

**T.C.
TRAKYA ÜNİVERSİTESİ
TIP FAKÜLTESİ
KALP VE DAMAR
CERRAHİSİ
ANABİLİM DALI**

Tez Yöneticisi
Prof. Dr. Suat CANBAZ

**DENEYSEL AORTİK İSKEMİ-REPERFÜZYON
MODELİNDE SİLDENAFİL VE N-ASETİLSİSTEİNİN
FEMORAL ARTER ENDOTELİ VE
GASTROKNEMİUS KASI HASARI ÜZERİNE ETKİSİ**

(Uzmanlık Tezi)

Dr. Volkan AKSU

EDİRNE – 2013

TEŞEKKÜR

Uzmanlık eğitimim süresince mesleki bilgi ve deneyimimi arttırmamda büyük destek ve yardımlarını gördüğüm, bana cerrahi sanatını öğreten değerli hocam Trakya Üniversitesi eski Rektörü sayın Prof. Dr. Enver DURAN'a, Kalp Damar Cerrahisi Anabilim Dalı Başkanı ve tez danışmanım sayın Prof. Dr. Suat CANBAZ'a, öğretim üyelerim sayın Prof. Dr. Turan EGE, Prof. Dr. Mutasım SÜNGÜN, Prof. Dr. Murat DİKMENGİL, Yrd. Doç. Dr. Serhat HÜSEYİN, Yrd. Doç. Dr. Volkan YÜKSEL ve Yrd. Doç. Dr. Ahmet Coşkun ÖZDEMİR'e, Patoloji Anabilim Dalı öğretim üyesi sayın Yrd. Doç. Dr. Ebru TAŐDEMİR'e, Biyokimya Anabilim Dalı öğretim üyesi sayın Doç. Dr. Sevgi ESKİOCAK, Dr. Gülben Sayılan ÖZGÜN'e, değerli asistan arkadaşlarım, tüm sağlık personeline ve sevgili eşim Sevde AKSU'ya teşekkür ederim.

İÇİNDEKİLER

GİRİŞ VE AMAÇ	1
GENEL BİLGİLER.....	3
İSKEMİ REPERFÜZYON HASARI	3
İSKEMİ REPERFÜZYON HASARI MEKANİZMASI	8
DAMAR CERRAHİSİNDE İSKEMİ REPERFÜZYON	18
RADİKALLERE KARŞI SAVUNMA SİSTEMLERİ	19
SİLDENAFİL.....	20
N-ASETİLSİSTEİN	22
GEREÇ VE YÖNTEM	24
BULGULAR.....	29
TARTIŞMA	41
SONUÇLAR	51
ÖZET	52
SUMMARY.....	54
KAYNAKLAR.....	56
EKLER	

SİMGE VE KISALTMALAR

ATP	: Adenosine triphosphate (adenozin trifosfat)
C4	: Complement factor 4 (kompleman faktör 4)
C5a	: Complement factor 5a (kompleman faktör 5a)
DNA	: Deoxyribonucleic acid (deoksiribonükleik asit)
EKG	: Elektrokardiyografi
ELAM-1	: Endotel lökosit adezyon molekülü 1
eNOS	: Endotelial nitrik oksit sentaz
Fe⁺²	: Ferröz demir
Fe⁺³	: Ferrik demir
GPIIb-IIIa	: Glycoprotein IIb-IIIa
GSH	: Glutatyon (indirgenmiş)
GSSG	: Glutatyon (oksitlenmiş)
GSH-Px	: Glutatyon peroksidaz
HE	: Hematoksilin Eozin
HIF-1	: Hypoxia inducible factor-1 (hipoksi ile indüklenen faktör-1)
HO₂[•]	: Hidroperoksil
H₂O₂	: Hidrojen peroksit
ICAM-1	: Intercellular adhesion molecule 1 (intersellüler adezyon molekülü 1)
IHK	: İmmünohistokimyasal
IL	: İnterlökin
iNOS	: İndüklenebilir nitrik oksit sentaz

İ/R	: İskemi/reperfüzyon
JAM 3	: Junctional adhesion molecule 3 (Bileşke adezyon molekülü 3)
LT	: Lökotrien
MDA	: Malondialdehid
MCP 1	: Monocyte chemoattractant protein 1 (monosit kemoatraktan protein 1)
MI	: Miyokard İnfarktüsü
MIP 2,1a,1b	: Makrofaj inflamatuvar protein 2,1a,1b
MODS	: Multiple organ dysfunction syndrome (Çoklu organ yetmezliği sendromu)
MPO	: Myeloperoksidaz
mRNA	: Messenger ribonucleic acid (Mesajcı ribonükleik asit)
NADP	: Nicotinamide adenine dinucleotide phosphate (nikotinamid adenin dinükleotid fosfat)
NADPH	: Nikotinamid adenin dinükleotid fosfat hidrojen
NAS	: N-asetilsistein
NO[•]	: Nitrik oksit
NO₂[•]	: Azot dioksit
NO₃⁻	: Nitrat
NOS	: Nitrik oksit sentaz
O₂	: Oksijen
O₂⁻	: Süperoksit radikali
•OH	: Hidroksil radikali
PAF	: Platelet activating factor (trombosit aktive edici faktör)
PAS	: Per- ARNT-sim
PDE-5	: Fosfodiesteraz-5
PECAM-1	: Platelet endothelial cell adhesion molecule (Platelet endotelial hücre adezyon molekülü)
PgE1	: Prostaglandin E1
PgI2	: Prostaglandin I2, Prostasiklin
PKG	: Protein kinaz G
PMNL	: Polimorfonükleer lökosit
PSGL-1	: P-selectin glycoprotein ligand-1
ROT	: Reaktif oksijen türevleri
S	: Sildenafil
sGMP	: Siklik guanozin-3',5'-monofosfat

SIRS	: Systemic inflamatuvar response syndrome (sistemik inflamatuvar yanıt sendromu)
SOD	: Süperoksit dismutaz
SOR	: Serbest oksijen radikalleri
TBA	:Tiyobarbitürik asid
TNFα	: Tümör nekrozis faktör alfa
TXA₂	: Tromboxane A2 (tromboksan A2)
VCAM₁	: Vascular cell adhesion molecule 1 (vasküler hücre adezyon molekülü 1)
VEGF	: Vascular endothelial growth factor (vasküler endotelial büyüme faktörü)
vWF	: von Willebrand faktör
XD	: Ksantin dehidrogenaz
XO	: Ksantin oksido-redüktaz

GİRİŞ VE AMAÇ

İskemi, bir dokuya ya da organa gelen kan akımının azalması veya durması ile dokunun oksijen ve diğer metabolitlere olan gereksiniminin dolaşım tarafından sağlanamaması ve bu süreçte oluşan atık ürünlerin yine dolaşım tarafından uzaklaştırılamaması olarak tanımlanır. Reperfüzyon ise, enerji ihtiyacının karşılanması ve toksik metabolitlerin uzaklaştırılması amacıyla iskemi sonrası dokuya ya da organa tekrar kan akımının sağlanması olayıdır. İskemiye uğrayan hücre ve dokularda aerobik metabolizma devre dışı kalır ve gerekli enerji anaerobik metabolizma yoluyla sağlanmaya çalışılır. Anaerobik metabolizma sonucu oluşan toksik metabolitler doku perfüzyonu olmadığı için dokuda birikir. Reperfüzyon ile buradaki metabolitlerin oksidasyonu sonucu oluşan maddeler dolaşıma karışır ve kan ile tüm vücuda yayılırlar (1-4).

İskemiye bağlı hasarın şiddeti, hipoperfüzyonun süresi ve miktarı ile orantılı olup, hücrenin tipi, travmaya karşı hassasiyeti, differansiyasyonu, kan ihtiyacı ve metabolizmasına göre farklılık gösterir. İskemiye kemik ve deri dirençliyken, iskelet kası ve barsak mukozası gibi dokular ise hassastır. Ancak uzun süreli iskemi hücrelerde şişme, asidoz, iyon dağılım değişiklikleri (hücre içi Ca^{+2} , Na^{+} oranları), artmış hipoksantin seviyesi, adenozin trifosfat (ATP) / fosfokreatin ve glutatyon düzeylerinde azalma, artmış adenozin sinyal aktivitesi, membran potansiyel değişiklikleri, iskelet bütünlüğü kaybı, nükleotid fosfohidrolizi ve hipoksi ile indüklenen faktör-1 (HIF-1) çekirdek translokasyonu / stabilizasyonu gibi hücre metabolizması ve iskelet yapısını ilgilendiren birçok değişime, ciddi hücre hasarına ve sonuç olarak hücre ölümüne neden olur (5-9).

İskemi/reperfüzyon (İ/R) hasarı; serebrovasküler olay, miyokard infarktüsü, sepsis, şok, yanık, travma gibi birçok hastalık ve trombolitik tedavi, koroner anjioplasti,

transplantasyon, kardiyopulmoner bypass, anevrizma cerrahisi, periferik arter cerrahisi gibi medikal / cerrahi girişimler için ortak klinik tablodur (7,10). Alt ekstremitelerde iskemi reperfüzyon hasarı, özellikle aort cerrahisi sırasında abdominal aortaya geçici süre klemp konulmasında, akut femoral arter tıkanıklıklarında, travmatik veya iatrojenik arteryal yaralanmalarda ortaya çıkmaktadır (11).

Alt ekstremitte İ/R hasarında lokal etkiler iskelet kası ve damar endotelinde gözlenirken, sistemik etkiler başlıca akciğer, kalp, beyin ve böbrekler olmak üzere tüm organlarda gözlenebilir (12). İskelet kası, iskemik hasara en hassas doku olması nedeniyle alt ekstremitte İ/R hasarında önemli rol oynar. Alt ekstremitte İ/R'unda prognoz kas hasarı miktarına bağlıdır. Reperfüzyonla oluşmuş inflamatuvar yanıt, geri dönüşümlü zedelenme miktarı ile doğru, nekrotik kas miktarı ile ters orantılıdır (1,12). İ/R'a bağlı mikrovasküler disfonksiyonda; endotel hücre değişiklikleri, endotel bariyer disfonksiyonu, vasküler tonusda değişiklik ve artmış sitokin / adezyon molekül cevabı görülür.

Reperfüzyonla birlikte, sistemik dolaşıma çıkan inflamatuvar aracılar, endotel hücre aktivasyonu ve mikrovasküler disfonksiyona yol açar, olası mikroembolilerle diğer organ kapillerlerini tıkayarak uzak organlarda hasara katkıda bulunurlar. Yaygın uzak organ hasarı durumunda yüksek mortalite ile seyreden multiple organ dysfunction syndrome (MODS) veya systemic inflamatuvar response syndrome (SIRS) gelişebilir (7,8).

Sildenafil, vasküler dilatatör etkisi nedeniyle günümüzde erektil disfonksiyon ve pulmoner hipertansiyonun tedavisinde klinik kullanımı gittikçe yaygınlaşan bir fosfodiesteraz-5 (PDE-5) enzimi inhibitörüdür. Vazodilatasyon etkisi dışında sildenafilin trombosit agregasyonunu engellediği, antiinflamatuvar ve antioksidatif etkilerinin de olduğu bilinmektedir. N-asetilsistein ise yaygın mukolitik olarak kullanılan antioksidan etkinliği bir çok klinik ve deneysel çalışmada gösterilmiş bir moleküldür. Sildenafil 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 sildenafil ve n-asetilsistein' in etkilerini araştırmaktır. Bu nedenle, sıçan infrarenal abdominal aortasında oklüzyon-reperfüzyon sonrası, kan örneklerinde malondialdehid (MDA) plazma düzeyleri ölçüldü. Ayrıca ışık mikroskobu ile femoral arter ve gastroknemius kas doku örneklerinin hematoksilin eozin (HE) ve immunohistokimyasal (TNF α , HIF-1 α) histopatolojik değerlendirilmesi yapıldı.

GENEL BİLGİLER

İSKEMİ REPERFÜZYON HASARI

Bir organın damar yatağında bulunan arterlerde kan akımının kısmen veya tamamen kesilmesi sonucu iskemi tablosu oluşmaktadır. Dokuya yetersiz oksijen sunumu ise hipoksi olarak tanımlanmaktadır. Hipoksinin en sık görülen nedeni iskemidir. İskemiye uğrayan hücre ve dokularda aerobik metabolizma devre dışı kalır ve gerekli enerji anaerobik metabolizma yoluyla sağlanmaya çalışılır. Anaerobik metabolizma sonucu oluşan toksik metabolitler doku perfüzyonu olmadığı için dokuda birikir (1,4). Ancak iskemide, hem metabolit yetersizliği hem de atık ürün birikimi nedeniyle, glikoliz metabolizması hipoksiye oranla daha erken sonlanır ve hasar çok daha erken oluşur (6). Sonuç olarak, hücresel enerji depolarındaki azalma ve toksik metabolit birikimi hücre ölümüne yol açar (8).

Hipoksik dokunun çeşitli moleküler mekanizmalarla yetersiz oksijenizasyona fizyolojik reaksiyonlar oluşturabilmesi, vascular endothelial growth factor (VEGF) sentezini kontrol edebilmesiyle oluşur. Vasküler endotelial büyüme faktörü, anjiogenezde 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 (7,13). Vasküler endotelial büyüme faktörü mRNA transkripsiyonu, HIF-1'in insan VEGF geni 5I-transkripsiyonel bölümüyle etkileşime girmesi sonucu aktive olur (7,14). Hipoksi ile indüklenen faktör-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 VEGF transkripsiyonunu aktive eder (7,15).

Sonuç olarak, uzun süreli doku iskemisinde; hücresel şişme, asidoz, iyon dağılım değişiklikleri (hücre içi Ca⁺²,Na⁺ oranları), artmış hipoksantin seviyesi, adenozin trifosfat (ATP) / fosfokreatin ve glutatyon düzeyi azalması, adenozin sinyal aktivitesi artışı, membran potansiyel değişiklikleri, iskelet bütünlüğü kaybı, nükleotid fosfohidrolizi ve HIF-1 çekirdek translokasyonu ile stabilizasyonu gibi hücre metabolizması ve iskelet yapısını ilgilendiren birçok değişim meydana gelir (5,6).

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 hücre 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 (7,16). 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 (17).

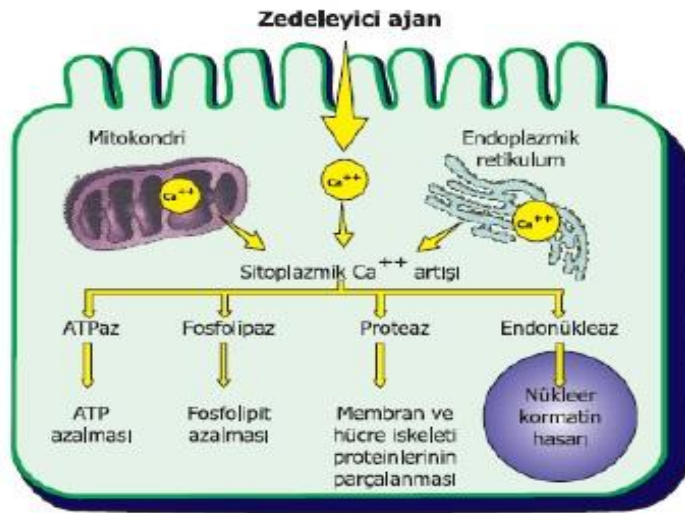
Adenozin trifosfat depolarındaki azalma, ATP bağımlı hücre zarı pompalarında fonksiyon bozukluğuna neden olarak, hücre dışı K⁺ kaybı ve hücre içi ani Na⁺-Ca⁺²-Cl⁻ artışına ikincil hücresel şişmeyle sonuçlanır. Bu hidropik değişiklik, inorganik fosfatlar, laktik asit ve pürin nükleotidleri gibi metabolitlerin birikimi sonucu artan osmotik yükü daha da belirginleştirir. Hücresel şişme, makroskopik olarak organ renginde solma ve ağırlığında artışla, mikroskopik olarak ise sitoplazmada berrak vakuoller oluşumuyla (hidropik değişiklik/vakuoler dejenerasyon) kendini gösterir (6).

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. Eğer doku perfüzyonu düzelirse tüm bu değişimler geri dönüşümlü olup iskeminin devamı durumunda geri dönüşümsüz zedelenme ile sonuçlanır (6).

Geri Dönüşümsüz Zedelenme

Kritik iskemi süresi, doku canlılığının sürdürebildiği maksimum iskemi süresi olarak tanımlanır. 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 (4). Hipoksi sonucunda gelişen mitokondri fonksiyon bozukluğu (oksidatif fosforilasyon yetersizliğine bağlı ATP depolarında azalma) ve hücre zarı hasarının doku oksijenizasyonunun yeniden sağlanmasına rağmen düzeltilememesi geri dönüşümsüz hasarın en büyük göstergesi olup, Şekil 1 ile gösterilmiştir (6,18).



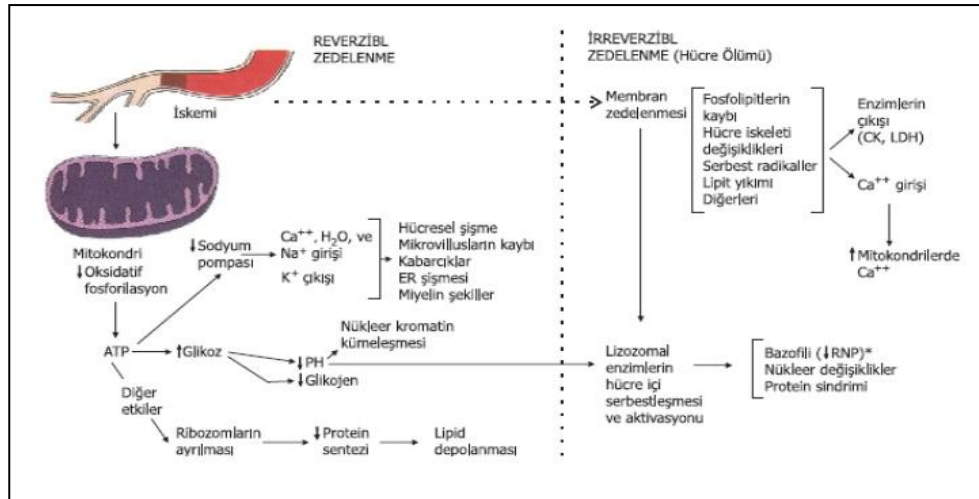
ATP: Adenozin trifosfat, Ca⁺⁺: Kalsiyum

Şekil 1. Hücre zedelenmesinde hücre içi kalsiyum artışı ve sonuçları (6)

Mitokondriyal vakuolizasyon artışı ve matriks içi kalsiyumdan zengin yoğunluk birikimi oluşur. Hücre zarında gelişen 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 sonucu enzimler sitoplazma içine sızar. Asit hidrolazlar, düşük sitoplazmik pH'da, tüm hücrel elemanların enzimatik yıkımına yolaçar. Lizozomol sindirim, hücre ölümü sonrası, interstisyel alanda dahi devam eder. Sonrasında ölü hücreler fosfolipid kitleler şekline

dönerek “myelin şekiller” olarak tanımlanırlar. Bunlar da yağ asitlerine parçalanır veya fagositoza uğrayarak ortamdan uzaklaştırılır. Oluşmuş yağ asitlerinin kalsifikasyonu ise kalsiyum sabunlarının oluşumuyla sonuçlanır (6).

Fosfolipid yıkım ürünleri membran üzerinde deterjan etkisi yapar. Bozulmuş oksidatif fosforilasyon ve azalmış hücre içi ATP depolarına bağlı gelişen membran iyon pompa disfonksiyonu hücre içi Ca^{+2} miktarında ani artışa neden olur. Bu artışa organellerden salınan Ca^{+2} da katkıda bulunur. Artmış hücre içi Ca^{+2} birçok enzimatik sistemde [fosfolipazlar (membran hasarı), proteazlar (membran ve hücre iskeleti hasarı), ATPazlar (ATP yıkımı) ve endonükleazlar (kromatin yıkımı)] aktivasyona neden olur (19) (Şekil 2).



ATP: Adenozin trifosfat; LDH: Laktat dehidrogenaz; CK: Kreatinin kinaz;

Şekil 2. İskemik zedelenmede olaylar dizisi (6)

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 (6).

Reperfüzyon, enerji ihtiyacının karşılanması ve toksik metabolitlerin uzaklaştırılması amacıyla iskemik sonrası dokuya ya da organa tekrar kan akımının sağlanması olayıdır. Reperfüzyon hasarı ilk kez 1975 yılında Cerra ve arkadaşları tarafından tanımlanmıştır (20). Oksijenin dokulara yeniden verilmesiyle miyokard veya diğer hücrelerde iskemik sırasında oluşan toksik hasar daha da şiddetlenmektedir. Bu nedenle dokuya oksijen sunulması sonucu oluşan bu duruma “oksijen paradoksu” adı verilmiştir (1).

Reperfüzyon hasarı iskemi sonrası kanlanmanın tekrar sağlanmasıyla başlamakta iskemi süresine bağlı olarak hedef ve uzak organlarda asemptomatik subklinik hasardan hedef dokuda ödem, çap artışı, nekroz, uzak organlarda fonksiyon bozukluğu, multiorgan yetmezliği ve sonrasında mortaliteye kadar ilerleyen semptomların olduğu geniş bir yelpazede karşımıza çıkmaktadır (1).

İskemiye bağlı hasarın geri döndürülebilmesinde doku reperfüzyonu mutlak gereklidir. Ancak paradoksik olarak, reperfüzyon sonrası oluşan metabolitler doku hasarının artışına neden olur. Hücresel şişme, hücre iskeleti değişiklikleri ve seçici mikrovasküler geçirgenlik kaybı reperfüzyona bağlı hasarın tipik özellikleridir. Bu mekanizmalar, doku ödemi ve kapiller kan akımında azalmaya neden olur (9).

Reperfüzyon sırasında oluşan reaktif oksijen türevlerinin endotel üzerindeki hasarlayıcı etkisi, endotel kaynaklı endotelin sentezinde artış ve nitrik oksit (NO) sentezinde azalma gibi faktörler ciddi endotel disfonksiyonuna yolaçar (21). İskemik dönemde oluşan oksidatif fosforilasyon hasarı, hem ATP depolarında hızlı tükenme ve hipoksantin artışına, hem de azalmış ATP'ye bağlı hücre içi kalsiyumda hızlı yükselişe neden olur. Dolayısıyla, hücre içi kalsiyumun artış hızı ve miktarı, hasarı etkileyen en önemli ve erken mekanizma olup, hücre nekroz ve apoptozuyla direkt ilgilidir (22). 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 kişilerde her iki enzim formu da aktif halde bulunur ancak XD hakimiyeti mevcut olup hipoksantin'i sırasıyla ksantin ve ürik aside çevirir. Ksantin dehidrogenaz 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 (23).

Doku oksijenasyonu yeniden sağlandığında, oksijen, XO ve hipoksantin'in birbirleriyle olan etkileşimi, ürik asit, süperoksit (O_2^-) ve su (H_2O) oluşumuyla sonuçlanır. Oluşan süperoksit, çok zararlı bir molekül olmayıp, hidrojen peroksit (H_2O_2) için kaynak oluşturur. O_2^- , süperoksit dismutaz (SOD) enzimi aracılığıyla hidrojen peroksit'e dönüşür. Katalaz enzimi ise oluşan hidrojen peroksiti, su ve oksijene çevirir. H_2O_2 'in geçiş metalleriyle (en sıklıkla serbest demir) reaksiyona girmesi sonucunda hidroksil (OH^-) radikali oluşur.

Dolayısıyla, O_2^- ve H_2O_2 radikallerine bağlı lipid peroksidasyonu ancak bu moleküllerin serbest demir ile reaksiyona girip hidroksil radikali oluşturmalarıyla belirgin

hale gelir. OH^- 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 şeklinde depolanarak serbest halde bulunmaz. Doku iskemisi sonucu oluşan hücrenel asidoz, artmış redüktan madde seviyesi ve SOD aktivitesi, ferritine bağlı hücrenel demirin serbestlenmesine neden olur. Aynı zamanda artmış hemoliz ve H_2O_2 aktivitesi de hemoglobine bağlı demiri açığa çıkartır (24). O_2^- toksisitesinde bağlı demiri serbestleyebilmesi ve ferrik formu ferröz forma çevirebilmesi önemli rol oynar.

Serbest oksijen radikallerinin diğer kaynakları; aktive olmuş polimorfonükleer lökosit (PMNL), mitokondri Nikotinamidadeninükleotidfosfat (NADP) dehidrogenaz sistemi, katekolaminlerin otooksidasyonu ve araşidonik asit metabolizmasıdır (6). Bu serbest radikaller, özellikle de OH^- 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 (6).

