerinde peritoneal boşluktan ısı ve sıvı kaybını en az miktara indirmek için; İAA’ya klemp konulması ve kaldırılması sonrası dönemlerinde, peritoneal boşluğa

serum fizyolojik uygulanıp, batin insizyonu geçici olarak ıslak gazlı bez ile sarılarak kapatıldı. Reperfüzyon süresi sonunda; tüm ratlarda, median laparotomi kesisi yukarıya doğru ilerletilerek mediasten açıldı, kalbe ulaşıldı ve 5 cc'lik enjektör yardımıyla sağ ventriküler boşluktan kan alındı. Aynı şekilde, median laparotomi kesisi sağ inguinal alana ilerletilip, atravmatik cerrahi malzeme yardımıyla sağ femoral arter yaklaşık 1 cm uzunluğunda alındı. Sonrasında sağ gastroknemius kas doku örneği alındı. Femoral arter ve kas doku örnekleri; immunohistokimyasal ve hematoksilen-eosin değerlendirme yapıncaya kadar %10'luk formaldehid solüsyonu içinde saklandı. Ratlardan alınan kanlar, oda sıcaklığında yarım saat bekletildikten sonra, 4000 rpm'de 10 dakika santrifüj edildi ve rat plazma örnekleri -70 derecede saklandı.

Çalışma Dizaynı (Deney Modeli)

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

Grup 1 (Kontrol): Laparotomi ve İAA diseksiyonu yapıldı.

Grup 2 (AİR): Laparotomi ve aortik iskemi reperfüzyon (AİR) yapıldı

Grup 3 (AİR + iloprost) : Laparotomi ve AİR yapıp ratlara iloprost verildi

I. Grup kontrol grubu (n=8); diğer gruplara uygulanan cerrahi işlemin stresi ve süresi eşit olacak şekilde laparotomi ve abdominal aort diseksiyonu işlemi uygulandı.

II. Grup AİR grubu (n=8); cerrahi işlem olan laparotomi ve abdominal aort diseksiyonu ardından infra renal aortaya 120 dakika süre ile atravmatik mikrovasküler klemp ile oklüzyonu takiben 120 dakikalık reperfüzyon işlemi uygulandı.

III. Grup AİR + iloprost (İlomedin® 20 mcg/ml, Schering) grubu (n=8); İloprost grubunda infrarenal aortadaki 120 dakikalık iskemik periyod sonrası klemp kaldırılarak, reperfüzyon periyod başlangıcıyla 0,45 µg/kg/saat dozunda iloprost i.v. infüzyonuna başlandı ve 120 dakikalık reperfüzyon periyodu boyunca infüzyon devam etti (Resim9). İlaç infüzyonu için; uygun antisepsi sonrası, cutdown metoduyla, kuyruk venine sarı renkli branül yerleştirildi (Resim 7-8). Her bir rat için 120 dakika içinde verilmesi gereken toplam iloprost miktarı 2 cc serum fizyolojik içerisinde dilue edilip, infüzyon (compact perfusator®, Braun, Germany) kuyruk veninden, sarı renkli branül yardımıyla yapıldı. Tüm ratlardan; patolojik değerlendirme için sağ gastroknemius kas ve sağ femoral arter doku örnekleri ile biyokimyasal analizler için kan örneği alındı. Doku ve kan örnekleri alınan ratlar dekapitasyon yöntemiyle sakrifiye edildi.



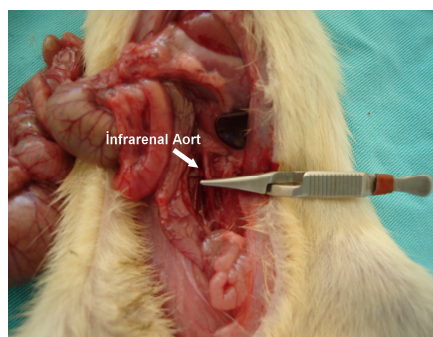
Resim 1



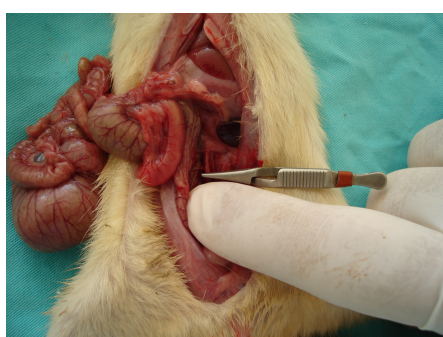
Resim 2



Resim 3



Resim 4



Resim 5



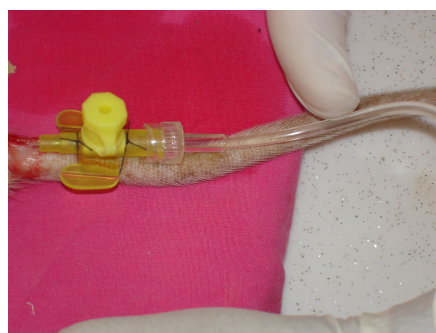
Resim 6



Resim 7



Resim 8



Resim 9

3.2 Biyokimyasal İşlemler:

Ratlar'dan alınan kanlar oda sıcaklığında yarım saat bekletildikten sonra 4000 rpm'de 10 dakika çevrilerek eritrositlerden ayrılan plazma -70 derecede saklandı. Sonrasında saklanmış plazmalar oda sıcaklığına getirilerek, iskemi- reperfüzyon hasarı göstergeleri olan MDA, CPK, P selektin, ICAM-I ve VCAM-I değerleri biyokimya bölümü tarafından ölçüldü.

a) Malondialdehid (MDA) Ölçümü:

Doku MDA High Performance Liquid Chromatography (HPLC) metoduyla; MDA kiti (İmmundiagnostic serum/plazma MDA kiti®, İmmundiagnostic Systems, Frankfurt, Almanya) kullanılarak, HPLC cihazı (Finnigan MAT TS700, Thermo Finnigan, San Jose, CA, USA)'nda çalışıldı.

b) Creatine Phosphokinase (CPK) Ölçümü:

Spektrofotometrik yöntemle (340 nm dalga boyunda); CPK kiti (Abbott Clinical chemistry CPK Kit No: 7D63-20®, Abbott Laboratories, Abbott Park, IL, USA) kullanılarak, spektrofotometre cihazı (Aeroset Automated Instrument Analyzer, Abbott Laboratories, Abbott Park, IL, USA)'nda çalışıldı.

c) P selektin (CD62P) Ölçümü:

Eliza yöntemiyle (450 nm dalga boyunda); P selektin kiti (Mouse sP-Selectin Quantikine®, R&D Systems, Inc., Minneapolis, USA) kullanılarak, Eliza cihazı (ELx808iu ultramicroplate reader Biotek Instruments, Winooski, Vermont, USA)'nda çalışıldı. Katalog no: MPS00

c) Intercellular Adhesion Molecule -1 (ICAM-I) (CD54) Ölçümü:

Eliza yöntemiyle (450 nm dalga boyunda); ICAM-I kiti (Mouse sICAM-I Quantikine®, R&D Systems, Inc., Minneapolis, USA) kullanılarak, Eliza cihazı (ELx808iu ultramicroplate reader Biotek Instruments, Winooski, Vermont, USA)'nda çalışıldı. Katalog no: RIC100

d) Vascular Cell Adhesion Molecule – 1 (VCAM-I) Ölçümü:

Eliza yöntemiyle (450 nm dalga boyunda); VCAM-I kiti (Mouse sVCAM-I Quantikine® R&D Systems, Inc., Minneapolis, USA) kullanılarak, Eliza cihazı (ELx808iu ultramicroplate reader Biotek Instruments, Winooski, Vermont, USA)'nda çalışıldı. Katalog no: MVC00

3.3 Femoral Arter ve Gastroknemius Kas Doku Örneklerinin Histopatolojik Olarak Değerlendirmesi:

Histopatolojik inceleme için doku örnekleri % 10'luk tamponlu nötral formaldehit solüsyonunda 24 saat fiske edildi. Örneklerin tümü doku takip cihazında (Shandon Pathcenter) rutin takibe alınarak parafin bloklar hazırlandı. Bu parafin bloklardan mikrotom (Leica Rotary) ile her doku örneği için 5 µm kalınlığında seri kesitler hazırlanarak Hematoksilen Eozin (HE) ve immunohistokimyasal (IHC) boyalar ile boyandı. Işık mikroskobu ile histopatolojik inceleme yapıldı.

a)Hematoksilen Eosin (HE) Boyama Tekniği ve Değerlendirme:

i)HE boyama tekniği:

Seçilen parafin bloklardan elde edilen 5 µm kalınlığındaki kesitler lamlara alınarak, ısıtıcı tablasında 70 °C de kurutuldu. Sonrasında, deparafinizasyon işlemi için; 20 dakika ksilende, dehidratasyon işlemi için; 20 dakika %96 alkolde bekletildi. Yaklaşık 5 dakika sudan geçirilen preparatlar 1 dakika kadar Mayers Hematoksilen (Mayer's Hematoxylin, 06002L®, Bio-Optica, Milano, İtaly)'de tutuldu. Yeniden 2 dakika sudan geçirilip, 30 saniye Eosin'de tutulan preparatlar sonrasında 2 dakika kadar sudan geçirildi. Tüm bu işlemler sonrasında, preparatlar 2 dakika alkolden geçirildi ve kurutuldu. Kurumuş preparatlar ksilene konulup entellan ile kapatılarak mikroskopik değerlendirme için hazır hale getirildi.

ii)HE Değerlendirme:

Femoral arter ve gastroknemius kas doku HE kesitlerinde; kontrol, AIR, AIR+iloprost gruplarında histopatolojik olarak belirgin değişiklik saptanmadı.

b)Immünohistokimyasal (IHC) Boyama Tekniği ve Değerlendirme:

i)IHC boyama tekniği:

Seçilen parafin bloklardan elde edilen 5 µm kalınlığındaki kesitler poly-L-Lizin kaplı lamlara alınarak, 37 °C'lik etüvde 1 gece bekletildi. Sonrasında 10 dakika ksilene konularak deparafinize edilen kesitler %96'lık saf alkolde 5 dakika bekletilerek dehidratasyon sağlandı. Ardından 2 dakika distile suda yıkandı. Bu işlemi takiben, antijen geri alımının sağlanabilmesi için, sitratlı tampon (ph:6) solüsyonu içinde, 98 °C de 20 dakika kaynatıldı ve aynı tampon içerisinde oda ısısında 20 dakika soğutuldu. Sonrasında IHC boyamaya geçildi. İlk olarak, endojen peroksidaz aktivitesini ortadan

kaldırmak için, % 3'lük hidrojen peroksit ile bloklama işlemine tabi tutulup, 20 dakika inkübasyon yapıldı ve 5 dakika Fosfat Buffer Solüsyonu (PBS) ile yıkandı. Sonrasında 5 dakika protein blok (Large Volume Ultra V Block, TA-125-UB®, Lab Vision Corporation, Fremont, CA, USA) uygulandı. Bu işlemi takiben kesitler yıkanmadan üzerlerindeki bloke eden solüsyon silkelenerek primer antikorlar uygulandı.

Uygulanan her bir primer antikor için farklı dilüsyon oranı ve inkübasyon zamanı uygulaması yapıldı;

1. P-Selectin goat polyclonal (M-20/ SC-6943®, Santa Cruz Biotechnology, Inc. Santa Cruz, California ,U.S.A), 1/100 dilüsyon, 60 dakika inkübasyon
2. L-Selectin goat polyclonal (N-18/SC-6946®, Santa Cruz Biotechnology, Inc. Santa Cruz, California ,U.S.A), 1/100 dilüsyon, 60 dakika inkübasyon.
3. TNF alpha Mouse Monoclonal (clone P/T2®, Histopathology Ltd, Hungary), 1/50 dilüsyon, 30 dakika inkübasyon.
4. CD11b (CBL 11®, Chemicon International, Inc., Temecula, California, USA), 1/100 dilüsyon, 60 dakika inkübasyon.
5. İntegrin β 2 (CD18) (M 18/2- SC-18862®, Santa Cruz Biotechnology, Inc. Santa Cruz, California ,U.S.A), 1/100 dilüsyon, 60 dakika inkübasyon.
6. ICAM-I (CD54) Mouse Monoclonal (15,2 / SC-107®, Santa Cruz Biotechnology, Inc. Santa Cruz, California ,U.S.A), 1/100 dilüsyon, 60 dakika inkübasyon.
7. COX-2 goat polyclonal (M-19 / SC-1747®, Santa Cruz Biotechnology, Inc. Santa Cruz, California ,U.S.A), 1/200 dilüsyon, 60 dakika inkübasyon.

Sonrasında primer antikorlar PBS' de 5 dakika yıkayıp, sekonder antikor (Biotinylated Goat Anti Polyvalent, TP-125-BN®, Lab Vision Corporation, Fremont, CA, USA) damlatılıp 20 dakika inkübasyon yapıldı. Tekrar PBS' de 5 dakika yıkanarak, tersiyer antikor (Large Volume Streptavidin Peroxidase, TS-125-HR®, Lab Vision Corporation, Fremont, CA, USA) damlatıldı ve 20 dakika inkübasyonda bırakıldı. 5 dakikalık PBS yıkaması tekrarlandı. Sonrasında diaminobenzidine (DAB) kromojen (TA-125-HD®, Lab Vision Corporation, Fremont, CA, USA) damlatılıp, 5-15 dakika inkübasyon sağlandı ve distile suda yıkandı. Dokular Mayer's Hematoksilen (Mayer's Hematoxylin, 06002L®, Bio-Optica, Milano, İtaly) içinde 1 dakika süreyle zıt boyandı. Ardından distile suda 2-5 dakika yıkayıp alkolden geçirildi. Havada kurutulan preparatlar ksilene konularak entellan ile kapatıldı.

ii) IHC Değerlendirme:

Femoral arter ve gastroknemius kas doku kesitlerinde, IHC olarak; P selektin, L selektin, TNF- α , CD11b, CD18, ICAM-1(CD54) ve COX-2 boya tutulum yoğunluğu ve şiddeti incelendi. Femoral arter kesitlerinde; P selektin, L selektin, TNF- α , CD11b, CD18 ve ICAM-1 (CD54) için sadece damar endoteli değerlendirilirken, COX-2 için hem damar endoteli hem de damar adventisyası değerlendirildi.

Tüm doku kesitlerinin P selektin, L selektin, TNF- α , CD11b, CD18, ICAM-1 (CD54) IHC boyamalarında; boya tutulum ve yoğunluğu, Andrej ve arkadaşlarının (305) yaptığı çalışmadaki skorlama sistemi referans alınarak; -, + ve ++ (-; boyama yok, +; hafif boyanma, ++; şiddetli boyanma) olarak derecelendirildi. IHC bulguların gruplara göre ortalama skorları (-) boyama yok 0 puan, (+) hafif 1 puan ve (++) şiddetli 2 puan olarak derecelendirilerek hesaplandı.

Tüm doku kesitlerinin COX-2 değerlendirilmesinde; boya tutulum ve yoğunluğu, yine Andrej ve arkadaşlarının (305) yaptığı çalışmadaki skorlama sistemi referans alınarak; -, +, ++ ve +++ (-; boyama yok, +; hafif boyanma, ++; orta boyanma, +++; şiddetli boyanma) olarak derecelendirildi. IHC bulguların gruplara göre ortalama skorları (-) bulgu yok 0 puan, (+) hafif 1 puan, (++) orta 2 puan ve (+++) şiddetli 3 puan olarak derecelendirilerek hesaplandı.

Tüm patolojik incelemeler, kesitlerin hangi gruba ait olduğunu bilmeyen bir patolog tarafından kör olarak yapıldı.

3.4 İstatistiksel Analiz

İstatistiksel analizin yapılmasında bilgisayar programı olarak SPSS13 (SPSS Inc., Chicago, IL, USA) kullanıldı. Sayısal değişkenler 'ortalama \pm standart sapma' şeklinde sunuldu. P değerinin 0.05'den küçük olması istatistiksel olarak anlamlı kabul edildi. Biyokimyasal ve histopatolojik bulguların istatistiksel değerlendirilmesi sırasında gruplar arasındaki anlamlı farkların belirlenmesinde Kruskal-Wallis testi, iki grup arasındaki farkın belirlenmesinde de Mann-Whitney U testi kullanıldı. Kruskal-Wallis testi için $p < 0.01$ değerleri ve Mann-Whitney U testi için $p < 0.05$ değerleri istatistiksel olarak anlamlı kabul edildi.

4. BULGULAR

4.1 Biyokimyasal Bulgular

	MDA ($\mu\text{mol} / \text{L}$)	CPK (u / L)	P seletin (ng / ml)	ICAM-1 (pg / ml)	VCAM-1 (ng / ml)
1	0,68	11270,00	2,35	-	-
2	0,65	6960,00	2,75	-	5,50
3	0,51	10246,00	-	18071,00	5,95
4	1,02	-	2,35	15555,55	2,75
5	-	-	2,35	19438,00	7,85
6	-	10810,00	1,55	23078,75	4,45
7	-	13107,00	-	18182,15	2,35
8	0,92	-	-	18991,60	3,10

Tablo 2: Kontrol grubu biyokimyasal değerlendirme sonuçları

	MDA ($\mu\text{mol} / \text{L}$)	CPK (u / L)	P seletin (ng / ml)	ICAM-1 (pg / ml)	VCAM-1 (ng / ml)
1	0,88	24600,00	-	21415,65	-
2	0,95	-	15,20	-	19,90
3	1,09	28280,00	5,45	21031,45	19,90
4	1,37	12038,00	4,70	24013,40	20,05
5	1,75	12640,00	14,00	20671,10	20,05
6	1,68	28290,00	-	24402,30	4,85
7	0,92	-	-	24629,35	4,85
8	0,88	12420,00	4,30	36343,40	-

Tablo 3: AİR grubu biyokimyasal değerlendirme sonuçları

	MDA ($\mu\text{mol} / \text{L}$)	CPK (u / L)	P seletin (ng / ml)	ICAM-1 (pg / ml)	VCAM-1 (ng / ml)
1	0,54	10427,00	-	-	-
2	-	9294,00	2,70	15794,55	-
3	-	-	7,80	14176,75	-
4	-	13262,00	-	14542,85	9,00
5	0,78	11747,00	-	9710,45	6,00
6	0,37	10422,00	3,75	9575,20	4,80
7	0,41	9756,00	2,70	13293,70	7,00
8	0,54	-	3,90	14854,65	4,95

Tablo 4: AİR + İloprost grubu biyokimyasal değerlendirme sonuçları

Not:Tablolardaki(-) işareti ile gösterilen parametreler teknik nedenlerle biyokimyasal değerlendirmelerin yapılamadığı veya hatalı çıkan sonuçları göstermekte olup istatistiksel değerlendirme dışında tutulmuştur.

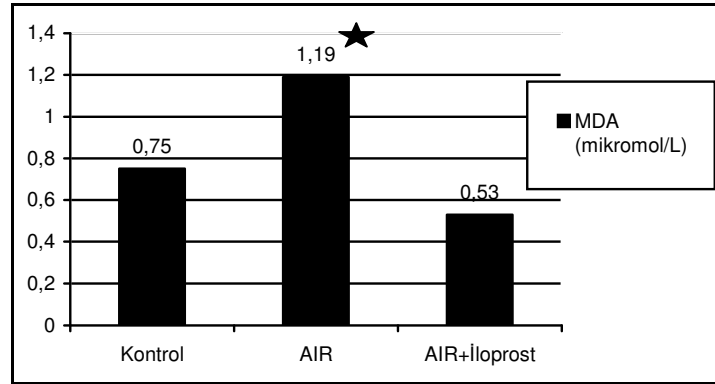
	Kontrol Grubu	AİR Grubu	AİR +iloprost Grubu
MDA ($\mu\text{mol} / \text{L}$)	0,75 \pm 0,20	1,19 \pm 0,36 ^a	0,53 \pm 0,16
CPK (u / L)	10478,60 \pm 2240,49	19711,33 \pm 8160,41 ^a	10818,00 \pm 1455,76
P selektin (ng / ml)	2,27 \pm 0,43 ^a	8,73 \pm 5,39 ^a	4,17 \pm 2,10
ICAM-1 (pg / ml)	18886,17 \pm 2455,46 ^a	24643,80 \pm 5425,07 ^a	13135,45 \pm 2500,75
VCAM-1 (ng / ml)	4,56 \pm 1,99	14,93 \pm 7,81 ^b	6,35 \pm 1,72

Tablo 5: Gruplara göre biyokimyasal sonuçların ortalama ve standart sapma değerleri

a: Diğer gruplar ile karşılaştırıldığında $p < 0.05$

b: Kontrol grubu ile karşılaştırıldığında $p < 0.05$

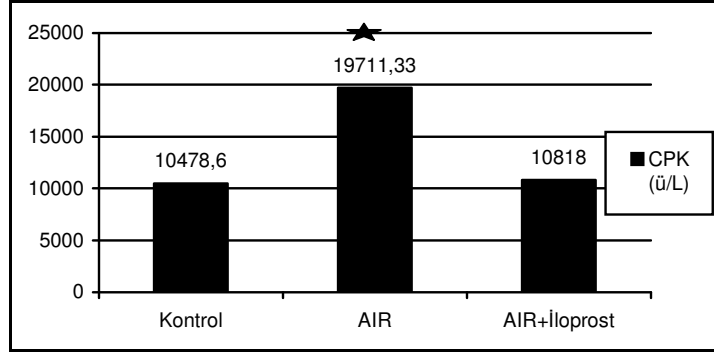
MDA, CPK, P selektin, ICAM-1 ve VCAM-1 plazma değerlerinin; AİR grubunda kontrol grubu değerlerine göre anlamlı olarak arttığı ($p < 0.05$), AİR+iloprost grubunda ise plazma MDA, CPK, P selektin ve ICAM-1 değerlerinin AİR grubu değerlerine göre anlamlı olarak azaldığı ($p < 0.05$) saptandı. AİR+iloprost grubu ICAM-1 plazma değerlerinin kontrol grubu değerlerine göre anlamlı azaldığı ($p < 0.05$) saptanırken, AİR+iloprost grubu P selektin plazma değerlerinin kontrol grubu değerlerine göre anlamlı olarak arttığı ($p < 0.05$) saptandı (Tablo 5).



Grafik 1: MDA'nın ($\mu\text{mol/L}$) gruplar arası değerlerinin grafiksel analizi

★ Diğer gruplar ile karşılaştırıldığında $p < 0.05$

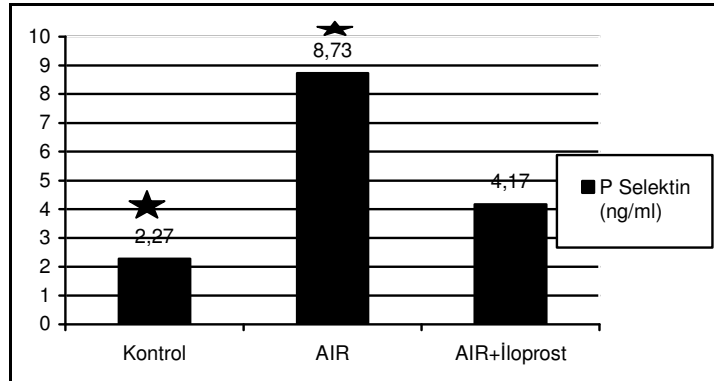
AİR grubu plazma MDA değerlerinin kontrol grubu değerlerine göre anlamlı düzeyde arttığı bulundu ($p < 0.05$). AİR+iloprost grubu plazma MDA değerlerinin ise AİR grubu değerlerine göre anlamlı düzeyde azaldığı bulundu ($p < 0.05$). Kontrol grubu MDA değerleri ile AİR+iloprost grubu MDA değerleri arasında anlamlı fark bulunmadı ($p > 0.05$) (Grafik1).