Bu olaylar sonucunda, hücre zarı seçici geçirgenlik kaybı, DNA hasarı, yapısal proteinlerin yıkımı, hücre zarı etkileşimli enzimlerin inaktivasyonu ve sitoliz görülür. OH^- radikali başka bir radikal ile birleşip inaktive oluncaya veya tükeninceye dek bu zincirleme reaksiyon devam eder.

İskemik bir dokuda reperfüzyonun başlamasıyla, polimorfonükleer lökositler endotel lökosit adezyon molekülü (ELAM-1), intersellüler adezyon molekülü (ICAM-1), vasküler hücre adezyon molekülü (VCAM-1), L-selektin gibi adezyon moleküllerine tutunarak iskemik dokuya yerleşirler ve birçok yoldan etki göstererek iskemik dokuyu yok ederler (25).

Sonuçta İ/R zedelenmesinden sorumlu tutulan mekanizmalar olarak serbest oksijen radikalleri, proinflamatuvar mediatörlerin artması, lökosit infiltrasyonu, kalsiyum yüklenmesi, lipid peroksidasyonu ve azalması ileri sürülmektedir (26).

İSKEMİ REPERFÜZYON HASARI MEKANİZMASI

İskemik dokunun infarktüsden kurtulması için reperfüzyon sağlanması şarttır. Kan akışının sağlanması iskeminin dokuda yapmış olduğu hasarı arttırarak infarkt sahasının genişlemesine neden olabilir. Bu olayların tamamına birden “reperfüzyon hasarı” adı verilir. İskemi oluşmuş doku ya da organa reperfüzyon sağlanması, sadece iskemi kaynaklı hasara göre daha çok hasara sebep olur (27).

İskemi reperfüzyon hasarında fizyopatolojik değişikliklere sebep olan faktörler şöyle sıralanmaktadır (28):

- a) Serbest oksijen radikalleri,
- b) Polimorf nükleer lökositler, plateletler
- c) Kompleman sistemi,
- d) Endotel hücreleridir.

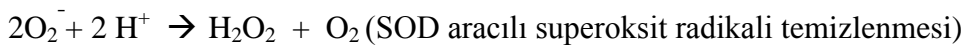
Serbest Oksijen Radikalleri

Serbest radikaller dış yörüngelerinde bir veya daha fazla ortaklanmamış elektron içeren molekül veya atom olarak tanımlanmaktadır. Serbest radikaller sahip oldukları serbest elektron nedeniyle stabil olmadığından kısa ömürlüdürler (1). Radikallerle eşlenmemiş elektron nokta ile gösterilmektedir.

Oksijen molekülü eşlenmemiş iki elektron içeren bir radikaldir. Aerobik canlılar yaşamları için gerekli kimyasal ve ısı enerjisini, gıdaları O₂ ile yakarak elde ederler (1). Organizma sürekli olarak serbest radikal ataklarıyla karşı karşıyadır. Serbest radikaller fizyolojik şartlarda ve dış etkenlere karşı organizmanın savunmasında da belirli oranda oluşur ve içsel mekanizmalarla organizmaya olabilecek zararlı etkileri önlenir. Biyolojik sistemlerde oluşan serbest radikallerin endojen kaynaklı oksijen, NO, uyarılmış nötrofil, mitokondriyal elektron transport sistemi, endoplazmik retikulum, peroksizom ve plazma membranı olarak sayılabilir (28).

Aerobik canlılarda serbest radikaller için en önemli kaynak moleküler oksijendir. Normal metabolizma sırasında O₂'nin %98'i H₂O'ya indirgenmektedir. Geriye kalan yaklaşık %2'lik kısım ise O₂⁻ ve OH⁻ radikaline dönüşür. En önemli serbest oksijen radikalleri O₂⁻ ve OH⁻ anyonlarıdır (1).

Hidrojen peroksid biyolojik sistemlerde süperoksid oluşumu yoluyla sık olarak meydana gelmektedir. Burada iki süperoksid molekülü iki hidrojenle reaksiyona girerek H₂O₂ ve O₂ oluşturur. Eşlenmemiş elektron içermediği için tek başına radikal değildir (1,29).



Hidrojen peroksitin hücre içinde metabolizması birkaç şekilde olabilir.

1. H₂O₂, katalaz veya glutatyon peroksidaz (GSH-Px) tarafından toksik olmayan ürünlere dönüşür:

a. $2\text{H}_2\text{O}_2 \xrightarrow{\text{Katalaz}} 2\text{H}_2\text{O} + \text{O}_2$ (Katalaz aracılı hidrojen peroksit radikali temizlenmesi)

b. $\text{H}_2\text{O}_2 + 2\text{GSH} \xrightarrow{\text{GSH-Px}} \text{GSH}_2 + \text{H}_2\text{O} + \text{GSSG}$ (Glutatyon peroksidaz aracılı hidrojen peroksit radikali temizlenmesi)

c. $\text{H}_2\text{O}_2 + \text{NADPH} + \text{H}^+ \xrightarrow{\text{GSH-redüktaz}} \text{NADP}^+ + 2\text{GSH}$ (Glutatyon redüktaz aracılı hidrojen peroksit radikali temizlenmesi)

2. H_2O_2 geçiş metallerinin varlığında toksik OH radikaline dönüşür: Bu reaksiyona Fenton reaksiyonu (Ferröz demirin oksidasyonu ile hidroksil radikali oluşumu) denilir.



Hidroksil radikali oldukça reaktif ve toksik bir radikaldir. Hidroksil radikali, elektronegativitesi ve büyük molekül yapısı nedeni ile DNA, protein, karbonhidrat ve lipitler gibi makromoleküllerle reaksiyona girerek oksidatif hasara neden olur (1,30). Tablo 1’de radikal olan ve olmayan oksijen bileşikleri görülmektedir.

Tablo 1. Oksijen bileşikleri (1)

Reaktif oksijen bileşikleri	Radikal olmayanlar
O_2^- = Süperoksit	H_2O_2 = Hidrojen peroksit
$\cdot\text{OH}$ = Hidroksil	$^1\text{O}_2$ = Singlet oksijen
$\text{HO}_2\cdot$ = Hidroperoksil	HOCl = Hipokloröz asit
$\text{RO}\cdot$ = Alkoksil	ONOO^- = Peroksinitrit radikali
$\text{ROO}\cdot$ = Peroksil	O_3 = Ozon
$\text{NO}\cdot$ = Nitrik oksit	LOOH = Lipid hidroperoksit
$\text{NO}_2\cdot$ = Azot dioksit	

Süperoksit (O_2^-): Çok toksik olmayan bir serbest radikaldir. Diğer oksijen bileşiklerinin oluşumunda anahtar rol oynar. Zayıf oksidan etkisine karşın düşük pH değerlerinde protonlanarak hidroperoksil oluşur (1).

Hidrojen peroksit (H_2O_2): Metal iyonların yokluğunda stabil, zayıf oksidan, zayıf redüktan, biyolojik membranları kolayca geçebilen ve uzun ömürlü bir reaktif oksijen bileşiğidir (1).

Hidroksil (OH): Aşırı reaktif, kısa ömürlü radikaldir. Hücrede oluştuğu yerden daha uzağa gidemez. Oluştugu yerin hemen çevresinde oldukça büyük hasara yol açabilir (1).

Singlet oksijen (O_2): Radikal değildir. Serbest oksijen radikalleri ile birlikte olan reaktif oksijen türüdür (1).

Hidroperoksil (HO_2^*): Süperoksit radikalının protonlanmasıyla oluşur ve süperoksitten daha reaktiftir. Biyolojik membranları kolay geçebilmesi ve yağ asitleriyle direkt etkileşime girebilmesi yönünden önemlidir (1).

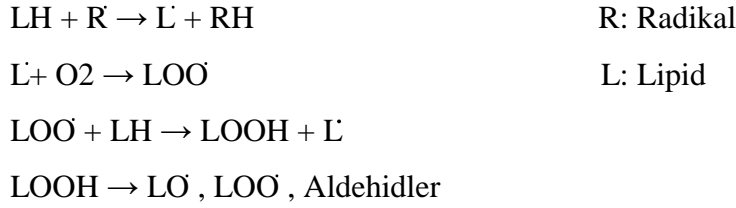
Diğer serbest radikaller: Lipid, nükleik asit, karbonhidrat veya protein gibi biyolojik molekülde (RH), oksidize radikal (OH^* gibi) atağı sonucu oluşan karbon merkezli (R^*) geniş kapsamlı bir grubu oluştururlar. Bunlar oksijen ile hızla reaksiyona girerek uygun peroksil radikalini (ROO^*) oluşturur. Bu peroksil radikaller alkoksil radikali (RO^*) oluşturmak üzere reaksiyona girebilirler. Glutasyonun oksidasyonunda olduğu gibi kükürt atomları serbest radikalın merkezinde (tiyl radikali; RS^*) olabilir (1).

Nitrik oksit (NO^*): L-Arginin'in guanidium grubundan, nitrik oksit sentetaz (NOS) enzimi aracılığı ile endotelde sentezlenen serbest radikaldir. Üç farklı NOS enzimi vardır. Endotelial, nöronal ve normal koşullarda üretilmeyen ancak enflamasyon veya enfeksiyon durumlarında sitokinler veya endotoksinler tarafından indüklenebilen NOS (iNOS)'dur. NO, süperoksit anyon radikali ile hızla reaksiyona girdiğinden hücre koruyucusu olarak düşünülebilir (1,31).

Nitrik oksit vasküler tonusun fizyolojik regülasyonu ve normal vasküler geçirgenliğin idamesi, endotele lökosit adezyonunun engellenmesi, trombosit agregasyonunun inhibisyonu, oksijen derive serbest radikallerin temizlenmesi, düz kas hücre proliferasyonunun engellenmesi, immun defansın güçlendirilmesi, endotel hücrelerinin rejenerasyonunun uyarılması gibi birçok doku koruyucu olayda etken bir maddedir (32). Ayrıca iskemik dokularda süperoksit dismutaz aktivitesini etkileyerek hidrojen peroksit birikimini azaltır (33).

Reperfüzyonla; SOR oluşumunda artış, NO seviyesinde azalma ve SOD / katalaz enzim aktivitelerinde düşme gerçekleşir. 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 meydana getirir. Bununla birlikte, NO yokluğunda süperoksit-hidrojen peroksit dönüşümü kolaylaşarak inflamatuvar araçların (PAF ve LTB4) sentezinde artış oluşur (31).

Fizyolojik derişimde üretilen NO, oksihemoglobin tarafından nitrata (NO_3^-) oksitlenerek aktivitesi sonlandırılır. Oksijen radikallerindeki durumun aksine, nitrik oksidi ortamdaki temizleyen herhangi bir özel enzim yoktur (34). Sonuç olarak NO azalması endotel disfonksiyonu ve nötrofil aracılı doku hasarıyla birliktelik gösterir (31).

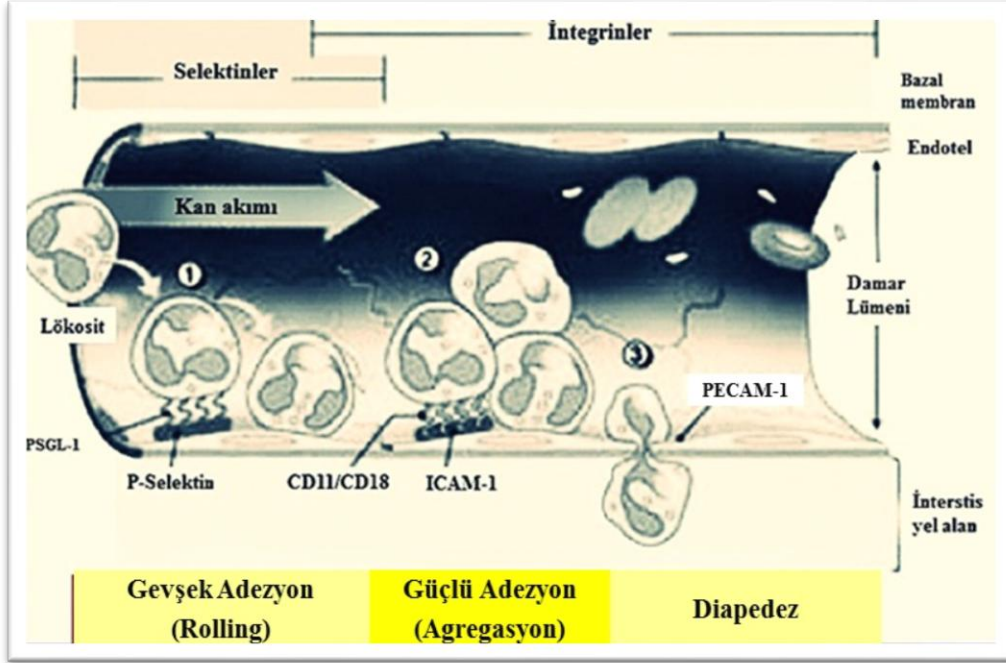


Lipid peroksidasyonu sonucu oluşan malondialdehid (MDA) gibi stabil ürünlerin ölçümü, serbest oksijen radikali öncülerinin aktiviteleri konusunda fikir verir. Lipid peroksidasyonu, İ/R hasarının hem tanısında hemde patofizyolojisinde önemli rol oynar (35).

İskemi Reperfüzyon Hasarında Lökositler, Trombositler ve Endotelin Rolü

İskemi reperfüzyon; endotel ve lökosit hücre yüzeyleri adezyon molekül oluşumunu arttırarak, lökosit diapediziyle sonuçlanan kaskadın aktivasyonuna neden olur (36). Bu adezyon moleküllerinin hücre yüzeylerindeki oluşumu kimyasal aracı maddelerce sağlanır. İ/R'da aktif hale gelen ilk hücre nötrofildir. Önceden nötrofillerin İ/R hasarında tetikleyici oldukları kabul edilmekteyken, artık mikrovasküler ve mukoza hasarının çoğundan sorumlu son mekanizma oldukları düşünülmektedir (4).

Doku iskemisi sonrası 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, trombosit) oluşturulan kimyasal maddeler (ROT, NO, PAF) sonucu oluşur (37). Lökositlerin endotel yüzeyde yuvarlanması ("rolling") selektin ailesi glikoproteinleri (lökosit; L selektin / endotel; E ve P selektin) aracılığıyla oluşur. Bu yuvarlanma etkisi ("rolling effect"); lökositleri, klasik kemoatraktan (LT-B4, C5a, PAF) ve kemokinlerle yakın temas haline sokar (38). Bu moleküller, lökosit hücre yüzey reseptörlerine bağlanarak, G proteinler aracılığıyla, β 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 β 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 (31). Şekil 3 ile endotel-lökosit ilişkisi gösterilmiştir (28).



PSGL-1: P-selectin glycoprotein ligand-1; **ICAM-1:** İntersellüler adezyon molekülü-1
PECAM-1: Platelet endothelial cell adhesion molecule.

Şekil 3. İskemi reperfüzyon hasarında lökosit-endothel etkileşimi (28)

Daha sonra endotel hücreleri arasından geçen lökositler hedef dokuya göç (diapedez) ederler. Lökosit göçü esas olarak venöz kılcallardan olur. Hasarlı dokuya olan lökosit kemotaksisi kompleman sistemi (C5a), araşidonik asit lipooksijenaz yolu ürünleri (LT-B4) ve sitokinler (özellikle kemokinler, IL-8) yoluyla sağlanır (6). İ/R sırasında oluşan $TNF\alpha$, IL 1 β , PAF ve kompleman sistemi gibi inflamatuvar araçların hepsi nötrofil göçüne katkıda bulunur (39).

Tümör nekrozis faktör α ; NADPH oksidaz aktivasyonu ve IL-2 reseptör / ICAM-1 artmış oluşumunu sağlayarak, nötrofil adezyon ve degranülasyonunu uyarır. Endotelde “endotelyal aktivasyon” olarak adlandırılan 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. Ayrıca nötrofillerin agregasyonu ve aktivasyonunu stimüle eder; mezenkimal hücrelerden proteolitik enzimlerin salınımını uyararak doku hasarına neden olur (6). Ksantin oksidaz kaynaklı SOR, hasarlanmış doku nötrofil devamlılığını sağlayarak, doku hasarının genişlemesine neden olur (24)

Hipoksi ile indüklenen faktör-1; transkripsiyon faktörü, hipoksiye adaptasyon cevabının gelişiminde anahtar rol oynayan düzenleyici bir proteindir (40-43). Bu proteinin

etki ettiği mekanizmalar, çok sayıda genin transkripsiyonunun düzenlenmesi, hücrelerin dediferansiyasyonu, vaskülarizasyon, otokrin büyüme faktörü üretimi, proliferasyon, invazyon ve metastaz, metabolik yeniden programlanma, tümör büyümesinin artması olarak sıralanabilir (40,44,45). HIF-1 proteini, hücrede sürekli olarak eksprese edilen HIF-1 β altünitesi ile HIF-1 α altünitesinin bir araya gelmesi ile oluşan bir heterodimerdir. HIF-1 α altünitesi, ortamda oksijen konsantrasyonunun azalmasına bağımlı olarak aktive olmaktadır. HIF-1 transkripsiyon faktörünün işlevinin düzenlenmesinde rol oynayan iki temel unsur, HIF-1 α 'nın hipoksik koşullarda stabilizasyonu ve normoksik koşullarda degradasyonudur (40,46). Hipoksik koşullar altında, HIF-1 α altünitesi sitoplazmadan çekirdeğe yer değiştirerek HIF-1 β ile dimer oluşturur. Çekirdekdeki diğer kofaktörlerin de bağlanması ile aktive olan HIF-1, DNA üzerinde “hipoksi cevap elemanı” olarak tanımlanan özgül diziyeye bağlanır ve hedef genlerin ekspresyonunu tetikler (40).

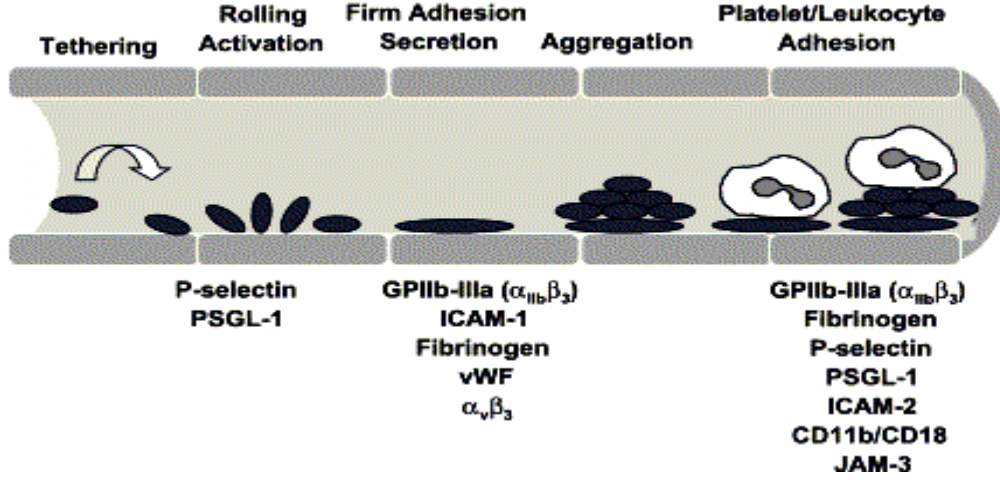
İskemi reperfüzyon hasarı bölgesinde artmış myeloperoksidaz (MPO) aktivitesi ile MDA konsantrasyonunun korelasyon göstermesi ise, lipid peroksidasyonun nötrofil kaynaklı reaktif oksijen türevleri (ROT) ile oluştuğunu gösterir. MPO aktivite artışının, hücre zarı fosfolipidlerinin lipoperoksidasyonu sonucu oluşan fosfolipid kaynaklı araçılara (PAF) bağlı da oluşabileceği gözlenmiştir (47).

Mikrodolaşım, en uç kan dolaşımı sistemidir. Arteriol, venül, arteryel ve venöz kılcalların boyutu 7-100 μ m arasında değişir. İskemi sonrası dokuda reperfüzyon sağlandığında aktive olmuş lökositler mikrodolaşımında birikerek kollaps ve tıkanıklığa neden olurlar. Dolayısıyla lökosit-trombosit ve lökosit-endotel hücre etkileşimleri ana mekanizma olup, interstisyel sıvı birikimi ve azalmış endotel bağımlı vazodilatasyon bu duruma katkıda bulunur (48). Bu durum ilk kez 1967 yılında Majno tarafından “no reflow” fenomeni olarak tanımlanmıştır (49).

Trombositler, trombotik etkileri dışında kemotaktik fonksiyonlarıyla da inflamatuvar cevapta kritik rol oynarlar (50). Adezyon sonrası aktive olmuş trombositler, hem salgıladıkları kemotaktik faktörlerle direkt olarak etki ederler hem de bağlandıkları hücrelerin (endotel / lökosit) kemotaktik özelliklerini değiştirerek etki ederler (51).

Lökosit-endotel adezyonu, endotelde şişme ve daha fazla lökosit adezyonuyla sonuçlanır. Lökosit-trombosit adezyonu ise trombositlerin subendotel alanda birikerek, endotel ayrılmasına neden olur. Bu yapışmış trombositler, selektin ve integrinler yoluyla, daha fazla lökositin trombositlere yapışmasını sağlarlar (52). Sonuç olarak endotel-lökosit-trombosit etkileşimleriyle, fibrin birikimini takiben, trombüs oluşumu gözlenir.

Trombosit-endotel adezyonu; lökositlerde olduğu gibi, zayıf bağlanma, yuvarlanma ve adezyon safhalarından oluşmakta olup Şekil 4 ile gösterilmiştir (53).



PSGL-1: P-selectin glycoprotein ligand-1; **ICAM :** İntersellüler adezyon molekülü

CD: Farklılaşma yığılım molekülü **vWF:** von Willebrand faktör **JAM-3:** Bileşke adezyon molekülü 3

GPIIb-IIIa: Glycoprotein IIb-IIIa

Şekil 4. Trombosit-endotel adezyonu gösterilmektedir (53).

Trombosit-endotel ve trombosit-matriks adezyonu, trombosit aktivasyon ve kemokin salınımına neden olarak lökositlerin trombosit birikim alanlarına göçünü sağlar. Trombosit adezyon bölgelerinde trombosit-lökosit ve lökosit-fibrin etkileşimi ile lökosit infiltrasyonu gerçekleşir (53). Trombosit-lökosit adezyonu da; zayıf bağlanma, yuvarlanma ve adezyon aşamalarını içermekte olup, trombosit P selektin ve ICAM-2 molekülleri ile lökosit PSGL-1 ve CD11b/CD18 molekülleri arasında etkileşimi gerektirir (54).

İskemi Reperfüzyon Hasarında Komplemanın Rolü

Kompleman sistemi bir dizi plazma proteini ve bu proteinlerin hücre zarı reseptörlerinden oluşur. Hepatositler, monositler, makrofajlar, böbreğin tübüler ve glomerüler hücreleri kompleman komponentlerinin sentez yerleridir. Kompleman sisteminin aktivasyonu sonucunda proinflamatuvar komponentler (C3a, C5a, iC3b ve C5b-9) oluşur. C3a ve C5a anaflatoksinlerdir ve lökositleri aktive ederler. C5a ayrıca, makrofaj inflamatuvar protein MIP-2, MIP-1a, MIP-1b, monosit kemoatraktan protein MCP-1, TNF α , IL-1 ve IL-6 üretimini uyararak inflamatuvar yanıtı artırır.

Kompleman tarafından sentezi uyarılan lökosit adezyon molekülleri VCAM-1, ICAM-1, E-selektin ve P-selektinlerdir (28,55). C5b9 endotelde IL-1a, IL-8 ve MCP-1 salgısını

uyararak lökosit aktivasyonu ve kemotaksisi artırır. Aynı zamanda endotel bağımlı vazodilatasyonu inhibe ederek ve endotelde siklik guanozin monofosfatı azaltarak vasküler tonusu bozar (28,56).

İskemi Reperfüzyon Sonrası Oluşan Vasküler Bozulmalar

Endotel hücreleri, hemostazın (akım, damarsal seçici geçirgenlik ve hücre trafiği) sağlanmasında önemli 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 (8).

İskemi reperfüzyon hasarının arteriollerdeki primer göstergesi endotel bağımlı vazodilatasyonda bozulma ve hiperreaktivitedir. Endotel bağımlı vazodilatasyon NO aracılığıyla oluşur. Doku reperfüzyonuyla birlikte; SOR oluşumunda artış, NO seviyesinde azalma meydana gelir. İ/R'a bağlı arteriol disfonksiyonundan tek bir mekanizma sorumlu olmayıp, pH bağımlı denaturasyon ve proteolize ikincil gelişen endotelial NOS inhibisyonu, azalmış yırtıcı kuvvetler, arteriol disfonksiyonundan sorumlu temel mekanizma olarak kabul edilmektedir (57-59).

Reperfüzyon sonrası arteriyel kılcal endotelinde hasardan ve tıkanıklıktan, intraluminal konjesyon ve interstisyel ödeme bağlı vasküler kompresyon sorumludur (60). Lökosit-endotel adezyonunun engellenmesi ve antioksidan tedaviyle mikrovasküler disfonksiyonda azalma sağlanabilir (61). Venöz kılcallar, eklenmiş nötrofil ROT oluşumu nedeniyle, oksidan stresin en yoğun görüldüğü vasküler kompartmandır (9,10) (Tablo 2).

Tablo 2. İskemi/reperfüzyon hasarında damarsal değişiklikler (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

NO: Nitrik oksit **ROT:** Reaktif oksijen türevleri

İskemi Reperfüzyon Sonrası Oluşan İskelet Kası Hasarı

Volkman tarafından 1881 yılında tariflenen ve kemik kırığını takiben oluşmuş iskemik kontraktür, muhtemelen belirlenmiş ilk kas iskemisi/reperfüzyon olayıdır. Yapılan hayvan deneylerinde; 1926'da Jepson, alt ekstremiteye turnike uygulaması sonrası ödem oluştuğunu, 1945'de ise Dennis, oluşan bu ödeme fasyatomi ile müdahalenin klinik düzelme sağladığını göstermişlerdir. Ancak fasyatomi, 1964'de Patven, Pavlos ve Shires tarafından 76 iskemik alt ekstremitte hastasında kas ödemi için kullanıldığında popülerlik kazanmıştır (1,12). İskemik ekstremitte revaskülarizasyonu ile oluşabilecek risk, ilk kez 1960 yılında Haimovici tarafından "myonefropatik-metabolik sendrom" olarak tariflenmiştir (7,62).

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 13. saatte, ciltte 24. saatte ve kemikte yaklaşık 4. günde oluşur (1,12).

Ekstremitte İskemi Reperfüzyonunun Patofizyolojisi

Kas değişiklikleri: İskelet kası, ekstremitteyi oluşturan primer kütle olup iskemik hasara en hassas dokudur. Dolayısıyla iskelet kası hasarı ekstremitte reperfüzyon hasarının en önemli kısmını oluşturur (1,12). İskemiye takiben yaklaşık üçüncü saatte ciddi kas hasarı ve altıncı saatte yaklaşık %97'lik fonksiyonel doku kaybı oluştuğu (yani geri dönüşümsüz zedelenme) spektrofotometrik (triphenyltetrazolium chloride) yöntemlerle gösterilmiştir (63).

Kas lifleri, içerdikleri myoglobinin miktarına göre, kırmızı (tip 1) ve beyaz (tip 2) olarak sınıflandırılır. Çoğu kas her iki türü de içermekteyse de bacağın ön kompartmanında daha çok tip 1 veya yavaş kasılan lifler baskın olup, enerji üretiminde aerobik metabolizmayı kullanmaları bu kas grubunu iskemiyeye daha hassas kılar. Bacağın arka kompartmanında; gastroknemius kasında tip 2 veya hızlı kasılan lifler baskın olup, enerji üretiminde anaerobik metabolizma ön plandadır. İskeminin süresi ve etkilenen kas lifi tipi iskemik hasarda önemli olmakla birlikte dokunun vücuttaki konumu da önemlidir. Örneğin, çabuk soğuma nedeniyle, distal ekstremitte kas dokusu proksimal kas dokusuna göre iskemiyeye daha dirençlidir (1,12).

Mikrosirkülasyon değişiklikleri: İskemi, ilk olarak kapiller endotel hücreleri etkileyerek, hem lümen hem de sitoplazmaya doğru uzanan parmaklı 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 artırır. İskeminin dördüncü saatinden sonra mikrosirkülasyonda hücresel etkileşimler (eritrositik, trombositik ve lökositik) başlar. Venöz ve arteriyel kılcallar,

reperfüzyon öncesinde, sıkışmış eritrositlerle kapanmış görünümde dirler. Rulo halindeki eritrosit kümeleri, erken reperfüzyon döneminde, endotel yüzeyde hasarlanma oluşturlar. Endotel hücre sitoplazmasındaki parçalanma sonucu hücreler arası büyük geçitler oluşur. Reperfüzyonla birlikte, özellikle venöz kılcallarda, lümen içi platelet ve fibrin kümeleri ile karakterize trombotik komplikasyonlar oluşur (12).

DAMAR CERRAHİSİNDE İSKEMİ-REPERFÜZYON

Reperfüzyon sendromunda esas olarak iki önemli komponent vardır. Bunlardan biri iskemik sahada oluşan lokal hasar, diğeri yetmezlikle sonuçlanan uzak organ hasarıdır (1).

İskemik dokuda reperfüzyonla birlikte başlayan inflamatuvar yanıt lokal hasarı arttırmaktadır. İnflamatuvar yanıt oluşumunda ölen hücrelerden salınan asit fosfataz, aminoasitler, aspartat aminotransferaz, laktat dehidrogenaz, kreatin fosfokinaz, histamin benzeri maddeler, inorganik fosfatlar, laktat, lizozimler, miyoglobin, nükleotidler, potasyum, proteolitik enzimler, pürin bazları gibi ürünler önemli rol oynamaktadır (1,12).

Hasarlı dokudan yıkım ürünlerinin salınması sonucu pıhtılaşma mekanizmalarının aktifleşmesi mikrovasküler hasar ve mikrovasküler trombozis oluşturarak kas hasarının daha da yaygınlaşmasına neden olur. Böylece kapiller kaçak ve interstisyel basınçta artma gözlenir. Eğer interstisyel basınçlar mikrosirkülasyon basıncına yaklaşır veya aşarsa kan akımı engellenecektir (1).

Doku hasarının ilerlemesinde önemli noktalardan biri pıhtılaşma sonucu oluşan inflamatuvar mediatörlere bağlıdır. Bu nedenle yapılan bazı çalışmalarda yüksek doz heparin'in permeabilite değişikliklerini azaltabileceği, kollateral akımı düzeltebileceği ve iskemik demarkasyon seviyesini azaltabileceği gösterilmiştir (1).

Prokoagulanlar ve yıkım ürünleri dokunun yıkanması sonucu sistemik dolaşıma geçer ve sistemik koagülasyon oluşturabilir. Faktör XII'nin aktivasyonu, histamin, kompleman, tromboksan ve bradikinin gibi inflamatuvar mediatörler pıhtılaşmayı başlatabilir (1). Ekstremitelerde, iske mi reperfüzyonu izleyen dönemde renal yetmezlik sonucu önemli mortalite artışının olduğu bilinmektedir. Burada iskemik dokudan salınan miyoglobin veya diğ er toksik faktörlerin önemli rol oynadığı kabul edilmektedir (8,12).

Ayrıca akciğ er, karaciğ er, santral sinir sistemi, gastrointestinal sistem ve miyokard disfonksiyonu görülebilir (8). Oluş an komplikasyonların şiddeti tutulan doku kitlesi ve iske mi süresi ile ilişkilidir, morbidite ve mortaliteyi azaltmak amacıyla kas hasarı oluşmadan önceki kritik safhada kan akımının düzeltilmesi gerekmektedir (12).

Bazı deneysel çalışmalarda antioksidanların, antitromboksanların, antilökotrienlerin ve antitrombosit aktive edici faktörlerin reperfüzyonun sistemik etkilerinden korunmak amacıyla kullanılabilceği gösterilmektedir (12).

Lökosit aracılı iskemi reperfüzyon hasarını engellemeyi hedefleyen çalışmalar inflamatuvar mediatör salınımı ve reseptör bağlanması, lökosit adezyon molekülü sentezi ve lökosit endotel adezyonunun inhibisyonu üzerine odaklanmıştır (64).

RADİKALLERE KARŞI SAVUNMA SİSTEMLERİ

Organizmada normal metabolik olaylar sırasında sürekli olarak oluşan serbest radikaller endojen antioksidanlar adı verilen moleküller tarafından etkisizleştirilir (1).

Oksidan maddeler belirli düzeyde kaldıklarında organizmanın yabancı cisimlere, maddelere ve infeksiyon ajanlarına karşı önemli savunma molekülleridir. Belirli düzeyin üstüne çıktığında ve antioksidan savunma sistemleri yetersiz kaldığında serbest radikaller lipid, protein, karbonhidrat ve nükleik asit gibi hücrenin bazal yapı taşlarını hasara uğratarak zararlı olmaktadır (1).

Memeli hücrelerini oksidanlara karşı savunan beş mekanizma önemlidir (1).

- a) Metal iyonlarının bağlanması ile toksik radikal oluşumunun önlenmesi,
- b) Oluşan radikallerin toplanması ve bastırılması,
- c) Radikal zincir reaksiyonlarının kırılması,
- d) Hedef molekülün hasar sonrası tamiri veya tamir edilemeyecek durumdaki moleküllerin uzaklaştırılması,
- e) Antioksidan kapasitenin artırılması.

Antioksidanlar

1. Endojen Antioksidanlar: Enzim ve enzim olmayanlar olarak ikiye ayrılır.

-Enzim olan endojen antioksidanlar: Süperoksit dismutaz, glutatyon peroksidaz, glutatyon S-transferaz, katalaz, mitokondrial sitokrom oksidaz sistemi, hidroperoksidaz (65).

-Enzim olmayan endojen antioksidanlar: Melatonin, seruloplazmin, transferrin, myoglobin, ferritin, bilirubin, glutatyon, sistein, metiyonin, ürat, laktoferrin, albumin (66).

2. Eksojen Antioksidanlar: Vitamin E, karoten, vitamin C, folik asit, allopürinol, oksipürinol, NADPH oksidaz inhibitörleri (adenozin, kalsiyum kanal blokörleri), rekombinant süperoksit dismutaz, endojen antioksidan aktiviteyi arttıranlar (ebselen, asetilsistein), nonenzimatik serbest radikal toplayıcılar (mannitol, albumin), nötrofil adezyon inhibitörleri, demir şelatörleri (28).

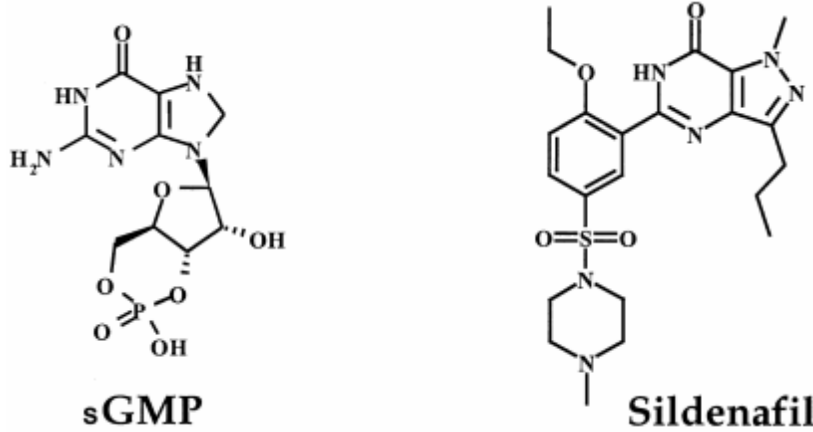
Yapılan bazı çalışmalarda C ve E vitamini ile melatonin'in önemli antioksidan etkileri olduğu kabul edilmektedir (1,67-69)

SİLDENAFİL

Günümüzde erektil disfonksiyonda kullanılan ve korpus kavernozumdaki siklik guanozin-3',5'-monofosfat (sGMP) degradasyonundan sorumlu, sGMP'ye spesifik PDE5 enziminin potent ve selektif bir inhibitörüdür (70).

Sildenafilin Farmakodinamiği

Sildenafil, sGMP, düz kas gevşemesi ve trombosit agregasyonu gibi bir çok fizyolojik durumda sinyal transdüksiyonunda önemli bir rol oynamaktadır. sGMP guanilil siklaz aracılığıyla üretilir ve siklik nukleotid PDE'ler aracılığıyla 5'-GMP'ye yıkılır. Vasküler düz kas hücrelerindeki sGMP konsantrasyonu, bu iki olay arasındaki denge ile belirlenmektedir (71,72). PDE'lerin memeli dokularında 11 sınıfı tanımlanmıştır. Bunlardan PDE 5 enziminin vasküler ve bronşiyal düz kaslarda ve trombositlerde bulunduğu gösterilmiştir (71,73). PDE 5 inhibitörleri yapısal olarak sGMP ile benzerdir ve PDE'nin katalitik bölgesinde sGMP ile yarışmaya girerler (Şekil 5) (71).



Şekil 5. Fosfodiesteraz 5'in kompetitif inhibitörü sildenafil ile onun doğal substratı olan siklik guanozin-3',5'-monofosfatın yapısal olarak karşılaştırılması (71)

Tek dozda ve 100 mg'a kadar oral yolla uygulanan sildenafil EKG'de klinik olarak anlamlı etkiler oluşturmamaktadır. 100 mg oral dozu takiben yatar pozisyonda ortalama sistolik kan basıncında 8.4 mmHg ve diastolik basıncında 5.5 mmHg düşüş görülmüştür. Kan

basıncındaki bu düşüş sildenafilin vazodilatör etkileri ile uyumludur ki bu vazodilatasyonun sebebi büyük olasılıkla vasküler düz kaslardaki artmış sGMP seviyesidir (70).

Sildenafilin Farmakokinetiği

Oral alımından sonra sildenafil hızla absorbe olur ve maksimum plazma konsantrasyonuna 1 saat içinde ulaşır (71,74). Sildenafil %96 oranında plazma proteinlerine bağlanır ve geri kalan %4 bağlı olmayan serbest ilaç plazmada dolaşıma katılarak PDE 5 inhibisyonu ile intrasellüler etkisini gösterir. Sildenafil özellikle CYP3A4 (majör yol) ve CYP2C9 (minör yol) karaciğer mikrozomal enzimleri ile metabolize edilir. Sildenafil, N-demetilasyon yolu ile dolaşımdaki majör metabolitine dönüşür. Bu metabolitin sildenafille benzer şekilde PDE selektivitesi mevcuttur ve PDE5 için gösterdiği in vitro potans sildenafilin gösterdiğinin yaklaşık %50'sidir. Bu metabolitin plazma konsantrasyonları sildenafil için gözlenenin yaklaşık %40'ıdır. N-desmetil de metabolize olur ve terminal yarı ömrü yaklaşık 4 saattir (70). Dolayısıyla sildenafilin bu enzimlerin inhibitörleri ile birlikte alınması ilacın plazma seviyelerini yükseltmektedir.

Sildenafilin yan etkileri: Sildenafilin yaygın görülen baş ağrısı, sersemlik hissi, palpasyon, yüzde flushing, anormal görüş (hafif ve geçici, özellikle görmede renklerin soluklaşması, bunun yanında ışığı algılamada artış ve bulanık görme), nazal konjesyon ve dispepsi gibi yan etkileri vasküler ve visseral düz kaslardaki PDE 5 inhibisyonuna bağlı olarak gelişmektedir. Bu durumlar ilacın kısa yarılanma ömrü (T_{1/2}) değeriyle uyumlu olarak geçici ve hafif seyretmektedir (70).

Sildenafilin terapötik kullanımı: Yeterli bir seksüel performans için gerekli penil ereksiyonun sağlanamaması veya sürdürülememesi olarak tanımlanan erektil disfonksiyonun semptomatik tedavisinde endikedir (70). Sildenafilin konjestif kalp yetmezliği, pulmoner hipertansiyon ve endotel disfonksiyonunun görüldüğü diğer bazı kardiyovasküler durumlarda yararlı etkileri gösterilmiştir (71,75,76).

Sildenafilin kontrendikasyonları: Nitratlar ile beraber (Nitrogliserin, isosorbid mononitrat, isosorbid nitrat, pentaeritritol tetranitrat, eritritol tetranitrat, isosorbid dinitrat/fenobarbital gibi) verilmesi, non-arteritik anterior iskemik optik nöropatisi olanlarda, ciddi karaciğer yetmezliği, anstabil angina pectoris, geçirilmiş MI, hipotansiyon durumlarında kontrendikedir (70).

N-ASETİLSİSTEİN

Mukolitik bir ajan olan n-asetilsistein (NAS) düşük molekül ağırlıklı, tiol grubu içeren bir bileşiktir (77). N-asetilsisteinin bir GSH prekürsörü olarak bilinmesi, radikal giderici etkisinden faydalanma fikrini gündeme getirmiştir. İlk kez 1963 yılında Sheffner, mukolitik tedavi amacıyla sistein derivelerini klinikte kullanıma sunmuştur.

N-asetilsisteinin Farmakodinamik ve Farmakokinetiği

N-asetilsistein, doğal bir amino asit olan L-sisteinin n-asetillenmiş türevine verilen isimdir. L-sisteinin sodyum tuzu olarak hazırlanmıştır. Sistein, antioksidan etkisi olan birkaç amino asitten biridir. N-asetilsistein $C_5H_9NO_3S$ şeklinde formüle edilebilir. NAS mukoproteindeki disülfid bağları ile reaksiyona giren serbest sülfidril grupları içeren bir tiol bileşiğidir. Sonuçta sülfidril-disülfid bağlarının yer değiştirmesi ile mukoprotein molekülleri daha küçük parçalara ayrılır ve daha az visköz birimler haline gelip infekte sekresyondaki DNA bağlarını belirgin önemli ölçüde azaltır. Mukopürülan materyal lizise uğrar ve daha az visköz hale gelmiş olur. Bu primer etki NAS'ın bir mukokinetik ajan olarak kullanımının ana nedenidir (78,79).

Glutasyon major bir serbest radikal giderici ajandır. Bir GSH prekürsörü olan NAS'ın serbest radikalleri ve reaktif elektrofilleri detoksifiye eder. Reaktif elektrofiller, elektronlara afinitesi oldukça yüksek olan ve yeni radikalleri oluşturmaya hazırlanan molekül parçalarıdır. NAS ayrıca ortamdaki H_2O_2 düzeyini azaltır ve H_2O_2 'nin toksik etkilerine karşı hücreyi korur. NAS'ın toksik radikallere karşı koruyucu etkisi, GSH biyosentezini arttırması ve GSH prekürsörü olması nedeniyledir (79).

N-asetilsistein, suda %22 oranında erir. Alkol ve değişik sıvılarda da benzer oranda erime gösterir. N-asetilsistein, karaciğerde metabolize olur ve yarılanma ömrü iki ile altı saattir. Plazma proteinlerine bağlanma oranı %50'dir. Başlıca karaciğer ve böbrek yoluyla olmak üzere yaklaşık %20-30'u idrarla değişmeden atılır. Aktif metabolitleri disülfidler, sistein, sistin, methionin ve indirgenmiş glutatyondur. N-asetilsistein alındıktan sonra hızla absorbe ve deasetile edilerek hücre içi ve hücre dışı GSH depolarına eklenir. N-asetilsistein, sistein derivasyonu olarak daha az toksik ve GSH prekürsörü olabilme yeteneği en iyi olan sistein derivasyonlarına dönüşür (78-80).

N-asetilsistein nitratin vazodilatör etkisine olan toleransı tersine çevirerek küçük kan damarlarında direkt vazodilatör etki yapar. N-asetilsisteinin aynı zamanda pozitif inotrop ve güçlü vazodilatör etkileri vardır. Hepatik disfonksiyonlu hastalarda karaciğer kan akımını düzenler. Sepsisli hastalarda kardiyak fonksiyonlarda düzelme ve gastrik pH'ın azalmasını

önlediği gösterilmiştir. N-asetilsisteinin intravenöz uygulamasının miyokard infarktöslü hastalarda trombolitik ajan olarak kullanılabilceği ve gliseril trinitritin periferel ve koroner etkilerini potansiyelize ettiği bildirilmiştir. N-asetilsistein bir thiol bileşiği olarak küçük koroner damarların dilatasyonunu arttırır (79,81).

N-asetilsisteinin Terapötik Kullanımı (79,81)

- 1- Akut solunumsal distres sendromu, amfizem, akut ve kronik bronşit gibi solunum yolu hastalıklarında
- 2- Kanser tedavisinde kullanılan alkilleyici ajanların neden olduğu hemorajik sistit sağaltımında
- 3- Temelinde oksidatif stres bulunan septik şok ve kardiovasküler sistem hastalıklarının sağaltımında (Angina, MI ve kalp yetmezliği)
- 4- Hidroksil ve singlet oksijen gibi reaktif oksijen türevlerinin temizleyici olarak hücrelerin oksidan strese karşı savunmasında
- 5- Bazı ağır metaller, karbontetraklorür ve bir antineoplastik ilaç olan doksorubisin zehirlenmelerinde antidot olarak
- 6- Parasetamol zehirlenmesinde antidot olarak
- 7- Birçok kimyasalın karaciğerde detoksifikasyonunda
- 8- Viral enfeksiyonlar ve HIV sağaltımında immunmodölatör amaçlı
- 9- Deneysel olarak deri fleplerinin korunmasında
- 10- Askeri tıpta radyasyona karşı korunma amaçlı
- 11- Kistik fibrozis ve mekonyum ileusunda
- 12- Karın ağrısı ve subakut ileusun tedavisinde
- 13- Kuru göz sendromunun tedavisinde (79,81).

N-asetilsisteinin yan etkileri: N-asetilsisteinin sistemik kullanımı sonrasında nadiren, ürtiker ve bronkospazm gibi aşırı duyarlılık reaksiyonları gelişebilir (78).

GEREÇ VE YÖNTEMLER

Bu çalışma Trakya Üniversitesi Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu'nun TÜHDYEK-2012/24 protokol, 2011.02.09 karar nolu onayı alındıktan sonra Trakya Üniversitesi Tıp Fakültesi Deney Hayvanları Birimi Laboratuvarı'nda yapıldı (Ek-1). Sıçanlar Deney Hayvanları Birimi'nden temin edildi. Çalışmada yaklaşık 3.5-4 aylık, her iki cinsten, 190-250 gr ağırlığında, 32 adet Sprague-Dawley cinsi sıçan kullanıldı. Sıçanlar randomize olarak eşit sayıda (n=8) 4 gruba ayrıldı. Sıçanlar deney süresince 12'şer saatlik aydınlık-karanlık ışıklandırması olan, ısısı 20-22°C ve nem oranı %45-50 olan, otomatik olarak ayarlanan odalarda yaşatıldı. Bu süreçte tüm sıçanlar şeffaf kafeslerde tutuldu. Sıçanların beslenmesinde standart ticari pellet yemi ve çeşme suyu kullanıldı. Deneye başlamadan önce hayvanların bir hafta ortam koşullarına adaptasyonları sağlandı. Tüm sıçanların bakımı, 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. Deneyde kullanılacak tüm sıçanlar yapılacak işlemler öncesinde tartılarak vücut ağırlıkları kaydedildi.

DENEKLERİN HAZIRLANMASI VE CERRAHİ TEKNİK

Tüm sıçanlara 8 saatlik açlık sonrasında ketamine HCl 40 mg/kg (Alfamin %10[®] 100 mg/ml flakon, Alfasan International B.V., Woerden, Hollanda) + ksilazin hidroklorür 5 mg/kg (Basilazin %2[®] 23.32 mg/ml, 25 ml flakon, aniMedica GmbH, Senden-Bösensel, Almanya) sol ön ayak adalesine intramusküler yolla anestezi uygulandı. Gerekli olduğunda deney

süresince bir kez olmak üzere ketamine HCI ek doz yapılması planlandı. İşlem boyunca sıçanların solunumları spontan olarak devam edecek şekilde uygulandı. Sıçanlar ısıtıcı lamba altında supin pozisyonda masaya yatırıldı. Tüm sıçanların ciltleri aseptik olarak hazırlandıktan sonra ksifoidin hemen altından pubisin 0,5 cm üstüne kadar orta hat median laparotomi yapıldı. Laparotomi sonrası barsaklar nemli bez yardımı ile sağa deviye edildi. İnfrarenal abdominal aorta künt diseksiyonla eksplere edildi. Tüm sıçanlara antikoagülan amaçlı düşük doz (100 ü/kg) heparin (Nevparin® 25000 IU 5ml flakon, Mustafa Nevzat İlaç Sanayi A.Ş. Türkiye) yapıldı. Deney süresince sıvı resüsitasyonu amacıyla 10 ml/kg %0,9'luk NaCl kuyruk veninden verildi. Tüm infüzyonlar perfüzetör (Perfusor Compact, B. Braun®, Almanya) yardımı ile gerçekleştirildi. İnfrarenal abdominal aortaya atravmatik mikrovasküler klemp (Novaclip® 12 mm Angle, Plymouth, ABD) kondu. Klemp sonrasında peritoneal boşluğa yaklaşık 5 ml ılık serum fizyolojik sıkıldı. Sıvı kaybını önlemek için karın 3 adet ipek dikiş ile yaklaştırıldı. 2 saatlik iskemiye takiben infrarenal abdominal aortadaki atravmatik mikrovasküler klemp kaldırıldı ve 2 saatlik reperfüzyon periyodu uygulandı. Aortik iskemi klempleme işlemi sonrasında distal aortada pulsasyon kaybı, reperfüzyon ise klempin kaldırılmasından sonra distal aortada pulsasyon varlığı ile takip edildi. Reperfüzyon süresi sonunda; tüm sıçanlarda, median laparotomi kesisi yukarıya doğru ilerletilerek mediasten açıldı, kalbe ulaşıldı ve 5 ml'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. İşlem sonrası sıçanlar sakrifiye edildi. Femoral arter ve gastroknemius kas doku örnekleri; immunohistokimyasal ve hematoksilen eozin ile değerlendirme yapıncaya kadar %10'luk formaldehid solüsyonu içinde saklandı. Sıçanlardan alınan kanlar, oda sıcaklığında yarım saat bekletildikten sonra, 4000 rpm'de 10 dakika santrifüj edildi ve sıçan plazma örnekleri -80°C saklandı. İşlem sonrası sıçanlar sakrifiye edildi.