Grafik 2: CPK'nın (u / L) gruplar arası değerlerinin grafiksel analizi

★ Diğer gruplar ile karşılaştırıldığında $p < 0.05$

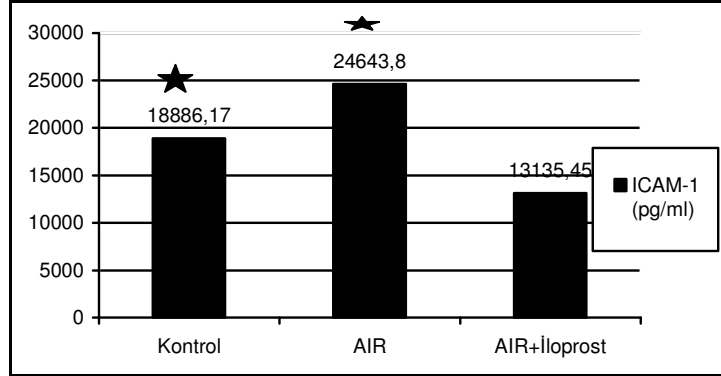
AİR grubu plazma CPK değerlerinin kontrol grubu değerlerine göre anlamlı düzeyde arttığı bulundu ($p < 0.05$). AİR+İloprost grubu plazma CPK değerlerinin ise AİR grubu değerlerine göre anlamlı düzeyde azaldığı bulundu ($p < 0.05$). Kontrol grubu CPK değerleri ile AİR+İloprost grubu CPK değerleri arasında anlamlı fark bulunmadı ($p > 0.05$) (Grafik 2).



Grafik 3: P seletin'in (ng/ml) gruplar arası değerlerinin grafiksel analizi

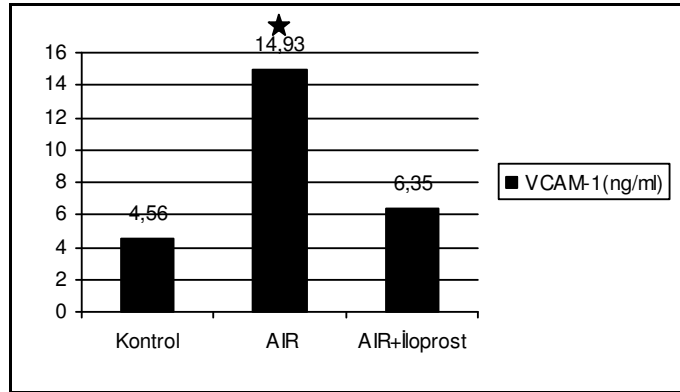
★ Diğer gruplar ile karşılaştırıldığında $p < 0.05$

AİR ve AİR+İloprost grupları plazma P seletin değerlerinin kontrol grubu değerlerine göre anlamlı düzeyde arttığı bulundu ($p < 0.05$). AİR+İloprost grubu plazma P seletin değerlerinin ise AİR grubu değerlerine göre anlamlı düzeyde azaldığı bulundu ($p < 0.05$) (Grafik 3).



Grafik 4: İCAM-1'in (pg/ml) gruplar arası değerlerinin grafiksel analizi
★ Diğer gruplar ile karşılaştırıldığında $p < 0.05$

AİR grubu plazma İCAM-1 değerlerinin kontrol grubu değerlerine göre anlamlı düzeyde arttığı bulundu ($p < 0.05$). AİR+İloprost grubu plazma İCAM-1 değerlerinin ise AİR ve kontrol grupları değerlerine göre anlamlı düzeyde azaldığı bulundu ($p < 0.05$) (Grafik 4).



Grafik 5: VCAM-1'in (ng/ml) gruplar arası değerlerinin grafiksel analizi
★ Kontrol grubu ile karşılaştırıldığında $p < 0.05$

AİR grubu plazma VCAM-1 değerlerinin kontrol grubu değerlerine göre anlamlı düzeyde arttığı bulundu ($p < 0.05$) (Grafik 5).

4.2 Histopatolojik Bulgular:

a) HE Değerlendirme:

Kontrol, AİR ve AİR+İloprost grupları rutin femoral arter HE kesitlerinde damar endotel hücrelerine ait belirgin değişiklik gözlenmedi. AİR grubunda endotel hücrelerinde hafif hidropik dejenerasyon vardı (Resim 1).

Kontrol, AİR ve AİR+İloprost grupları rutin gastroknemius kas HE kesitlerinde kesit dahilindeki damar endotel hücrelerinde belirgin değişiklik gözlenmedi (Resim 9).

b)IHC Değerlendirme:

i)Femoral arter:

Kontrol grubuna ait femoral arter doku kesitlerinin İHC değerlendirmesinde; ortalama olarak, P selektin, L selektin, TNF- α , CD11b, CD18 ve ICAM-1 için immunoreaktivitenin olmadığı (ortalama skor; -) görüldü (Tablo 6)(Resim 2,3,4,5,6,7). COX2 için ise, ortalama olarak, damar endotel hücre ve adventisyası immünoreaktivitesinin orta düzeyde (ortalama skor; ++) olduğu saptandı (tablo 7)(Resim 8).

AİR grubuna ait femoral arter doku kesitlerinin İHC değerlendirmesinde; ortalama olarak, P selektin, L selektin, TNF- α , CD11b, CD18 ve ICAM-1 için immunoreaktivitenin şiddetli düzeyde (ortalama skor; ++) olduğu görüldü (Tablo 6) (Resim 2,3,4,5,6,7). COX2 için ise, ortalama olarak, damar endotel hücre ve adventisyası immünoreaktivitesinin şiddetli düzeyde (ortalama skor; +++) olduğu saptandı (tablo 7)(resim8).

AİR+iloprost grubuna ait femoral arter doku kesitlerinin İHC değerlendirmesinde; ortalama olarak, P selektin, L selektin, TNF- α , CD11b, CD18 ve ICAM-1 için immunoreaktivitenin hafif düzeyde (ortalama skor; +) olduğu görüldü (Tablo 6) (Resim 2,3,4,5,6,7). COX2 için ise; ortalama olarak, damar endotel hücre ve adventisyası immünoreaktivitesinin orta düzeyde (ortalama skor; ++) olduğu saptandı (tablo 7) (resim8).

Ortalama skorları alınan histopatolojik bulguların Kruskal-Wallis yöntemiyle istatistiksel analizinde P selektin, L selektin, TNF- α , CD11b, CD18, ICAM-1 ve COX2 İHC parametreleri açısından anlamlı farklılık saptandı ($p<0.01$)(tablo 6, 7).

Grupların her birisi kendi arasında karşılaştırılıp değişikliklerin Mann-Whitney U yöntemiyle istatistiki anlamlılığı incelendiğinde, P selektin, L selektin, TNF- α , CD11b, CD18 ve ICAM-1 immünoreaktivitesinin; AİR ve AİR+iloprost gruplarında, Kontrol grubuna göre anlamlı düzeyde yükseldiği saptandı ($p<0.05$). AİR+iloprost grubu P selektin, L selektin, TNF- α , CD11b, ICAM-1 ve COX2 (endotel ve adventisya) immünoreaktivitesinin ise; AİR grubuna göre, anlamlı derecede düştüğü saptandı ($p<0.05$). COX2 için ise; hem endotel hemde adventisya değerlendirmelerinde, AİR grubu immünoreaktivitesinin kontrol grubuna göre anlamlı düzeyde yükseldiği ($p<0.05$), AİR+iloprost grubu immünoreaktivitesinin ise AİR grubuna göre anlamlı derecede azaldığı ($p<0.05$) saptandı. Femoral arter adventisyası COX2 immünoreaktivitesi AİR+iloprost grubunda kontrol grubuna göre anlamlı düzeyde ($p<0.05$) artarken,

femoral arter endoteli COX2 immunohistokimyasal incelemesinde kontrol ve AİR+iloprost gruplarında anlamlı fark bulunmadı ($p>0.05$)(tablo 6, 7).

ii)Gastroknemius kas:

Kontrol grubuna ait gastroknemius kas doku kesitleri İHC değerlendirmesinde; ortalama olarak, P selektin, L selektin, TNF- α , CD11b, CD18 ve ICAM-1 için immunoreaktivitenin olmadığı (ortalamaskor;-) görüldü (tablo8) (Resim 10,11,12,13, 14,15).COX2 için ise, ortalama olarak, kas dokusu içi endotel hücre immünoreaktivitesi hafif düzeyde (ortalama skor; +) olduğu saptandı (tablo 9)(resim 16).

AİR grubuna ait gastroknemius kas doku kesitlerinin İHC değerlendirmesinde; ortalama olarak, P selektin, L selektin, TNF- α , CD11b, CD18 ve ICAM-1 için immunoreaktivitenin şiddetli düzeyde (ortalama skor; ++) olduğu görüldü (tablo 8) (Resim 10, 11,12,13,14,15). COX2 için ise, ortalama olarak, kas dokusu içi endotel hücre immünoreaktivitesi şiddetli düzeyde (ortalama skor;+++) olduğu saptandı (tablo9) (resim 16).

AİR+iloprost grubuna ait gastroknemius kas doku kesitlerinin İHC değerlendirmesinde; ortalama olarak, P selektin, L selektin, TNF- α , CD11b, CD18 ve ICAM-1 için immunoreaktivitenin hafif düzeyde (ortalama skor; +) olduğu görüldü (tablo 8) (Resim 10,11,12,13,14,15). COX2 için ise, ortalama olarak, kas dokusu içi endotel hücre immünoreaktivitesi orta düzeyde (ortalama skor; ++) olduğu saptandı (tablo 9) (resim 16).

Ortalama skorları alınan histopatolojik bulguların Kruskal-Wallis yöntemiyle istatistiksel analizinde P selektin, L selektin, TNF- α , CD11b, CD18, ICAM-1 ve COX2 İHC parametreleri açısından anlamlı farklılık saptandı ($p<0.05$) (tablo 8, 9).

Grupların her birisi kendi arasında karşılaştırılıp değişikliklerin Mann-Whitney U yöntemiyle istatistiki anlamlılığı incelendiğinde, P selektin, L selektin, TNF- α , CD11b, CD18 ve ICAM-1 immünoreaktivitesinin; AİR ve AİR+iloprost gruplarında, kontrol grubuna göre anlamlı düzeyde yükseldiği saptandı ($p<0.05$). AİR+iloprost grubu P selektin, L selektin, CD18 ve COX2 immünoreaktivitesinin ise; AİR grubuna göre, anlamlı derecede düştüğü saptandı ($p<0.05$). COX2 için ise; AİR grubu immünoreaktivitesinde kontrol grubuna göre anlamlı düzeyde yükselme ($p<0.05$) ve AİR+iloprost grubu immünoreaktivitesin de AİR grubuna göre anlamlı düzeyde azalma saptandı ($p<0.05$) (tablo 8, 9).

FEMORAL ARTER

Femoral Arter	Kontrol Grubu (n=8) (Grup I)				AİR Grubu (n=8) (Grup II)				AİR+iloprost Grubu (n=8) (Grup III)				Kruskal-Wallis	Mann-Whitney U
	-	+	++	Ortalama Skor	-	+	++	Ortalama Skor	-	+	++	Ortalama Skor	P	P<0.05
P selektin	5	3	0	-	0	0	8	++	1	7	0	+	p<0.01	I-II, II-III, I-III
L selektin	5	3	0	-	0	0	8	++	1	7	0	+	p<0.01	I-II, II-III, I-III
TNF α	7	1	0	-	0	0	8	++	0	6	2	+	p<0.01	I-II, II-III, I-III
CD11b	5	3	0	-	0	0	8	++	0	7	1	+	p<0.01	I-II, II-III, I-III
CD18	6	2	0	-	0	2	6	++	0	6	2	+	p<0.01	I-II, I-III
ICAM-1 (CD54)	5	3	0	-	0	0	8	++	0	6	2	+	p<0.01	I-II, II-III, I-III

Tablo 6: Grupların immunohistokimyasal skorları ve değerlerin gruplar arasındaki istatistiksel analizi.

İmmunohistokimyasal bulguların ortalama skorları; (-) boyama yok, (+) hafif boyama, ve (++) şiddetli boyama olarak derecelendirilerek hesaplandı. Gruplar arası anlamlı farkların belirlenmesinde Kruskal-Wallis testi, iki grup arasındaki farkın belirlenmesinde de Mann-Whitney U testi kullanıldı. Kruskal-Wallis testi için p<0.01 değerleri ve Mann-Whitney U testi için p<0.05 değerleri istatistiksel olarak anlamlı kabul edildi.

Femoral Arter	Kontrol Grubu (n=8) (Grup I)					AİR Grubu (n=8) (Grup II)					AİR+iloprost Grubu (n=8) (Grup III)					Kruskal-Wallis	Mann-Whitney U	
	-	+	++	+++	Ort. Skor	-	+	++	+++	Ort. Skor	-	+	++	+++	Ort. Skor	P	P<0.05	
COX2	Endotel	0	3	3	2	++	0	0	0	8	+++	0	0	5	3	++	p<0.01	I-II, II-III
	Advent.	0	4	4	0	++	0	0	0	8	+++	0	0	5	3	++	p<0.01	I-II, II-III, I-III

Tablo 7: Grupların immunohistokimyasal skorları ve değerlerin gruplar arasındaki istatistiksel analizi.

İmmunohistokimyasal bulguların ortalama skorları; (-) boyama yok, (+) hafif boyama, (++) orta boyama ve (+++) şiddetli boyama olarak derecelendirilerek hesaplandı. Gruplar arası anlamlı farkların belirlenmesinde Kruskal-Wallis testi, iki grup arasındaki farkın belirlenmesinde de Mann-Whitney U testi kullanıldı. Kruskal-Wallis testi için p<0.01 değerleri ve Mann-Whitney U testi için p<0.05 değerleri istatistiksel olarak anlamlı kabul edildi.

GASTROKNEMİUS KAS

Gastroknemius Kas	Kontrol Grubu (n=8) (Grup I)				AİR Grubu (n=8) (Grup II)				AİR+iloprost Grubu (n=8) (Grup III)				Kruskal-Wallis	Mann-Whitney U
	-	+	++	Ortalama Skor	-	+	++	Ortalama Skor	-	+	++	Ortalama Skor	P	P<0.05
P selektin	8	0	0	-	0	0	8	++	1	5	2	+	p<0.01	I-II, II-III, I-III
L selektin	8	0	0	-	0	1	7	++	1	6	1	+	p<0.01	I-II, II-III, I-III
TNF α	8	0	0	-	0	2	6	++	0	6	2	+	p<0.01	I-II, I-III
CD11b	7	1	0	-	0	3	5	++	0	5	3	+	p<0.01	I-II, I-III
CD18	8	0	0	-	0	3	5	++	0	7	1	+	p<0.01	I-II, II-III, I-III
ICAM-1 (CD54)	8	0	0	-	0	2	6	++	0	4	4	+	p<0.01	I-II, I-III

Tablo 8: Grupların immunohistokimyasal skorları ve değerlerin gruplar arasındaki istatistiksel analizi.

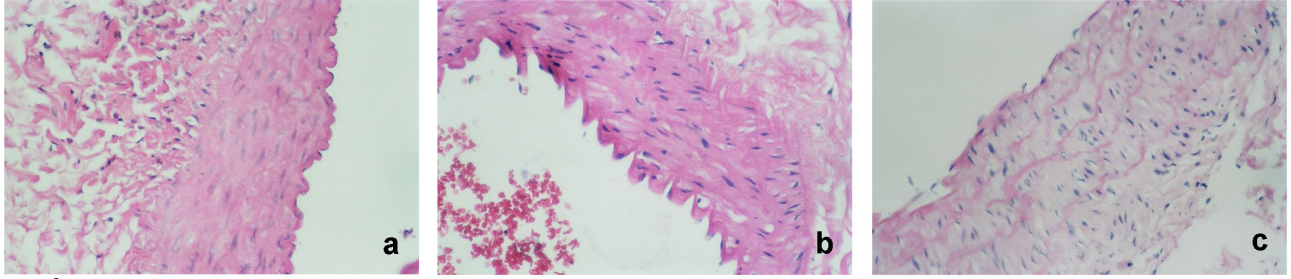
İmmunohistokimyasal bulguların ortalama skorları; (-) boyama yok, (+) hafif boyama, ve (++) şiddetli boyama olarak derecelendirilerek hesaplandı. Gruplar arası anlamlı farkların belirlenmesinde Kruskal-Wallis testi, iki grup arasındaki farkın belirlenmesinde de Mann-Whitney U testi kullanıldı. Kruskal-Wallis testi için p<0.01 değerleri ve Mann-Whitney U testi için p<0.05 değerleri istatistiksel olarak anlamlı kabul edildi.

Gastroknemius Kas	Kontrol Grubu (n=8) (Grup I)					AİR Grubu (n=8) (Grup II)					AİR+iloprost Grubu (n=8) (Grup III)					Kruskal-Wallis	Mann-Whitney U
	-	+	++	+++	Ort Skor	-	+	++	+++	Ort. Skor	-	+	++	+++	Ort. Skor	P	P<0.05
COX2	0	5	3	0	+	0	0	3	5	+++	0	4	3	1	++	p<0.01	I-II, II-III

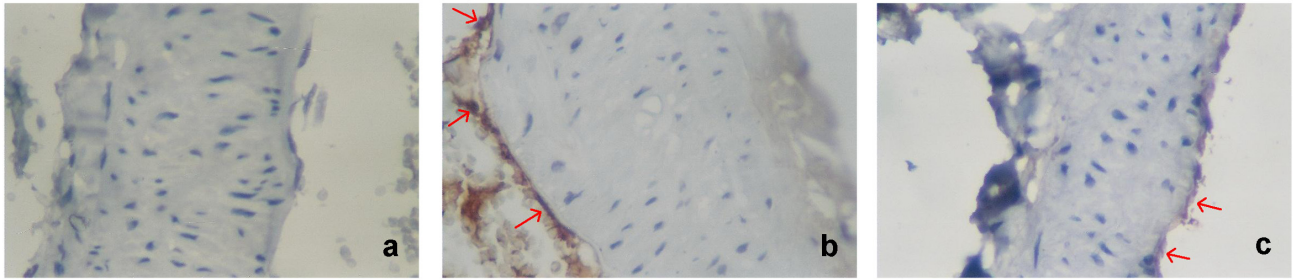
Tablo 9: Grupların immunohistokimyasal skorları ve değerlerin gruplar arasındaki istatistiksel analizi.

İmmunohistokimyasal bulguların ortalama skorları; (-) boyama yok, (+) hafif boyama, (++) orta boyama ve (+++) şiddetli boyama olarak derecelendirilerek hesaplandı. Gruplar arası anlamlı farkların belirlenmesinde Kruskal-Wallis testi, iki grup arasındaki farkın belirlenmesinde de Mann-Whitney U testi kullanıldı. Kruskal-Wallis testi için p<0.01 değerleri ve Mann-Whitney U testi için p<0.05 değerleri istatistiksel olarak anlamlı kabul edildi.

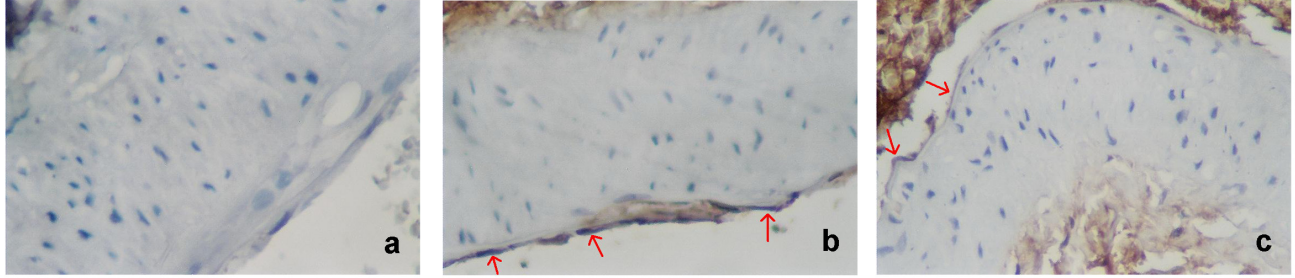
FEMORAL ARTER HİSTOPATOLOJİK KESİTLERİ(1)



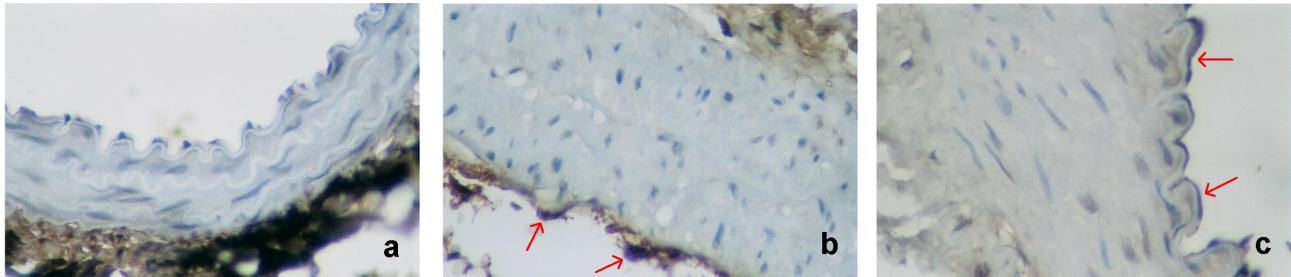
RESİM 1: Femoral arter HE kesitleri.(400xHE)
 a)Kontrol grubu HE kesiti(400xHE)
 b)AiR grubu HE kesiti(400xHE)
 c)AiR+Iloprost grubu HE kesiti(400xHE)



RESİM 2: Femoral arter P seletin immunohistokimyasal kesitleri(400xDAB)
 a)Kontrol grubu P seletin kesiti (400xDAB) (boyama yok, skor;0)
 b)AiR grubu Pseletin kesiti (400xDAB) (güçlü boyanma, skor;++) (ok ile işaretli)
 c)AiR+Iloprost grubu P seletin kesiti (400xDAB) (zayıf boyanma, skor;+) (ok ile işaretli)

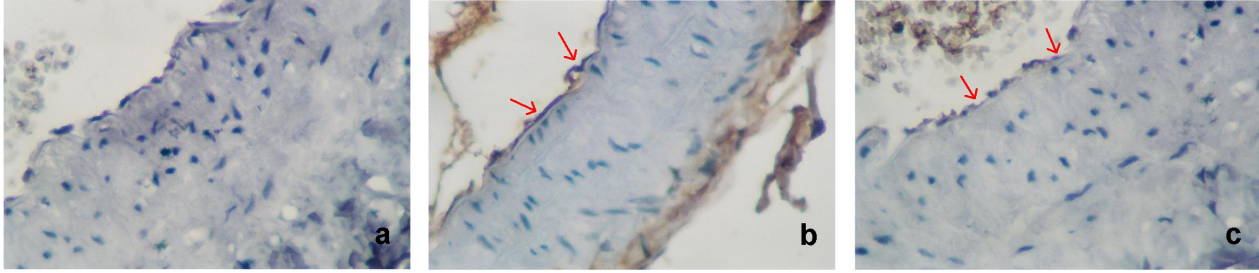


RESİM 3: Femoral arter L seletin immünohistokimyasal kesitleri (400xDAB)
 a)Kontrol grubu L seletin kesiti (400xDAB) (boyanma yok, skor;0)
 b)AiR grubu L seletin kesiti (400xDAB) (güçlü boyanma, skor;++) (ok ile işaretli)
 c)AiR+Iloprost grubu L seletin kesiti (400xDAB) (zayıf boyanma, skor;+) (ok ile işaretli)