DENEY GRUPLARI

I. Grup (Kontrol Grubu) (n=8)

Cerrahi hazırlık ve anestezi indüksiyonu sonrasında median laparotomi yapılarak infrarenal aorta eksplere edildi. Aorta künt diseksiyonla dönüldü. Aortaya klemp konulmadı. Karın içine ılık serum fizyolojik enjekte edilerek, karın 3 adet ipek ile yaklaştırıldı. Diğer gruplara uygulanan 2 saat iskemi, 2 saat reperfüzyon süresi tamamlandı.

II. Grup (İskemi Reperfüzyon Grubu) (n=8)

Cerrahi hazırlık ve anestezi indüksiyonu sonrasında median laparotomi yapılarak infrarenal aort eksplere edildi. Aorta künt diseksiyonla dönüldü ve atravmatik mikrovasküler klemp yerleştirildi. Aorta distalinde pulsasyon kaybı olduğu görüldü. Karın içine ılık serum fizyolojik enjekte edilerek, karın 3 adet ipek ile yaklaştırıldı. 2 saatlik iskemi ardından ipekler alındı. Mikrovasküler klemp kaldırıldı. Aorta distalinde pulsasyonun tekrar başladığı görüldü. Karın katları tekrar yaklaştırıldı. Diğer gruplara uygulanan 2 saatlik reperfüzyon süresi tamamlandı.

III. Grup (İskemi Reperfüzyon + Sildenafil Grubu) (n=8)

Cerrahi hazırlık ve anestezi indüksiyonu sonrasında median laparotomi yapılarak infrarenal aorta eksplere edildi. Aorta künt diseksiyonla dönüldü ve atravmatik mikrovasküler klemp yerleştirildi. Aorta distalinde pulsasyon kaybı olduğu görüldü. Karın içine ılık serum fizyolojik enjekte edilerek, karın 3 adet ipek ile yaklaştırıldı. 2 saatlik iskemi periyodu sonrasında karın açıldı, mikrovasküler klemp kaldırıldı. Aorta distalinde pulsasyonun tekrar başladığı görüldü. Karın katları sıvı kaybını engellemek amacıyla tekrar yaklaştırıldı. Sildenafil 25 mg tablet (Viagra® 25 mg film tablet Pfizer İlaçları Ltd. Şti., İstanbul, Türkiye) toz haline getirilip 1mg/ml olacak şekilde 25 ml serum fizyolojik içinde çözülerek intravenöz injeksiyon için hazırlandı. Klemp kaldırıldıktan sonra reperfüzyon başlaması ile birlikte 1 mg/kg dozunda sildenafil infüzyonuna başlandı ve 2 saatlik reperfüzyon süresince devam edildi. İlaç infüzyonu için; uygun antisepsi sonrası, kuyruk venine sarı renkli branül yerleştirildi. Her bir sıçan için 2 saat içinde verilmesi gereken toplam sildenafil miktarı 2 ml serum fizyolojik içerisinde dilue edilip, infüzyon (Perfusor Compact, B. Braun®, Almanya) kuyruk veninden, sarı renkli branül yardımıyla yapıldı.

IV. Grup (İskemi Reperfüzyon + N-Asetil Sistein Grubu) (n=8)

Cerrahi hazırlık ve anestezi indüksiyonu sonrasında median laparotomi yapılarak infrarenal aorta eksplere edildi. Aorta künt diseksiyonla dönüldü ve atravmatik mikrovasküler klemp yerleştirildi. Aorta distalinde pulsasyon kaybı olduğu görüldü. Karın içine ılık serum fizyolojik enjekte edilerek, karın 3 adet ipek ile yaklaştırıldı. 2 saatlik iskemi periyodu sonrasında karın açıldı, mikrovasküler klemp kaldırıldı. Aorta distalinde pulsasyonun tekrar başladığı görüldü. Karın katları sıvı kaybını engellemek amacıyla tekrar yaklaştırıldı. Klemp kaldırıldıktan sonra reperfüzyon başlaması ile birlikte 100 mg/kg dozunda n-asetil sistein (Asist® 300 mg/3 ml (%10) ampul Hüsnü Arsan İlaçları A.Ş., İstanbul, Türkiye) infüzyonuna

başlandı ve 2 saatlik reperfüzyon süresince devam edildi. İlaç infüzyonu için; uygun antisepsi sonrası, kuyruk venine sarı renkli branül yerleştirildi. Her bir sıçan için 2 saat içinde verilmesi gereken toplam n-asetil sistein miktarı 2 cc serum fizyolojik içerisinde dilüe edilip, infüzyon (Perfusor Compact, B. Braun®, Almanya) kuyruk veninden, sarı renkli branül yardımıyla yapıldı.

Deney gruplarındaki tüm sıçanlardan; patolojik değerlendirme için sağ gastroknemius kas ve sağ femoral arter doku örnekleri ile biyokimyasal analizler için kan örneği alındı. Doku ve kan örnekleri alınan sıçanlar sakrifiye edildi.

BİYOKİMYASAL DEĞERLENDİRME

Sıçanlardan alınan kanlar oda sıcaklığında yarım saat bekletildikten sonra 4000 rpm'de 10 dakika çevrilerek eritrositlerden ayrılan plazma -80°C saklandı. Sonrasında saklanmış plazmalar oda sıcaklığına getirilerek, iskemi/reperfüzyon hasarı göstergesi olan malondialdehid (MDA) değerleri biyokimya bölümü tarafından ölçüldü.

Malondialdehid Tayini

Poliansatüre yağ asitlerinin peroksidasyonu ile oluşan son ürünlerden biri olan MDA'nın sıcak ortamda tiyobarbitürik asid (TBA) ile oluşturduğu pembe-kırmızı renkli bileşiğin rengi 532 nm dalga boyunda spektrofotometrik olarak ölçülmesi esasına göre serum MDA düzeyleri ölçüldü (82).

Analiz gününe dek -80°C 'de saklanan serumlar kademeli olarak çözüldükten sonra MDA analizinde kullanıldı. Tüm örneklerde çalışmalar iki kez tekrarlandı. MDA'nın 532 nm'de molar absorpsivitesi kullanılarak serum MDA konsantrasyonu hesaplandı. Sonuçlar nmol/mL olarak ifade edildi

HİSTOPATOLOJİK DEĞERLENDİRME

Histopatolojik inceleme için femoral arter ve gastroknemius kası doku örnekleri % 10'luk tamponlu nötral formaldehit solüsyonunda 24 saat fiske edildi. Örneklerden parafin bloklar hazırlandı. Bu parafin bloklardan mikrotom bıçağı ile her doku örneği için 5 µm kalınlığında seri kesitler hazırlanarak hematoksilin eozin (HE) ve immunohistokimyasal (IHK) boyalar ile boyandı. Işık mikroskobu ile histopatolojik inceleme yapıldı.

İmmunohistokimyasal Boyama ile Değerlendirme

Femoral arter ve gastroknemius kas doku kesitlerinde, immunohistokimyasal olarak; TNF α [(4E1):sc-130349. Santa Cruz Biotechnology, Inc. Santa Cruz, California, ABD] ve HIF-1 α [(H1alpha 67):sc-53546. Santa Cruz Biotechnology, Inc. Santa Cruz, California, ABD] antikoları uygulandı.

TNF α antikorunun, boya tutulum yoğunluğu ve şiddeti incelendi. TNF α değerlendirmesinde Andrej ve arkadaşlarının (83) yaptığı çalışmadaki skora sistemi referans alınarak; boyama yok (-), hafif boyanma (+), şiddetli boyanma (++) olarak derecelendirildi. İHK'sal bulguların gruplara göre ortalama skorları (-) boyama yok 0 puan, (+) hafif 1 puan ve (++) şiddetli 2 puan olarak derecelendirilerek hesaplandı.

HIF-1 α değerlendirilmesinde boyanma yaygınlığına göre; % 1-25 oranında boyanma (+), % 26-50 oranında boyanma (++) , % 51-75 oranında boyanma (+++) , % 76-100 oranında boyanma (++++) olarak değerlendirildi ve sırasıyla 0,1,2,3,4 puan olarak derecelendirildi (84).

Her iki antikor için femoral arter kesitlerinde damar endotelindeki, gastroknemius kası kesitlerinde kas liflerindeki boyanma değerlendirildi. TNF α için sitoplazmik boyanma, HIF-1 α için nükleer, sitoplazmik boyanma pozitif kabul edildi.

Tüm patolojik incelemeler, patolog tarafından kesitlerin hangi gruba ait olduğu bilinmeksizin mikroskopik olarak (Olympus BX51) değerlendirildi.

İSTATİSTİKSEL ANALİZ

Sonuçlar ortalama \pm standart sapma ya da sayı (yüzde) olarak ifade edildi. Verilerin gruplar arası karşılaştırmalarında Kruskal Wallis test kullanıldı. Gruplararası fark bulunduğu farklılığın hangileri arasında olduğunu belirlemede Bonferroni düzeltmeli Mann Whitney U testi kullanıldı. $p < 0.05$ değeri istatistiksel anlamlılık sınırı olarak kabul edildi. İstatistiksel analizlerde Trakya Üniversitesi Tıp Fakültesi Biyoistatistik ve Tıbbi Bilişim Anabilim Dalının SPSS 19.0 (Lisans no=10240642 SPSS Inc, Chicago, IL, ABD) istatistiksel paket programı kullanıldı.

BULGULAR

BİYOKİMYASAL BULGULAR

İskemi/reperfüzyon hasarı göstergesi olan deneklere ait serum MDA değerleri nmol/mL cinsinden aşağıdaki tabloda gruplara göre verilmiştir (Tablo 3).

Tablo 3. Tüm gruplara ait malondialdehid serum (nmol/ml) sonuçları

Denekler	Grup 1 (Kontrol) (n=8)	Grup 2 (İ/R) (n=8)	Grup 3 (İ/R+ S) (n=8)	Grup 4 (İ/R+ NAS) (n=8)
1	4,88	5,67	4,88	4,52
2	4,13	5,10	5,05	5,70
3	4,18	7,19	4,88	5,25
4	4,90	7,45	5,38	5,05
5	4,87	6,30	5,96	4,33
6	4,88	5,72	4,40	5,55
7	4,95	5,93	5,76	4,66
8	4,75	5,97	5,12	4,69

İ/R: İskemi Reperfüzyon, İ/R+ S: İskemi Reperfüzyon+Sildenafil,
İ/R+ NAS: İskemi Reperfüzyon+N-asetilsistein.

Çalışmamızda tüm gruplara ait serum MDA sonuçlarının ortalama ve standart sapma değerleri Tablo 4’de verilmiştir. İ/R grubunda kontrol grubuna göre serum MDA değerlerinin anlamlı derecede yüksek olduğu tespit edilmiştir. İ/R+Sildenafil ve İ/R+NAS gruplarında serum MDA değerlerinin İ/R grubuna göre anlamlı derecede düşük olduğu bulunmuştur. Kontrol grubunda serum MDA değerlerinin İ/R+Sildenafil ve İ/R+NAS gruplarından anlamlı derecede düşük olduğu saptanmıştır ($p<0,001$) (Tablo 5).

Tablo 4. Gruplara göre malondialdehid sonuçlarının ortalama ve standart sapma değerleri

MDA serum (nmol/mL)	Gruplar			
	Grup 1 (Kontrol) (n=8)	Grup 2 (İ/R) (n=8)	Grup 3 (İ/R+ S) (n=8)	Grup 4 (İ/R+ NAS) (n=8)
	4,69±0,33	6,16±0,79	5,17±0,50	4,96±0,49

İ/R: İskemi Reperfüzyon, İ/R+ S: İskemi Reperfüzyon+Sildenafil,
İ/R+ NAS: İskemi Reperfüzyon+N-asetilsistein, MDA : Malondialdehid.

Tüm gruplara ait serum MDA sonuçları Kruskal Wallis testi kullanılarak karşılaştırıldı. Kruskal Wallis testine ait istatistiksel veriler, medyan, minimum, maksimum ve p değerleri Tablo 5’te verilmiştir. Kruskal Wallis testiyle dört grup karşılaştırıldığında gruplar arasındaki farklılığın ileri derecede anlamlı olduğu tespit edilmiştir (p<0,001).

Tablo 5. Gruplara ait malondialdehid değerlendirme sonuçları

MDA serum (nmol/mL)	Gruplar				p
	Grup 1 (Kontrol) (n=8)	Grup 2 (İ/R) (n=8)	Grup 3 (İ/R+ S) (n=8)	Grup 4 (İ/R+ NAS) (n=8)	
	4,87 (4,13-4,95)	5,95 (5,10-7,45)	5,08 (4,40-5,96)	4,87 (4,33-5,70)	<0,001

İ/R: İskemi Reperfüzyon, İ/R+ S: İskemi Reperfüzyon+Sildenafil,
İ/R+ NAS: İskemi Reperfüzyon+N-asetilsistein, MDA : Malondialdehid.
Medyan (minimum-maximum).
Kruskal Wallis Test.

İkili gruplar arası istatistiksel değerlendirmede Bonferroni düzeltilmeli Mann Whitney U testi kullanıldı. Tablo 6’da görüldüğü gibi İ/R+Sildenafil grubu ile İ/R+NAS grupları arası ve Kontrol ile İ/R+NAS grupları arası karşılaştırmalar dışındaki diğer karşılaştırmalarda istatistiksel olarak anlamlı fark tespit edilmiştir (p<0,05). İkili gruplar arası istatistiksel değerlendirmede elde edilen sonuçlar Tablo 6’da gösterilmiştir.

Tablo 6. İkili gruplar arası malondialdehid sonuçlarının istatistiksel analizi

P	Gruplar					
	Kontrol- İ/R Grup 1 -Grup 2	Kontrol- İ/R+ S Grup 1 -Grup 3	Kontrol- İ/R+ NAS Grup 1 -Grup 4	İ/R- İ/R+ S Grup 2 -Grup 3	İ/R- İ/R+ NAS Grup 2 -Grup 4	İ/R+ S- İ/R+ NAS Grup 3 -Grup 4
	0,001	0,034	0,400	0,016	0,003	0,371

İ/R: İskemi Reperfüzyon, İ/R+ S: İskemi Reperfüzyon+Sildenafil,
İ/R+ NAS: İskemi Reperfüzyon+N-asetilsistein.
Bonferroni düzeltilmeli Mann Whitney U Testi.

HİSTOPATOLOJİK BULGULAR

Hematoksilen Eozin ile Boyama Sonuçları

Femoral arter ve gastroknemius kas doku HE kesitlerinde; Kontrol, İ/R, İ/R+NAS ve İ/R+Sildenafil gruplarında histopatolojik olarak belirgin değişiklik saptanmamıştır.

Femoral arter için immunohistokimyasal sonuçlar

Kontrol grubuna ait femoral arter doku kesitlerinin immunohistokimyasal değerlendirilmesinde ortalama olarak TNF α ve HIF-1 α için immunoreaktivitenin olmadığı (ortalama skor; -) görülmüştür. İ/R grubuna ait değerlendirmede ortalama olarak TNF α için immunoreaktivitenin şiddetli (ortalama skor; ++) ve HIF-1 α için immunoreaktivitenin %51-75 oranında (ortalama skor; ++) olduğu tespit edilmiştir. İ/R+Sildenafil ve İ/R+ NAS gruplarına ait değerlendirmede ortalama olarak TNF α için immunoreaktivitenin hafif (ortalama skor; +) ve HIF-1 α için immunoreaktivitenin %26-50 oranında (ortalama skor; ++) olduğu saptanmıştır. Tüm gruplara ait TNF α ve HIF-1 α skorlarının ortama ve standart sapma değerleri Tablo 7’de verilmiştir.

Tablo 7. Gruplara ait femoral arter için tümör nekrozis faktör alfa ve hipoksi ile indüklenen faktör-1 alfa skorlarının ortalama ve standart sapma değerleri

Femoral Arter	TNF α				HIF-1 α					
	-	+	++	Ortalama ve Standart sapma	-	+	++	+++	++++	Ortalama ve Standart sapma
Grup 1 (Kontrol) (n=8)	7	1	0	0,12 \pm 0,35	7	1	0	0	0	0,12 \pm 0,35
Grup 2 (İ/R) (n=8)	0	0	8	2,00 \pm 0,00	0	0	1	5	2	3,12 \pm 0,64
Grup 3 (İ/R+S) (n=8)	3	5	0	0,62 \pm 0,51	2	2	4	0	0	1,25 \pm 0,88
Grup 4 (İ/R+NAS) (n=8)	3	5	0	0,62 \pm 0,51	0	2	6	0	0	1,75 \pm 0,46

İ/R: İskemi Reperfüzyon, **İ/R+ S:** İskemi Reperfüzyon+Sildenafil,

İ/R+ NAS: İskemi Reperfüzyon+N-asetilsistein, **TNF α :** Tümör nekrozis faktör alfa,

HIF-1 α : Hipoksi ile indüklenen faktör-1 alfa.

Tüm gruplara ait femoral arter doku kesitlerinin immunohistokimyasal değerlendirmesine ait veriler Kruskal Wallis testi kullanılarak karşılaştırıldı. Kruskal Wallis

testine ait istatistiksel veriler, medyan, minimum, maksimum ve p değerleri Tablo 8’te verilmiştir. Kruskal Wallis testiyle dört grup karşılaştırıldığında immunohistokimyasal parametreler açısından gruplar arasındaki farklılığın ileri derecede anlamlı olduğu tespit edilmiştir (p<0,001).

Tablo 8. Gruplara ait femoral arter tümör nekrozis faktör alfa ve hipoksi ile indüklenen faktör-1 alfa değerlendirme sonuçları

Femoral arter	Gruplar				P
	Grup 1 (Kontrol)	Grup 2 (İ/R)	Grup 3 (İ/R+S)	Grup 4 (İ/R+NAS)	
TNF-α	0,00 (0,00-1,00)	2,00 (2,00-2,00)	1,00 (0,00-1,00)	1,00 (0,00-1,00)	<0,0001
HIF-1α	0,00 (0,00-1,00)	3,00 (2,00-4,00)	1,50 (0,00-2,00)	2,00 (1,00-2,00)	<0,0001

İ/R: İskemi Reperfüzyon, **İ/R+ S:** İskemi Reperfüzyon+Sildenafil,
İ/R+ NAS: İskemi Reperfüzyon+N-asetilsistein, **TNF α :** Tümör nekrozis faktör alfa,
HIF-1 α : Hipoksi ile indüklenen faktör-1 alfa.
 Medyan (minimum-maximum).
 Kruskal Wallis Test.

İkili gruplar arası istatistiksel değerlendirmede Bonferroni düzeltilmeli Mann Whitney U testi kullanıldı. Tablo 9’da görüldüğü gibi İ/R+Sildenafil grubu ile İ/R+NAS grupları arası karşılaştırmalar dışındaki diğer karşılaştırmalarda istatistiksel olarak anlamlı fark tespit edilmiştir (p<0,05). İkili gruplar arası istatistiksel değerlendirmede elde edilen sonuçlar Tablo 9’da gösterilmiştir.

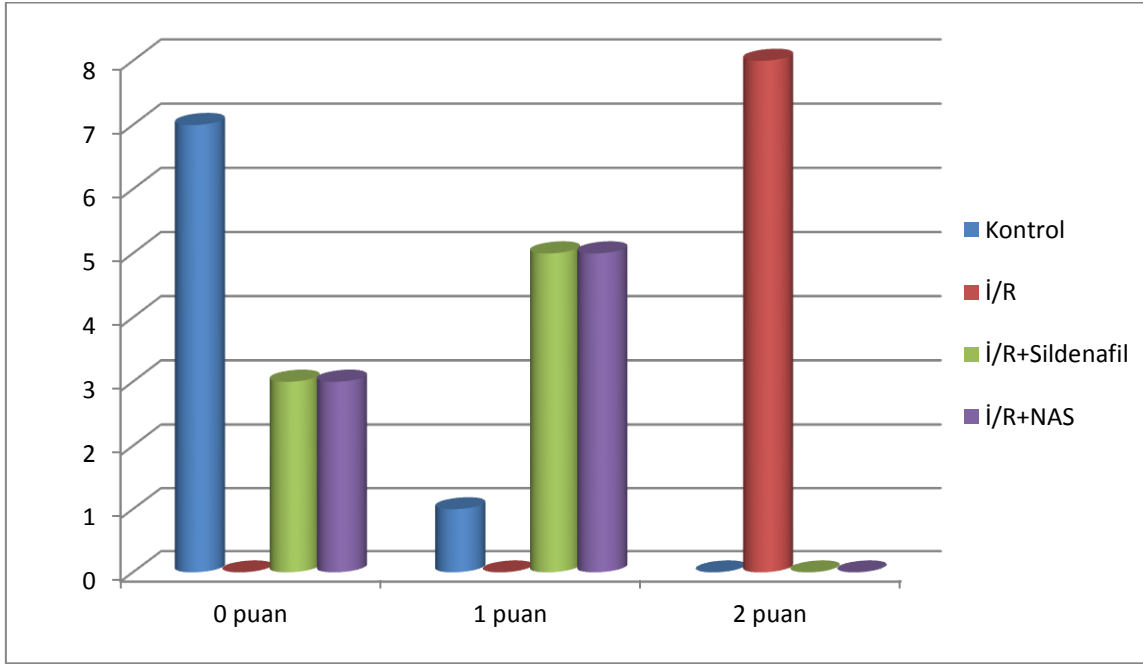
Tümör nekrozis faktör α ve HIF-1 α immunoreaktivitesinin İ/R, İ/R+Sildenafil ve İ/R+NAS gruplarında Kontrol grubuna göre anlamlı düzeyde yükseldiği saptanmıştır (p<0,05). İ/R+Sildenafil ve İ/R+NAS gruplarında immunoreaktivitenin İ/R grubuna göre anlamlı düzeyde azaldığı görülmüştür (p<0,001)

Tablo 9. İkili gruplar arası femoral arter tümör nekrozis faktör alfa ve hipoksi ile indüklenen faktör-1 alfa sonuçlarının istatistiksel analizi

Femoral arter	Gruplar					
	Kontrol- İ/R	Kontrol- İ/R+ S	Kontrol- İ/R+ NAS	İ/R- İ/R+ S	İ/R- İ/R+ NAS	İ/R+ S- İ/R+ NAS
TNF-α	p<0,0001	p=0,046	p=0,046	p<0,0001	p<0,0001	p=1,000
HIF-1α	p<0,0001	p=0,010	p<0,0001	p<0,001	p<0,001	p=0,223

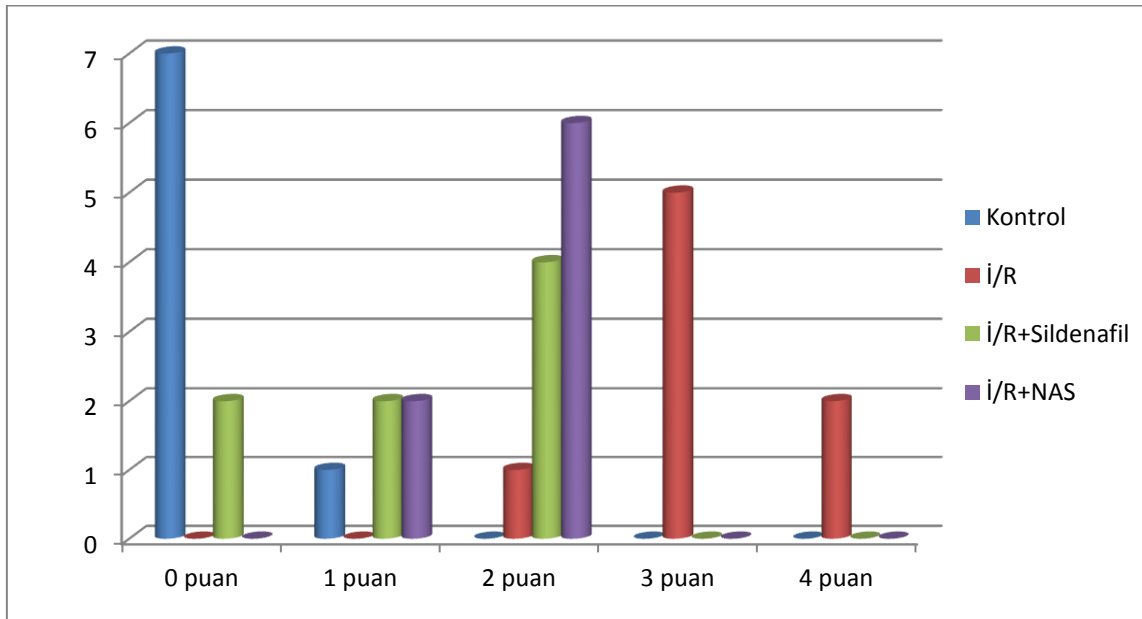
İ/R: İskemi Reperfüzyon, **İ/R+ S:** İskemi Reperfüzyon+Sildenafil,
İ/R+ NAS: İskemi Reperfüzyon+N-asetilsistein, **TNF α :** Tümör nekrozis faktör alfa,
HIF-1 α : Hipoksi ile indüklenen faktör-1 alfa.
 Bonferroni düzeltilmeli Mann Whitney U Testi.

Femoral arter endotel immunohistokimyasal incelemesinde TNF α ve HIF-1 α skorlarının gruplara göre dağılımı Şekil 6 ve Şekil 7’de verilmiştir.



İ/R: İskemi Reperfüzyon, **İ/R+ Sildenafil:** İskemi Reperfüzyon+Sildenafil, **İ/R+ NAS:** İskemi Reperfüzyon+N-asetilsistein.

Şekil 6. Femoral arter endotel tümör nekrozis faktör alfa skorlarının gruplara göre dağılımı



İ/R: İskemi Reperfüzyon, **İ/R+ Sildenafil:** İskemi Reperfüzyon+Sildenafil, **İ/R+ NAS:** İskemi Reperfüzyon+N-asetilsistein

Şekil 7. Femoral arter endotel hipoksi ile indüklenen faktör-1 alfa skorlarının gruplara göre dağılımı

Gastroknemius kası için immunohistokimyasal sonuçlar

Kontrol grubuna ait gastroknemius kas doku kesitlerinin immunohistokimyasal değerlendirilmesinde ortalama olarak TNF α ve HIF-1 α için immunoreaktivitenin olmadığı (ortalama skor; -) görülmüştür. İ/R grubuna ait değerlendirmede ortalama olarak TNF α için immunoreaktivitenin şiddetli (ortalama skor; ++) ve HIF-1 α için immunoreaktivitenin %51-75 oranında (ortalama skor; ++) olduğu tespit edilmiştir. İ/R+Sildenafil ve İ/R+ NAS gruplarına ait değerlendirmede ortalama olarak TNF α için immunoreaktivitenin hafif (ortalama skor; +) ve HIF-1 α için immunoreaktivitenin %1-25 oranında (ortalama skor; +) olduğu saptanmıştır. Tüm gruplara ait TNF α ve HIF-1 α skorlarının ortama ve standart sapma değerleri Tablo 10'da verilmiştir.

Tablo 10. Gruplara ait gastroknemius kas için tümör nekrozis faktör alfa ve hipoksi ile indüklenen faktör-1 alfa skorlarının ortalama ve standart sapma değerleri

Gastroknemius kas	TNF α				HIF-1 α					
	-	+	++	Ortalama ve Standart sapma	-	+	++	+++	++++	Ortalama ve Standart sapma
Grup 1 (Kontrol) (n=8)	8	0	0	0,00±0,00	8	0	0	0	0	0,00±0,00
Grup 2 (İ/R) (n=8)	0	1	7	2,00±0,00	0	0	1	5	2	3,12±0,64
Grup 3 (İ/R+S) (n=8)	3	5	0	0,62±0,51	1	3	4	0	0	1,37±0,74
Grup 4 (İ/R+NAS) (n=8)	4	4	0	0,50±0,53	2	4	2	0	0	1,00±0,75

İ/R: İskemi Reperfüzyon, **İ/R+ S:** İskemi Reperfüzyon+Sildenafil,

İ/R+ NAS: İskemi Reperfüzyon+N-asetilsistein, **TNF α :** Tümör nekrozis faktör alfa,

HIF-1 α : Hipoksi ile indüklenen faktör-1 alfa.

Tüm gruplara ait gastroknemius kas doku kesitlerinin immunohistokimyasal değerlendirmesine ait veriler Kruskal Wallis testi kullanılarak karşılaştırıldı. Kruskal Wallis testine ait istatistiksel veriler, medyan, minimum, maksimum ve p değerleri Tablo 11'de verilmiştir. Kruskal Wallis testiyle dört grup karşılaştırıldığında immunohistokimyasal parametreler açısından gruplar arasındaki farklılığın ileri derecede anlamlı olduğu tespit edilmiştir (p<0,0001).

Tablo 11. Gruplara ait gastroknemius kas tümör nekrozis faktör alfa ve hipoksi ile indüklenen faktör-1 alfa değerlendirme sonuçları

Gastroknemius kası	Gruplar				
	Grup 1 (Kontrol)	Grup 2 (İ/R)	Grup 3 (İ/R+S)	Grup 4 (İ/R+NAS)	P
TNF-α	0,00 (0,00-0,00)	2,00 (2,00-2,00)	1,00 (0,00-1,00)	0,50 (0,00-1,00)	<0,0001
HIF-1α	0,00 (0,00-0,00)	3,00 (2,00-4,00)	1,50 (0,00-2,00)	1,00 (0,00-2,00)	<0,0001

İ/R: İskemi Reperfüzyon, **İ/R+ S:** İskemi Reperfüzyon+Sildenafil,
İ/R+ NAS: İskemi Reperfüzyon+N-asetilsistein, **TNF α :** Tümör nekrozis faktör alfa,
HIF-1 α : Hipoksi ile indüklenen faktör-1 alfa.
 Medyan (minimum-maximum).
 Kruskal Wallis Test.

İkili gruplar arası istatistiksel değerlendirmede Bonferroni düzeltilmeli Mann Whitney U testi kullanıldı. Tablo 12’de görüldüğü gibi İ/R+Sildenafil grubu ile İ/R+NAS grupları arası karşılaştırmalar dışındaki diğer karşılaştırılmalarda istatistiksel olarak anlamlı fark tespit edilmiştir ($p<0,05$). İ/R grubu ile İ/R+Sildenafil grubu arası ve İ/R grubu ile İ/R+NAS grubu arası karşılaştırmada ileri derecede anlamlı fark saptanmıştır ($p<0,001$). İkili gruplar arası istatistiksel değerlendirmede elde edilen sonuçlar Tablo 9’da gösterilmiştir.

Tümör nekrozis faktör α ve HIF-1 α immunoreaktivitesinin İ/R, İ/R+Sildenafil ve İ/R+NAS gruplarında Kontrol grubuna göre anlamlı düzeyde yükseldiği saptanmıştır ($p<0,05$). İ/R+Sildenafil ve İ/R+NAS gruplarında immunoreaktivitenin İ/R grubuna göre anlamlı düzeyde azaldığı görülmüştür ($p<0,001$). İ/R+Sildenafil ve İ/R+NAS grupları arasında anlamlı derecede fark bulunamamıştır.

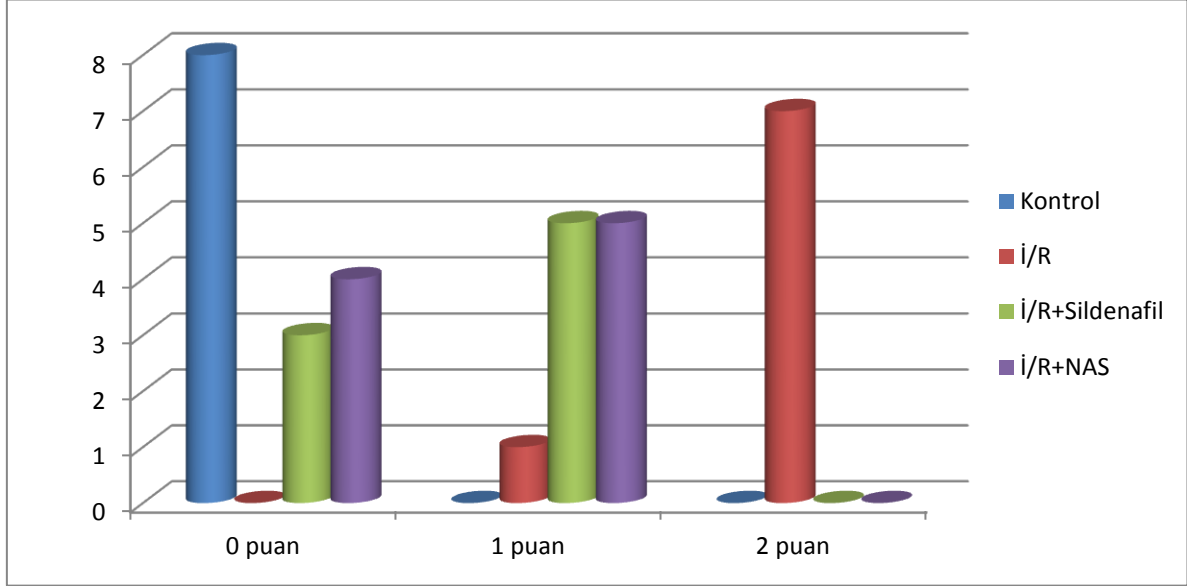
Tablo 12. İkili gruplar arası gastroknemius kas tümör nekrozis faktör alfa ve hipoksi ile indüklenen faktör-1 alfa sonuçlarının istatistiksel analizi

Gastroknemius kası	Gruplar					
	Kontrol- İ/R	Kontrol- İ/R+ S	Kontrol- İ/R+ NAS	İ/R- İ/R+ S	İ/R- İ/R+ NAS	İ/R+ S- İ/R+ NAS
TNF-α	p<0,0001	p=0,009	p=0,025	p<0,0001	p<0,0001	p=0,626
HIF-1α	p<0,0001	p<0,001	p=0,003	p<0,001	p<0,001	p=0,308

İ/R: İskemi Reperfüzyon, **İ/R+ S:** İskemi Reperfüzyon+Sildenafil,
İ/R+ NAS: İskemi Reperfüzyon+N-asetilsistein, **TNF α :** Tümör nekrozis faktör alfa,
HIF-1 α : Hipoksi ile indüklenen faktör-1 alfa.
 Bonferroni düzeltilmeli Mann Whitney U Testi.

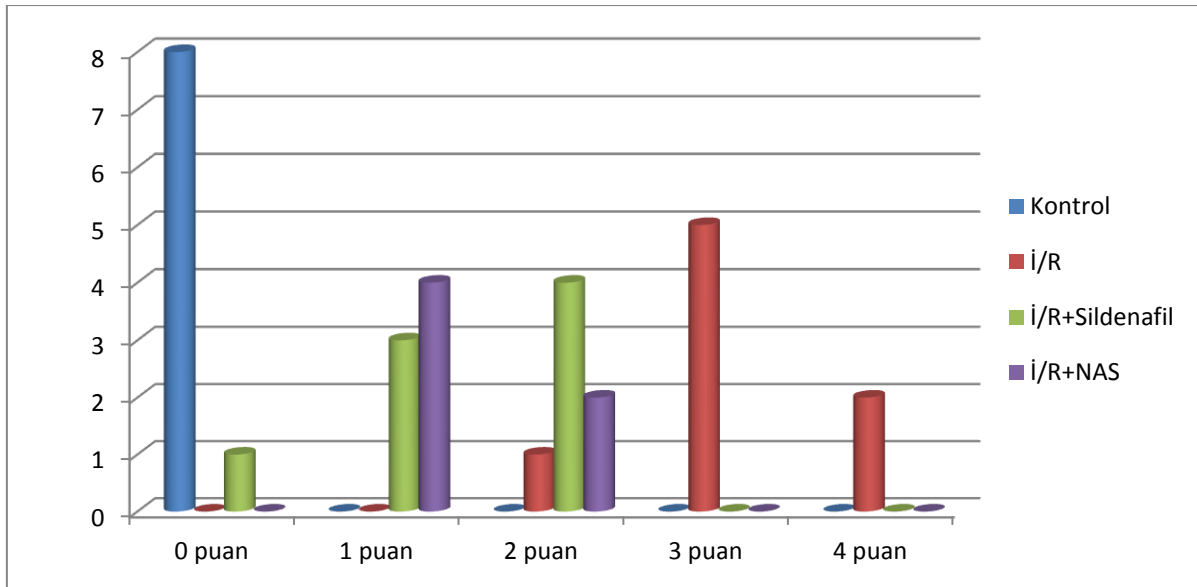
Gastroknemius kası immunohistokimyasal incelemesinde TNF α ve HIF-1 α skorlarının gruplara göre dağılımı Şekil 8 ve Şekil 9’de verilmiştir.

Tüm gruplara ait femoral arter ve gastroknemius kas histopatolojik kesitleri Şekil 10, Şekil 11, Şekil 12 ve Şekil 13’da verilmiştir.



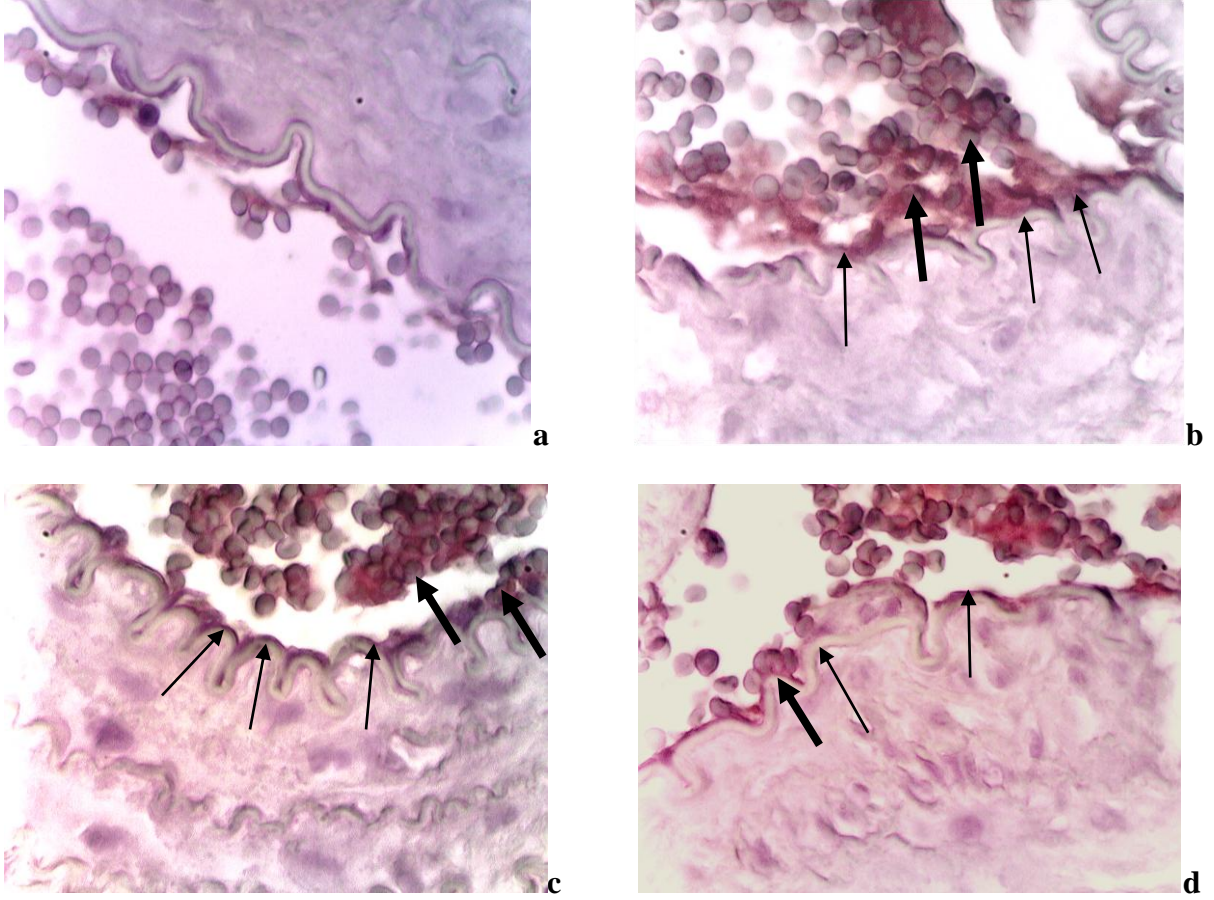
i/R: İskemi Reperfüzyon, **i/R+ S:** İskemi Reperfüzyon+Sildenafil,
i/R+ NAS: İskemi Reperfüzyon+N-asetilsistein, **TNF α :** Tümör nekrozis faktör alfa,
HIF-1 α : Hipoksi ile indüklenen faktör-1 alfa.

Şekil 8. Gastroknemius kası immunohistokimyasal incelemesinde tümör nekrozis faktör alfa skorlarının gruplara göre dağılımı



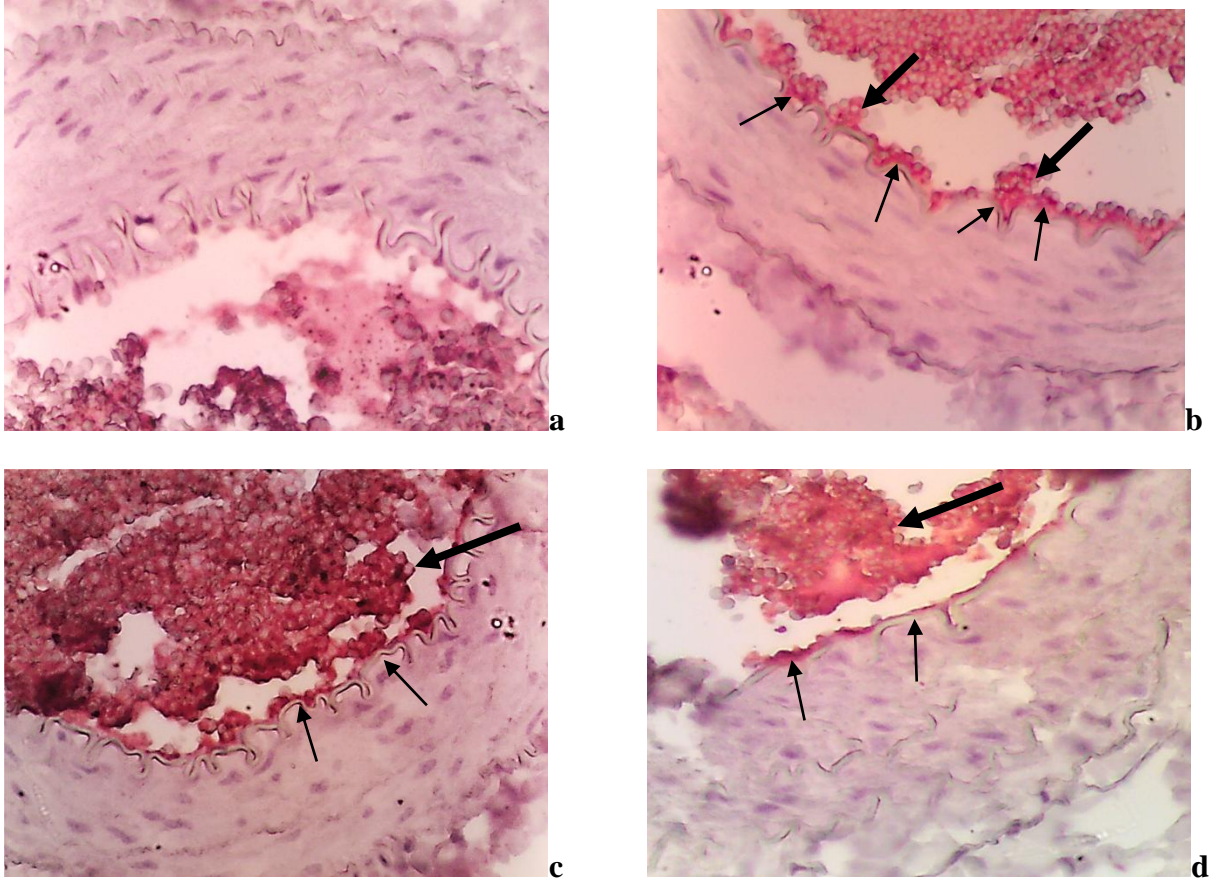
i/R: İskemi Reperfüzyon, **i/R+ S:** İskemi Reperfüzyon+Sildenafil,
i/R+ NAS: İskemi Reperfüzyon+N-asetilsistein, **TNF α :** Tümör nekrozis faktör alfa,
HIF-1 α : Hipoksi ile indüklenen faktör-1 alfa.

Şekil 9. Gastroknemius kası immunohistokimyasal incelemesinde hipoksi ile indüklenen faktör-1 alfa skorlarının gruplara göre dağılımı



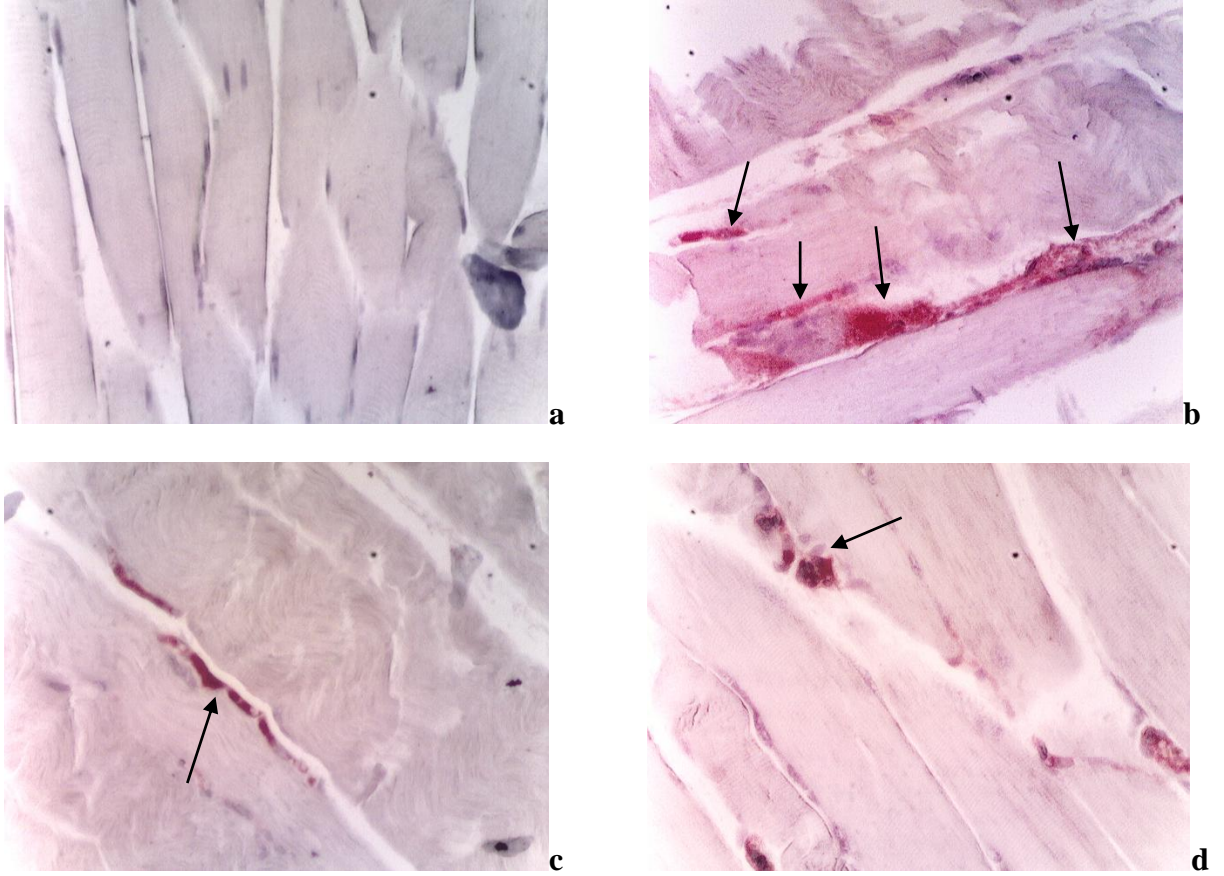
Şekil 10. Femoral arter endoteli kesitlerinde immunohistokimyasal olarak tümör nekrozis faktör alfa ile boyanma özellikleri; a- Kontrol grubu, b- İ/R grubu, c- İ/R+Sildenafil grubu, d- İ/R+NAS grubu (x400, tümör nekrozis faktör alfa antikorü).