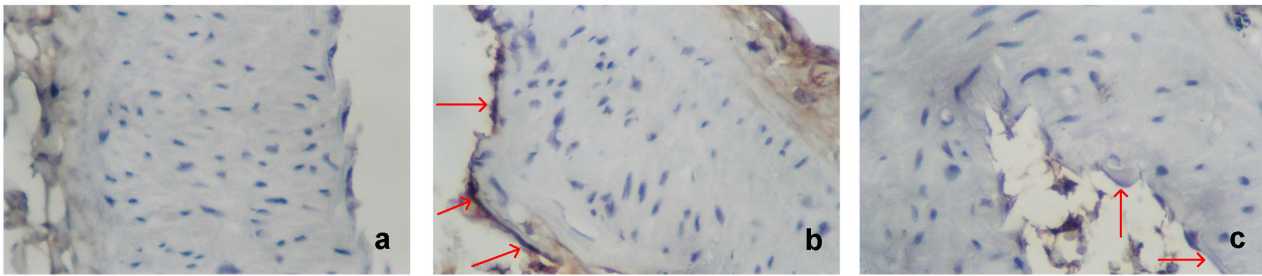


RESİM 4:Femoral arter TNF-alfa immünohistokimyasal kesitleri (400xDAB)
 a)Kontrol grubu TNF-alfa kesiti (400xDAB) (boyanma yok, skor;0)
 b)AiR grubu TNF-alfa kesiti (400xDAB) (güçlü boyanma, skor;++) (ok ile işaretli)
 c)AiR+Iloprost grubu TNF-alfa kesiti (400xDAB) (zayıf boyanma, skor;+) (ok ile işaretli)

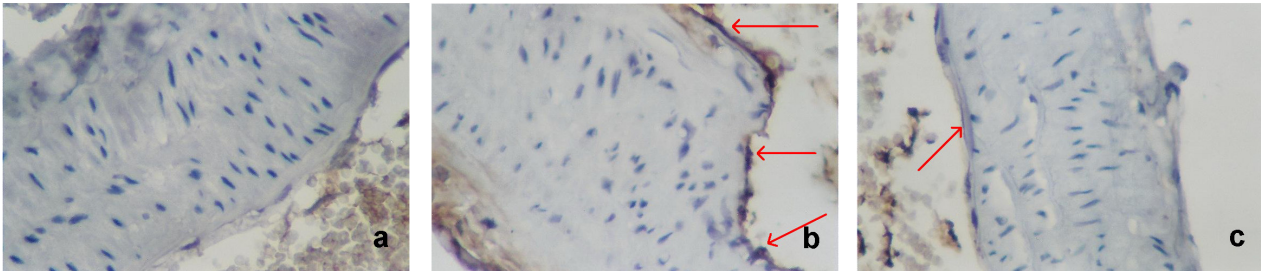
FEMORAL ARTER HİSTOPATOLOJİK KESİTLERİ(2)



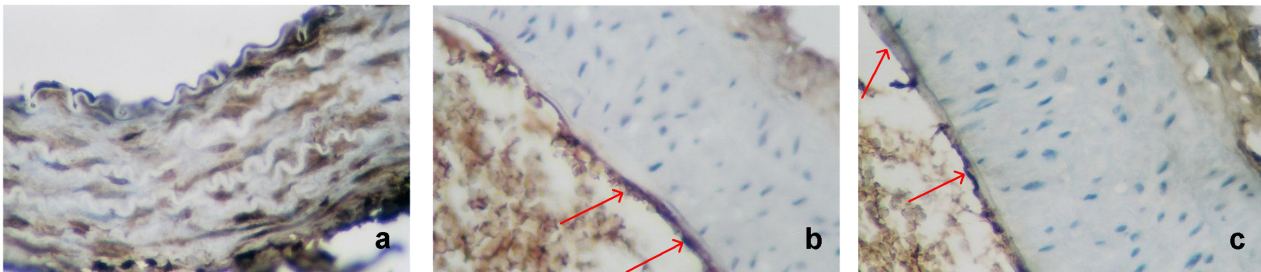
RESİM 5: Femoral arter CD11b immünohistokimyasal kesitleri (400xDAB)
 a)Kontrol grubu CD11b kesiti (400xDAB) (boyanma yok, skor;0)
 b)AIr grubu CD11b kesiti (400xDAB) (güçlü boyanma, skor;++)(ok ile işaretli)
 c)AIr+iloprost grubu CD11b kesiti (400xDAB) (zayıf boyanma, skor;+)(ok ile işaretli)



RESİM 6: Femoral arter CD18 immünohistokimyasal kesitleri (400xDAB)
 a)Kontrol grubu CD18 kesiti (400xDAB) (boyanma yok, skor;0)
 b)AIr grubu CD18 kesiti (400xDAB) (güçlü boyanma, skor;++)(ok ile işaretli)
 c)AIr+iloprost grubu CD18 kesiti (400xDAB) (zayıf boyanma, skor;+)(ok ile işaretli)

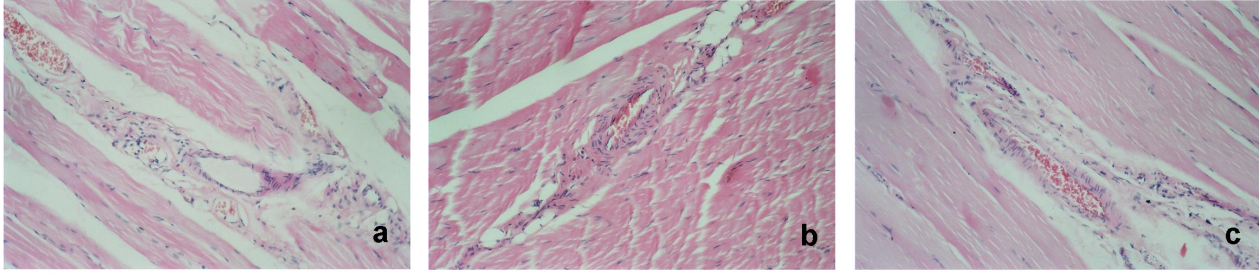


RESİM 7: Femoral arter ICAM-1 immünohistokimyasal kesitleri (400xDAB)
 a)Kontrol grubu ICAM-1 kesiti (400xDAB) (boyanma yok, skor;0)
 b)AIr grubu ICAM-1 kesiti (400xDAB) (güçlü boyanma, skor;++)(ok ile işaretli)
 c)AIr+iloprost grubu ICAM-1 kesiti (400xDAB) (zayıf boyanma, skor;+)(ok ile işaretli)

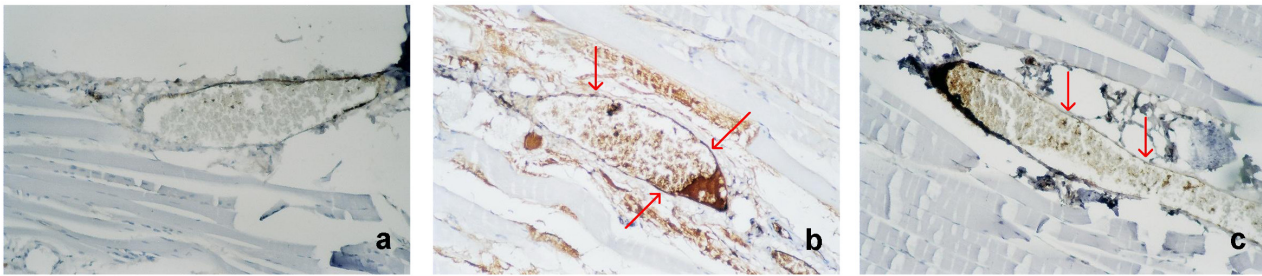


RESİM 8: Femoral arter COX-2 immünohistokimyasal kesitleri (400xDAB)
 a)Kontrol grubu COX-2 kesiti (400xDAB) (boyanma yok, skor;0)
 b)AIr grubu COX-2 kesiti (400xDAB) (güçlü boyanma, skor;++)(ok ile işaretli)
 c)AIr+iloprost grubu COX-2 kesiti (400xDAB) (zayıf boyanma, skor;+)(ok ile işaretli)

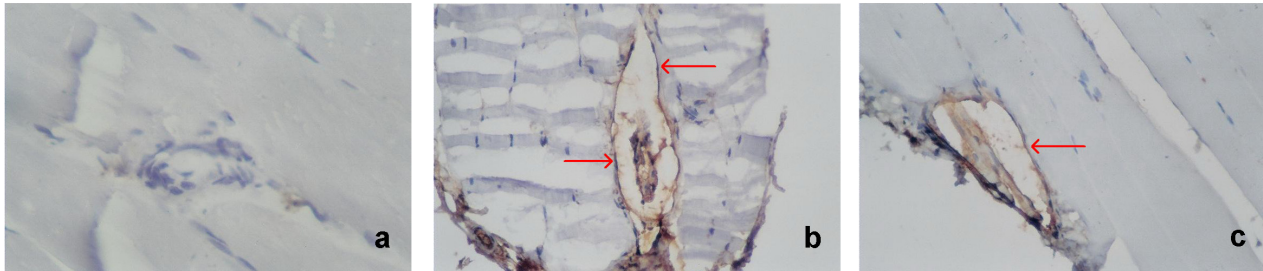
GASTROKNEMIUS KAS HİSTOPATOLOJİK KESİTLERİ(1)



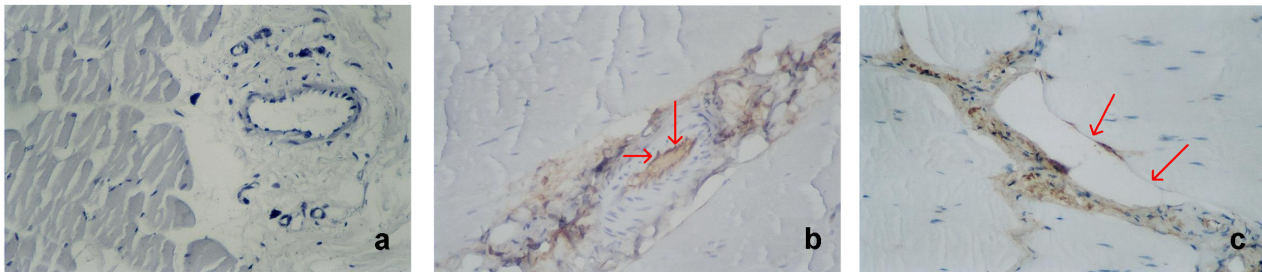
RESİM 9: Gastrocnemius kas HE kesitleri (200xHE)
 a)Kontrol grubu HE kesiti (200xHE)
 b)AİR grubu HE kesiti (200xHE)
 c)AİR+iloprost grubu HE kesiti (200xHE)



RESİM 10: Gastrocnemius kas P seletin immünohistokimyasal kesitleri (200xDAB)
 a)Kontrol grubu P seletin kesiti (200xDAB) (boyanma yok, skor;0)
 b)AİR grubu P seletin kesiti (200xDAB) (güçlü boyanma, skor;++)(ok ile işaretli)
 c)AİR+iloprost grubu P seletin kesiti (200xDAB)(zayıf boyanma, skor;+)(ok ile işaretli)



RESİM 11: Gastrocnemius kas L seletin immünohistokimyasal kesitleri (200xDAB)
 a)Kontrol grubu L seletin kesiti (200xDAB) (boyanma yok, skor;0)
 b)AİR grubu L seletin kesiti (200xDAB) (güçlü boyanma, skor;++)(ok ile işaretli)
 c)AİR+iloprost grubu L seletin kesiti(200xDAB)(zayıf boyanma, skor;+)(ok ile işaretli)

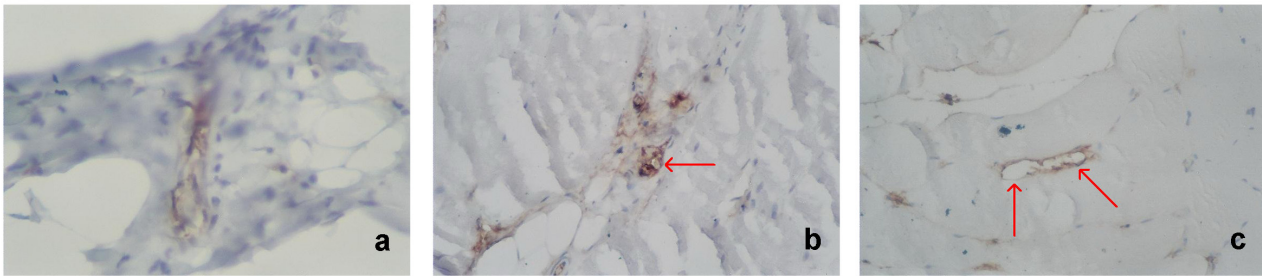


RESİM 12: Gastrocnemius kas TNF-alfa immünohistokimyasal kesitleri (200xDAB)
 a)Kontrol grubu TNF-alfa kesiti (200xDAB) (boyanma yok, skor;0)
 b)AİR grubu TNF-alfa kesiti (200xDAB) (güçlü boyanma, skor;++)(ok ile işaretli)
 c)AİR+iloprost grubu TNF-alfa kesiti (200xDAB)(zayıf boyanma, skor;+)(ok ile işaretli)

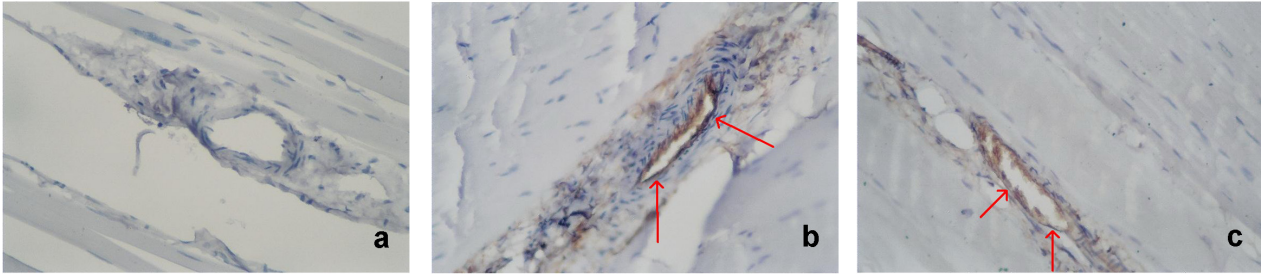
GASTROKNEMIUS KAS HİSTOPATOLOJİK KESİTLERİ(2)



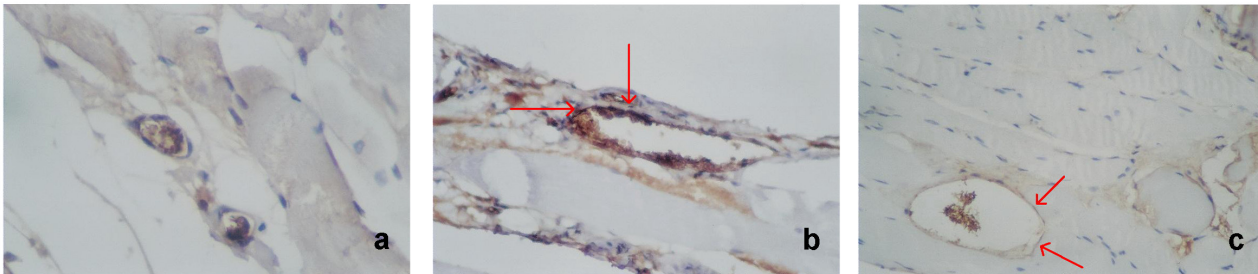
RESİM 13: Gastrocnemius kas CD11b immünohistokimyasal kesitleri (200xDAB)
 a)Kontrol grubu CD11b kesiti (200xDAB) (boyanma yok, skor;0)
 b)AİR grubu CD11b kesiti (200DAB) (güçlü boyanma, skor;++)(ok ile işaretli)
 c)AİR+iloprost grubu CD11b kesiti (200DAB)(zayıf boyanma, skor;+)(ok ile işaretli)



RESİM 14: Gastrocnemius kas CD18 immünohistokimyasal kesitleri (200xDAB)
 a)Kontrol grubu CD18 kesiti (200xDAB) (boyanma yok, skor;0)
 b)AİR grubu CD18 kesiti (200xDAB) (güçlü boyanma, skor;++)(ok ile işaretli)
 c)AİR+iloprost grubu CD18 kesiti (200xDAB) (zayıf boyanma, skor;+)(ok ile işaretli)



RESİM 15: Gastrocnemius kas ICAM-1 immünohistokimyasal kesitleri (200xDAB)
 a)Kontrol grubu ICAM-1 kesiti (200xDAB) (boyanma yok, skor;0)
 b)AİR grubu ICAM-1 kesiti (200xDAB) (güçlü boyanma, skor;++)(ok ile işaretli)
 c)AİR+iloprost grubu ICAM-1 kesiti (200xDAB) (zayıf boyanma, skor;+)(ok ile işaretli)



RESİM 16: Gastrocnemius kas COX-2 immünohistokimyasal kesitleri (200xDAB)
 a)Kontrol grubu COX-2 kesiti (200xDAB) (boyanma yok skor;0)
 b)AİR grubu COX-2 kesiti (200xDAB) (güçlü boyanma, skor;++)(ok ile işaretli)
 c)AİR+iloprost grubu COX-2 kesiti (200xDAB) (zayıf boyanma, skor;+)(ok ile işaretli)

5. TARTIŞMA

Bu çalışmanın sonuçları, iloprost'un, İAA oklüzyon-reperfüzyonu sonrası, femoral arter endoteli ve gastroknemius kasında oluşan iskemi-reperfüzyon hasarını azalttığını göstermektedir. Bu düşünceyi destekleyen ana bulgular, AİR+iloprost grubunda plazma MDA, CPK, P selektin ve ICAM-1 değerlerinin, AİR grubundaki değerlere göre anlamlı derecede düşük bulunmasıdır. Ayrıca, femoral arter endoteli örnekleri immünohistokimyasal yöntemle incelendiğinde, AİR+iloprost grubuna ait P selektin, L selektin, TNF- α , CD11b, ICAM-1 ve COX-2 immünoaktiviteleri AIR grubundaki değerlere göre anlamlı derecede düşük bulundu. Benzer şekilde, gastroknemius kas örnekleri immünohistokimyasal yöntemle incelendiğinde ise, AİR+iloprost grubuna ait P selektin, L selektin, CD18 ve COX2 immünoaktiviteleri AIR grubundaki değerlere göre anlamlı derecede düşük bulundu.

MDA, poliansatüre yağ asitlerinin peroksidasyonu sonucu oluşan stabil bir son üründür. Doku İ-R hasarında, ksantin oksidaz enzimi, mitokondriyal oksidasyon, siklooksijenaz aracılı doymamış yağ asidi oksidasyonu, katekolamin oksidasyonu, sitokrom p 450 aracılı oksidasyon, lökosit NADPH oksidaz aktivasyonu, demir salınımı ve redoks siklusu lokal ve sistemik serbest oksijen radikal oluşumuna katkıda bulunur (1,3). Bununla birlikte her doku için baskın sistem farklıdır. Artmış serbest oksijen radikalleri (özellikle hidroksil radikali), hücre zarı fosfolipidlerinin (araşidonik asit, linoleik asit ve linolenik asit gibi çoklu doymamış yağ asitleri) peroksidasyonuna neden olarak hücre zarı bütünlüğünde bozulma, hücre şişmesi ve arşidonik asit / lipidperoksil salınımına neden olur (1,3). Bu süreçte, zincirleme bir serbest oksijen ve yağ asidi radikali oluşumu ile ilerleyici hücre zarı hasarı gerçekleşir (1,3). Dolayısıyla, bu kısır döngü sırasında meydana gelen ve stabil bir molekül olan MDA düzeyi ölçümü ile reaktif oksijen türevleri ve membran hasarı derecesi hakkında fikir sahibi olunabilir (57). Çalışmamızda, AIR sonrası plazma MDA değerinin anlamlı derecede yükseldiği görüldü. Benzer şekilde, AIR sonrası plazma MDA düzeylerinin yükseldiğini gösteren deneysel çalışmalar vardır (302,161,306). AİR+iloprost grubundaki plazma MDA düzeylerinin, AİR grubundaki düzeye göre anlamlı derecede düşük olduğunu bulduk. Benzer şekilde, Baltalarlı ve ark. (302), iloprost ve vitamin C'nin rat alt ekstremitte İ-R sonrası akciğer hasarına olan etkisini araştırdıkları çalışmalarında, AİR+iloprost grubunda plazma MDA düzeylerinin AİR grubundaki düzeylere göre anlamlı derecede

azaldığını bulmuşlardır. İloprost'un deneysel AIR modelinde iskelet kası hasarına olan etkisinin araştırıldığı bir çalışmada ise, AİR+iloprost grubuna ait MDA değerlerinin AİR grubundaki değerlere göre anlamlı düzeyde azaldığı bulunmuştur (161). Katırcıoğlu ve ark. (306) ise, köpeklerde deneysel kardiyopulmoner bypass modelinde kardiyoplejik solüsyon ile birlikte iloprost verilmesinin miyokard performansına olan etkisini araştırdıkları çalışmalarında iloprost grubunda kontrol grubuna göre plazma MDA düzeyinde anlamlı düşüş saptamışlardır. Bunun yanında, Köksel ve ark. (307), rat AIR modelinde tarafından plazma MDA düzeyleri bakımından AİR ve AİR+iloprost grupları arasında anlamlı fark saptamamışlardır. Çalışmamızda, AİR+iloprost grubundaki plazma MDA değerinin AİR grubuna göre anlamlı derecede düşük olmasının benzer çalışmaların sonuçları ile paralellik içinde olduğu görülmektedir. AİR+iloprost grubu MDA değerlerinin AIR grubuna göre düşük olması, iloprostun, AIR sonrası oluşan lipid peroksidasyonu miktarını azalttığını düşündürmektedir.

Kas hasarının belirlenmesinde görüntüleme yöntemleri ve kas içi enzim plazma düzeylerinin ölçümü kullanılır. Fizyolojik şartlarda, enzim molekülleri büyük moleküler yapıları nedeniyle plazma zarından sınırlı miktarda geçebilirler. Ancak herhangi bir nedenle (hipoksi, viral, bakteriyel, fizik ajanlar) hücre zarı hasar gördüğünde seçici geçirgenlik özelliği bozulur ve hasarın derecesi, hücre zarı yüzey komşuluğu, sitoplazmik konsantrasyonu ve molekül büyüklüğüne bağlı olarak seruma sızarlar. İskelet kası hasarını tespitinde kullanılan moleküller arasında, kreatin fosfokinaz (CPK), myogloblin, aspartat aminotransferaz (AST), laktat dehidrogenaz (LDH), beyin natriüretik peptit (BNP), atrial natriüretik peptit (ANP), karbonik anhidraz, troponin ve kas yapı proteinleri yer alır (308). Bunların arasında kas hasarına duyarlılığı en yüksek olan ve klinik olarak en çok kullanılan enzim CPK'dır (308). CPK, kas hücresi kasılma veya taşıma sistemlerinde ATP yenilenmesinden sorumlu enzimdir. İskelet kası her kontraksiyon döngüsünde kreatin fosfat kullanarak ATP oluşturur. Böylelikle kas ATP düzeyi sabit kalır. Geri dönüşümlü olan bu reaksiyonda CPK katalizör görevi görür. Çalışmamızda, AİR sonrası plazma CPK düzeyleri anlamlı derecede arttı. Bu bulgu, aortik okluzyon-reperfüzyon sonrası gastroknemius kasında oluşan İ-R hasarını yansıtmaktadır. AİR sonrası plazma CPK düzeylerinin arttığını gösteren birçok deneysel ve klinik çalışma vardır (161,249,251,309). AİR+iloprost grubunda ise, plazma CPK düzeylerinin AİR grubundaki düzeylere göre anlamlı derecede düşük olduğunu bulduk. Benzer şekilde, iloprost'un AİR sonrası iskelet kası hasarına olan

etkisinin araştırıldığı bir çalışmada AİR+iloprost grubunda CPK değerlerinin AİR grubundaki değerlere göre anlamlı düzeyde azaldığı görülmüştür (161). Miyokardial İ-R hasarında da iloprost uygulanan grupta, İ-R grubuna göre plazma CPK değerlerinde anlamlı düşüş olduğu bildirilmiştir (249,251,309). Çalışmamızda AİR+iloprost grubunda elde edilen plazma CPK düzeylerindeki anlamlı azalma benzer çalışmalar ile uyumludur. İloprost'un, AIR sonrası oluşan iskelet kası hasarını azalttığını düşündürmektedir.