Kontrol grubunda boyanma izlenmemiştir (Şekil 10a). İskemi/reperfüzyon grubunda TNF α ile genellikle yaygın, kuvvetli sitoplazmik boyanma izlenmiştir. İnce okla gösterilen yerlerde immunohistokimyasal olarak tümör nekrozis faktör α ile pozitif reaksiyon gösteren endotelial alanlar değişik yoğunlukta izlenmektedir. Kalın okla gösterilen yerlerde lümen içi kümeleşmiş eritrositler ve endotelial yüzeyle ilişkileri izlenmektedir (Şekil 10b). Oysa İ/R+Sildenafil ve İ/R+NAS gruplarında femoral arter endotelinde iskemi/reperfüzyona bağlı hasar birbiri ile benzer şekilde boyanma oranında azalma olarak izlenmiştir. İnce okla gösterilen yerlerde immunohistokimyasal olarak tümör nekrozis faktör α ile pozitif reaksiyon gösteren endotelial alanlar, kalın okla gösterilen yerlerde lümen içi kümeleşmiş eritrositler ve endotelial yüzeyle ilişkileri izlenmektedir (Şekil 10c, Şekil 10d) (x400, TNF α antikorü).



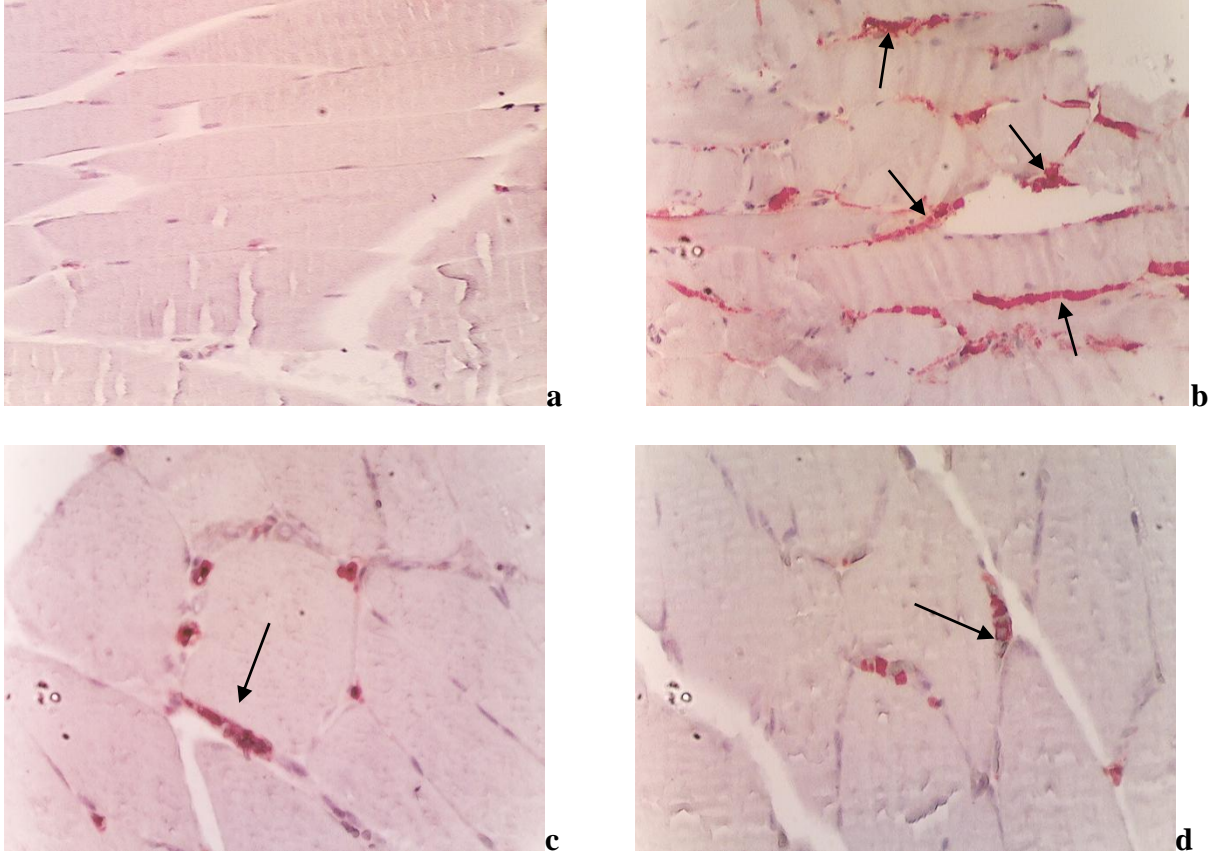
Şekil 11. Femoral arter endoteli kesitlerinde immunohistokimyasal olarak hipoksi ile indüklenen faktör-1 alfa ile boyanma özellikleri; a- Kontrol grubu, b- İ/R grubu, c-İ/R+Sildenafil grubu, d-İ/R+NAS grubu (x400, hipoksi ile indüklenen faktör-1 alfa antikoru)

Kontrol grubunda boyanma izlenmemiştir (Şekil 11a). İskemi/reperfüzyon grubunda HIF-1 α ile genellikle yaygın sitoplazmik nükleer pozitifliği gösteren boyanma izlenmiştir. İnce okla gösterilen yerlerde immunohistokimyasal olarak HIF-1 α ile pozitif reaksiyon gösteren endotelial alanlar değişik yoğunlukta izlenmektedir. Kalın okla gösterilen yerlerde lümen içi kümeleşmiş eritrositler ve endotelial yüzeye ilişkileri, endotelial yüzeye olan adezyonu izlenmektedir (Şekil 11b). Oysa İ/R+Sildenafil ve İ/R+NAS gruplarında HIF-1 α hafif ve orta düzeylerde sitoplazmik nükleer boyanma izlenmiştir. İnce okla gösterilen yerlerde immunohistokimyasal olarak HIF-1 α ile pozitif reaksiyon gösteren endotelial alanlar, kalın okla gösterilen yerlerde lümen içi kümeleşmiş eritrositler izlenmektedir (Şekil 11c, Şekil 11d) (x400, HIF-1 α antikoru).



Şekil 12. Gastrocnemius kas kesitlerinde immunohistokimyasal olarak tümör nekrozis faktör alfa ile boyanma özellikleri; a-Kontrol grubu, b-İ/R grubu, c- İ/R+Sildenafil grubu, d- İ/R+NAS grubu (x200, tümör nekrozis faktör alfa antikoru)

Kontrol grubunda boyanma izlenmemiştir (Şekil 12a). İskemi/reperfüzyon grubunda İ/R hasarı oluşmuş iskelet kasında miyofibriler alanlarda yaygın düzensizlik, TNF α ile genellikle yaygın, kuvvetli sitoplazmik boyanma şeklinde izlenmiştir. Okla gösterilen yerlerde immunohistokimyasal olarak TNF α ile pozitif reaksiyon gösteren miyofibriler alanlar değişik yoğunlukta izlenmektedir (Şekil 12b). Oysa İ/R+sildenafil ve İ/R+NAS gruplarında birbiri ile benzer şekilde boyanma oranında azalma, daha miyofibriler düzensizlik izlenmiştir. Okla gösterilen yerlerde immunohistokimyasal olarak TNF α ile pozitif reaksiyon gösteren miyofibriler alanlar değişik yoğunlukta izlenmektedir (Şekil 12c, Şekil 12d) (x200, TNF α antikoru).



Şekil 13. Gastrocnemius kas kesitlerinde immunohistokimyasal olarak hipoksi ile indüklenen faktör-1 alfa ile boyanma özellikleri; a-Kontrol grubu, b-İ/R grubu, c-İ/R+Sildenafil grubu, d-İ/R+NAS grubu (x200, hipoksi ile indüklenen faktör-1 alfa antikorunu)

Kontrol grubunda boyanma izlenmemiştir (Şekil 13a). İskemi/reperfüzyon grubunda HIF-1 α ile genellikle yaygın sitoplazmik nükleer pozitiflik gösteren boyanma izlenmiştir. Okla gösterilen yerlerde immunohistokimyasal olarak HIF-1 α ile pozitif reaksiyon gösteren miyofibriler alanlar değişik yoğunlukta izlenmektedir. Miyofibriler yapıda yaygın düzensizlik izlenmektedir (Şekil 13b). Oysa İ/R+Sildenafil ve İ/R+NAS gruplarında HIF-1 α ile hafif ve orta düzeylerde sitoplazmik nükleer boyanma izlenmiştir. Okla gösterilen yerlerde immunohistokimyasal olarak HIF-1 α ile pozitif reaksiyon gösteren miyofibriler alanlar izlenmektedir (Şekil 13c, Şekil 13d) (x200, HIF-1 α antikorunu).

TARTIŞMA

Ekstremitenin akut iskemisi periferik vasküler cerrahi, aort cerrahisi, ekstremitelerin reimplantasyonu, ezici yaralanmalar, periferik vasküler yaralanmalar ya da akut arteriyel tıkanıklıklar sırasında karşılaşılan bir durumdur (85,86). İskemi/reperfüzyon hasarı özellikle aort cerrahisinde aortaya geçici süreyle klemp konulması sonucu oluşmaktadır. İskemik kalan ekstremitede lokal doku hasarı oluşur, iskemik alanın dışındaki bölgelerde de uzak organ hasarı meydana gelir (87).

Akut ekstremitte iskemisi kollaterallerin gelişmiş olduğu kronik ateroskleroz varlığında bile ciddi mortalite ve morbiditeye sebep olan klinik bir sorundur. Ekstremitenin reperfüzyonu tam olarak sağlansa bile oluşan sistemik inflamatuvar cevap, ekstremitte kaybına, akut böbrek ve solunum yetmezliğine, multipl organ disfonksiyonuna kadar gidebilen mortalite ve morbiditelere neden olabilir. Cerrahi müdahalenin gecikmesi bu riskleri daha da artırır (85,86,88).

İskelet kası büyük kütle olması ve iskemik hasara en hassas dokulardan olması nedeniyle alt ekstremitte İ/R hasarında önemli rol oynar. Reperfüzyon hasarında prognoz kas hasarı miktarına bağlıdır (12).

Deneysel alt ekstremitte iskem/reperfüzyon hasarının alt ekstremitte kas ve arter dokusuna verdiği zarar sıçanlarda çok iyi belirlenmiştir ve çalışmaların çoğunda sıçanlar tercih edilmiştir (77,89). Bu amaçla çalışmamızda Sprague Dawley cinsi sıçanlar kullanıldık.

Akut ekstremitte iskemisini takiben ekstremitenin yeniden perfüzyonu şiddetli lokal doku hasarı ve sistemik komplikasyonları beraberinde getirmektedir. Buna bağlı ölüm oranı %25-50, amputasyon ise %15-40 olarak belirtilmiştir (89).

Alt ekstremite dolaşımının kesilmesi sonucu ilk saptanan değişiklik kapiller lümendeki hücrelerde görülmektedir. İskemi süresinin uzadığı ve reperfüzyonun henüz başlamadığı durumlarda kapiller ve venüller eritrositler ile dolarak sıkışmakta ve endotel yüzeyi ile birleşmektedir. Reperfüzyonun erken safhasında eritrositler sıkışmakta ve endotelial yüzey deforme olmaktadır. Endotel bağlantıları ve sitoplazması bozulmaktadır. İskemi süresi dört saat veya daha uzun olan reperfüzyon olaylarında trombolitik etkileşimler daha ön plana çıkmaktadır. Mikrosirkülasyonda oluşan bu değişiklikler plazma proteinlerine karşı permeabiliteyi artırır ve ilerleyici interstisyel ödeme yol açar (1,90,91). Sonuçta majör organlarda mikrovasküler endotel hasarına bağlı geçirgenlik artışı, trombosit agregasyonu ve nekroz alanları oluşmaktadır (89).

İnflamasyonun süresi ve uyarının tipine göre, hasarlanmış dokuda biriken hücre tipi değişir. Hasarlanmış dokuda akut dönemde nötrofil, kronik dönemde monosit hakimiyeti vardır. Reperfüzyona bağlı hasarın karakteristik özellikleri; hücresel şişme, hücre iskeleti değişiklikleri ve seçici mikrovasküler geçirgenlik kaybıdır. Bu mekanizmalar doku ödemi ve kapiller kan akımında azalmaya neden olur. Hayvan deneyleri, hücre ve doku kültürü ile biyokimyasal alanda yapılmış olan birçok çalışma, yeniden oksijenlenmenin zararlı etkileri sonucunda meydana gelen SOR miktarının aşırı derecede artış gösterdiğini, bu durum karşısında da vücutta yer alan SOR tutucu antioksidan savunma mekanizmasının yetersiz kaldığını ve sadece reperfüze olan dokunun yanında tüm vücut organlarını da etkileyebileceğini göstermiştir (90,92).

Hardy ve ark. (93) akut alt ekstremite iskemi modeliyle yaptıkları çalışmalarında, reperfüzyon sonunda no reflow'un nedenini iskemiye bağlı vazokonstriksiyon, nötrofil agregasyonu, endotel kaynaklı relaksan faktörün oksijen radikalleri tarafından ortadan kaldırılmasına bağlamışlardır.

Sağlıklı bireylerde normal metabolizma sonucunda oluşan serbest oksijen radikalleri vücudun savunma mekanizması olan antioksidan enzim sistemiyle uzaklaştırılır ve oksijen radikalleri, antioksidan savunma mekanizması ile denge halindedir. Bu denge serbest radikallerin lehine bozulursa oksidatif stres oluşur. Serbest oksijen radikalleri sadece DNA ve protein düzeyinde zararlı etki göstermemekte, aynı zamanda fosfolipid ve poliansature yağ asitlerini içeren hücre membranında geçirgenliği bozarak, hücre içi kalsiyum birikimi ve hücre ölümüne neden olmaktadır (92,94).

Bazı deneysel çalışmalarda antioksidanların, antitromboksanların, antilökotrienlerin ve antiplatelet aktive edici faktörlerin reperfüzyonun sistemik etkilerinden korunmak amacıyla kullanılabileceği gösterilmektedir (12).

Günümüzde İ/R sonrasında ortaya çıkan serbest oksijen radikallerinin olumsuz etkilerini ortadan kaldırmak için süperoksit dismutaz, allopürinol, katalaz, mannitol, vitamin C, alfa tokoferol, L-karnitin, pentoksifilin, n-asetilsistein gibi çeşitli maddeler çok sayıda deneysel hayvan çalışmalarında, tedavide denenmiş ve etkili oldukları gösterilmiştir. Bu antioksidan maddelerin ya mikrovasküler permeabilite artışı ve nötrofil akümülyasyonunu önleyerek ya da antioksidan sistemi aktive etmek suretiyle, iskemi reperfüzyon sonrasında ortaya çıkan uzak doku organ hasarına koruyucu etkiye sahip oldukları gösterilmiştir (86,95).

Biz de çalışmamızda alt ekstremitte İ/R hasarında damar endoteli ve iskelet kası hasarı üzerine etkileri henüz yeterince araştırılmamış olan sildenafil ve güçlü antioksidan etkinliği deneysel çalışmalarda gösterilmiş, mukolitik bir ajan olan n-asetilsisteinin alt ekstremitenin akut iskemisine etkisini araştırdık.

Akut alt ekstremitte iskemisinin güncel tedavisi, iskemik hasarın derecesinin artmaması için mümkün olduğunca hızlı bir şekilde iskemik ekstremitteye kan akımının tekrar sağlanmasını içermektedir. Klinik kontrendikasyon olmadığı takdirde heparin kullanımı artık gelenekselleşmiştir. Akut alt ekstremitte iskemisinde heparin kullanımı Blaisdell ve ark. (12) tarafından operatif yaklaşıma alternatif olarak önerilmiştir. Heparin, tekrarlayan emboli insidansını ve trombusun distal dolaşımında büyümesini azaltır. Ayrıca, heparinin mikrosirkülatuar disfonksiyon üzerine yararlı etkileri vardır (96). Yapılan araştırmalar, heparinin rolünün bilinen antikoagulan etkisinden bağımsız olduğunu göstermiştir (97).

İntimal hiperplazinin önlenmesinde gelecek vadede bir tedavi de NO üretiminin artırılmasını sağlayan tedavilerdir. NO, endotelyal devamlılık, ateroskleroz gelişimi, vazospazm ve İ/R üzerinde önemli roller oynayan bir moleküldür. Platelet agregasyonunu, lökosit kemotaksisini ve düz kas hücre proliferasyonunu inhibe ederek endotelyal rejenerasyonu arttırdığı gösterilmiştir. Bu faydalı etkileri nedeniyle araştırmacılar vasküler hasar bölgelerinde NO üretiminin artırılmasını düşünmüşlerdir. Birçok deney hayvanı çalışmasında NO sentaz uygulaması sonrasında intimal hiperplazinin gerilediği gösterilmiştir (98).

Torakoabdominal aortik anevrizma tamirleri önemli postoperatif morbidite ve mortalite nedenidir. Deneysel hayvan modellerinde iskemik abdominal organların reperfüzyonu lokal ve distal organ hasarına yol açan bir çok faktörün salınmasına neden olur. Aynı fenomen insanlarda da torakoabdominal aortik anevrizma tamirlerinden sonra görülmektedir ve yüksek mortalite ve morbidite nedenidir (99).

Abdominal aort anevrizma tamiri ile oluşan inflamatuvar cevap alt ekstremitte ve gastrointestinal İ/R hasarı sonrası oluşan cevap gibidir (100). Abdominal aort cerrahisi

sırasında infrarenal abdominal aortun klemlenmesi ve klempin alınarak dolaşımın tekrar sağlanması, aortik İ/R periyodunun sebebidir (101). IL-1, IL-6 ve TNF α gibi inflamatuvar sitokinlerle başlayan sistemik inflamatuvar cevap sendromundan, multipl organ disfonksiyonuna kadar giden sonuçlar oluşabilir (102).

Çalışmamızda sıçan abdominal aortası klemlenerek alt ekstremitte iskemisi oluşturulmuş ve anevrizma cerrahisinde oluşan İ/R tablosu taklit edilmiştir. Abdominal aortaya klemp konulması sonrası oluşan İ/R ile birçok organda oluşan hasar ve birçok ilacın bu hasar üzerine etkisini değerlendiren çalışmalar bulunmaktadır.

Alt ekstremitte İ/R sonrası gelişen doku hasarının ortaya çıkmasında İ/R süresi ile orantılı değişiklikler görülmektedir. Gündüz ve ark. (102) izole endotel hücre kültüründe yaptığı İ/R çalışmasında 30 dakika iskemik periyotta endotel sitozolik kalsiyum konsantrasyonunun iki aşamalı arttığını ve takiben 40 dakika reperfüzyon sürecinde iskemik periyoda göre artışın daha fazla olduğunu göstermişlerdir. Kalsiyum artışı endotel hücre kontraksiyonuna neden olarak endotel hücreleri arasındaki mesafeyi artırır ve ödeme sebep olur. Kiriş ve ark. (101) yaptığı çalışmada 30 dakika iskemi sonrası 60 dakika reperfüzyon uygulanan sıçanlarda aortik İ/R grubunda kontrol grubuna göre malonil dealdehit, katalaz, süperoksit dismutaz seviyelerini ve myeloperoksidaz aktivitesini anlamlı derece yüksek bulunmuştur. Narin ve ark. (103) 120 dakika iskemi sonrası 120 dakika reperfüzyon uygulanan sıçanlarda aortik İ/R grubunda kontrol grubuna göre malonil dealdehit, katalaz, süperoksit dismutaz seviyeleri anlamlı derece yüksek bulunmuştur. Bizim çalışmamızda deney gruplarına 120 dakika iskemi, 120 dakika reperfüzyon süresi uygulanmıştır.

Sildenafil, vasküler dilatör etkisi nedeniyle günümüzde erektil disfonksiyon ve pulmoner hipertansiyonun tedavisinde klinik kullanımı gittikçe yaygınlaşan, sGMP seviyesini yükselterek düz kasta gevşemeye neden olan bir PDE-5 enzimi inhibitörüdür. Vazodilatasyon etkisi dışında sildenafilin trombosit agregasyonunu engellediği, antiinflamatuvar ve antioksidatif etkilerinin de olduğu bilinmektedir.

Sildenafil koroner arter hastalarında endotele bağımlı vazodilatasyonu ve egzersiz toleransını artırmaktadır (104,105).

Son zamanlarda insanlarda ve hayvanlarda yapılan çalışmalarda, sildenafilin konjestif kalp yetmezliğine, pulmoner hipertansiyona ve kalpte İ/R hasarına karşı olumlu etkileri olduğu gösterilmiştir. Bu çalışmaların çoğu sildenafilin önkoşullama benzeri bir etki gösterdiğini ortaya koymuştur. Kalp İ/R modellerinde oluşturulan endotel disfonksiyonu, apoptoz ve nekrozu, oksidatif hasarı ve trombosit aktivasyonunu azalttığı, ayrıca infarkt alanında azalma meydana getirdiği bildirilmiştir (104-110).

Sildenafilin in vitro fare kardiyomyositlerinde iskemi/reoksijenasyon sonucu artan apoptotik hücre sayısını azalttığı, nekroz ve apoptoza karşı NO üzerinden direkt koruyucu etkisi olduğu bildirilmiştir. Sildenafilin bu etkilerinde, endoteliyal nitrik oksit sentaz (eNOS) ve indüklenebilir nitrik oksit sentaz (iNOS) ekspresyonunu ve buna bağlı olarak NO biyoyararlanımını arttırmasının rolü olduğu gösterilmiştir (111). Bu durum İ/R'yi takiben oluşan hücre ölümüne karşı sildenafilin terapötik etkisinin olduğunu desteklemektedir. Sildenafilin farede doksorubisin ile oluşan kardiyomyopatiye apoptozu azaltarak sol ventrikül disfonksiyonunu düzelttiği bildirilmiştir (109).

Çeşitli çalışmalarda sildenafilin kalpteki İ/R modeli ve insan ön kol İ/R modelinde hedef organ üzerindeki etkileri, sıçan mezenter İ/R modelinde mezenter arter ve ileumda meydana gelen hasar üzerindeki etkileri araştırılmıştır (107, 112, 113). Ancak sıçan infrarenal abdominal aortasının oklüzyonu ve reperfüzyonu sonrası femoral arter endoteli ve gastroknemius kasında oluşan iskemi/reperfüzyon hasarına etkisi ile ilgili herhangi bir çalışmaya literatürde rastlanamamıştır.

İzole fare kalbinde sildenafil ön tedavisi İ/R sonrasında gelişen kalpteki infarkt alanını azaltmış ve sildenafilin bu etkisi selektif bir iNOS inhibitörü olan 1400 W ile ortadan kalkmıştır (113). Ayrıca sildenafilin bu infarkt-kısıtlayıcı etkisi ventriküler fonksiyon üzerinde herhangi bir değişiklik göstermeksizin gerçekleşmektedir. Sildenafil uygulaması sonrasında kalpte eNOS ve iNOS mRNA ekspresyonunun hızla arttığı, pik değerlerine eNOS'un 45 dakika, iNOS'un ise 2 saat sonra ulaştığı ve normal seviyelerine ise saatler sonra geri döndüğü gösterilmiştir (113). Aynı çalışmada sildenafil tedavisinin kalpte eNOS ve iNOS protein ekspresyonlarını da 24 saat sonunda anlamlı olarak arttırdığı gösterilmiştir. Benzer olarak izole kardiyomyositlerinde sildenafil uygulaması eNOS ve iNOS mRNA ve protein ekspresyonlarını artırmaktadır (111).