P selektin, endotel hücre Weibel-Palade cisimcikleri ve platelet alfa granüllerde yapısal olarak bulunan bir adezyon molekülüdür. Endotel hücresi ve plateletler aktive olduğunda P selektin hücre yüzey ifadesinde hızlı bir şekilde artış oluşur ve bu artış, lökosit, lenfosit ve monosit ile olan etkileşimlerinde önemli rol oynar (3,81). Çalışmamızda, AİR grubundaki plazma P selektin düzeylerinin, kontrol grubuna göre anlamlı derecede yüksek olduğunu bulduk. Akut miyokard infarktüsü sonrası trombolitik tedavi (310) ve PTCA (percutaneous transluminal coronary angioplasty) (311) ile erken dönem reperfüzyon sağlandığında plazma P selektin düzeylerinde kontrol grubuna göre anlamlı derecede yükseklik saptanmıştır. Wei ve ark. (312), koroner arter bypass operasyonu yapılan hastaları, kardiyopulmoner bypass kullanılanlar ve atan kalp tekniği kullanılanlar olarak iki gruba ayırmış ve endotel aktivasyonunun bir göstergesi olarak iki gruba ait plazma P selektin düzeylerini karşılaştırmışlardır. Kardiyopulmoner bypass grubundaki plazma P selektin düzeylerinin, oluşan miyokardiyal İ-R nedeniyle atan kalp tekniği ile opere edilen hastalardaki düzeye göre anlamlı düzeyde yüksek olduğu görülmüştür (312). Mathru ve ark. (313) ise, alt ekstremiteye turnike uygulanması sonrası diz cerrahisi uygulanan hastalarda nitrik oksitin reperfüzyonla oluşmuş inflamatuvar cevaba etkisini inceledikleri çalışmalarında İ-R grubundaki plazma P selektin düzeyinin kontrol grubundaki düzeye göre anlamlı düzeyde yüksek olduğunu bildirmişlerdir. Çalışmamızda, histopatolojik olarak hem femoral arter endoteli hemde gastroknemius kas dokusu içindeki damar endoteli incelendiğinde, AİR grubundaki P selektin immünoreaktivitelerinin kontrol grubuna göre anlamlı düzeyde arttığı saptandı. Cuzzocrea ve ark. (314), n-acetylsisteinin rat splanknik arter oklüzyonuyla oluşturulan İ-R modelinde oluşan ileum hasarı üzerine etkilerini araştırdıkları çalışmalarında, barsak damar endoteli P selektin ifadesinin İ-R grubunda kontrol grubuna göre anlamlı düzeyde yükseldiğini bildirmişlerdir. Wei ve ark. (315), rat kremaster kas I-R modelinde mikrovasküler

disfonksiyona diazoxide etkisinin araştırıldığı çalışmalarında ise, kremaster kas doku örneklerinde RT-PCR (reverse transcription polymerase chain reaction) yöntemi kullanılarak P seletin mRNA ifadesine bakılmış ve İ-R grubunda kontrol grubuna göre anlamlı düzeyde yükseldiğini bulmuşlardır. Çalışmamızda histopatolojik olarak hem femoral arter endoteli hemde gastroknemius kas dokusundaki damar endotelinde AİR+iloprost grubu P seletin immünoreaktivitesinin AİR grubuna göre anlamlı düzeyde azaldığı görüldü. Hepatik I-R modelinde PG E1 infüzyonunun etkisini araştıran bir çalışmada, doku ve plazma P seletin düzeylerinin İ-R grubunda kontrol grubuna göre anlamlı düzeyde arttığı, İ-R+PGE1 grubunda ise İ-R grubuna göre anlamlı düzeyde azaldığı tespit edilmiştir (316). Trombinle uyarılmış plateletlerdeki P seletin yüzey ifadesinin iloprost ile azaldığı (317), ayrıca, P seletin aracılı platelet lökosit adezyonunun iloprost ve nitrik oksit ile engellendiği gösterilmiştir (226). Chung ve ark. da (318), kardiyopulmoner bypass sırasında iloprost uygulanmasının postoperatif dönem plazma P seletin düzeylerinde anlamlı düşüş sağladığını göstermişlerdir. Benzer şekilde, Katırcıoğlu ve ark. (306) tarafından oluşturulan deneysel kardiyopulmoner bypass modelinde kardiyoplejik solüsyon ile birlikte iloprost uygulamasının miyokard performansına etkisinin araştırılmış ve iloprost grubunda kontrol grubuna göre plazma P seletin düzeyinde anlamlı düşüş saptanmış. Çalışmamızda, AİR+iloprost grubundaki, hem biyokimyasal hem de histopatolojik olarak ölçülen P seletin düzeylerinin AİR grubundaki düzeylere göre anlamlı derecede düşük olduğu görülmektedir. Bu sonuçlar, iloprostun AİR sonrası oluşan hem femoral arter endoteli hem de iskelet kası hasarını azaltıcı etkisinin P seletin aracılı olabileceğini düşündürmektedir.

ICAM-1 ve VCAM-1 immünglobulin süper ailesi içinde yer alan adezyon molekülleridir. ICAM-1, endotel, lökosit, dermal fibroblast ve melanositlerde VCAM-1 ise, endotel hücrelerinde yapısal olarak bulunurlar. TNF- α , İL-1 β ve lipopolisakkarit gibi sitokinler aracılığıyla ICAM-1 ve VCAM-1 hücre yüzey ifadeleri artışı, bu hücrelerin sırasıyla β 2 integrin (CD11a/CD18 ve CD11b/CD18) ve β 1 integrin (VLA-4) ailesine üye hücre yüzey molekülleri olan ile etkileşimini artırır. Bu integrin moleküller nötrofil, monosit, lenfosit, eozinofil, bazofil ve makrofajlarda bulunurlar. Dolayısıyla endotel-lökosit adezyonu ve birçok inflamatuvar olayda önemli rol oynarlar (76,77,81). Çalışmamızda, AİR grubu plazma ICAM-1 ve VCAM-1 düzeylerinin kontrol grubuna göre anlamlı düzeyde arttığı gözlemlendi. Yoshimoto ve ark. (319), geçici iskemik atak

geçiren hastalarda plazma İCAM-1 düzeylerinin kontrol grubuna göre anlamlı düzeyde yüksek olduğunu saptamışlardır. Akut miyokard infarktüsü sonrası USAP olan hastalardaki (tekrarlayan miyokardiyal I-R) plazma ICAM-1 düzeyleri, sadece akut miyokard infarktüsü geçirmiş hastalardaki düzeylerle karşılaştırıldığında anlamlı düzeyde yükseklik saptanmış (320). Vejchapipat ve ark. (321) ise, barsak İ-R hasarında hipoterminin etkisini incelemişler ve barsak İ-R grubunda plazma İCAM-1 düzeyinin kontrol grubuna göre anlamlı düzeyde arttığını bildirmişlerdir. Ayrıca, koroner bypass cerrahisi sırasında kardiyopulmoner bypass ile oluşmuş miyokard İ-R'a kristaloid ve kan kardiyoplejisinin etkilerinin çalışıldığı bir çalışmada kardiyopulmoner bypass ile tüm gruplarda plazma ICAM-1 ve VCAM-1 düzeylerinde anlamlı yükselme saptanmıştır (322). Mickley ve arkadaşları tarafından yapılan bir çalışmada ise İAA anevrizmasının cerrahi ve endovasküler tamir yöntemlerinin her ikisinde de anlamlı plazma İCAM-1 düzey artışı saptanmış ancak artışın cerrahi grupta daha yüksek olduğu gözlenmiştir (323). Çalışmamızda, histopatolojik olarak hem femoral arter endoteli hemde kas içi endotel yapıda ICAM-1 immünoreaktivitesinin kontrol grubuna göre AİR grubunda anlamlı düzeyde arttığı görüldü. AİR sonrası, lokal ve uzak organlarda ICAM1 ifadesinin araştırıldığı çalışmalar vardır. Huda ve ark. (324) , diz cerrahisi sırasında hemostaz amaçlı konulan turnikeye ikincil gelişen iskelet kası İ-R hasarında ICAM-1 mRNA ifadesinin kontrol grubuna göre anlamlı düzeyde arttığını saptamışlardır. Yoshimoto ve ark. tarafından oluşturulan hayvan serebral İ-R modelinde mikrovasküler İCAM-1 mRNA ifadesinin kontrol grubuna göre anlamlı düzeyde arttığı bildirilmiştir (319). Beauchamp ve ark. tarafından yapılan in vitro çalışmada ise, İ-R hasarı sonrası rat aortası endoteli İCAM-1 gen ifade artışının iskemik önkoşullanma ile azaltılabildiği PCR ile gösterilmiştir (325). Hattori ve ark. (326), yaptıkları in vitro çalışmada İ-R hasarı sonrası artmış rat aortası endotel hücre ICAM-1 mRNA ifadesinin sodyum / hidrojen pompası inhibitörleri tarafından anlamlı derecede azaltıldığını bildirmişlerdir. Zhou ve ark. (327), deneysel alt ekstremite İ-R modelinde, İ-R hasarına ikincil gelişen akciğer PMNL birikimine karbon monoksitin etkisini incelemişler ve akciğer mikrovasküler endotel hücrelerinin İ-R grubu ICAM-1 ifadesinin kontrol grubuna göre anlamlı düzeyde arttığını bulmuşlardır. Lu ve ark. tarafından yapılan deneysel alt ekstremite İ-R modelinde SOD'un iskelet kası adezyon molekül ifadesine etkisinin incelendiği çalışmada İ-R grubu ICAM-1 ifadesinin kontrol grubuna göre anlamlı düzeyde yükseldiği saptanmıştır (328). Cuzzocrea ve ark. (314), deneysel

splanknik arter İ-R modelinde n-asetilsistein'in etkisini araştırmışlar ve İ-R grubu İCAM-1 ifadesini kontrol grubuna göre anlamlı düzeyde yüksek bulmuşlardır. Lozano ve ark. (329) ise deneysel suprarenal aortik İ-R modelinde nitrik oksitin İ-R böbrek hasarı üzerine etkisini araştırmışlar ve İ-R grubunda böbrek dokusu İCAM-1 ifadesinin kontrol grubuna göre anlamlı düzeyde yükseldiğini saptamışlardır. Sonuçlarımızla paralellik gösteren bu çalışma sonuçları da, AİR'un ICAM-1 ve VCAM-1 ifadesi üzerinde etkili olduğunu düşündürmektedir. AİR grubundaki anlamlı derecede yüksek doku ICAM-1 immünoreaktivitesi ve plazma ICAM-1 / VCAM-1 düzeyleri sırasıyla, bu grupta lokal ICAM-1 ve sistemik ICAM-1 / VCAM-1 ifadelerindeki artışa işaret etmektedir. AİR'in, ICAM-1 ve VCAM-1 aracılığı ile endotel-lökosit etkileşimini arttırdığı da speküle edilebilir.

Bunun yanında, AİR grubunda artmış plazma İCAM-1 düzeylerinin AİR+iloprost grubunda anlamlı düzeyde azaldığını bulduk. Boehme ve ark. (224), romatoid artrit hastalarında iloprost tedavisiyle plazma ICAM-1 düzeylerinde kontrol grubuna göre anlamlı derecede azalma sağlandığını tespit etmişlerdir. Mazzone ve ark. tarafından sistemik skleroz ve periferik arter hastalığı hastalarında yapılan bir çalışmada ise iloprost'un kontrol grubuna göre plazma İCAM-1 düzeyinde anlamlı düşüş oluşturduğu saptanmıştır (223). Mittag ve ark. (225), sistemik sklerozla ilişkili Raynaud fenomeninde iloprost'un etkisini araştırdıkları çalışmalarında ise plazma ICAM-1 düzeylerinde belirgin düşme saptamışlardır. Ayrıca, in vitro İL-1 ile uyarılmış lenfosit-endotel adezyonu ve artmış plazma İCAM-1 düzeyinin iloprost tedavisiyle azaltıldığı gösterilmiştir (14). AİR+iloprost grubundaki femoral arter endotel örneklerinin histopatolojik incelemesinde İCAM-1 immünoreaktivitesinin AİR grubundaki eşdeğer örneklerle göre anlamlı düzeyde azaldığını bulduk. Benzer şekilde, Della Bella ve ark. (14), in vitro çalışmalarında İL-1 ile uyarılmış lenfosit adezyonu ve artmış ICAM-1 immünoreaktivitesinin iloprost tedavisiyle anlamlı düzeyde azaldığını göstermişlerdir. Katircioğlu ve ark. tarafından oluşturulan deneysel kardiyopulmoner bypass modelinde ise, kardiyoplejik solüsyon ile birlikte iloprost uygulamasının miyokard performansına etkisini araştırdıkları çalışmalarında, iloprost grubunda kontrol grubuna göre plazma ICAM-1 düzeyinde anlamlı düşüş saptamışlardır (306). Bizim çalışmamızın ve benzer çalışmaların sonuçları paralellik göstermekte ve iloprost'un AİR sonrası artmış lokal ve sistemik ICAM-1 ifadesini azalttığını düşündürmektedir. Hem lokal hem de sistemik

ICAM-1 ifadesini azaltarak da, AİR sonrası indüklenen endotel-lökosit etkileşimini inhibe edebileceği öne sürülebilir.

L selektin, nötrofiller ve monositlerin tamamına yakınında, T ve B lenfositlerin büyük bölümünde ve NK hücrelerin bir alt grubunda ifade edilen bir adezyon molekülü olup, lenfositlerin lenf nodlarını hedefleyebilmesinde ve sitokinle aktive olmuş nötrofillerin endotel hücrelerine bağlanmasında (yuvarlanma etkisi) önemli rol oynar (3,81). L selektin bağlanma bölgeleri; lenf nodu GlyCAM-1, barsak lenfoid sistem MadCAM-1 ve damar endoteli CD34'tür. Çalışmamızda, AİR grubunda, histopatolojik olarak hem femoral arter endoteli hemde kas içi endotel yapıda L selektin immünoaktivitesinin kontrol grubundaki eşdeğer immünoaktiviteye göre anlamlı derecede arttığı gözlemlendi. Wei ve ark. (315), rat kremaster kas I-R modelinde mikrovasküler disfonksiyona diazoxide'in etkisini araştırdıkları çalışmalarında kremaster kas doku örneklerinde RT-PCR (reverse transcription polymerase chain reaction) yöntemi kullanarak, İ-R grubunda L selektin mRNA ifadesinin kontrol grubuna göre anlamlı derecede yükseldiğini saptamışlardır. Cheng ve ark. (330) ise, serebral İ-R modelinde polydatin'in adezyon moleküllerine etkisini değerlendirmiş ve serebral İ-R ile anlamlı derecede yüksek doku L selektin ifadesi elde etmişlerdir. Sonuçlarımızın literatürdeki benzer çalışma sonuçları ile uyum içerisinde olduğu görülmektedir. AİR grubunda artmış L selektin immünoaktivitesi, lokal olarak artmış L selektin ifadesine işaret etmektedir. L selektin sitokinle aktive olmuş nötrofillerin endotel hücrelerine bağlanmasında (yuvarlanma etkisi) önemli rol oynadığı için (3,81), AİR, L selektin aracılığı ile nötrofil-endotel hücresi arasındaki yuvarlanma etkisini artırıyor olabilir. Bunun yanında, AİR+iloprost grubunda, histopatolojik olarak hem femoral arter endoteli hemde kas içi endotel yapıda L selektin immünoaktivitesinin AİR grubuna göre anlamlı düzeyde azaldığını gözledik. Bu sonuç da, iloprostun, AİR ile indüklenmiş lokal L selektin ifadesini ve dolaylı olarak nötrofil-endotel etkileşimini azalttığını düşündürmektedir. Benzer şekilde, Drinda ve ark. (331), kollajenoza ikincil gelişmiş Raynaud hastalarında iloprost'un immünolojik ve reolojik değişkenlere olan etkisini araştırdıkları çalışmalarında i.v. iloprost tedavisiyle kontrol grubuna göre doku L selektin ifadesinde anlamlı düşüş olduğunu bildirmişlerdir.

I-R sırasında oluşan TNF- α , IL-1 β , PAF ve kompleman sistemi gibi inflamatuvar araçlar endotelde "endotelial aktivasyon" olarak isimlendirilen bir grup değişikliğe neden olurlar (6,66). Bu değişiklikler; ICAM-1 ve VCAM-1 gibi adezyon

moleküllerinde artmış yüzey ifadesi, bazı sitokinlerin ve büyüme faktörlerinin salınımı, eikozanoidler / NO sentezinde artış ve trombüs oluşumuna olan artmış eğilimdir (6). TNF- α ayrıca, nötrofillerde agregasyon / aktivasyon ve mezenkimal hücrelerden proteolitik enzim salınımı oluşturarak doku hasarına neden olur (3). PF-4 tek başına lökosit kemotaksisini sağlayamazken, TNF- α ile birlikte, lökositlerin başka yüzeylere olan adezyonunda rol oynar. TNF- α , TNF- β , IFN- γ ve IL-1 β gibi sitokinlerin sekresyonu; endotoksinler, immun kompleksler, toksinler, fiziksel travma ve bazı inflamasyon mediatörleri tarafından stimüle edilir (3). TNF- α ve IL-1 β molekülleri için en önemli kaynaklar mevcut makrofaj ve mast hücreleri olup, aktif nötrofiller tarafından da sentezlendikleri gösterilmiştir. TNF- β ise T hücrelerinden sentezlenir (67,68). PAF, histamin, LT-B4 ve TNF- α gibi aracı inflamatuvar maddelerin sentez veya reseptör etkileşimlerinin engellenmesi ile İ-R hasarında iyileştirici etki sağlanmıştır (56). Çalışmamızda, AİR grubunda, histopatolojik olarak hem femoral arter endoteli hem de kas içi endotel yapıda TNF- α immünoreaktivitesinin kontrol grubuna göre anlamlı düzeyde arttığını gözledik. Wei ve ark. (315), rat kremaster kas I-R modelinde mikrovasküler disfonksiyona diazoxide'in etkisini araştırdıkları çalışmalarında, kremaster kas doku örneklerinin RT-PCR (reverse transcription polymerase chain reaction) yöntemi kullanılarak TNF- α mRNA ifadesine bakılmış ve İ-R grubunda kontrol grubuna göre anlamlı derecede yükseldiğini saptamışlardır. Harkin ve ark. (332) ise, deneysel aort anevrizma rüptürü modelinde multipl organ hasarına C5a reseptör antagonistlerinin etkisini araştırmışlar, hem şok oluşturulan hem de aortik kros klemp uygulanan gruplardaki akciğer ve barsak dokuları TNF- α protein konsantrasyonlarında kontrol grubuna göre anlamlı düzeyde artış saptamışlardır. Benzer şekilde, Altavilla ve ark. (333), splanknik arter I-R ile sağlanan deneysel şok modelinde monosit ve lenfositlerin I-R patogenezindeki rollerini incelemişler ve İ-R grubundaki makrofaj TNF- α ifadesinin kontrol grubuna göre anlamlı düzeyde arttığını bildirmişlerdir. Mizusawa ve ark. tarafından turnike yöntemiyle oluşturulmuş deneysel ekstremitte İ-R modelinde arka kök ganglion'u sitokin, nörotropin, nörotropin reseptörü ve NOS mRNA ifadesine bakılmış, PCR yöntemiyle İ-R grubu TNF- α mRNA ifadesinin kontrol grubuna göre anlamlı düzeyde arttığı tespit edilmiştir (334). Çalışmamızda, AİR grubunda anlamlı derecede artmış TNF- α immünoreaktivitesi, AİR sonrası artmış lokal TNF- α sentezine işaret etmektedir. Çalışmamızda saptanan AİR grubu yüksek ICAM-1 ve VCAM-1 düzeylerine artmış TNF- α sentezi katkıda bulunmuş olabilir. Ayrıca,

artmış TNF- α sentezi lökosit ve nötrofil aktivasyon ve adezyonunu da indüklemiş olabilir. Bunun yanında, histopatolojik olarak AİR+iloprost grubu femoral arter endoteli TNF- α immünoreaktivitesinin AİR grubuna göre anlamlı düzeyde azaldığını gözledik. Bu sonuç da, iloprost'un, AİR sonrası indüklenen lokal TNF- α ifadesini baskıladığını düşündürmektedir. Katırcıoğlu ve ark. tarafından oluşturulan deneysel kardiyopulmoner bypass modelinde miyokard performansına kardiyoplejik solüsyon ile birlikte iloprost uygulamasının etkisi araştırılmış ve iloprost grubunda kontrol grubuna göre plazma TNF- α düzeyinde anlamlı düşüş saptanmıştır (306).

İntegrin süper ailesi, hücre-hücre ve hücre-matriks etkileşimini sağlar. Ekstraselüler ligandlardan kaynaklanan işaretlerin koordinasyonunu, iskelet hareketliliği, şekil ve fagositik değişiklikler aracılığı ile sağlar (3). Tüm integrinler heterodinamik hücre yüzey proteinleri olup α ve β zincirler içerirler. Bu zincirlerin ekstraselüler yüzeyleri, ekstraselüler matriks glikoproteinler, aktive olmuş kompleman sistem elemanları ve diğer hücre yüzey proteinleri ile bağlanır (3). Zincirlerin sitoplazmik yüzeyleri ise hücre iskelet elemanları (vinkulin, talin, aktin, α -aktinin ve tropomyosin) ile etkileşime girer. İntegrinler, β zincirlerine göre başlıca üç gruba ayrılır. Birinci grupta, $\beta 2$ alt grubu içeren LFA-1 ($\alpha L\beta 2$: CD11a/CD18), Mac-1 ($\alpha M\beta 2$: CD11b/ CD18) ve P150,90 ($\alpha X\beta 2$: CD11c/CD18), ikinci grupta, $\beta 1$ alt grubu içeren VLA-4 ($\alpha 4\beta 1$: CD49d/CD29) ve üçüncü grupta $\beta 7$ alt grubu içeren $\alpha 4\beta 7$ yer alır (3). $\beta 2$ integrinler, LFA veya CD11a-c/CD18 olarak da adlandırılır. CD11a-c değişik α zincirlerini, CD18 ise ortak $\beta 2$ zincirini tanımlar. Reperfüzyona bağlı inflamatuvar yanıt (kalsiyum iyonofor, E selektin, LT-B4, C5a, PAF, TNF- α ve IL-1), lökositlerde $\beta 2$ integrin, endotelde ise immunglobulin süper aile üyelerinin oluşumunu uyararak güçlü lökosit-endotel adezyonuna neden olur (6). Bu integrin-ICAM / VCAM etkileşimleri lökositlerin değişik patolojik durumlarda selektif birikimi için bir mekanizma oluşturur (76). CD11a/CD18 ve CD11b/CD18'in endotel hücreindeki reseptörlerinin sırasıyla ICAM-I ve ICAM-II olduğu bilinirken, CD11c/CD18'in reseptörü halen bilinmemektedir. Platelet-lökosit adezyonu da, yuvarlanma ve adezyon aşamalarını içermekte olup, sırasıyla platelet P selektin ve ICAM-2/GPIb α /JAM-3 molekülleri ile lökosit PSGL-1 ve CD11b/CD18 molekülleri arasındaki etkileşimi gerektirir (117). Çalışmamızda, AİR grubuna ait femoral arter ve gastroknemius kas doku kesitleri CD11b ve CD18 immünoreaktivitelerinin kontrol grubu kesitlerine göre anlamlı düzeyde arttığı saptandı. Bu bulgu, AİR sonrası oluşan sistemik inflamatuvar yanıtın

lökosit CD11b ve CD18 ifadesini veya bir başka deyişle $\beta 2$ integrin ifadesini arttırdığını düşündürmektedir. Ayrıca, çalışmamızda AİR grubuna ait endotel doku örneklerinde artmış ICAM-1 immünoreaktivitesi de, AİR'un, endotel hücrelerinde CD11b ve CD18 için hedef reseptör konsantrasyonunu yükselterek endotel hücresi-CD11b ve CD18 etkileşimlerini indüklemiş olabileceğini düşündürmektedir. İndüklenmiş ICAM1-CD11b / CD18 etkileşimleri de güçlü endotel-lökosit adezyonuna yol açar. Norwood ve ark. (335), abdominal aort anevrizması cerrahi onarımı sırasında gerçekleşen nötrofil aracılı sistemik inflamasyonun kaynağını araştırdıkları çalışmalarında, bu hastalarda nötrofil yüzey CD11b ifadesinde kontrol grubuna göre anlamlı yükseliş saptamışlardır. Zhou ve ark. tarafından yapılan deneysel ekstremite İ-R modelinde ise ekzojen karbon monoksitin akciğer PMNL birikimine etkisi değerlendirilmiş ve immünofloresans akım sitometrisi'nde pulmoner mikrovasküler yatak endotel CD11b düzeyinin İ-R grubunda kontrol grubuna göre anlamlı düzeyde arttığı saptanmıştır (327). Willy ve ark. (336), ise ekstremitelere turnike aracılığıyla oluşturulan İ-R'un, PMNL, CD11b ve CD18 ifadesini kontrol grubuna göre anlamlı düzeyde arttırdığını bildirmişlerdir.

Siklooksijenaz, COX-1 ve COX-2 adıyla bilinen iki izoforma sahiptir. COX-1 tüm hücrelerde yapısal olarak bulunurken, COX-2 inflamatuvar yanıtta sekonder oluşur. COX-2, ağırlığı 70 kd olup, 1. kromozomdaki bir gen tarafından kodlanır. Sağlıklı bireylerde yapılan çalışmalarda vasküler endotel doku PGI₂ üretiminden COX-2'nin sorumlu olduğu gösterilmiştir (337). Endotel dışındaki bölgelerde COX-2 aktivitesi çok düşüktür. Ancak inflamasyon başta olmak üzere bir çok durum COX-2 genini indükleyebilir. Sitokinler ve büyüme faktörleri bu enzimin aktivasyonunu arttırmalar. Bazal koşullarda sadece beyin ve böbrekte COX-2 aktivitesi saptanırken, inflamatuvar süreçlerde sinoviyal sıvılarda da belirgin COX-2 aktivite artışı görülebilir (338). Aterom plaklarında COX-2 enzim aktivitesinin gösterilmesi selektif COX-2 inhibitörlerinin ateroskleroz sürecini yavaşlatabileceği düşüncesini doğurmuştur. Çalışmamızda, AİR grubu femoral arter (endotel ve adventisya) ve gastroknemius kas örneklerinde COX-2 immünoreaktivitesinin kontrol grubuna göre anlamlı düzeyde arttığı ve AİR+İloprost grubunda ise AİR grubuna göre anlamlı düzeyde azaldığı saptandı. Dupouy ve ark. (339), deneysel tek taraflı alt ekstremite İ-R hasarı modelinde COX-1 ve COX-2 ifade zamanlamasını araştırmışlar ve İ-R grubu iskelet kası COX-2 mRNA ifadesinin kontrol grubuna göre anlamlı düzeyde arttığını bulmuşlardır. Hiratsuka ve ark. (340) ise, deneysel mide İ-R hasarı modelinde, İ-R grubu mezenkimal hücre COX-2 ifadesinin

kontrol grubuna göre anlamlı düzeyde arttığını bildirmişlerdir. Yamazaki ve ark. tarafından oluşturulan intrauterin büyüme geriliği modelinde, uterin arter İ-R'u sonrası plasenta dokusu COX-2 ve PG E2 reseptör ifadesi incelenmiş, her ikisinin de İ-R grubunda kontrol grubuna göre anlamlı düzeyde arttığı tespit edilmiştir (341). Matsuyama ve ark. (342) ise, deneysel renal arter İ-R modelinde, immünohistokimyasal olarak, endotel hücre COX-2 ifadesinin İ-R grubunda kontrol grubuna göre anlamlı düzeyde yükseldiğini saptamışlardır. Yapılan bir diğer çalışmada, karaciğer İ-R hasarı modelinde Trolox'un damar düzenleyici gen ifadesine etkisi çalışılmış, İ-R grubu karaciğer doku örneklerinde COX-2 mRNA ifadesinin RT-PCR yöntemiyle kontrol grubuna göre anlamlı derecede yüksek olduğu saptanmıştır (343). Domoki ve ark. tarafından yapılan deneysel serebral İ-R modelinde, serebral arter doku örneklerinin COX-2 mRNA ifadesi AİR grubunda kontrol grubuna göre anlamlı olarak yüksek bulunmuştur (344). Benzer şekilde, Cai ve ark. (345) da, serebral İ-R modelinde Theaflavin'in serebral İ-R hasarına etkisini araştırmışlar ve serebral korteks immünohistokimyasal kesitlerinde COX-2 immünoaktivitesinin İ-R grubunda kontrol grubuna göre anlamlı düzeyde arttığını bildirmişlerdir. Sonuçlarımız, AİR'un lokal COX-2 ifadesini indüklediğini düşündürmektedir. Hem femoral arter endoteli hem de iskelet kasındaki lokal COX-2 ifadesi AİR sonrası sentezlenen ve dolaşıma salınan inflamatuvar mediyatörler tarafından indüklenmiş olabilir. İloprost uygulaması ile lokal COX-2 ifadesinin anlamlı derecede azalması da, iloprost'un olası antiinflamatuvar etkisine bağlı olabilir.

Sonuç olarak, bulgularımız, iloprost'un İAA oklüzyon-reperfüzyonu sonrası femoral arter endoteli ve gastroknemius kasında oluşan İ-R hasarını azalttığını göstermektedir. İloprost'un bu yararlı etkisi, AİR sonrası artmış lokal ve sistemik adezyon molekülleri ifadesini azaltmasına bağlıdır. Bunun yanında, iloprost'un bu yararlı etkisinin hangi mekanizmalar aracılığı ile oluştuğunu tam olarak aydınlatılabilmek için yeni deneysel çalışmalara gereksinim vardır. Bildiğimiz kadarıyla çalışmamız, İAA oklüzyon-reperfüzyonu sonrası femoral arter endoteli ve iskelet kası hasarında iloprost'un adezyon molekülleri üzerinden etkisi ile ilgili olarak yapılmış ilk deneysel çalışmadır. Çalışmamız, AİR'e bağlı femoral arter endoteli ve iskelet kası hasarının iloprost uygulaması ile azaltılmasını hedefleyecek yeni klinik çalışmalar için bir temel oluşturabilir.

ÖZET

Amaç: Bu çalışmanın amacı, infrarenal abdominal aorta (İAA) oklüzyon-reperfüzyonu sonrası femoral arter endoteli ve gastroknemius kasında oluşan iskemi-reperfüzyon (İ-R) hasarına iloprost'un etkisini araştırmaktır.

Materyal ve Metod: Yirmi dört adet Wistar-Albino rat rastgele ve eşit sayıda (n = 8) olarak üç gruba ayrıldı. Kontrol grubunda, laparotomi ve İAA diseksiyonu yapıldı ama İAA'ya oklüzyon uygulanmadı. Aortik iskemi reperfüzyon (AİR) grubunda, İAA diseksiyonu sonrası İAA'ya kros-klemp konularak 120 dakika iskemi ve kros-klemp kaldırılarak 120 dakika reperfüzyon uygulandı. AİR+iloprost grubunda, AİR işlemine ek olarak, 120 dakikalık reperfüzyon süresince, kuyruk veni kullanılarak i.v 0,45 µg/kg/saat dozda iloprost (İlomedin®, Bayer Schering Pharma AG, Berlin, Germany) infüzyonu yapıldı. Deney sonunda tüm ratlardan, biyokimyasal analizler için kan örneği ve histopatolojik değerlendirme için gastroknemius kas ve femoral arter doku örnekleri alındı. Kan örneklerinde malondialdehid (MDA), kreatin fosfokinaz (CPK), intercellular adhesion molecule-1 (ICAM-I), vascular cell adhesion molecule-1 (VCAM-I) ve P selektin plazma düzeyleri ölçüldü. Femoral arter ve gastroknemius kas doku örneklerinde ise, ışık mikroskobu kullanılarak, P selektin, L selektin, tumor necrosis factor- α (TNF- α), CD11b, CD18, ICAM-1 ve cyclooxygenase-2 (COX-2) için immünohistokimyasal değerlendirme yapıldı.

Sonuçlar: Biyokimyasal incelemede, AİR grubu MDA, CPK, P Selektin, VCAM-1 ve ICAM-1 plazma düzeyleri kontrol grubu düzeylerine göre anlamlı derecede yüksekti (p < 0.05). AİR+iloprost grubu MDA, CPK, P selektin ve ICAM-1 plazma düzeyleri ise AİR grubu düzeylerine göre anlamlı derecede düşüktü (p < 0.05). Femoral arter örneklerinin histopatolojik incelemesinde, AİR grubu P selektin, L selektin, TNF- α , CD11b, CD18, ICAM-1 ve COX-2 (endotel ve adventisya) immünoreaktivitesinin kontrol grubuna göre anlamlı derecede yüksek olduğu (p < 0.05), AİR+iloprost grubunda ise P selektin, L selektin, TNF- α , CD11b, ICAM-1 ve COX-2 (endotel ve adventisya) immünoreaktivitesinin AİR grubuna göre anlamlı derecede düşük olduğu (p < 0.05) saptandı. Gastroknemius kas örneklerinin histopatolojik incelemesinde, AİR grubu P selektin, L selektin, TNF- α , CD11b, CD18, ICAM-1 ve COX-2 immünoreaktivitesinin kontrol grubuna göre anlamlı derecede yüksek olduğu (p<0.05), AİR+iloprost grubunda ise P selektin, L selektin, CD18 ve COX-2

immünoreaktivitesinin AİR grubuna göre anlamlı derecede düşük olduğu saptandı ($p < 0.05$).

Tartışma: Bu çalışmanın sonuçları, iloprost'un, İAA okluzyon-reperfüzyonu sonrası femoral arter endoteli ve gastroknemius kasında oluşan İ-R hasarını azalttığını göstermektedir. İloprost'un bu yararlı etkisi, AİR sonrası artmış lokal ve sistemik adezyon molekülleri ifadesini azaltmasına bağlıdır.

SUMMARY

Purpose: The purpose of the present study was to examine the effect of iloprost on ischemia-reperfusion (I-R) injury at femoral artery endothelium and gastrocnemius muscle after occlusion-reperfusion of infrarenal abdominal aorta (IAA).

Material and Methods: Twenty four Wistar-Albino rats were randomized in equal numbers (eight per group) into three groups. Control group underwent laparotomy and dissection of the IAA without occlusion. Aortic ischemia reperfusion (AIR) group underwent dissection of the IAA and then ischemia and reperfusion performed by clamping of the IAA for 120 minutes and declamping of the IAA for 120 minutes respectively. In AIR+iloprost group, in addition to AIR, rats received intravenous infusion of iloprost (Ilomedin®, Bayer Schering Pharma AG, Berlin, Germany), with a dosage of 0,45 µg/kg/hour via tail vein during 120 min of reperfusion. At the end of the experiment, blood samples for biochemical analysis and, femoral artery and gastrocnemius muscle tissue samples for histopathological examinations were taken from all rats. In blood samples, plasma levels of malondialdehyde (MDA), creatine phosphokinase (CPK), intercellular adhesion molecule-1 (ICAM-1), vascular cell adhesion molecule (VCAM-1) and P selectin were measured. In femoral artery and gastrocnemius muscle tissue sections, by using light microscope, immunohistochemical analyses were done for P selectin, L selectin, tumor necrosis factor- α (TNF- α), CD11b, CD18, ICAM-1 (CD54) and cyclooxygenase-2 (COX-2).

Results: Biochemical analysis showed that, in the AIR group, plasma levels of MDA, CPK, P selectin, VCAM-1 and ICAM-1 were significantly higher than the levels in the control group ($p < 0.05$). In the AIR+iloprost group, plasma levels of MDA, CPK, P selectin and ICAM-1 were significantly lower than the levels in the AIR group ($p < 0.05$). Histopathological examination of the femoral artery sections showed that, in the AIR group, immunoreactivity of P selectin, L selectin, TNF- α , CD11b, CD18, ICAM-1 and COX-2 (endothel and adventitia) were significantly higher than in the control group ($p < 0.05$). In AIR+iloprost group, immunoreactivity of P selectin, L selectin, TNF- α , CD11b, ICAM-1 and COX-2 (both endothelial and adventitial expression) were significantly lower than in the AIR group ($p < 0.05$). Histopathological examination of the gastrocnemius sections showed that, in the AIR group, immunoreactivity of P selectin, L selectin, TNF- α , CD11b, CD18, ICAM-1 and COX-2 were significantly higher than in the control group ($p < 0.05$). In the AIR+iloprost group,

immunoreactivity of P selectin, L selectin, CD18 and COX-2 were significantly lower than in the AIR group ($p < 0.05$).

Conclusion: The results of this study show that, iloprost attenuates I-R injury in femoral artery endothelium and gastrocnemius muscle after occlusion-reperfusion of IAA. This beneficial effect of iloprost is due to decrement of increased local and systemic expression of adhesion molecules after AIR.

KAYNAKLAR

1. Siemionow M, Arslan E. Ischemia/reperfusion injury: a review in relation to free tissue transfers. *Microsurgery*. 2004;24(6):468-75. Review.
2. Eltzschig HK, Collard CD. Vascular ischaemia and reperfusion injury. *Br Med Bull*. 2004; Oct 19;70:71-86. Print 2004. Review. Erratum in: *Br Med Bull*. 2005;73-74:139.
3. Kumar V, Abbas AK, Fausto N, eds Robbins and Cotran Pathologic Basis of Disease, 7th Edition, Philadelphia: Elsevier Saunders, 2004.
4. Hensley K, Robinson KA, Gabbita SP, Salsman S, Floyd RA. Reactive oxygen species, cell signaling, and cell injury. *Free Radic Biol Med*. 2000; 15;28(10):1456-62.
5. Carden DL, Granger DN. Pathophysiology of ischaemia-reperfusion injury. *J Pathol*, 2000; 190:255-266.
6. Anaya-Prado R, Toledo-Pereyra LH, Lentsch AB, Ward PA Ischemia/reperfusion injury. *J Surg Res*.2002; 15;105(2):248-58.
7. Cerra FB, Lajos TZ, Montes M, Siegel JH. Hemorrhagic infarction: A reperfusion injury following prolonged myocardial ischemic anoxia. *Surgery*.1975; Jul;78(1):95-104
8. Homer-Vanniasinkam S, Crinnion JN, Gough MJ: Post-ischaemic organ dysfunction: a review. *Eur J Vasc Endovasc Surg*, 1997; 14:195-203.
9. Seal JB, Gewertz BL. Vascular dysfunction in ischemia-reperfusion injury. *Ann Vasc Surg*. 2005 Jul;19(4):572-84.
10. Xu Y, Huo Y, Toufektsian MC, Ramos SI, Ma Y, Tejani AD, French BA, Yang Z. Activated platelets contribute importantly to myocardial reperfusion injury. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 2006;290(2): H 92-9.
11. Maureen McMichael DVM, DACVECC, Rustin M. Moore DVM, PhD, DACVS Ischemia-reperfusion injury pathophysiology, part I. *Journal of Veterinary Emergency and Critical Care* 2004; 14 (4): 231–241.
12. Florian Krötz, Hae-Young Sohn, Ulrich Pohl. Reactive Oxygen Species: Players in the Platelet Game. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology*. 2004;24: 1988-1996.
13. Blaisdell FW: The pathophysiology of skeletal muscle ischemia and the reperfusion syndrome: a review. *Cardiovasc Surg* 2002; 10:620-630
14. S.Della Bela et al. Novel mode of action of iloprost: in vitro down-regulation of endothelial cell adhesion molecules. *Prostaglandins & other Lipid Mediators* 2001;65:73-83.
15. Grant SM, Goa KL. Iloprost. A review of its pharmacodynamic and pharmacokinetic properties, and therapeutic potential in peripheral vascular disease, myocardial ischaemia and extracorporeal circulation procedures. *Drugs*. 1992 Jun; 43(6): 889-924. Review.
16. Semenza GL. Perspectives on oxygen sensing. *Cell*. 1999; Aug 6;98(3):281-4.
17. Stein I, Itin A, Einat P, Skaliter R, Grossman Z, Keshet E Translation of vascular endothelial growth factor mRNA by internal ribosome entry: implications for translation under hypoxia. *Mol Cell Biol*, 1998; 18, 3112–3119.
18. Forsythe J, Jiang B, Iyer N et al. Activation of vascular endothelial growth factor gene transcription by hypoxia-inducible factor 1. *Mol Cell Biol*,1996; 16, 4604–4613.
19. Semenza GL. HIF-1: mediator of physiological and pathophysiological responses to hypoxia. *J Appl Physiol*, 2000; 88, 1474–1480.
20. Lehninger AL. Generation of ATP in anaerobic cell. In: *Bioenergetics*.ed 2 Menlo park,Calif:WA Benjamin 1971:53-71.
21. Grum CM. Cellular energetics, In: Zelenock G. ed. *Clinical Ischemic Syndromes: Mechanism and Consequence of Tissue Injury*. St. Louis: The CV Mosby Co.; 1990; pp. 47–62.
22. Siesjö BK. Mechanisms of ischemic brain damage. *Crit. Care Med* 1988;16:954-63.
23. Newmeyer DD, Ferguson-Miller S. Mitochondria: releasing power for life and unleashing the machineries of death. *Cell*. 2003;21;112(4):481-90.
24. Anaya-Prado R, Toledo-Pereyra LH. The molecular events underlying ischemia/reperfusion injury. *Transplant Proc*. 2002;34(7):2518-9.
25. Droge W. Free radicals in the physiological control of cell function *Physiol Rev*. 2002;82(1):47-95.
26. Braschen W. Role of calcium in neuronal cell injury: which subcellular compartment is involved? *Brain Res Bull*. 2000;1;53(4):409-13.
27. Orrenius S, Zhivotovsky B, Nicotera P. Regulation of cell death: the calcium-apoptosis link. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2003;4(7):552-65.

28. Mangino MJ, Anderson CB, Murphy MK, et al. Mucosal arachidonate metabolism and intestinal ischemia–reperfusion injury. 1989; *Am J Physiol*: 257:G299–G307.
29. Granger DN. Ischemia–reperfusion: mechanisms of microvascular dysfunction and the influence of risk factors for cardiovascular disease. *Microcirculation* 1999; 6:167–178.
30. Hatanaka N, Kamike W, Shimizu S, et al. Ca²⁺ release from mitochondria induces cytosolic enzyme leakage in anoxic liver. *J Surg Res* 1995; 58:485–490.
31. Shibasaki F, McKeon F. Calcineurin functions in Ca(21)- activated cell death in mammalian cells. *J Cell Biol* 1995; 131:735–743.
32. Parr Dr, Wimshurst JM, Harris EI. Calcium-induced damage of rat heart mitochondria. *Cardiovasc Res* 1975; 9: 366–372.
33. Steenbergen C, Murphy E, Watts JA, London RE. Correlation between cytosolic free calcium contracture, ATP, and irreversible ischemic injury in perfused rat heart. *Circ Res* 1990; 66: 135–146.
34. Schoenberg MH, Beger HG. Reperfusion injury after intestinal ischemia. *Crit Care Med* 1993; 21:1376–1386.
35. Granger DN. Role of xanthine oxidase and granulocytes in ischemia–reperfusion injury. *Am J Physiol* 1988; 255: H1269–H1275.
36. Zweier JL, Flaherty JT, Weisfeldt ML. Direct measurement of free radical generation following reperfusion of ischemic myocardium. *Proc Natl Acad Sci USA* 1987; 84:1404–1407.
37. Voogd A, Sluiter W, van Eijk HG, et al. Low molecular weight iron and the oxygen paradox in isolated rat hearts. *J Clin Invest* 1992; 90:2050–2055.
38. Gutteridge JM. Iron promoters of the Fenton reaction and lipid peroxidation can be released from haemoglobin by peroxides. *FEBS Lett* 1986; 201:291–295.
39. Kehrer JP. The Haber–Weiss reaction and mechanisms of toxicity. *Toxicology* 2000; 149:43–50.
40. Halliwell B, Gutteridge JM. *Free Radicals in Biology and Medicine*. Oxford: Oxford University Press/Clarendon Press; 1989.
41. Horton JW, White DJ. Cardiac contractile injury after intestinal ischemia–reperfusion. *Am J Physiol* 1991; 261:H1164–H1170.
42. Schmeling DJ, Caty MG, Oldham KT, et al. Evidence for neutrophil-related acute lung injury after intestinal ischemia–reperfusion. *Surgery* 1989; 106:195–201.
43. Curtin JF, Donovan M, Cotter TG. Regulation and measurement of oxidative stress in apoptosis. *J Immunol Methods* 2002; 265:49–72.
44. Luscher TF, Yang Z, Tschudi M, et al. Interaction between endothelin-1 and endothelium-derived relaxing factor in human arteries and veins. *Circ Res* 1990; 66:1088–1094.
45. Kourembanas S, Marsden PA, McQuillan LP, et al. Hypoxia induces endothelin gene expression and secretion in cultured human endothelium. *J Clin Invest* 1991; 88:1054–1057.
46. Hon WM, Lee KH, Khoo HE. Nitric oxide in liver diseases: friend, foe, or just passerby? *Ann NY Acad Sci* 2002; 962:275–295.
47. Beckman JS, Beckman TW, Chen J, et al. Apparent hydroxyl radical production by peroxynitrite: implications for endothelial injury from nitric oxide and superoxide. *Proc Ntl Acad Sci USA* 1990; 87:1620–1624.
48. Ricciardi R, Foley DP, Quarfordt SH, et al. V-PYRRO/NO: an hepato-selective nitric oxide donor improves porcine liver hemodynamics and function after ischemia reperfusion. *Transplantation* 2001; 71:193–198.
49. Rieder H, Ramadori G, Meyer zum Buschenfelde KH. Sinusoidal endothelial liver cells in vitro release endothelin – augmentation by transforming growth factor beta and Kupffer cell-conditioned media. *Klin Wochenschr* 1991; 69:387–391
50. Pannen BH, Al Adili F, Bauer M, et al. Role of endothelins and nitric oxide in hepatic reperfusion injury in the rat. *Hepatology* 1998; 27:755–764.
51. De Caterina R, Libby P, Peng HB, et al. Nitric oxide decreases cytokine-induced endothelial activation. Nitric oxide selectively reduces endothelial expression of adhesion molecules and proinflammatory cytokines. *J Clin Invest* 1995; 96:60–68.
52. Diez-Fernandez C, Sanz N, Alvarez AM, et al. Influence of aminoguanidine on parameters of liver injury and regeneration induced in rats by a necrogenic dose of thioacetamide. *Br J Pharmacol* 1998; 125:102–108.
53. Sugioka A, Morita M, Esaki T, et al. Kinetics and significance of graft tissue nitric oxide after rat and mouse liver transplantation. *Transplant Proc* 1999; 31: 860–862.