Sildenafil veya diğer PDE 5 inhibitörlerinin vazodilatör etkisi, adozin ve/veya bradikinin gibi ön koşullama benzeri etki gösteren endojen mediyatörlerin salıverilmesine neden olarak, kinazların aktivasyonu sonucu NOS fosforilasyonuna ve sonrasında NO oluşmasıyla sonuçlanacak bir sinyal yolağını tetikleyebilir (114). Daha sonra NO'nun guanilat siklazı aktive ederek sGMP oluşturduğu ve oluşan sGMP'nin protein kinaz G (PKG) aktivasyonu ile mitokondriyal potasyum-ATP kanallarını açarak kardiyoprotektif etki yaptığı ileri sürülmüştür (114,115). Sildenafilin alt ekstremitelerde İ/R sonucu bozulan kas ve femoral arter endotel fonksiyonunu düzeltici etkisi için aynı mekanizma geçerli olabilir. Diğer taraftan sildenafilin kardiyovasküler koruyucu etkisini başlıca doku sGMP düzeylerini artırarak ve PKG yolağı üzerinden gösterdiği bildirilmiştir (116). Potasyum-ATP kanallarının varlığı

sadece kalpte değil, aynı zamanda endotel hücrelerinde de gösterilmiştir (116). İnsanda yapılan bir in vivo çalışmada, brakial arterin kapatılıp açılmasıyla oluşturulan İ/R'de, sildenafilin potasyum-ATP kanallarını açarak güçlü bir endotel koruyucu etki gösterdiği bildirilmiştir (107).

Yapılan bir çalışmada sildenafilin insanda kardiyak outputu artırdığı, pulmoner arter sistolik basıncını, ortalama pulmoner arter basıncını, pulmoner vasküler rezistansı ve ortalama arter basıncını azalttığı bildirilmiştir (106).

Köpeklerde sildenafil pulmoner embolinin indüklediği oksidatif stresi ve pulmoner hipertansiyonu azaltmaktadır (110). Pulmoner hipertansiyon hastası çocuklarda sildenafilin hiç bir yan etki göstermeksizin deoksihemoglobin saturasyonunu ve egzersiz toleransını artırarak pulmoner hipertansiyon üzerine olumlu etkileri olduğu gösterilmiştir (118).

Özbek ve ark. (119) sildenafilin sıçan aortasına etkilerini araştırdıkları çalışmalarında sıçan aortasında fenilefrinin oluşturduğu kontraksiyon üzerine sildenafil sitratın sodyum nitroprusside ve asetil koline göre daha fazla relaksasyon etkisinin olduğunu bildirmişlerdir.

Yeğinsu ve ark. (120) akciğer kontüzyonunda sildenafilin etkilerini araştırdıkları çalışmalarında, sildenafilin akciğer kontüzyonu sonrasında ortaya çıkan inflamatuvar reaksiyonu ve oksidatif stresi azalttığını bildirmişlerdir.

İşeri ve ark. (121) çalışmasında, kolon inflamasyonu oluşturulan sıçanlarda üç günlük 5 mg/kg/gün sildenafil verilmesinin lipid peroksidasyonu, oksidatif stresi, sitokin üretimi ve nötrofil birikimini önleyici etkisi olduğu bildirilmiştir. Benzeri bulgular Perk ve ark. (122) Milara ve ark. (123), Yıldırım ve ark. (124) ve de Visser ve ark. (125) gibi birçok yazar tarafından da bildirilmiştir.

Malondialdehid, 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 (4,6). 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 (4,6). Bu süreçte, zincirleme bir serbest oksijen ve yağ asidi radikali oluşumu ile ilerleyici hücre zarı hasarı gerçekleşir (4,6). 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 (35).

N-asetilsistein, İ/R'ye maruz bırakılan kalp kası, karaciğer, böbrek ve solunum sisteminde deneysel olarak kullanılmış ve MDA seviyelerinde düşüş, antioksidan enzim etkinliğinde artışa neden olduğu gösterilmiştir (126).

Güven ve ark. (126) sıçanlarda intestinal iskemi/reperfüzyon hasarında n-asetilsisteinin ve ebselenin etkileri ile ilgili yaptıkları araştırmada NAS grubunda iskemi/reperfüzyon grubuna göre MDA düzeylerinde anlamlı düşüş, antioksidan enzim etkinliğinde artış saptamışlardır. İntestinal iskemi/reperfüzyon hasarında endotelial ve epitelyal bariyerin sağlamlaştırılmasında, reperfüzyon hasarının önlenmesinde NAS'ın yararlı ve etkin bir ajan olduğu bildirilmiştir.

Erdem ve ark. (127) medulla spinalisin iskemi/reperfüzyon hasarını önlemede, n-asetilsisteinin alt ekstremit motor fonksiyonlarına etkisini araştırdıkları çalışmada deney gruplarında postoperatif 48 saat sonra tavşanların alt ekstremit motor fonksiyonlarının değerlendirilmesi sonucu spinal kord korumasında NAS kullanımı ile daha iyi bir nörolojik sonuç elde edildiği ve NAS'ın reperfüzyon hasarını azalttığını bildirmişlerdir.

Kurtuluş ve ark. (128) deneysel sistemik hipoksi geliştirilmiş yenidoğan ratlarda n-asetilsistein uygulamasının etkilerini araştırdıkları çalışmada; NAS grubu ve hipoksik grup karşılaştırıldığında, karaciğerdeki arjinaz aktivitesinin ve doku MDA düzeylerinin NAS grubunda daha düşük olduğunu tespit etmişlerdir. Bu nedenle hipoksi gelişen yenidoğanlarda NAS tedavisinin doku hasarının önlenmesinde yararlı bir yöntem olabileceği sonucuna varıldığını bildirmişlerdir.

Gürçün ve ark. (77) yaptıkları çalışmada ise; iskemik önkoşullamanın iskelet kasını İ/R hasarından koruyucu etkilerinin antioksidan NAS kullanımı ile kısmen engellenmiş olmakla birlikte, tamamen bloke olmadığına işaret etmişlerdir.

Serbest radikallerin reperfüzyon sonrası 15-20 sn içinde hızla oluştukları gösterildiğinden, reperfüzyon hasarını azaltmak amacıyla radikal yakalayıcı kullanılacak ise bunun reperfüzyondan 15 dakika önce verildiğinde efektif olduğu, reperfüzyondan sonra verildiği takdirde hiçbir önleyici özelliğinin olmadığı bilinmektedir (1). Biz de çalışmamızda aortadaki klemp kaldırılmadan 15 dakika önce sildenafil ve NAS infüzyonuna başlayarak deneyin efektif olmasını sağlamaya çalıştık.

Çalışmamızda İ/R grubunda kontrol grubuna göre serum MDA değerlerinin anlamlı derecede yüksek olduğu tespit edilmiştir. İskemi/Reperfüzyon+Sildenafil ve İ/R+NAS gruplarında serum MDA değerlerinin İ/R grubuna göre anlamlı derecede düşük olduğu

bulunmuştur. Kontrol grubunda serum MDA değerlerinin İ/R+Sildenafil ve İ/R+NAS gruplarından anlamlı derecede düşük olduğu saptanmıştır. Benzer şekilde, İ/R sonrası plazma MDA düzeylerinin yükseldiğini gösteren deneysel çalışmalardan bahsedilmiştir.

Hipoksi ile indüklenen faktör-1alfa, hipoksinin yol açtığı hücrel yanıtarda rol alan yüzden fazla enzim ve proteinin transkripsiyonunu sağlayan ve hipoksi ile indüklenen bir transkripsiyon faktörüdür. Hipoksi ile indüklenen faktör-1alfa, oksijenin yeterli olduğu durumlarda inaktiftir. Hipoksi ile degradasyonu önlenir ve akümüle olarak nükleer translokasyona uğrar. Nükleusta transkripsiyon görevini gerçekleştirir. Bununla birlikte bazal seviyede de HIF-1 α eksprese olur (129).

İskelet kası ve kalp dokusu da hipoksik hasara uğrayabilmekte, verdiği hücrel yanıtlar oksijen desteği ile ihtiyacı arasındaki dengeye göre değişebilmektedir. Hipoksi ile indüklenen faktör-1alfa ile ilgili çalışmalar farklı dokularda, kalp dokusunda, umbilikal ven endotel hücrelerinde, lökositlerde ve plazmada yapılmıştır ve çelişkili sonuçlar elde edilmiştir (129). İskelet kas dokusunda HIF-1 α ile ilgili sınırlı sayıda çalışma mevcuttur ve uygulanan hipoksi, iskemi protokolleri standart değildir.

Hipoksi ile HIF-1 ekspresyonu dokuya özgüdür. Beyin ve dalak, karaciğer ve böbrekten daha duyarlıdır (130). Çeşitli yüksekliklerde fizyolojik hipoksiye maruz kalma üzerine yapılmış bazı çalışmalarda HIF-1 α düzeyleri, ekspresyonu araştırılmıştır.

Vogt ve ark. (131) tarafından yapılan bir çalışmada 3850 m yüksekliğe karşılık gelen aralıklı normobarik hipoksi ile insan iskelet kasında HIF-1 α mRNA'sında artış bulunmakla birlikte Lundby ve ark. (132) 4100 metrede 2 hafta ve 8 hafta kalan insanlarda iskelet kası örneklerinde HIF-1 α ve kapillarizasyonda herhangi bir artış bulamamışlardır.

İmmünohistokimyasal çalışmalarda HIF-1 α 'nın kalp dokusunda 12 saat/gün 12 gün aralıklı hipoksi ile ekspresyonunun artmadığı fakat nükleer translokasyonunun gerçekleştiği bulunmuştur (133). Nitekim koroner arter hastalarında yapılan bir çalışmada koroner kollateralizasyonu olan hastalarda lökosit HIF-1 α ekspresyonları yüksek bulunmuştur ve iskemik anjiyogenezde bu yolun etkili olduğunu savunulmuştur (134).

Çalışmamızda, İ/R grubunda anlamlı derecede artmış HIF-1 α immunoreaktivitesi, İ/R sonrası artmış hasarın ve hipoksinin önemli bir belirteci olan HIF-1 α sentezine işaret etmektedir. Çalışmamızda, İ/R grubunda, histopatolojik olarak hem femoral arter endoteli hem de iskelet kası dokusu kesitlerinde HIF-1 α immünoaktivitesinin kontrol grubuna göre anlamlı düzeyde arttığı saptanmıştır. İskemi/Reperfüzyon+Sildenafil ve İ/R+NAS gruplarında immunoreaktivitenin İ/R grubuna göre anlamlı düzeyde azaldığı görülmüştür.

Tümör nekrozis faktör alfa, nötrofillerde agregasyon / aktivasyon ve mezenkimal hücrelerden proteolitik enzim salınımı oluşturarak doku hasarına neden olur (6). Tümör nekrozis faktör alfa gibi sitokinlerin sekresyonu; endotoksinler, immun kompleksler, toksinler, fiziksel travma ve bazı inflamasyon mediatörleri tarafından stimüle edilir (6). Tümör nekrozis faktör alfa için en önemli kaynaklar mevcut makrofaj ve mast hücreleri olup, aktif nötrofiller tarafından da sentezlendikleri gösterilmiştir (6,7,135). Tümör nekrozis faktör alfa gibi aracı inflamatuvar maddelerin sentez veya reseptör etkileşimlerinin engellenmesi ile İ/R hasarında iyileştirici etki sağlanmıştır (7,64).

Wei ve ark. (136) sıçan kremaster kas İ/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. (137) ise, deneysel aort anevrizma rüptürü modelinde multipl organ hasarına C5a reseptör antagonistlerinin etkisini araştırmışlar, hem şok oluştulan hem de aortik kros klemp uygulanan gruplardaki akciğer ve barsak dokuları TNF- α protein konsantrasyonlarında kontrol grubuna göre anlamlı düzeyde artış saptamışlardır.

Altavilla ve ark. (138) splanknik arter İ/R ile sağlanan deneysel şok modelinde monosit ve lenfositlerin İ/R patogenezindeki rollerini incelemişler ve İ/R grubundaki makrofaj TNF- α ifadesinin kontrol grubuna göre anlamlı düzeyde arttığını bildirmişlerdir.

Mizusawa ve ark. (139) 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.

Katırcıoğlu ve ark. (140) 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.

Çalışmamızda, İ/R grubunda anlamlı derecede artmış TNF- α immunreaktivitesi, İ/R sonrası artmış lokal TNF- α sentezine işaret etmektedir. Çalışmamızda, İ/R grubunda, histopatolojik olarak hem femoral arter endoteli hem de iskelet kası dokusu kesitlerinde TNF- α immünreaktivitesinin kontrol grubuna göre anlamlı düzeyde arttığı saptanmıştır. İskemi/Reperfüzyon+Sildenafil ve İ/R+NAS gruplarında immunreaktivitenin İ/R grubuna göre anlamlı düzeyde azaldığı görülmüştür.

Çalışmamızda femoral arter endoteli ve gastroknemius kası doku kesitlerinde hematoksilen eozin ile yapılan incelemede gruplar arasında histopatolojik olarak belirgin değişiklik saptanmamıştır.

Yapılan istatistiksel değerlendirme sonucunda da elde edilen biyokimyasal ve histopatolojik veriler anlamlı bulunmuştur. Elde ettiğimiz sonuçlar yapılmış diğer çalışmalarla benzerlik göstermiştir.

N-asetilsisteinin güçlü antioksidan etkinliği çeşitli iskemi/reperfüzyon modellerinde gösterilmiştir. Ancak sildenafilin deneysel iskemi/reperfüzyon modelinde femoral arter endoteli ve iskelet kas hasarına etkisi ile ilgili herhangi bir çalışmaya literatürde rastlanamamıştır. Bu anlamda reperfüzyon hasarını azaltmada etkinliğinin n-asetilsistein kadar olduğunu düşündüğümüz sildenafil için bu çalışma ileri klinik ve deneysel çalışmalara ışık tutabilecek nitelikte olduğuna inanmaktayız.

Sonuç olarak, infrarenal abdominal aort oklüzyon-reperfüzyonu sonrası, femoral arter endoteli ve gastroknemius kasında oluşan iskemi/reperfüzyon hasarını sildenafilin vazodilatör ve lipid peroksidasyonu, oksidatif stresi, sitokin üretimi, nötrofil birikimini önleyici etkisi, n-asetilsisteinin doku hasarını önleyici antioksidan etkisi ile önemli ölçüde azalttığını düşünmekteyiz.

SONUÇLAR

Trakya Üniversitesi Tıp Fakültesi Kalp Damar Cerrahisi Anabilim Dalı'nda yürütülen ve Trakya Üniversitesi Deney Hayvanları Birimi'nde gerçekleştirilen bu çalışmada, sıçanlarda deneysel iskemi/reperfüzyona bağlı femoral arter endoteli ve gastroknemius kası hasarını azaltmada sildenafil ve n-asetilsisteinin etkinliği biyokimyasal ve bazı histopatolojik parametrelerle incelenmiş ve aşağıdaki sonuçlar elde edilmiştir.

1. İskemi/reperfüzyon sonucu biyokimyasal olarak serum MDA artışı, femoral arter endoteli ve gastroknemius kas dokusunda histopatolojik olarak iskemi parametrelerinde (TNF α ve HIF-1 α skorlarında) artış izlenmiştir.
2. Sildenafil ve n-asetilsistein verilen deneklerde serum MDA düzeylerinde, histopatolojik olarak TNF α ve HIF-1 α skorlarında anlamlı derecede azalma tespit edilmiştir.
3. Sildenafil ve n-asetilsisteinin, reperfüzyon sonrası femoral arter endoteli ve gastroknemius kas dokusu hasarını azaltıcı etkisi istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur.

ÖZET

Bu deneysel çalışmada, sıçan infrarenal abdominal aortunda oklüzyon-reperfüzyon sonrası femoral arter endoteli ve gastroknemius kasında oluşan iskemi/reperfüzyon hasarına sildenafil ve n-asetilsisteinin etkisi araştırıldı. Her iki cinsten 32 adet Sprague-Dawley cinsi sıçan randomize olarak, eşit sayıda (n=8) dört gruba ayrıldı. Kontrol grubuna median laparotomi ve diseksiyon uygulandı ve diğer gruplara uygulanan toplam deney süresi kadar takip edildi. İskemi/reperfüzyon grubuna median laparotomi ardından infrarenal aortaya mikrovasküler klemp konularak 120 dakika iskemi oluşturuldu, ardından klemp kaldırılarak 120 dakika reperfüzyon uygulandı. Sildenafil grubuna, iskemi/reperfüzyon grubuna ek olarak klemp kaldırılmadan 15 dakika önce 1 mg/kg dozunda sildenafil infüzyonu başlandı ve reperfüzyon süresince devam edildi. N-asetilsistein grubuna iskemi/reperfüzyon grubuna ek olarak klemp kaldırılmadan 15 dakika önce 100 mg/kg dozunda n-asetilsistein infüzyonu başlandı ve reperfüzyon süresince devam edildi. Deney sonunda tüm gruplardan biyokimyasal analiz için kan örneği ve histopatolojik değerlendirme için femoral arter ve gastroknemius kas doku örneği alındı. Kan örneklerinde malondialdehid serum düzeyleri ölçüldü. Femoral arter ve gastroknemius kas doku örnekleri formaldehit ile fikse edildi. Ardından kesitler hazırlanarak ışık mikroskobu altında hematoksilen eozinle ve immünohistokimyasal değerlendirme yapıldı. İmmünohistokimyasal değerlendirmede tümör nekrozis faktör α ve hipoksi indükleyici faktör-1 α bakıldı. Biyokimyasal incelemede serum malaondialdehid düzeylerinde iskemi reperfüzyon grubunda kontrol grubuna göre anlamlı derecede artış saptandı. Sildenafil ve n-asetilsistein gruplarında ise iskemi/reperfüzyon grubuna göre anlamlı düzeyde azalma tespit edildi. Histopatolojik incelemede gruplar karşılaştırıldığında iskemi/reperfüzyon grubuna göre iskemi/reperfüzyon+sildenafil ve iskemi/reperfüzyon+n-

asetilsistein grupları lehine anlamlı değişiklikler tespit edildi. Sonuç olarak sildenafil ve n-asetilsisteinin vazodilatatör ve oksidatif stresi azaltıcı etkisi ile mikrodolaşımı koruyarak alt ekstremite iskemilerinde reperfüzyon sonrası femoral arter endoteli ve gastroknemius kasında gelişecek hasarı azaltabileceği düşüncesindeyiz.

Anahtar Kelimeler: İskemi, reperfüzyon, femoral arter endoteli, gastroknemius kası, sildenafil, n-asetilsistein

THE EFFECTS OF SILDENAFIL AND N-ACETYLCYSTEIN ON EXPERIMENTAL AORTIC ISCHEMIA/REPERFUSION INJURY IN FEMORAL ARTERY ENDOTHELIUM AND GASTROCNEMIUS MUSCLE

SUMMARY

This experimental study examines the effect of sildenafil and n-acetylcystein on ischemia/reperfusion injury in femoral artery endothelium and gastrocnemius muscle following occlusion-reperfusion of infrarenal abdominal aorta in rats. 32 rats of Sprague-Dawley breed were randomly divided into 4 groups of equal size (n=8). Rats in the control group were subjected to median laparotomy and dissection, then were kept under observation for the total duration of experimentation on other groups. Rats in the ischemia/reperfusion group were performed median laparotomy, then a 120-minute ischemia was created by microvascular clamping of infrarenal aorta, which was followed by the release of clamping and a 120-minute reperfusion. Sildenafil group, in addition to the procedure steps applied to ischemia/reperfusion group, was given 1mg/kg of sildenafil infusion 15 minutes prior to the removal of clamping, infusion was continued throughout the reperfusion. In addition to the procedures applied to ischemia/reperfusion group, 100 mg/kg of n-acetylcystein infusion was administered to n-acetylcystein group 15 minutes before the release of clamps, the infusion was continued throughout the reperfusion. At the end of the experiment, blood samples were withdrawn from all groups for biochemical analysis and tissue samples of femoral artery and gastrocnemius muscle were extracted for a histopathological evaluation. Serum levels of

malondialdehyde were measured in blood samples. Femoral artery and gastrocnemius muscle tissue samples were fixated with formaldehyde. Afterwards, specimen sections were prepared before going into immunohistochemical evaluation with hematoxylin eosin under optical microscope. The specimens were examined for tumor necrosis factor α and hypoxia inducing factor 1 α during immunohistochemical evaluation. Biochemical examination revealed significant increase in serum levels of malondialdehyde in ischemia/reperfusion group compared to the control group, whereas a significant decrease was detected in sildenafil and n-acetylcystein groups in comparison to the control group. When all groups were considered, significant positive differences were detected in ischemia/reperfusion+sildenafil and ischemia/reperfusion+n-acetylcystein groups compared to the ischemia/reperfusion group in histopathological examination. In conclusion, we think that sildenafil and n-acetylcystein, by protecting microcirculation due to vasodilatation and oxidative stress-reducing effects, may reduce femoral artery endothelium and gastrocnemius muscle injury following lower extremity ischemia reperfusions.

Keywords: Ischemia, reperfusion, femoral artery endothelium, gastrocnemius muscle, sildenafil, n-acetylcystein

KAYNAKLAR

1. Ege T. Kalp ve damar hastalıklarında iskemi-reperfüzyon hasarı. Duran E (Editör). Kalp ve Damar Cerrahi. I. Baskı. İstanbul: Çapa Tıp Kitabevi; 2004. s.197-215.
2. Serracino-Inglott F, Habib NA, Mathie RT. Hepatic ischemia-reperfusion injury. Am J Surg 2001;181(2):160-6.
3. Montalvo-Jave EE, Escalante-Tattersfield T, Ortega-Salgado JA, Piña E, Geller DA. Factors in the pathophysiology of the liver ischemia-reperfusion injury. J Surg Res 2008;147(1):153-9.
4. Siemionow M, Arslan E. Ischemia/reperfusion injury: a review in relation to free tissue transfers. Microsurgery 2004;24(6):468-75.
5. 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.
6. Kumar V, Cotran RS, Robbins SL. Hücre zedelenmesi adaptasyonu ve ölümü (çeviri: U. Çevikbaş). Çevikbaş U (Ed.). Robbins temel patoloji 6th ed. İstanbul: Nobel Tıp Kitabevi; 2000. s.3-24.
7. Tekin İ. İloprost'un deneysel aortik iskemi-reperfüzyon modelinde femoral arter endoteli ve gastrokinemius kası hasarı üzerine etkisi (tez). Isparta. Süleyman Demirel Üniversitesi Tıp Fakültesi 2007.
8. Carden DL, Granger DN. Pathophysiology of ischaemia-reperfusion injury. J Pathol 2000; 190:255-66.
9. Homer-Vanniasinkam S, Crinnion JN, Gough MJ: Post-ischaemic organ dysfunction: a review. Eur J Vasc Endovasc Surg 1997;14:195-203.

10. Seal JB, Gewertz BL. Vascular dysfunction in ischemia-reperfusion injury. *Ann Vasc Surg* 2005;19(4):572-84.
11. Norwood MGA, Bown MJ, Sayers RD. Ischemia-reperfusion injury and regional inflammatory responses in abdominal aneurysm repair. *Eur J Vasc Endovasc Surg* 2004;28:234-45.
12. Blaisdell FW. The pathophysiology of skeletal muscle ischemia and the reperfusion syndrome: a review. *Cardiovasc Surg* 2002;10:620-30.
13. Stein I, Itin A, Einat P, Skaliter R, Grossman Z, Keshet E. Translation of vascular endothelial growth factor mRNA by internal ribosome entry: implications for translation under hypoxia. *Mol Cell Biol* 1998;18,3112–9.
14. Forsythe J, Jiang B, Iyer N. Activation of vascular endothelial growth factor gene transcription by hypoxia-inducible factor 1. *Mol Cell Biol* 1996;16,4604–13.
15. Semenza GL. HIF-1: mediator of physiological and pathophysiological responses to hypoxia. *J Appl Physiol* 2000;88,1474–80.
16. Lehninger AL. Generation of ATP in anaerobic cell. In: *Bioenergetics*. ed 2 Menlo park, Calif:WA Benjamin 1971:53-71.
17. 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.
18. Anaya-Prado R, Toledo-Pereyra LH. The molecular events underlying ischemia/reperfusion injury. *Transplant Proc* 2002;34(7):2518-9.
19. Paschen W. Role of calcium in neuronal cell injury: which subcellular compartment is involved? *Brain Res Bull* 2000;1;53(4):409-13.
20. Cerra FB, Lajos TZ, Montes M, Siegel JH. Hemorrhagic infarction: A reperfusion injury following prolonged myocardial ischemic anoxia. *Surgery* 1975;78(1):95-104
21. Granger DN. Ischemia–reperfusion: mechanisms of microvascular dysfunction and the influence of risk factors for cardiovascular disease. *Microcirculation* 1999; 6:167–78.
22. Hatanaka N, Kamike W, Shimizu S. Ca²⁺ release from mitochondria induces cytosolic enzyme leakage in anoxic liver. *J Surg Res* 1995; 58:485–90.
23. Schoenberg MH, Beger HG. Reperfusion injury after intestinal ischemia. *Crit Care Med* 1993; 21:1376–86.