54. McIntyre TM, Zimmerman GA, Prescott SM. Leukotrienes C4 and D 4 stimulate human endothelial cells to synthesize platelet-activating factor and bind neutrophils. *Proc Natl Acad Sci USA* 1986; 83: 2204-2208.
55. Bevilacqua MP, Prober JS, Wheeler ME, Coltran RS, Gimbtone MA. Interleukin-1 acts on cultured human vascular endothelium to increase the adhesion of polymorphonuclear leukocytes, monocytes and related leukocyte cell lines. *J Clin Invest* 1985; 76: 2003-2011.
56. Panes J, Perry M, Granger DN. Leukocyte-endothelial cell adhesion: avenues for therapeutic intervention. *Br J Pharmacol* 1999; 126, 537-550.
57. Kingston R, Kelly CJ, Murray P. The therapeutic role of taurine in ischaemia-reperfusion injury. *Curr Pharm Des.* 2004;10(19):2401-10.
58. Zweier JL, Talukder MA. The role of oxidants and free radicals in reperfusion injury. *Cardiovasc Res.* 2006 May 1;70(2): 181-90. Epub 2006 Mar 3.
59. Springer TA. Traffic signals for lymphocyte recirculation and leukocyte emigration: the multistep paradigm. *Cell* 1994; 76: 301-314.
60. Granger DN, Kubes P The microcirculation and inflammation: Modulation of leukocyte-endothelial cell adhesion. 1994; *J. Leukocyte Biol.* 55: 662
61. Schall TJ, Bacon KB. Chemokines, leukocyte trafficking, and inflammation. *Curr Opin Immunol* 1994;6: 865-873.
62. Butcher EC. Leukocyte-endothelial cell recognition: three (or more) steps to specificity and diversity. *Cell* 1991;67: 1033-1036.
63. Jassem W, Roake J. The molecular and cellular basis of reperfusion injury following organ transplantation. 1998; *Transplant. Rev.* 12: 14.
64. Patel KD, Zimmerman GA, Prescott SM, et al. Oxygen radicals induce human endothelial cells to express GMP- 140 and bind neutrophils. *J Cell Biol* 1991; 112:749-759.
65. Kokura S, Yoshida N, Yoshikawa T. Anoxia/reoxygenation- induced leukocyte-endothelial cell interactions. *Free Radic Biol Med* 2002; 33:427-432.
66. Serizawa A, Nakamura S, Suzuki, et al. Involvement of platelet-activating factor in cytokine production and neutrophil activation after hepatic ischemia-reperfusion. *Hepatology* 1996; 23:1656-1663.
67. Chensue SW, Remick DG, Shmyr-Forsch C, et al. Immunohistochemical demonstration of cytoplasmic and membrane-associated tumor necrosis factor in murine macrophages. *Am J Pathol* 1988; 133:564-572.
68. Frangogiannis NG, Lindsey ML, Michael LH, et al. Resident cardiac mast cells degranulate and release preformed TNF-alpha, initiating the cytokine cascade in experimental canine myocardial ischemia / reperfusion. *Circulation* 1998; 98:699-710.
69. Ikeda U, Ikeda M, Kano S, et al. Neutrophil adherence to rat cardiac myocyte by proinflammatory cytokines. *J Cardiovasc Pharmacol* 1994; 23:647-652.
70. Otamiri T, Lindahl M, Tagesson C. Phospholipase A2 inhibition prevents mucosal damage associated with small intestinal ischaemia in rats. *Gut* 1988; 29:489-494.
71. Carden DL, Smith JK, Korthuis RJ. Neutrophil-mediated microvascular dysfunction in postischemic canine skeletal muscle. Role of granulocyte adherence. *Circ Res* 1990;66:1436_1444
72. Weiss SJ. Tissue destruction by neutrophils. *N Engl J Med* 1989;320:365_376.
73. Bagge U, Amundson B, Lauritzen C. White blood cell deformability and plugging of skeletal muscle capillaries in hemorrhagic shock. *Acta Physiol Scand* 1980;108:159_163.
74. Jassem W, Fuggle SV, Rela M, Koo DD, Heaton ND. The role of mitochondria in ischemia/reperfusion injury. *Transplantation* 2002;73:493_499.
75. Ondiveeran HK, Fox-Robichaud A. New developments in the treatment of ischemia/reperfusion injury. *Curr Opin Invest Drugs* 2001; 2:783-791.
76. Elangbam CS, Qualls CW Jr, Dahlgren RR. Cell adhesion molecules--update. *Vet Pathol.* 1997 Jan;34(1):61-73.
77. Fantone JC, Ward PA: Inflammation. In: *Pathology*, ed. Rubin E and Farber JL, pp. 33-66. JB Lippincott Co, Philadelphia, PA, 1994
78. Bochner BS, Luscinskas RW, Gimbrone MA Jr, Newman W, Sterbinsky SA, Derse-Anthony CP, Klunk D, Schleimer RP: Adhesion of human basophils, eosinophils, and neutrophils to interleukin 1-activated human vascular endothelial cells, contributions of endothelial cell adhesion molecules. *J Exp Med*, 1991; 173:1553-1556.

79. Vaporciyan AA, DeLisser HM, Yan HC, Mendiguren II, Thorn SR, Jones ML, Ward PA, Albelda SM: Involvement of platelet-endothelial cell adhesion molecule-1 in neutrophil recruitment in vivo. *Science*, 1993; 262: 1580-1582.
80. Hamann A, Andrew DP, Jablonski-Westrich D, Holzmann B, Butcher EC: Role of $\alpha_5\beta_1$ -integrin in lymphocyte homing to mucosal tissues in vivo. *J Immunol*, 1994; 152: 3282-3292.
81. Dicle Güç. Adezyon molekülleri. *ANKEM Derg* 2004; 18 (Ek 2):158-163.
82. Reffelmann T, Hale SL, Dow JS, Kloner RA. No-reflow phenomenon persists long-term after ischemia/reperfusion in the rat and predicts infarct expansion. *Circulation*, 2003; 108, 2911-2917.
83. Majno G, Ames A III, Chiang J, et al. No reflow after cerebral ischemia. *Lancet* 1967; 2:569-570.
84. Kuijper PH, Gallardo Torres HI, van der Linden JA, et al. Platelet-dependent primary hemostasis promotes selectin and integrin-mediated neutrophil adhesion to damaged endothelium under flow conditions. *Blood* 1996; 87:3271-3281.
85. Barroso-Aranda J, Schmid-Schonbein GW, Zweifach BW, et al. Granulocytes and no-reflow phenomenon in irreversible hemorrhagic shock. *Circ Res* 1988; 63:437-447.
86. Rosemarie C. Forde, PhD; Desmond J. Fitzgerald, MD. Reactive Oxygen Species and Platelet Activation in Reperfusion Injury. *Circulation*. 1997;95:787-789.
87. Leo R, Pratico D, Iuliano L, Pulcinelli FM, Ghiselli A, Pignatelli P, Colavita AR, FitzGerald GA, Violi F. Platelet activation by superoxide anion and hydroxyl radicals intrinsically generated by platelets that had undergone anoxia and then reoxygenated. *Circulation*. 1997; Feb 18;95(4):885-91.
88. Stuart MJ, Holmsen H. Hydrogen peroxide, an inhibitor of platelet function: effect on adenine nucleotide metabolism, and the release reaction. *Am J Hematol*. 1977;2:53-63.
89. De la Cruz JP, Garcia PJ, Sanchez DLC. Dipyridamole inhibits platelet aggregation induced by oxygen-derived free radicals. *Thromb Res*. 1992;66:277-285.
90. Moro MA, Darley-USmar VM, Goodwin DA, Read NG, Zamora-Pino R, Feelisch M, Radomski MW, Moncada S. Paradoxical fate and biological action of peroxynitrite on human platelets. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1994;9:6702-6706.
91. Belisario MA, Tafuri S, Di Domenico C, Squillacioti C, Della MR, Lucisano A, Staiano N. H₂O₂ activity on platelet adhesion to fibrinogen and protein tyrosine phosphorylation. *Biochim Biophys Acta*. 2000;1495:183-193.
92. Marcus AJ, Silk ST, Safier LB, Ullman HL. Superoxide production and reducing activity in human platelets. *J Clin Invest*. 1977;59:149-158.
93. Kroetz F, Sohn HY, Gloe T, Zahler S, Riexinger T, Schiele TM, Becker BF, Theisen K, Klaus V, Pohl U. NAD(P)H-oxidase-dependent platelet superoxide anion release increases platelet recruitment. *Blood*. 2002;100:917-924.
94. Seno T, Inoue N, Gao D, Okuda M, Sumi Y, Matsui K, Yamada S, Hirata KI, Kawashima S, Tawa R, Imajoh-Ohmi S, Sakurai H, Yokoyama M. Involvement of NADH/NADPH oxidase in human platelet ROS production. *Thromb Res*. 2001;103:399-409.
95. Pignatelli P, Sanguigni V, Lenti L, Ferro D, Finocchi A, Rossi P, Violi F. gp91phox Dependent Expression of Platelet CD40 Ligand. *Circulation*. 2004; Sep 7;110(10):1326-9.
96. Clutton P, Miermont A, Freedman JE. Regulation of endogenous reactive oxygen species in platelets can reverse aggregation. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2004;24:187-192.
97. Zielinski T, Wachowicz B, Saluk-Juszczak J, Kaca W. The generation of superoxide anion in blood platelets in response to different forms of *Proteus mirabilis* lipopolysaccharide: effects of staurosporin, wortmannin, and indomethacin. *Thromb Res*. 2001;103:149-155.
98. van Gorp RM, Dam-Mieras MC, Hornstra G, Heemskerk JW. Effect of membrane-permeable sulfhydryl reagents and depletion of glutathione on calcium mobilisation in human platelets. *Biochem Pharmacol*. 1997; 53:1533-1542.
99. Essex DW, Li M, Feinman RD, Miller A. Platelet Surface Glutathione Reductase-Like Activity. *Blood*. 2004;104:1383-1385
100. Law DA, Nannizzi-Alaimo L, Phillips DR. Outside-in integrin signal transduction. IIB α -3-(GP IIB IIIa) tyrosine phosphorylation induced by platelet aggregation. *J Biol Chem*. 1996;271:10811-10815.
101. Clarke R, Armitage J. Antioxidant vitamins and risk of cardiovascular disease. Review of large-scale randomised trials. *Cardiovasc Drugs Ther*. 2002;16:411-415.
102. Cooper D, Stokes KY, Tailor A, Granger DN. Oxidative stress promotes blood cell-endothelial cell interactions in the microcirculation. *Cardiovasc Toxicol*. 2002;2:165-180.
103. Yao SK, Ober JC, Gonenne A, Clubb FJ, Jr., Krishnaswami A, Ferguson JJ, Anderson HV, Gorecki M, Buja LM, Willerson JT. Active oxygen species play a role in mediating platelet aggregation and cyclic flow variations in severely stenosed and endothelium-injured coronary arteries. *Circ Res*. 1993;73:952-967.

104. Klinger MH, Jelkmann W. Role of blood platelets in infection and inflammation. *J Interferon Cytokine Res.* 2002;22:913–22.
105. Gawaz M. Role of platelets in coronary thrombosis and reperfusion of ischemic myocardium. *Cardiovasc Res.* 2004 Feb 15;61(3):498–511.
106. Harrison P, Cramer EM. Platelet alpha-granules. *Blood Rev* 1993;7:52– 62.
107. Rendu F, Brohard-Bohn B. The platelet release reaction: granules' constituents, secretion and functions. *Platelets.* 2001;12:261– 73.
108. Denizot Y. Platelet-activating factor. In: Bruchhausen FV, Authi KS, Walter U, editors. *Platelets and their factors.* Heidelberg: Springer-Verlag; 1997.
109. Halushka PV, Pawate S, Martin ML. Thromboxane A2 and other eicosanoids. In: Bruchhausen FV, Authi KS, Walter U, editors. *Platelets and their factors.* Heidelberg: Springer Verlag; 1997.
110. Barry OP, FitzGerald GA. Mechanisms of cellular activation by platelet microparticles. *Thromb Haemost* 1999;82:794– 800.
111. Siess W. Athero- and thrombogenic actions of lysophosphatidic acid and sphingosine-1 phosphate. *Biochim Biophys Acta.* 2002;1582: 204–15.
112. Massberg S, Enders G, Leiderer R, et al. Platelet – endothelial cell interactions during ischemia/reperfusion: the role of P-selectin. *Blood.* 1998;92:507– 15.
113. Romo GM, Dong JF, Schade AJ, et al. The glycoprotein Ib-IX-V complex is a platelet counterreceptor for P-selectin. *J Exp Med.* 1999;190:803–14.
114. Gawaz M, Neumann FJ, Dickfeld T, et al. Vitronectin receptor (alpha(v)beta3) mediates platelet adhesion to the luminal aspect of endothelial cells: implications for reperfusion in acute myocardial infarction. *Circulation* 1997;96:1809–18.
115. Babinska A, Kedees MH, Athar H, et al. F11-receptor (F11R/JAM) mediates platelet adhesion to endothelial cells: role in inflammatory thrombosis. *Thromb Haemost* 2002;88:843– 50.
116. May AE, Kalsch T, Massberg S, Herouy Y, Schmidt R, Gawaz M. Engagement of glycoprotein IIb/IIIa (alpha(IIb)beta3) on platelets upregulates CD40L and triggers CD40L-dependent matrix degradation by endothelial cells. *Circulation* 2002;106:2111 –7.
117. Diacovo TG, Roth SJ, Buccola JM, Bainton DF, Springer TA. Neutrophil rolling, arrest, and transmigration across activated, surfaceadherent platelets via sequential action of P-selectin and the beta 2-integrin CD11b/CD18. *Blood* 1996;88:146– 57.
118. Santoso S, Sachs UJ, Kroll H, et al. The junctional adhesion molecule 3 (JAM-3) on human platelets is a counterreceptor for the leukocyte integrin Mac-1. *J Exp Med* 2002;196:679– 91.
119. Fernandez N, Martinez MA, Climent B, Garcia-Villalon AL, Monge L, Sanz E, Dieguez G. In vivo coronary effects of endothelin-1 after ischemia-reperfusion. Role of nitric oxide and prostanoids. *Eur J Pharmacol* 2003;481:109–117.
120. Nathan C, Xie QW. Nitric oxide synthases: Roles, tolls, and controls. *Cell* 1994;78: 915.
121. Wink DA, Mitchell JB. Chemical biology of nitric oxide: Insights into regulatory cytotoxic, and cytoprotective mechanisms of nitric oxide. *Free Radicals Biol. Med.* 1998; 25: 434.
122. Barnes PJ. Nuclear factor-kB. *Int. J. Biochem. Cell. Biol.* 1997; 29: 867.
123. Schreck R, Albermann K, Baeuerle PA. Nuclear factor kB: An oxidative stress response transcription factor of eukaryotic cells (a review). *Free Radicals Res. Commun.* 1993; 17: 221.
124. Collard CD, Lekowski R, Jordan JE, Agah A, Stahl GL. Complement activation following oxidative stress. *Mol Immunol* 1999; 36, 941–948.
125. Davies MG, Huynh TTT, Hagen PO. *Endothelial Physiology in Ischemia Reperfusion.* Edited by R. Mathie and P. Grace, Blackwell Science Ltd, Oxford 1999; chapter 15:157-179.
126. Kvietys PR, Granger DN. Endothelial cell monolayers as a tool for studying microvascular pathophysiology. *Am J Physiol.* 1997 Dec;273(6 Pt 1):G1189-99. Review.
127. Parvums DV. The pathology of ischemia-reperfusion. In: Grace PA, and Mathie RT, editors. *Ischemia-reperfusion injury.* London: Blackwell Science, 1999; 3–19.
128. Romanenko VG, Davies PF, Levitan I. Dual effect of fluid shear stress on volume-regulated anion current in bovine aortic endothelial cells. *Am J Physiol Cell. Physiol.* 2002;282:C708-C718.
129. Al-Mehdi AB, Zhao G, Fisher AB. ATP-independent membrane depolarization with ischemia in the oxygenventilated isolated rat lung. *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.* 1998;18:653-661.
130. Kelsall CJ, Brown MD, Hudlicka O. Alterations in reactivity of small arterioles in rat skeletal muscle as a result of chronic ischaemia. *J. Vasc. Res.* 2001;38:212-218.
131. Fruchterman TM, Spain DA, Wilson MA, Harris PD, Garrison RN. Complement inhibition prevents gut ischemia and endothelial cell dysfunction after hemorrhage/resuscitation. *Surgery* 1998;124:782-791; discussion 791–792.

132. Giraldez RR, Panda A, Xia Y, Sanders SP, Zweier JL. Decreased nitric-oxide synthase activity causes impaired endothelium-dependent relaxation in the postischemic heart. *J. Biol. Chem.* 1997;272:21420-21426.
133. Rosenblum WI. Selective impairment of response to acetylcholine after ischemia/reperfusion in mice. *Stroke* 1997;28:448-451 discussion 451-452.
134. Tiefenbacher CP, Chilian WM, Mitchell M, DeFily DV. Restoration of endothelium-dependent vasodilation after reperfusion injury by tetrahydrobiopterin. *Circulation* 1996;94:1423-1429.
135. Iraculis E, Cequier A, Gomez-Hospital JA, et al. Early dysfunction and long-term improvement in endothelium-dependent vasodilation in the infarct-related artery after thrombolysis. *J. Am. Coll. Cardiol.* 2002;40:257-265.
136. Horwitz LD, Kaufman D, Keller MW, Kong Y. Time course of coronary endothelial healing after injury due to ischemia and reperfusion. *Circulation* 1994;90:2439-2447.
137. Alexander JS, Alexander BC, Eppihimer LA, et al. Inflammatory mediators induce sequestration of VE-cadherin in cultured human endothelial cells. *Inflammation* 2000;24:99-113.
138. Gute DC, Ishida T, Yarimizu K, Korthuis RJ. Inflammatory responses to ischemia and reperfusion in skeletal muscle. *Mol. Cell. Biochem.* 1998;179:169-187.
139. Schutte H, Mayer K, Burger H, et al. Endogenous nitric oxide synthesis and vascular leakage in ischemic-reperfused rabbit lungs. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* 2001;164:412-418.
140. Schutte H, Lockinger A, Seeger W, Grimminger F. Aerosolized PGE1, PGI2 and nitroprusside protect against vascular leakage in lung ischaemia-reperfusion. *Eur. Respir. J.* 2001;18:15-22.
141. Lee TD, Gonzalez ML, Kumar P, Chary-Reddy S, Grammas P, Pereira HA. CAP37, a novel inflammatory mediator: its expression in endothelial cells and localization to atherosclerotic lesions. *Am J Pathol*, 2002; 160, 841-848.
142. Kishi M, Tanaka H, Seiyama A, et al. Pentoxifylline attenuates reperfusion injury in skeletal muscle after partial ischemia. *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.* 1998;274:1435-1442.
143. Kubes P. The role of shear forces in ischemia/reperfusion-induced neutrophil rolling and adhesion. *J. Leukoc. Biol.* 1997;62:458-464.
144. Hayashi S, Takamiya R, Yamaguchi T, et al. Induction of heme oxygenase-1 suppresses venular leukocyte adhesion elicited by oxidative stress: role of bilirubin generated by the enzyme. *Circ. Res.* 1999;85:663-671.
145. Ostrovsky L, Woodman RC, Payne D, Teoh D, Kubes P. Antithrombin III prevents and rapidly reverses leukocyte recruitment in ischemia/reperfusion. *Circulation* 1997;96: 2302-2310.
146. Haimovici H. Metabolic complications of acute arterial occlusions and related conditions: myoneuropathic-metabolic syndrome. Futura Publ Co, Mount Kisco, NY, 1988.
147. Stallone RJ, Blaisdell FW, Cafferata HT et al. Analysis of morbidity and mortality from arterial embolectomy. *Surgery*, 1969; 65, 207-217.
148. Belkin M, Brown RD, Wright JG et al. A new quantitative spectrophotometric assay of ischemia reperfusion injury in skeletal muscle. *Am J Surg*, 1988; 156, 83-86.
149. Hayes G, Liauw S, Romaschin AD, Walker PM. Separation of reperfusion injury from ischemia-induced necrosis. *Surg Forum*, 1988; 39, 306-308.
150. Harman JW. The significance of local vascular phenomena in the production of ischemic necrosis in skeletal muscle. *Am J Pathol*, 1948; 24, 625-641.
151. Brooks B. Pathologic changes in muscle as the result of disturbances of circulation. *Arch Surg*, 1922, 5, 188-216.
152. Ames A Jr, Wright RL, Kowada M. Cerebral ischemia II. The no-reflow phenomenon. *Am J Pathol*, 1968, 52, 437-453. 28.
153. McCarter SD, Badhwar A, Scott JR, Akyea TG, Bihari A, Dungey AA, Harris KA, Potter RF. Remote liver injury is attenuated by adenovirus-mediated gene transfer of heme oxygenase-1 during the systemic inflammatory response syndrome. *Microcirculation*. 2004 Oct-Nov;11(7):587-95.
154. Yokoyama H, Lingle DM, Crestanello JA, Kamelgard J, Kott BR, Momeni R, et al. Coenzyme Q10 protects coronary endothelial function from ischemia reperfusion injury via an antioxidant effect. *Surgery* 1996; 120 (2): 189-196.
155. Scuito AM. Antioxidant properties of glutathione and its role in tissue protection, in oxidants, antioxidants and free radicals. Baskin SI, Salem H, editors. *Oxidants, antioxidants, and free radicals*. Washington (DC): Taylor and Francis Publishers; 1997. p. 171-191.
156. Hastie LE, Patton WF, Hechtman HB, Shepro D. Filamin redistribution in an endothelial cell reoxygenation injury model. *Free Radic Biol Med* 1997; 22 (6): 955-966.
157. Jarrod Wall. Antioxidants In Prevention Of Reperfusion Damage Of Vascular Endothelium. *TSMJ*, 2000 May; Volume 1: 67-71.

158. Massey KD, Burton KP. Alpha-tocopherol attenuates myocardial membrane-related alterations resulting from ischemia and reperfusion. *Am J Physiol* 1989; 256: H1192-H1199.
159. Lehr HA, Vajkoczy P, Menger MD. Vitamin E: focus on microcirculation. *Microcirculation* 1998; 5: 117-128.
160. Bilgin-Karabulut A, Ademoglu E, Aydin I, Erer M, Gokkusu C. Protective effects of vitamins A and E pretreatment in venous ischemia/reperfusion injury. *J Reconstr Microsurg*. 2001 Aug;17(6):425-9.
161. Bozkurt AK. Alpha-tocopherol (Vitamin E) and iloprost attenuate reperfusion injury in skeletal muscle ischemia/reperfusion injury. *J Cardiovasc Surg (Torino)*. 2002 Oct;43(5):693-6
162. De Vecchi E, Lubatti L, Beretta C, Ferrero S, Rinaldi P, Galli Kienle M, et al. Protection from renal ischemia-reperfusion injury by the 2-Methylaminochroman U83836E. *Kidney Int* 1998; 54 (3): 857-863.
163. Christopher TA, Lopez BL, Ma XL, Feuerstein GZ, Ruffolo RR Jr, Yue TL. Effects of a hydroxylated metabolite of the betaadrenoreceptor antagonist carvedilol, on postischemic splanchnic tissue injury. *Br J Pharmacol* 1998; 123 (2): 292-298.
164. Korthuis RJ, Granger DN, Townsley MI, Taylor AE. The role of oxygen-derived free radicals in ischemia-induced increases in canine skeletal muscle vascular permeability. *Circ Res*. 1985 Oct;57(4):599-609.
165. Shutenko Z, Henry Y, Pinard E, Seylaz J, Potier P, Berthet F, et al. Influence of the antioxidant quercetin in vivo on the level of nitric oxide determined by electron paramagnetic resonance in rat brain during global ischemia and reperfusion. *Biochem Pharmacol* 1999; 57 (2): 199-208.
166. Jassem W, Roake J. The molecular and cellular basis of reperfusion injury following organ transplantation. *Transplant. Rev.* 1998;12: 14.
167. Maxwell SR, Lip GY. Reperfusion injury: a review of the pathophysiology, clinical manifestations and therapeutic options. *Int J Cardiol*. 1997 Jan 31;58(2):95-117. Review.
168. Chiang N, Gronert K, Clish CB, O'Brien JA, Freeman MW, Serhan CN. Leukotriene B4 receptor transgenic mice reveal novel protective roles for lipoxins and aspirin-triggered lipoxins in reperfusion. *J Clin Invest* 1999; 104, 309-316.
169. Murry CE, Jennings RB, Reimer KA. Preconditioning with ischemia: a delay of lethal cell injury in ischemic myocardium. *Circulation*. 1986 Nov;74(5):1124-36.
170. Cuttrn JC, Perrelli MG, Cavalieri B, Peralta C, Rosell Catafau J, Poli G. Microvascular dysfunction induced by reperfusion injury and protective effect of ischemic preconditioning. *Free Radic Biol Med* 2002;33:1200-1208.
171. Adanali G, Ozer K, Siemionow M. Early and late effects of ischemic preconditioning on microcirculation of skeletal muscle flaps. *Plast Reconstr Surg* 2002;109:1344-1351.
172. Jerome SN, Akimitsu T, Gute DC, Korthuis RJ. Ischemic preconditioning attenuates capillary no-reflow induced by prolonged ischemia and reperfusion. *Am J Physiol*, 1995; 268, H2063-H2067.
173. Minamino T, Kitakaze M, Morioka T et al. Cardioprotection due to preconditioning correlates with increased ecto-5'-nucleotidase activity. *Am J Physiol* 1996; 270, H238-H244.
174. Kubes P, Payne D, Ostrovsky L. Preconditioning and adenosine in I/R-induced leukocyte endothelial cell interactions. *Am J Physiol* 1998;274:1230-1238.
175. Xuan YT, Tang XL, Qiu Y, Banerjee S, Takano H, Han H, Bolli R. Biphasic response of cardiac NO synthase isoforms to ischemic preconditioning in conscious rabbits. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2000;279:2360-2371.
176. Yamaguchi T, Dayton C, Shigematsu T, Carter P, Yoshikawa T, Gute DC, Korthuis RJ. Preconditioning with ethanol prevents postischemic leukocyte-endothelial cell adhesive interactions. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2002;283:1019-1030.
177. Seifalian AM, Chaloupka K, Lohn JW, Gurke L, Heberer M, Hamilton G. The effect of pretreatment with ischaemic preconditioning or cromakalim on perfusion in skeletal muscle during ischaemia-reperfusion injury. *Int Angiol* 2001;20:174-180.
178. Wu Z-K, Iivainen T, Pehkonen E, Laurikka J, Tarkka MR. Ischemic preconditioning suppresses ventricular tachyarrhythmias after myocardial revascularization. *Circulation*, 2002; 106, 3091-3096.
179. Clavien PA, Yadav S, Sindram D, Bentley RC. Protective effects of ischemic preconditioning for liver resection performed under inflow occlusion in humans. *Ann Surg*, 2000; 232, 155-162.
180. Khalil AA, Aziz FA, Hall JC. Reperfusion injury. *Plast Reconstr Surg*. 2006 Mar;117(3):1024-33
181. Krapohl BD, Siemionow M, Zins JE. Effect of tissue-plasminogen activator on leukocyte-endothelial interactions at the microcirculatory level. *Plast Reconstr Surg* 1998;102:2388-2394.
182. Neumann FJ, Blasini R, Schmitt C, et al. Effect of glycoprotein IIb/IIIa receptor blockade on recovery of coronary flow and left ventricular function after the placement of coronary-artery stents in acute myocardial infarction. *Circulation* 1998;98:2695-701.

183. Aoki N, Johnson G 3rd, Lefer AM. Beneficial effects of two forms of NO administration in feline splachnic artery occlusion shock. *Am. J. Physiol.* 1990; 258: G275.
184. Frostell C, Fratacci MD, Wain JC, et al. Inhaled nitric oxide: A selective pulmonary vasodilator reversing pulmonary vasoconstriction. *Circulation* 1991; 83: 2038.
185. Kurose I, Wolf R, Grisham MB, and Granger DN. Modulation of ischemia/reperfusion-induced microvascular dysfunction by nitric oxide. *Circ. Res.* 1994; 74: 376.
186. Seekamp A, Mulligan MS, Till GO, et al. Requirements for neutrophil products and L-arginine in ischemia-reperfusion injury. *Am. J. Pathol.* 1993; 142: 1217.
187. Weyrich AS, Ma XL, Lefer AM. The role of L-arginine in ameliorating reperfusion injury after myocardial ischemia in the cat. *Circulation* 1992; 86: 279.
188. Rivera-Chavez FA, Toledo-Pereyra LH, Dean RE et al. Exogenous and endogenous nitric oxide but not iNOS inhibition improve function and survival os ischemically injured livers. *J. Invest. Surg.* 2001 Sep-Oct; 14(5): 267-73.
189. Mowlavi A, Neumeister MW, Wilhelmi BJ, Song YH, Suchy H, Russell RC. Local hypothermia during early reperfusion protects skeletal muscle from ischemia-reperfusion injury. *Plast Reconstr Surg.* 2003 Jan; 111(1):242-50.
190. Usui M, Ishii S, Muramatsu I, Takahata N. An experimental study on "replantation toxemia". The effect of hypothermia on an amputated limb. *J Hand Surg [Am].* 1978 Nov;3(6):589-96.
191. Zacharowski K, Otto M, Hafner G, Marsh HC Jr, Thiemermann C. Reduction of myocardial infarct size with sCR1sLe(x), an alternatively glycosylated form of human soluble complement receptor type 1 (sCR1), possessing sialyl Lewis x. *Br J Pharmacol* 1999;128:945_952.
192. Fitch JCK, Rollins S, Matis L et al. Pharmacology and biological efficacy of a recombinant, humanized, single-chain antibody C5 complement inhibitor in patients undergoing coronary artery bypass graft surgery with cardiopulmonary bypass. *Circulation* 1999; 100, 2499–2506.
193. Buerke M, Prufer D, Dahm M, Oelert H, Meyer J, Darius H. Blocking of classical complement pathway inhibits endothelial adhesion molecule expression and preserves ischemic myocardium from reperfusion injury. *J Pharmacol Exp Ther* 1998;286:429_438.
194. Arumugam TV, Shiels IA, Woodruff TM, Reid RC, Fairlie DP, Taylor SM. Protective effect of a new C5a receptor antagonist against ischemia-reperfusion injury in the rat small intestine. *J Surg Res* 2002;103:260_267.
195. Fisher CA, Kappa JR, Sinha AK, Cottrell ED, Reiser HJ, Addonizio VP. Comparison of equimolar concentrations of iloprost, prostacyclin, and prostaglandin E1 on human platelet function. *J Lab Clin Med.* 1987 Feb;109(2):184-90.
196. Oliva DW, Maderna P, Accomazzo MR, Nicosia S, Tremoli E. Iloprost binding and inhibition of aggregation in platelet rich plasma. Differences between normal and type IIa hypercholesterolemic subjects. *Biochem Pharmacol.* 1989 Jan 1;38(1):39-45.
197. Zahavi J, Zahavi M. Enhanced platelet release reaction, shortened platelet survival time and increased platelet aggregation and plasma thromboxane B2 in chronic obstructive arterial disease. *Thromb Haemost.* 1985 Feb 18;53(1):105-9.
198. Collier A, Tymkewycz PM, Matthews DM, Jones RL, Clarke BF. Changes in some aspects of platelet function with improvement of glycaemic control over 6 months. *Diabetes Res.* 1987 Jun;5(2):79-82.
199. Lobel P, Steinhagen-Thiessen E, Schror K. Cholestyramine treatment of type IIa hypercholesterolaemia normalizes platelet reactivity against prostacyclin. *Eur J Clin Invest.* 1988 Jun;18(3):256-60.
200. Witt W, Muller B. Antithrombotic profile of iloprost in experimental models of in vivo platelet aggregation and thrombosis. *Adv Prostaglandin Thromboxane Leukot Res.* 1987;17A:279-84.
201. Casals-Stenzel J, Buse M, Losert W. Comparison of the vasodepressor action of ZK36-374, a stable prostacyclin derivative, PGI2 and PGE1 with their effect on platelet aggregation and bleeding time in rats. *Prostaglandins Leukot Med.* 1983 Feb;10(2):197-212.
202. Belch JJ, Greer I, McLaren M, Saniabadi AR, Miller S, Sturrock RD, Forbes CD. The effects of intravenous ZK36-374, a stable prostacyclin analogue, on normal volunteers. *Prostaglandins.* 1984 Jul;28(1):67-77.
203. Cowley AJ, Heptinstall S, Hampton JR. Effects of prostacyclin and of the stable prostacyclin analogue ZK 36374 on forearm blood flow and blood platelet behaviour in man. *Thromb Haemost.* 1985 Feb 18;53(1):90-4
204. Swedberg K, Held P, Wadenvik H, Kutti J. Central haemodynamic and antiplatelet effects of iloprost--a new prostacyclin analogue--in acute myocardial infarction in man. *Eur Heart J.* 1987 Apr;8(4):362-8.

205. Fitscha P, Tiso B, Kraus T, Sinzinger H. Effect of iloprost on in vivo and in vitro platelet function in patients with peripheral vascular disease (PVD). *Advances in Prostaglandin, Thromboxane and Leukotriene Research* 17. 1987a; 450-454.
206. Sturzebecher CS, Losert W. Effects of Iloprost on platelet activation in vitro. In: Gryglewski RJ & Stock G, eds. *Prostacyclin and its Stable Analogue Iloprost*. Berlin: Springer-Verlag, 1987:39-45
207. Addonizio VP Jr, Fisher CA, Kappa JR, Ellison N. Prevention of heparin-induced thrombocytopenia during open heart surgery with iloprost (ZK36374). *Surgery*. 1987 Nov;102(5):796-807.
208. Steurer G, Jankovic B, Ettl K, Scherthaner G. Investigation of selective [3H]iloprost binding sites on human platelet membranes. *Prog Clin Biol Res*. 1987;242:25-34.
209. Jaschonek K, Faul C, Schmidt H, Renn W. Desensitization of platelets to iloprost. Loss of specific binding sites and heterologous desensitization of adenylate cyclase. *Eur J Pharmacol*. 1988 Mar 1;147(2):187-96.
210. Jaschonek K, Weisenberger H, Tidow S, Daiss W, Renn W, Ostendorf P. Platelet prostacyclin binding in smokers. *J Lab Clin Med*. 1986 Aug;108(2):88-95.
211. Jaschonek K, Karsch KR, Weisenberger H, Tidow S, Faul C, Renn W. Platelet prostacyclin binding in coronary artery disease. *J Am Coll Cardiol*. 1986 Aug;8(2):259-66.
212. Modesti PA, Fortini A, Poggesi L, Boddi M, Abbate R, Gensini GF. Acute reversible reduction of PGI₂ platelet receptors after iloprost infusion in man. *Thromb Res*. 1987 Dec 15;48(6):663-9.
213. Kovacs IB, Mayou SC, Kirby JD. Infusion of a stable prostacyclin analogue, iloprost, to patients with peripheral vascular disease: lack of antiplatelet effect but risk of thromboembolism. *Am J Med*. 1991 Jan;90(1):41-6.
214. Hossmann V, Schrör K. Iloprost: a stable prostacyclin analog, for the treatment of obliterative arterial disease(OAD) st. IV: a placebo controlled cross-over study. 1985; *Thrombosis and Haemostasis* 54; 136.
215. Grauso F, Biagi G, Puddu P, Bugiardini R, Capelli M, Coccheri S. Effects of iloprost (ZK 36374), a prostacyclin derivative, on platelet function after ischaemic exercise in patients with stable angina pectoris. *Thromb Res*. 1987 Oct 15;48(2):131-43.
216. Di Perri T, Laghi Pasini F, Acciavatti A, Pieragalli D, Domini L, et al. Haemodynamics, rheology and mechanism of action of iloprost in man. *Clinical Hemorheology*. 1990; 10:171-183.
217. Ciuffetti G, Sokola E, Lombardini R, Pasqualini L, Pirro M, Mannarino E. The influence of iloprost on blood rheology and tissue perfusion in patients with intermittent claudication. *Kardiol Pol*. 2003 Sep;59(9):197-204
218. Musial J, Wilczynska M, Sladek K, Cierniewski CS, Nizankowski R, Szczeklik A. Fibrinolytic activity of prostacyclin and iloprost in patients with peripheral arterial disease. *Prostaglandins*. 1986 Jan;31(1):61-70.
219. Bertele V, Mussoni L, del Rosso G, Pintucci G, Carriero MR, Merati MG, Libretti A, de Gaetano G. Defective fibrinolytic response in atherosclerotic patients--effect of iloprost and its possible mechanism of action. *Thromb Haemost*. 1988 Oct 31;60(2):141-4.
220. Belch JJ, Saniabadi AR, Forbes CD. Whole blood white cell aggregation: a novel technique. *Thromb Res*. 1987 Dec 15;48(6):631-9.
221. Wadenvik H, Kutti J. Effect of Iloprost (ZK 36 374), a novel prostacyclin analogue, on ADP-induced platelet aggregation. *Acta Haematol*. 1985;73(4):224-7.
222. Dormandy JA. The pathophysiology of critical limb ischaemia and pharmacological intervention with a stable prostacyclin analogue, iloprost. Royal Society of Medicine Services, London, 1989.
223. Mazzone A, Faggioli P, Cusa C, Stefanin C, Rondena M, Morelli B. Effects of iloprost on adhesion molecules and F1 + 2 in peripheral ischemia. *Eur J Clin Invest*. 2002 Dec;32(12):882-8.
224. Boehme MW, Gao IK, Norden C, Lemmel EM. Decrease in circulating endothelial cell adhesion molecule and thrombomodulin levels during oral iloprost treatment in rheumatoid arthritis patients: preliminary results. *Rheumatol Int*. 2006 Feb;26(4):340-7
225. Mittag M, Beckheinrich P, Haustein UF. Systemic sclerosis-related Raynaud's phenomenon: effects of iloprost infusion therapy on serum cytokine, growth factor and soluble adhesion molecule levels. *Acta Derm Venereol*. 2001 Aug-Sep;81(4):294-7.
226. Dembinska-Kiec A, Zmuda A, Wenhryniewicz O, Stachura J, Peskar BA, Gryglewski RJ. Selectin-P mediated adherence of platelets to neutrophils is regulated by prostanoids and nitric oxide. *Int J Tissue React*. 1993;15(2):55-64.
227. Darius H, Binz C, Veit K, Fisch A, Meyer J. Platelet receptor desensitization induced by elevated prostacyclin levels causes platelet-endothelial cell adhesion. *J Am Coll Cardiol*. 1995 Sep;26(3):800-6.

228. Arosio E, Minuz P, Prior M, Zuliani V, Gaino S, De Marchi S, Fontana L, Andrioli G, Lechi C, Lechi A. Vascular adhesion molecule-1 and markers of platelet function before and after a treatment with iloprost or a supervised physical exercise program in patients with peripheral arterial disease. *Life Sci.* 2001 Jun 15;69(4):421-33.
229. Ercan ZS, Turker RK. The relaxing activity of iloprost and prostaglandin E2 in the isolated various smooth muscle strips of the rabbit. *Pharmacology.* 1985;31(2):61-6.
230. Lye RH, Parsons AA, Whalley ET. Effect of iloprost (ZK36374) and prostacyclin on in vitro human cerebral arteries. *Br J Pharmacol* 1986;89:691
231. Rucker W, Schror K. Evidence for high affinity prostacyclin binding sites in vascular tissue: radioligand studies with a chemically stable analogue. *Biochem Pharmacol.* 1983 Aug 15;32(16):2405-10.
232. Ioannou P, Talesnik J. Platelet antiaggregatory substances inhibit arachidonic acid induced coronary constriction. *Can J Physiol Pharmacol.* 1986 Apr;64(4):398-405.
233. Schröder G, Graichen G, Fiske F, Wehrmann D. Iloprost, a potent functional antagonist of thromboxane A2 induced vasoconstriction? 1990 Naunyn-Schmiedeberg's Archives of Pharmacology 341 (Suppl.): 37
234. Groom TM, Gautieri RF. Influence of a stable prostacyclin analogue (iloprost) and cyclooxygenase inhibition on angiotensin-II in the perfused human placenta. *Res Commun Chem Pathol Pharmacol.* 1989 Oct;66(1):21-32.
235. Turker RK, Aksulu HE, Ercan ZS, Aslan S. Thromboxane A2 inhibitors and iloprost prevent angiotensin II-induced oedema in the isolated perfused rat lung. *Arch Int Pharmacodyn Ther.* 1987 Jun;287(2):323-9.
236. Schror K, Verheggen R. Prostacyclins are only weak antagonists of coronary vasospasm induced by authentic thromboxane A2 and serotonin. *J Cardiovasc Pharmacol.* 1986 May-Jun;8(3):607-13.
237. Ercan ZS, Turker RK. Possible beta-adrenoceptor modulating effect of ZK 36 374 a stable analogue of carbacyclin. *Prostaglandins Leukot Med.* 1984 Jul;15(1):45-52.
238. Schror K, Ohlendorf R, Darius H. Beneficial effects of a new carbacyclin derivative, ZK 36 374, in acute myocardial ischemia. *J Pharmacol Exp Ther.* 1981 Oct;219(1):243-9.
239. Herman F, Hadhazy P, Magyar K. Critical evaluation of the in vivo selectivity between hypotensive and platelet antiaggregating actions of iloprost and prostacyclin in beagle dogs. *Arch Int Pharmacodyn Ther.* 1989 Jul-Aug;300:281-91.
240. Bergman G, Kiff PS, Atkinson L et al: Dissociation of platelet aggregation and vasodilatation with iloprost, a stable, orally active prostacyclin derivative. *Circulation* 1983; 68(Suppl III):398
241. Steinberg H, Medvedev OS, Luft FC, Unger T. Effect of a prostacyclin derivative (iloprost) on regional blood flow, sympathetic nerve activity, and baroreceptor reflex in the conscious rat. 1: *J Cardiovasc Pharmacol.* 1988 Jan;11(1):84-9.
242. Haberey M, Loge O, Maas B, Ohme G. Haemodynamic profile of iloprost in rats, rabbits and cats. In Gryglewski RJ and Stock G (Eds) *Prostacyclin and its stable analogue iloprost*, pp. 151-158, Springer-Verlag, Berlin, 1987.
243. Borzeix MG, Cahn R, Cahn J. Effects of new chemically and metabolically stable prostacyclin analogues (iloprost and ZK 96480) on early consequences of a transient cerebral oligemia, in the rat. *Prostaglandins.* 1988 May;35(5):653-64.
244. Archer SL, Chesler E, Cohn JN, Weir EK. ZK 36-374, a stable analog of prostacyclin, prevents acute hypoxic pulmonary hypertension in the dog. *J Am Coll Cardiol.* 1986 Nov;8(5):1189-94.
245. Kaukinen S, Ylitalo P, Pessi T, Vapaatalo H. Hemodynamic effects of iloprost, a prostacyclin analog. *Clin Pharmacol Ther.* 1984 Oct;36(4):464-9.
246. Scott JP, Higenbottam T, Wallwork J. The acute effect of the synthetic prostacyclin analogue iloprost in primary pulmonary hypertension. *Br J Clin Pract.* 1990 Jun;44(6):231-4.
247. Arzilli F, Giovannetti R, Lenzi M, Salvetti A. Acute hemodynamic (systemic and renal) and humoral effects of three increasing doses of iloprost in essential hypertensives. *Am J Hypertens.* 1989 Nov;2(11 Pt 1):856-60.
248. Lee FO, Nadler JL, Hsueh WA. Effect of a synthetic prostacyclin analogue on renin release in man. *J Hypertens Suppl.* 1986 Dec;4(5):S10-3.
249. Ferrari R, Cargnoni A, Curello S, Boffa GM, Ceconi C. Effects of iloprost (ZK 36374) on glutathione status during ischaemia and reperfusion of rabbit isolated hearts. *Br J Pharmacol.* 1989 Oct;98(2):678-84.
250. van Gilst WH, Boonstra PW, Terpstra JA, Wildevuur CR, de Langen CD. Improved recovery of cardiac function after 24 h of hypothermic arrest in the isolated rat heart: comparison of a

- prostacyclin analogue (ZK 36 374) and a calcium entry blocker (diltiazem). *J Cardiovasc Pharmacol.* 1985 May-Jun;7(3):520-4.
251. Ferrari R, Cargnoni A, Ceconi C, Curello S, Belloli S, Albertini A, Visioli O. Protective effect of a prostacyclin-mimetic on the ischaemic-reperfused rabbit myocardium. *J Mol Cell Cardiol.* 1988 Dec;20(12):1095-1106.
 252. Thiernemann C, Steinhagen-Thiessen E, Schror K. Inhibition of oxygen-centered free radical formation by the stable prostacyclin-mimetic iloprost (ZK 36 374) in acute myocardial ischemia. *J Cardiovasc Pharmacol.* 1984 Mar-Apr;6(2):365-6.
 253. Darius H, Osborne JA, Reibel DK, Lefer AM. Protective actions of a stable prostacyclin analog in ischemia induced membrane damage in rat myocardium. *J Mol Cell Cardiol.* 1987 Mar;19(3):243-50.
 254. Chiariello M, Golino P, Cappelli-Bigazzi M, Ambrosio G, Tritto I, Salvatore M. Reduction in infarct size by the prostacyclin analogue iloprost (ZK 36374) after experimental coronary artery occlusion-reperfusion. *Am Heart J.* 1988 Mar;115(3):499-504.
 255. van der Giessen WJ, Schoutsen B, Tijssen JG, Verdouw PD. Iloprost (ZK 36374) enhances recovery of regional myocardial function during reperfusion after coronary artery occlusion in the pig. *Br J Pharmacol.* 1986 Jan;87(1):23-7.
 256. de Langen CD, van Gilst WH, Wesseling H. Sustained protection by iloprost of the porcine heart in the acute and chronic phases of myocardial infarction. *J Cardiovasc Pharmacol.* 1985 Sep-Oct;7(5):924-8.
 257. Farber NE, Pieper GM, Thomas JP, Gross GJ. Beneficial effects of iloprost in the stunned canine myocardium. *Circ Res.* 1988 Feb;62(2):204-15.
 258. Smith EF 3rd, Gallenkamper W, Beckmann R, Thomsen T, Mannesmann G, Schror K. Early and late administration of a PGI₂-analogue, ZK 36 374 (iloprost): effects on myocardial preservation, collateral blood flow and infarct size. *Cardiovasc Res.* 1984 Mar;18(3):163-73.
 259. Simpson PJ, Fantone JC, Mickelson JK, Gallagher KP, Lucchesi BR. Identification of a time window for therapy to reduce experimental canine myocardial injury: suppression of neutrophil activation during 72 hours of reperfusion. *Circ Res.* 1988 Dec;63(6):1070-9.
 260. Parratt JR, Coker SJ, Wainwright CL. Eicosanoids and susceptibility to ventricular arrhythmias during myocardial ischaemia and reperfusion. *J Mol Cell Cardiol.* 1987 Oct;19 Suppl 5:55-66.
 261. Aksulu HE, Ercan ZS, Turker RK. Further studies on the antiarrhythmic effect of iloprost. *Arch Int Pharmacodyn Ther.* 1985 Oct;277(2):223-34.
 262. Bursch W, Taper HS, Somer MP, Meyer S, Putz B, Schulte-Hermann R. Histochemical and biochemical studies on the effect of the prostacyclin derivative iloprost on CCl₄-induced lipid peroxidation in rat liver and its significance for hepatoprotection. *Hepatology.* 1989 Jun;9(6):830-8.
 263. Levitt MA, Lefer AM. Anti-shock properties of the prostacyclin analog, iloprost, in traumatic shock. *Prostaglandins Leukot Med.* 1986 Dec;25(2-3):175-85.
 264. Smith EF 3rd, Tempel GE, Wise WC, Halushka PV, Cook JA. Experimental endotoxemia in the rat: efficacy of prostacyclin or the prostacyclin analog iloprost. *Circ Shock.* 1985;16(1):1-7.
 265. Kirk AJB, Corris PA, Conacher I, McGregor CGA, Dark JH. Clinical results with a flush perfusion method of lung preservation. *Journal of Heart Transplantation* 1989; 8:92.
 266. Foegh ML, Rowles JR, Khirabadi BS, Ramwell PW. Allograft survival with iloprost. In Gryglewski RJ and Stock G (Eds) *Prostacyclin and its stable analogue iloprost*, pp. 243-246, Springer-Verlag, Berlin, 1987.
 267. Kort WJ, de Kam J, Westbroek DL. Per-operative topical administration of ZK 36 374 (Iloprost) acts favorably on patency of small artery anastomoses in rats. *Microsurgery.* 1987;8(1):17-21.
 268. Krause W, Kraus T. Pharmacokinetics and pharmacodynamics of the prostacyclin analogue iloprost in man. *Eur J Clin Pharmacol.* 1986;30(1):61-8.
 269. Hildebrand M, Krause W, Oberender HA, Zurdell-Dillinger S, Junger M, Bodenbunrg H. Pharmacokinetics of iloprost in patients with severe peripheral arterial occlusive disease. *Eicosanoids.* 1990;3(3):145-8.
 270. Hildebrand M, Krause W, Angeli P, Koziol T, Gatta A, Merkel C, Bolognesi M. Pharmacokinetics of iloprost in patients with hepatic dysfunction. *Int J Clin Pharmacol Ther Toxicol.* 1990Oct;28(10):430-4.
 271. Hildebrand M, Krause W, Fabian H, Koziol T, Neumayer HH. Pharmacokinetics of iloprost in patients with chronic renal failure and on maintenance haemodialysis. *Int J Clin Pharmacol Res.* 1990;10(5):285-92.
 272. Duthois S et al. Tolerance of Iloprost and results of treatment of chronic severe lower limb ischaemia in diabetic patients. A retrospective study of 64 consecutive cases. *Diabetes Metab.* 2003 Feb;29(1):36-43

273. Staben P, Albring M. Treatment of patients with peripheral arterial occlusive disease Fontaine stage III and IV with intravenous iloprost: an open study in 900 patients. *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids*. 1996 May;54(5):327-33.
274. Altstaedt HO, Berzewski B, Breddin HK, Brockhaus W, Bruhn HD, Cachovan M, Diehm C, Dorrlor J, Franke CS, Gruss JD, et al. Treatment of patients with peripheral arterial occlusive disease Fontaine stage IV with intravenous iloprost and PGE1: a randomized open controlled study. *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids*. 1993 Aug;49(2):573-8. Erratum in: *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids* 1993 Dec;49(6):973.
275. TASC, Supplement to *J of Vasc Surgery* 2000; 31(1) part 2.
276. Bozkurt AK, Koksall C, Demirbas MY, Erdogan A, Rahman A, Demirkilic U, Ustunsoy H, Metin G, Yillik L, Onol H, Cinar B, Karacelik M, Erdinc I, Bolcal C, Sayin AG; Turkish Buerger's Disease Research Group. A randomized trial of intravenous iloprost (a stable prostacyclin analogue) versus lumbar sympathectomy in the management of Buerger's disease. *Int Angiol*. 2006 Jun;25(2):162-8.
277. Zulian F, Corona F, Gerloni V, Falcini F, Buoncompagni A, Scarazatti M, Martini G, Zaccchello F. Safety and efficacy of iloprost for the treatment of ischaemic digits in paediatric connective tissue diseases. *Rheumatology (Oxford)*. 2004 Feb;43(2):229-33. Epub 2003 Aug 15.
278. Scorza R, Caronni M, Mascagni B, Berruti V, Bazzi S, Micallef E, Arpaia G, Sardina M, Origgi L, Vanoli M. Effects of long-term cyclic iloprost therapy in systemic sclerosis with Raynaud's phenomenon. A randomized, controlled study. *Clin Exp Rheumatol*. 2001 Sep Oct;19(5):503-8.
279. Wigley FM, Wise RA, Seibold JR, McCloskey DA, Kujala G, Medsger TA Jr, Steen VD, Varga J, Jimenez S, Mayes M, Clements PJ, Weiner SR, Porter J, Ellman M, Wise C, Kaufman LD, Williams J, Dole W. Intravenous iloprost infusion in patients with Raynaud phenomenon secondary to systemic sclerosis. A multicenter, placebo-controlled, double-blind study. *Ann Intern Med*. 1994 Feb 1;120(3):199-206.
280. de Donato, et al. The ILAILL study: iloprost as adjuvant to surgery for acute ischemia of lower limbs: a randomized, placebo-controlled, double-blind study by the Italian society for vascular and endovascular surgery. *Ann Surg*. 2006 Aug; 244(2):185-93.
281. The Iloprost Bypass International Study Group. Effects of perioperative iloprost on patency of femorodistal bypass grafts. *Eur J Vasc Endovasc Surg*. 1996 Oct;12(3):363-71.
282. Hickey NC, Shearman CP, Crowson MC, Simms MH, Watson HR. Iloprost improves femoro-distal graft flow after a single bolus injection. *Eur J Vasc Surg*. 1991 Feb;5(1):19-22.
283. Heise M, Schmidmaier G, Husmann I et al. PEG-hirudin/iloprost Coating of Small Diameter ePTFE Grafts Effectively Prevents Pseudointima and Intimal Hyperplasia Development. *Eur J Vasc Endovasc Surg*. 2006 Oct;32(4):418-24.
284. Boga M, Discigil B, Ozkisacik EA et al. The combined effect of iloprost and N-acetylcysteine in preventing spinal cord ischemia in rabbits. *Eur J Vasc Endovasc Surg*. 2006 Apr;31(4):366-72.
285. Silistreli E, Kabakci B, Yilmaz E et al. Early protective effects of iloprost, a stable prostacyclin analog, during spinal cord ischemia in a rabbit model. *Heart Vessels*. 2005 Mar;20(2):66-71.
286. Katircioglu SF, Ulus AT, Gokce P et al. Iloprost protects the spinal cord during aortic cross-clamping in a canine model. *J Cardiovasc Surg (Torino)*. 2000 Feb;41(1):89-93.
287. Ustundag N, Bozkurt AK, Demirkaya A, Koksall C, Mayda AS. Histopathological and immunohistochemical detection of protective effects of University of Wisconsin solution supplemented with iloprost on donor lung damage. *Transplant Proc*. 2004 Jun;36(5):1271-4.
288. Zardi EM, Picardi A, Ambrosino G, Fazio VM, Dobrina A, Frego M, Afeltra A, Lumachi F. Iloprost enhances portal flow velocity and volume in patients with systemic sclerosis. *In Vivo*. 2006 May-Jun;20(3):377-80.
289. Meyrier A. Cholesterol crystal embolism: diagnosis and treatment. *Kidney Int*. 2006 Apr;69(8):1308-12.
290. Boulon C, Diard A, Naibo D, Constans J, Conri C. Hypothenar hammer syndrome: a case. *J Mal Vasc*. 2006 Jul;31(3):159-60.
291. Gouny P, Gaitz JP, Vayssairat M. Acute hand ischemia secondary to intraarterial buprenorphine injection: treatment with iloprost and dextran-40, a case report. *Angiology*. 1999 Jul;50(7):605-6.
292. Kalgaard OM, Mork C, Kvernebo K. Prostacyclin reduces symptoms and sympathetic dysfunction in erythromelalgia in a double-blind randomized pilot study. *Acta Derm Venereol*. 2003;83(6):442-4.
293. Balbir-Gurman A, Braun-Moscovici Y, Nahir AM. Cocaine-Induced Raynaud's phenomenon and ischaemic finger necrosis. *Clin Rheumatol*. 2001;20(5):376-8.
294. Piquemal R, Emmerich J, Guilmet JL, Fiessinger JN. Successful treatment of ergotism with Iloprost, a case report. *Angiology*. 1998 Jun;49(6):493-7.
295. Hodl S. Treatment of freezing injury. *Wien Med Wochenschr*. 2005 Apr;155(7-8):199-203.

296. Emreçan B, Tulukoglu E, Bozok S, Kestelli M, Onem G, Kupelioglu A, Yagdi S, Gurbuz A. Effects of Iloprost and pentoxifylline on renal ischemia-reperfusion in rabbit model. *Eur J Med Res.* 2006 Jul 31;11(7):295-9.
297. Kawashima M, Nakamura T, Schneider S, Vollmar B, Lausberg HF, Bauer M, Menger MD, Schafers HJ. Iloprost ameliorates post-ischemic lung reperfusion injury and maintains an appropriate pulmonary ET-1 balance. *J Heart Lung Transplant.* 2003 Jul;22(7):794-801.
298. Saeed SA, Waqar MA, Zubairi AJ, Bhurgri H, Khan A, Gowani SA, Waqar SN, Choudhary MI, Jalil S, Zaidi AH, Ara I. Myocardial ischaemia and reperfusion injury: reactive oxygen species and the role of neutrophil. *J Coll Physicians Surg Pak.* 2005 Aug;15(8):507-14. Review.
299. Yegen C, Aktan AO, Buyukgebiz O, Haklar G, Yalcin AS, Yalin R, Ercan S. Effect of verapamil and iloprost (ZK 36374) on endothelin release after mesenteric ischemia reperfusion injury. *Eur Surg Res.* 1994;26(2):69-75.
300. Okboy N, Yegen C, Aktan AO, Dosluoglu HH, Sav A, Yalin R, Ercan S. The effect of iloprost and NDGA in ischemia reperfusion injury in rat liver. *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids.* 1992 Dec;47(4):291-5.
301. Aytacoglu BN, Sucu N, Tamer L, Polat A, Gul A, Degirmenci U, Mavioglu I, Dikmengil M. Iloprost for the attenuation of ischaemia/reperfusion injury in a distant organ. *Cell Biochem Funct.* 2006 Jul-Aug;24(4):341-6.
302. Baltalarli A, Ozcan V, Bir F, Aybek H, Sacar M, Onem G, Goksin I, Demir S, Teke Z. Ascorbic acid (vitamin C) and iloprost attenuate the lung injury caused by ischemia/reperfusion of the lower extremities of rats. *Ann Vasc Surg.* 2006 Jan;20(1):49-55.
303. Product Information: Ventavis iloprost inhalation solution. CoTherix, Inc, South San Francisco, CA (original 12/2004) reviewed 12/2004.
304. Beischer W, Dembski JC, Gruss JD et al: Low-dose iloprost infusions compared to the standard dose in patients with peripheral arterial occlusive disease Fontaine stage IV. 1998; *VASA* 27:15-19.
305. Andrej Khandoga, Georg Enders, Peter Biberthaler and Fritz Krombach. Poly(ADP-ribose) polymerase triggers the microvascular mechanisms of hepatic ischemia-reperfusion injury. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 2002;283:553-560.
306. Katircioğlu SF, Saritas Z, Ulus AT, Yamak B, Yücel D, Ayaz S. Iloprost added to the cardioplegic solutions improves myocardial performance. *Prostaglandins & other Lipid Mediators.* 1998;55:51-65.
307. Koksel O, Ozdulger A, Aytacoglu B, Tamer L, Polat A, Sucu N, Yildirim C, Degirmenci U, Kanik A. The influence of iloprost on acute lung injury induced by hind limb ischemia-reperfusion in rats. *Pulm Pharmacol Ther.* 2005;18(4):235-41.
308. Murray R.K, Granger D.K, Mayes P.A, Rodwel V.W. Harper'ın Biyokimyası, 24.Baskı, Barış Kitabevi, pp. 24-68 İstanbul, (1998).
309. Bhargava AS, Preus M, Khater AR, Gunzel P. Effect of iloprost on serum creatine kinase and lactate dehydrogenase isoenzymes after isoprenaline-induced cardiac damage in rats. *Arzneimittelforschung.* 1990 Mar;40(3):248-52.
310. Kayikcioglu M, Can L, Mete-Erdem N, Kultursay H, Payzin S, Kokuludag A, Turkoglu C. Soluble P-selectin and the success of thrombolysis in acute myocardial infarction. *Int J Cardiol.* 2001 Jul;79(2-3):223-9
311. Schaefer U, Kurz T, Bonnemeier H, Dendorfer A, Hartmann F, Schunkert H, Richardt G. Intracoronary enalaprilat during angioplasty for acute myocardial infarction: alleviation of postischaemic neurohumoral and inflammatory stress? *J Intern Med.* 2007 Feb;261(2):188-200.
312. Wei M, Kuukasjarvi P, Laurikka J, Kaukinen S, Iisalo P, Laine S, Tarkka M. Soluble adhesion molecules and myocardial injury during coronary artery bypass grafting. *World J Surg.* 2003 Feb;27(2):140-4.
313. Mathru M, Huda R, Solanki DR, Hays S, Lang JD. Inhaled nitric oxide attenuates reperfusion inflammatory responses in humans. *Anesthesiology.* 2007 Feb;106(2):275-82.
314. Cuzzocrea S, Mazzon E, Costantino G, Serraino I, De Sarro A, Caputi AP. Effects of n acetylcysteine in a rat model of ischemia and reperfusion injury. *Cardiovasc Res.* 2000 Aug 18;47(3):537-48.
315. Wei W, Wei FC, Hung LM. Diazoxide ameliorates microcirculatory disturbances through PKC-dependent pathway in I/R-injured rat cremaster muscles. *J Biomed Sci.* 2005;12(3):521-9.
316. Hafez T, Moussa M, Nesim I, Baligh N, Davidson B, Abdul-Hadi A. The effect of intraportal prostaglandin e1 on adhesion molecule expression, inflammatory modulator function, and histology in canine hepatic ischemia / reperfusion injury. *J Surg Res.* 2007 Mar;138(1):88-99.
317. Darius H, Veit K, Binz C, Fisch A, Meyer J Diminished inhibition of adhesion molecule expression in prostacyclin receptor desensitized human platelets. *Agents Actions Suppl.* 1995;45:77-83.

318. Chung A, Wildhirt SM, Wang S, Koshal A, Radomski MW Combined administration of nitric oxide gas and iloprost during cardiopulmonary bypass reduces platelet dysfunction: a pilot clinical study. *J Thorac Cardiovasc Surg*. 2005 Apr;129(4):782-90.
319. Yoshimoto T. The expression of ICAM-1 and cytokines in the reperfusional state] *Hokkaido Igaku Zasshi*. 1997 Jan;72(1):97-112.
320. Kaikita K, Ogawa H, Yasue H, Sakamoto T, Miyao Y, Suefuji H, Soejima H, Tayama S, Hayasaki K, Honda T, Kamijikkoku S. Increased plasma soluble intercellular adhesion molecule-1 levels in patients with acute myocardial infarction. *Jpn Circ J*. 1997 Sep;61(9):741-8.
321. Vejchapipat P, Leawhiran N, Poomsawat S, Theamboonlers A, Chittmittrapap S, Poovorawan Y. Amelioration of intestinal reperfusion injury by moderate hypothermia is associated with serum sICAM-1 levels. *J Surg Res*. 2006 Jan;130(1):152-7. Epub 2005 Sep 8.
322. Kalawski R, Majewski M, Kaszkowiak E, Wysocki H, Siminiak T. Transcardiac release of soluble adhesion molecules during coronary artery bypass grafting: effects of crystalloid and blood cardioplegia. *Chest*. 2003 May;123(5):1355-60.
323. Mickley V, Gallmeier U, Galster A, Scharrer-Pamler R, Bruckner UB, Sunder-Plassmann L. Monitoring ischemia-/reperfusion syndrome in abdominal aortic aneurysm--conventional operation versus stent implantation] *Langenbecks Arch Chir Suppl Kongressbd*. 1998;115(Suppl I):7-11.
324. Huda R, Solanki DR, Mathru M. Inflammatory and redox responses to ischaemia/reperfusion in human skeletal muscle. *Clin Sci (Lond)*. 2004 Nov;107(5):497-503.
325. Beauchamp P, Richard V, Tamion F, Lallemand F, Lebreton JP, Vaudry H, Daveau M, Thuillez C. Protective effects of preconditioning in cultured rat endothelial cells: effects on neutrophil adhesion and expression of ICAM-1 after anoxia and reoxygenation. *Circulation*. 1999 Aug 3;100(5):541-6.
326. Hattori R, Otani H, Moriguchi Y, Matsubara H, Yamamura T, Nakao Y, Omiya H, Osako M, Imamura H. NHE and ICAM-1 expression in hypoxic/reoxygenated coronary microvascular endothelial cells. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 2001 Jun;280(6):H2796-803.
327. Zhou JL, Wang QY, Du XR, Zhu XG, Ling YL, Liu QH. [Effect of exogenous carbon monoxide on sequestration of polymorphonuclear neutrophils in the lung following limb ischemia-reperfusion: an experimental study] *Zhonghua Yi Xue Za Zhi*. 2005 Jul 27;85(28):1987-90.
328. Lu S, Wang X, Wen L, Han Z, Tao T, Guan D. [Effect of superoxide dismutase on adhesion molecules expression in skeletal muscle ischemia/reperfusion injury in rats] *Zhonghua Yi Xue Za Zhi*. 2002 Jun 25;82(12):840-3.
329. Lozano FS, Lopez-Novoa JM, Rodriguez JM, Barros MB, Garcia-Criado FJ, Nicolas JL, Parreno A, Revilla J, Gomez-Alonso A. Exogenous nitric oxide modulates the systemic inflammatory response and improves kidney function after risk-situation abdominal aortic surgery. *J Vasc Surg*. 2005 Jul;42(1):129-39.
330. Cheng Y, Zhang HT, Sun L, Guo S, Ouyang S, Zhang Y, Xu J. Involvement of cell adhesion molecules in polydatin protection of brain tissues from ischemia-reperfusion injury. *Brain Res*. 2006 Sep 19;1110(1):193-200. Epub 2006 Jul 25.
331. Drinda S, Neumann T, Pohlmann G, Vogelsang H, Stein G, Wolf G, Hein G. The response of skin perfusion and of rheological and immunological variables to intravenous prostanoid administration in Raynaud's phenomenon secondary to collagenosis. *Vasa*. 2005 Nov;34(4):243-9.
332. Harkin DW, Romaschin A, Taylor SM, Rubin BB, Lindsay TF. Complement C5a receptor antagonist attenuates multiple organ injury in a model of ruptured abdominal aortic aneurysm. *J Vasc Surg*. 2004 Jan;39(1):196-206.
333. Altavilla D, Squadrito F, Ammendolia L, Squadrito G, Campo GM, Canale P, Ioculano M, Musolino C, Alonci A, Sardella A, Urna G, Saitta A, Caputi AP. Monocytes and lymphocytes as active participants in the pathogenesis of experimental shock. *Inflamm Res*. 1996 Aug;45(8): 398-404.
334. Mizusawa I, Abe S, Kanno K, Yabashi A, Honda T, Suto M, Hiraiwa K. Expression of cytokines, neurotrophins, neurotrophin receptors and NOS mRNA in dorsal root ganglion of a rat tourniquet model. *Leg Med (Tokyo)*. 2003 Mar;5 Suppl 1:S271-4.
335. Norwood MG, Horsburgh T, Bown MJ, Sayers RD. Neutrophil activation occurs in the lower-limbs of patients undergoing elective repair of abdominal aortic aneurysm. *Eur J Vasc Endovasc Surg*. 2005 Apr;29(4):390-4.
336. Willy C, Kaffenberger W, Gerngross H. [Systemic effect of extremity-ischemia reperfusion surgical trauma. Assessment of tourniquet ischemia induced activation of polymorphonuclear neutrophilic granulocytes] *Langenbecks Arch Chir Suppl Kongressbd*. 1998;115(Suppl I):347-51.
337. McAdam BF, Catella-Lawson F, Mardini IA, et al. Systemic biosynthesis of prostacyclin by COX-2: the human pharmacology of a selective inhibitor of COX-2. *Proc Natl Acad Sci USA* 1999;96:272-77.

338. Seibert K, Zhang Y, Leahy K, et al. Pharmacological and biochemical demonstration of the role of cyclooxygenase-2 in inflammation and pain. *Proc Natl Acad Sci USA* 1999;91:12013-17.
339. Dupouy VM, Ferre PJ, Uro-Coste E, Lefebvre HP. Time course of COX-1 and COX-2 expression during ischemia-reperfusion in rat skeletal muscle. *J Appl Physiol*. 2006 Jan;100(1):233-9.
340. Hiratsuka T, Futagami S, Tatsuguchi A, Suzuki K, Shinji Y, Kusunoki M, Shinoki K, Nishigaki H, Fujimori S, Wada K, Miyake K, Gudis K, Tsukui T, Sakamoto C. COX-1 and COX-2 conversely promote and suppress ischemia-reperfusion gastric injury in mice. *Scand J Gastroenterol*. 2005 Aug;40(8):903-13.
341. Yamazaki K, Endo T, Kitajima Y, Manase K, Nagasawa K, Honma H, Hayashi T, Kudo R, Saito T. Elevation of both cyclooxygenase-2 and prostaglandin E2 receptor EP3 expressions in rat placenta after uterine artery ischemia-reperfusion. *Placenta*. 2006 Apr-May;27(4-5):395-401.
342. Matsuyama M, Yoshimura R, Hase T, Kawahito Y, Sano H, Nakatani T. Study of cyclooxygenase-2 in renal ischemia-reperfusion injury. *Transplant Proc*. 2005 Jan-Feb;37(1):370-2.
343. Eum HA, Lee SM. Effect of Trolox on altered vasoregulatory gene expression in hepatic ischemia/reperfusion. *Arch Pharm Res*. 2004 Feb;27(2):225-31.
344. Domoki F, Veltkamp R, Thrikawala N, Robins G, Bari F, Louis TM, Busija DW. Ischemia-reperfusion rapidly increases COX-2 expression in piglet cerebral arteries. *Am J Physiol*. 1999 Sep;277:H1207-14.
345. Cai F, Li CR, Wu JL, Chen JG, Liu C, Min Q, Yu W, Ouyang CH, Chen JH. Theaflavin Ameliorates Cerebral Ischemia-Reperfusion Injury in Rats Through Its Anti-Inflammatory Effect and Modulation of STAT-1. *Mediators Inflamm*. 2006; 2006(5): 30490.