24. McMichael M, Moore RM. Ischemiareperfusion injury pathophysiology, part I. *Journal of Veterinary Emergency and Critical Care* 2004;14 (4): 231–41.
25. Heinzelmann M, Mercer-Jones MA, Passmore JC. Neutrophils and renal failure. *Am J Kidney Dis* 1999;34(2):384-99.
26. Kiriş İ, Okutan H, Savaş Ç, Yönden Z, Delibaş N. Deneysel aortik iskemi-reperfüzyon modelinde renal hasara gadolinyum klorürün etkisi. *Turkish J Vasc Surg* 2005;14(2):13-18.
27. Zimmerman BJ, Granger DN. Reperfusion injury. *Surg Clin North Am* 1992;72(1):65-83.
28. Şener G, Yeğen BÇ. İskemi reperfüzyon hasarı. *Klinik Gelişim Derg* 2009;22(3):5-14.
29. Davies SJ, Reichardt-Pascal SY, Vaughan D, Russell GI. Differential effect of ischaemia-reperfusion injury on anti-oxidant enzyme activity in the rat kidney. *Exp Nephrol* 1995;3(6):348-54.
30. Reiter RJ, Acuña-Castroviejo D, Tan DX, Burkhardt S. Free radical-mediated molecular damage. Mechanisms for the protective actions of melatonin in the central nervous system. *Ann N Y Acad Sci* 2001;939:200-15.
31. Anaya-Prado R, Toledo-Pereyra LH, Lentsch AB, Ward PA. Ischemia/reperfusion injury. *The Surg Res* 2002;105(2):248-58.
32. Lefer AM, Lefer DJ. The role of nitric oxide and cell adhesion molecules on the microcirculation in ischaemia-reperfusion. *Cardiovasc Res* 1996;32(4):743-51.
33. Wink DA, Mitchell JB. Chemical biology of nitric oxide: insights into regulatory, cytotoxic, and cytoprotective mechanisms of nitric oxide. *Free Radic Biol Med* 1998;25(4-5):434-56.
34. Phillips L, Toledo AH, Lopez-Neblina F, Anaya-Prado R, Toledo-Pereyra LH. Nitric oxide mechanism of protection in ischemia and reperfusion injury. *J Invest Surg* 2009;22(1):46-55.
35. Kingston R, Kelly CJ, Murray P. The therapeutic role of taurine in ischaemia-reperfusion injury. *Curr Pharm Des* 2004;10(19):2401-10.
36. Springer TA. Traffic signals for lymphocyte recirculation and leukocyte emigration: the multistep paradigm. *Cell* 1994; 76: 301-14.
37. Granger DN, Kubes P The microcirculation and inflammation: Modulation of leukocyte-endothelial cell adhesion. *J Leukocyte Biol* 1994;55:662

38. Jassem W, Roake J. The molecular and cellular basis of reperfusion injury following organ transplantation. *Transplant Rev* 1998;12:14.
39. Serizawa A, Nakamura S, Suzuki S, Baba S, Nakano M. Involvement of platelet-activating factor in cytokine production and neutrophil activation after hepatic ischemia-reperfusion. *Hepatology* 1996;23(6):1656-63.
40. Doğan AL, Çimen E, Oskay S, Öksüz S, Güç D. Meme kanseri hücre dizilerinde HIF-1 alfa ekspresyonunun PI3K/Akt yoluyla inhibitörleri ile kontrolü. *Turk J Biochem* 2012; 37(3);264–71.
41. Shafee N, Kaluz S, Ru N, Stanbridge EJ. PI3K/Akt activity has variable cell-specific effects on expression of HIF target genes, *CA9* and *VEGF*, in human cancer cell lines. *Cancer Lett* 2009;282(1):109-15.
42. Semenza GL. Defining the role of hypoxia-inducible factor 1 in cancer biology and therapeutics. *Oncogene* 2010; 29(5):625-34.
43. Semenza GL. Oxygen sensing, homeostasis, and disease. *N Engl J Med* 2011; 365(6):537-47.
44. Patiar S, Harris AL. Role of hypoxia-inducible factor-1 α as a cancer therapy target. *Endocrine-Related Cancer* 2006; 13:61-75.
45. Semenza GL. Evaluation of HIF-1 inhibitors as anticancer agents. *Cancer Lett* 2007;12(19-20):853-59.
46. Weidemann A, Johnson RS. Biology of HIF-1 alpha. *Cell Death Differ* 2008; 15(4):621-27.
47. Otamiri T, Lindahl M, Tagesson C. Phospholipase A2 inhibition prevents mucosal damage associated with small intestinal ischaemia in rats. *Gut* 1988; 29:489–94.
48. 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, 2911–17.
49. Majno G, Ames A III, Chiang J. No reflow after cerebral ischemia. *Lancet* 1967; 2:569–70.
50. Klinger MH, Jelkmann W. Role of blood platelets in infection and inflammation. *J Interferon Cytokine Res* 2002;22:913–22.
51. Gawaz M. Role of platelets in coronary thrombosis and reperfusion of ischemic myocardium. *Cardiovasc Res* 2004 Feb 15;61(3):498-511.

52. Kuijper PH, Gallardo Torres HI, van der Linden JA. Platelet-dependent primary hemostasis promotes selectin and integrin-mediated neutrophil adhesion to damaged endothelium under flow conditions. *Blood* 1996; 87:3271–81.
53. Krötz F, Sohn HY, Pohl U. Reactive oxygen species: Players in the platelet game. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2004;24:1988-96.
54. Diacovo TG, Roth SJ, Buccola JM, Bainton DF, Springer TA. Neutrophil rolling, arrest, and transmigration across activated, surface adherent platelets via sequential action of P-selectin and the beta 2-integrin CD11b/CD18. *Blood* 1996;88:146– 57.
55. Thrane AS, Skehan JD, Thrane PS. A novel interpretation of immune redundancy and duality in reperfusion injury with important implications for intervention in ischaemic disease. *Med Hypotheses* 2007;68(6):1363-70.
56. Zhang W, Smith C, Shapiro A, Monette R, Hutchison J, Stanimirovic D. Increased expression of bioactive chemokines in human cerebrovascular endothelial cells and astrocytes subjected to simulated ischemia in vitro. *J Neuroimmunol* 1999;101(2):148-60.
57. Parvums DV. The pathology of ischemia-reperfusion. In: Grace PA, and Mathie RT, editors. *Ischemia-reperfusion injury*. London: Blackwell Science, 1999; 3–19.
58. 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;272:21420-26.
59. Rosenblum WI. Selective impairment of response to acetylcholine after ischemia/reperfusion in mice. *Stroke* 1997;28:448-451 discussion 451–52.
60. Iraculis E, Cequier A, Gomez-Hospital JA. Early dysfunction and long-term improvement in endothelium dependent vasodilation in the infarct-related artery after thrombolysis. *J Am Coll Cardiol* 2002;40:257-65.
61. 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;38:212-18.
62. Haimovici H. *Metabolic complications of acute arterial occlusions and related conditions: myoneuropathic-metabolic syndrome*. Futura Publ Co, Mount Kisco, NY, 1988.
63. Belkin M, Brown RD, Wright JG. A new quantitative spectrophotometric assay of ischemia reperfusion injury in skeletal muscle. *Am J Surg* 1988;156, 83–6.
64. Panés J, Perry M, Granger DN. Leukocyte-endothelial cell adhesion: avenues for therapeutic intervention. *Br J Pharmacol* 1999;126(3):537-50.

65. Valko M, Leibfritz D, Moncol J, Cronin MT, Mazur M, Telser J. Free radicals and antioxidants, in normal physiological functions and human disease. *Int J Biochem Biol* 2007;39:44-84.
66. Şehirli AO. Renal iskemi reperfüzyon hasarında melatoninin koruyucu etkisi (tez). Marmara Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü; 2001.
67. Canbaz S, Duran E, Ege T, Sunar H, Cıkırıkçıoğlu M, Acıpayam M. The effects of intracoronary administration of vitamin E on myocardial ischemia-reperfusion injury during coronary artery surgery. *Thorac Cardiovasc Surg* 2003;51:57-61.
68. Akar H, Sarac A, Konuralp C. Comparison of histopathologic effects of carnitine and ascorbic acid on reperfusion injury. *Eur J Cardio-thorac Surg* 2001;19:500-6.
69. Reiter RJ, Tan DX. Melatonin: a novel protective agent against oxidative injury of the ischemic-reperfused heart. *Cardiovasc Surg* 2003;58:10-9.
70. VIAGRA™ 25 mg film kaplı tablet Pfizer İlaçları Ltd. Şti. İstanbul, Türkiye. Prospektüs
71. Soydan G. Sıçan mezenter iskemi-reperfüzyon modelinde mezenter arter ve ileumdaki fonksiyonel ve yapısal değişiklikler üzerine sildenafilin etkileri (tez). Ankara. Hacettepe Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü 2007.
72. Lucas KA, Pitari GM, Kazerounian S, Ruiz-Stewart I, Park J, Schulz S, et al. Guanylyl cyclases and signaling by cyclic GMP. *Pharmacol Rev* 2000;52:375–414.
73. Corbin JD, Francis SH. Pharmacology of phosphodiesterase-5 inhibitors. *Int J Clin Pract* 2002;56(6):453-59.
74. Milligan PA, Marshall SF, Karlsson MO. A population pharmacokinetic analysis of sildenafil citrate in patients with erectile dysfunction. *Br J Clin Pharmacol* 2002;53:45S–52S.
75. Bocchi EA, Guimaraes G, Mocelin A, Bacal F, Bellotti G, Ramires JF. Sildenafil effects on exercise, neurohormonal activation, and erectile dysfunction in congestive heart failure: a double-blind, placebo-controlled, randomized study followed by a prospective treatment for erectile dysfunction. *Circulation* 2002;106(9):1097-103.
76. Reffelmann T, Kloner RA. Therapeutic potential of phosphodiesterase 5 inhibition for cardiovascular disease. *Circulation* 2003;108(2):239-44.
77. Gürcün U, Kurtoğlu T, Dişçigil B, Özkısacık E, Boğa M, Yenisey Ç. Sıçan iskelet kası iskemi-reperfüzyon modelinde iskemik ön koşullama ve N-asetilsistein: Antioksidan tedavi iskemik ön koşullamayı etkiliyor mu? *Türk Göğüs Kalp Damar Cer Derg* 2012;20(4):862-8.

78. ASİST® 300 mg/3 ml (%10) solüsyon içeren ampul Hüsnü Arsan İlaçları A.Ş. İstanbul, Türkiye. Prospektüs
79. Ayvaz S. N-Asetilsistenin intestinal iskemi reperfüzyon hasarına etkisi (tez). Edirne. Trakya Üniversitesi Tıp Fakültesi. 2005.
80. Stewart S, Ryan C, Poropat S. Managing patients with acute myocardial ischemia and reperfusion injury with N-acetylcysteine. *Dimens Crit Care Nurs* 1997; 16(3):122-31.
81. Sehirli AO, Sener G, Satiroglu H, Ayanoglu-Dulger G. Protective effect of N-acetylcysteine on renal ischemia/reperfusion injury in the rat. *J Nephrol* 2003; 16(1):75-80.
82. Ohkawa H, Ohishi N, Yagi K. Assay for lipid peroxides in animal tissues by thiobarbituric acid reaction. *Anal Biochem* 1979;95(2):351-8.
83. Khandoga A, Enders G, Biberthaler P, Krombach F. Poly(ADP-ribose) polymerase triggers the microvascular mechanisms of hepatic ischemia-reperfusion injury. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 2002;283:553-60.
84. Yoshimura H, Dhar DK, Kohno H, Kubota H, Fujii T, Ueda S, et al. Prognostic impact of hypoxia-inducible factors 1alpha and 2alpha in colorectal cancer patients: correlation with tumor angiogenesis and cyclooxygenase-2 expression. *Clin Cancer Res* 2004 Dec 15;10(24):8554-60.
85. İşcan Ş. Alt ekstremitenin deneysel iskemi/reperfüzyon modelinde gelişen reperfüzyona bağlı akciğer hasarına iloprost'un etkilerinin araştırılması (tez). Edirne: Trakya Üniversitesi Tıp Fakültesi; 2012.
86. Uysal A, Burma O, Akar İ, Özsin KK, Rahman A, Üstündağ B ve ark. Alt ekstremitte iskemi reperfüzyonunun yol açtığı akciğer hasarında melatoninin koruyucu etkinliği. *Türk Göğüs Kalp Damar Cer Derg* 2006;14(4):308-14.
87. Yetkin U, Karabay Ö, Duru LS. Alt ekstremitte iskemi reperfüzyonuna bağlı gelişen akciğer hasarının önlenmesi. *DEÜ Tıp Fakültesi Dergisi* 2003;253-8.
88. Yassin MMI, Harkin DW, Barrsos AAB, Halliday MI, Rowlands BJ, Lower limb ischemia-reperfusion injury triggers a systemic inflammatory response and multiple organ dysfunction. *World J Surg* 2002;26:115-21.
89. Saba D, Yavuz H, Şenkaya I, Ağrış M, Dirican M, Serdar Z ve ark. Kalsiyum dobesilatın iskelet kası iskemi-reperfüzyon hasarındaki rolü. *Turkish J Thorac and Cardiovasc Surg* 2000;8:797-801.
90. Arslan K. Alt ekstremitenin deneysel iskemi reperfüzyon modelinde gelişen reperfüzyona bağlı börek hasarına Papaverin ve Vitamin C (Askorbik asit)'nin etkilerinin araştırılması (tez). Edirne: Trakya Üniversitesi Tıp Fakültesi; 2012.

91. Badhwar A, Dungey AA, Harris KA, Scott JA, McCarter SD, Scott JR et al. Limitations of ischemic tolerance in oxidative skeletal muscle: perfusion vs tissue protection. *J Surg Res* 2003;109(1):62-7.
92. Gülmen Ş, Doğuç DK, Ceylan BG, Çetin NK, Meteöglü İ, Okutan H ve ark. Deneysel aortik iskemi-reperfüzyonda beta-glukanın böbrek hasarı üzerine etkisi. *Türk Göğüs Kalp Damar Cer Derg* 2011;19(2):234-41.
93. Hardy SC, Homer-Vanniasinkam S, Gough MJ. The triphasic pattern of skeletal muscle blood flow in reperfusion injury: an experimental model with implications for surgery on the acutely ischaemic lower limb. *Eur J Vasc Surg* 1990;4(6):587-90
94. Karaca Ş, Güder H. Dermatolojide antioksidan sistem. *Turk J Dermatol* 2009;3:32-9.
95. Collard CD, Gelman S. Pathophysiology, clinical manifestations, and prevention of ischemia-reperfusion injury. *Anesth* 2001;94(6):1133-8.
96. Duran WN, Pappas PJ, Boric MP, Hobsor RW. Pathophysiology of skeletal muscle ischemia-reperfusion injury. In: Henry Haimovici (Ed.). *Haimovici's Vascular Surgery, Fifth Edition*, Maiden, Massachusetts, USA: Blackwell Publishing, 2004;31:373-87.
97. Sternberg WC III, Makhoul RG, Adelman B. Heparin prevents post-ischemic endothelial cell dysfunction by a mechanism independent of its anticoagulant activity. *J Vasc Surg* 1993;17:318-27.
98. Jacobs CH, McCarthy WJ. Limb salvage and revascularization. In: Caralis DG, Bakris GL (Eds.). *Lower extremity arterial disease*. Humana Press Totowa New Jersey 2005;13:268-92.
99. Harward TRS, Wellborn B, Martin TD, Flynn TC, Huber TS, Moldaver LL, et al. Visceral ischemia and organ dysfunction after thoracoabdominal aortic aneurism repair. *Ann Surg* 1996;223:6,729-36.
100. Norwood MGA, Bown MJ, Sayers RD. Ischemia-reperfusion injury and regioal inflammatory responses in abdominal aortic aneurysm repair. *Eur J Vasc Endovasc Surg* 2004;28:234-45.
101. Kiris I, Kapan Ş, Kılbas A, Yılmaz N, Atuntaş I, Karahan N ve ark. The Protective effect of erythropoietin on renal injury induced by abdominal aortic-ischemia-reperfusion in rats. *J Surg Res*. 2008;149:206-13.
102. Gündüz D, Kasseckert SA, Härtel FV, Aslam M, Abdallah Y, Schäfer M et al. Accumulation of extracellular ATP protects against acute reperfusion injury in rat heart endothelial cells. *Cardiovasc Res* 2006;71(4):764-73.

103. Narin C, Kiris I, Gülmen S, Toy H, Yilmaz N, Sütcü R. Endothelin receptor blockade with tezosentan ameliorates myocardial injury induced by abdominal aortic ischemia-reperfusion. *Tohoku J Exp Med* 2008;216(3):267-76.
104. Halcox JP, Nour KR, Zalos G, Mincemoyer RA, Waclawiw M, Rivera CE, et al. The effect of sildenafil on human vascular function, platelet activation, and myocardial ischemia. *J Am Coll Cardiol* 2002;40(7):1232-40.
105. Fox KM, Thadani U, Ma PT, Nash SD, Keating Z, Czorniak MA, et al. Sildenafil citrate does not reduce exercise tolerance in men with erectile dysfunction and chronic stable angina. *Eur Heart J* 2003;24(24):2206-12.
106. Bhatia S, Frantz RP, Severson CJ, Durst LA, McGoon MD. Immediate and long-term hemodynamic and clinical effects of sildenafil in patients with pulmonary arterial hypertension receiving vasodilator therapy. *Mayo Clin Proc* 2003;78(10):1207-13.
107. Gori T, Sicuro S, Dragoni S, Donati G, Forconi S, Parker JD. Sildenafil prevents endothelial dysfunction induced by ischemia and reperfusion via opening of adenosine triphosphatesensitive potassium channels: a human in vivo study. *Circulation* 2005;111(6):742-6.
108. Das S, Maulik N, Das DK, Kadowitz PJ, Bivalacqua TJ. Cardioprotection with sildenafil, a selective inhibitor of cyclic 3',5'-monophosphate-specific phosphodiesterase 5. *Drugs Exp Clin Res* 2002;28(6):213-9.
109. Fisher PW, Salloum F, Das A, Hyder H, Kukreja RC. Phosphodiesterase-5 inhibition with sildenafil attenuates cardiomyocyte apoptosis and left ventricular dysfunction in a chronic model of doxorubicin cardiotoxicity. *Circulation* 2005;111(13):1601-10.
110. Dias-Junior CA, Souza-Costa DC, Zerbini T, da Rocha JB, Gerlach RF, Tanus-Santos JE. The effect of sildenafil on pulmonary embolism-induced oxidative stress and pulmonary hypertension. *Anesth Analg* 2005;101(1):115-20
111. Das A, Xi L, Kukreja RC. Phosphodiesterase-5 inhibitor sildenafil preconditions adult cardiac myocytes against necrosis and apoptosis. Essential role of nitric oxide signaling. *J Biol Chem* 2005;280(13):12944-55.
112. Ockaili R, Salloum F, Hawkins J, Kukreja RC. Sildenafil (Viagra) induces powerful cardioprotective effect via opening of mitochondrial K(ATP) channels in rabbits. *Am J Physiol. Heart Circ Physiol* 2002;283(3):1263-9.
113. Salloum F, Yin C, Xi L, Kukreja RC. Sildenafil induces delayed preconditioning through inducible nitric oxide synthase-dependent pathway in mouse heart. *Circ Res* 2003;92(6):595-7.

114. Kukreja RC, Salloum F, Das A, Ockaili R, Yin C, Bremer YA, et al. Pharmacological preconditioning with sildenafil: Basic mechanisms and clinical implications. *Vascul Pharmacol* 2005;42(5-6):219-32
115. Salloum FN, Takenoshita Y, Ockaili RA, Daoud VP, Chou E, Yoshida K, et al. Sildenafil and vardenafil but not nitroglycerin limit myocardial infarction through opening of mitochondrial K(ATP) channels when administered at reperfusion following ischemia in rabbits. *J Mol Cell Cardiol* 2007;42(2):453-8.
116. Rossoni G, Manfredi B, De Gennaro Colonna V, Berti M, Guazzi M, Berti F. Sildenafil reduces L-NAME-induced severe hypertension and worsening of myocardial ischaemia reperfusion damage in the rat. *Br J Pharmacol* 2007;150(5):567-76.
117. Katnik C, Adams DJ. An ATP-sensitive potassium conductance in rabbit arterial endothelial cells. *J Physiol* 1995;485(3):595–606.
118. Karatza AA, Bush A, Magee AG. Safety and efficacy of Sildenafil therapy in children with pulmonary hypertension. *Int J Cardiol* 2005;100(2):267-73.
119. Özbek H, Güler N, Aydın S, Eryonucu B, Bilge M. Sildenafil'in sıçan aortasına etkileri *Ana Kar Der* 2001;1:23-6.
120. Yeğinsu A, Ergin M, Gürlek K, Şaylan O. Akciğer kontüzyonunda sildenafilin etkileri. *Turkish J Thorac Cardiovasc Surg* 2011;19(4):613-7
121. Iseri SO, Ersoy Y, Ercan F, Yuksel M, Atukeren P, Gumustas K, et al. The effect of sildenafil, a phosphodiesterase-5 inhibitor, on acetic acid-induced colonic inflammation in the rat. *J Gastroenterol Hepatol* 2009;24:1142-8.
122. Perk H, Armagan A, Naziroğlu M, Soyupek S, Hoscan MB, Sütcü R, et al. Sildenafil citrate as a phosphodiesterase inhibitor has an antioxidant effect in the blood of men. *J Clin Pharm Ther* 2008;33:635-40.
123. Milara J, Juan G, Ortiz JL, Guijarro R, Losada M, Serrano A, et al. Cigarette smoke-induced pulmonary endothelial dysfunction is partially suppressed by sildenafil. *Eur J Pharm Sci* 2010;39:363-72
124. Yildirim A, Ersoy Y, Ercan F, Atukeren P, Gumustas K, Uslu U, et al. Phosphodiesterase-5 inhibition by sildenafil citrate in a rat model of bleomycin-induced lung fibrosis. *Pulm Pharmacol Ther* 2010;23:215-21.
125. de Visser YP, Walther FJ, Laghmani el H, Boersma H, van der Laarse A, Wagenaar GT. Sildenafil attenuates pulmonary inflammation and fibrin deposition, mortality and right ventricular hypertrophy in neonatal hyperoxic lung injury. *Respir Res* 2009;10(30):1-16.

126. Güven A, Tunç T, Atabek C, Uysal B, Topal T, Erdoğan E, Korkmaz A, Öztürk H. Sıçanlarda intestinal iskemi/reperfüzyon hasarında n-asetilsisteinin ve ebselenin etkileri. *Türkiye Klinikleri J Cardiovasc Sci* 2008; 20:1-7.
127. Erdem K, Yavuz C, Çakır Ö. Medulla spinalisin iskemi-reperfüzyon hasarını önlemede kullanılan n-asetil sisteinin alt ekstremitte motor fonksiyonlarına etkisi. *Yeni Tıp Dergisi* 2012;29(4):214-7.
128. Kurtuluş H, Eskioçak S, Tütüncüler F, Başaran ÜN, Gülen Ş. Deneysel sistemik hipoksi geliştirilmiş yenidoğan ratlarda n-asetilsistein uygulamasının etkileri. *Turk J Biochem*, 2003; 28 (2); 40-4.
129. Tekin D, Dursun AD, Baştuğ M, Karaorman G, Fıçıcılar H. The effects of acute and intermittent hypoxia on the expressions of HIF-1 α and VEGF in the left and right ventricles of the rabbit heart. *Anadolu Kardiyol Derg* 2011; 11: 379-85
130. Stroka DM, Burkhardt T, Desbaillets I, Wenger RH, Neil DA, Bauer C, Gassmann M, Candinas D. HIF-1 is expressed in normoxic tissue and displays an organ-specific egulation under systemic hypoxia. *FASEB J* 2001;15(13):2445-53.
131. Vogt M, Puntchart A, Geiser J, Zuleger C, Billeter R, Hoppeler H. Molecular adaptations in human skeletal muscle to endurance training under simulated hypoxic conditions. *J Appl Physiol* 2001;91(1):173-82.
132. Lundby C, Pilegaard H, Andersen JL, van Hall G, Sander M, Calbet JA. Acclimatization to 4100 m does not change capillary density or mRNA expression of potential angiogenesis regulatory factors in human skeletal muscle. *J Exp Biol* 2004;207(Pt 22):3865-71.
133. Molecular and morphological modifications occurring in rat heart exposed to intermittent hypoxia: role for protein kinase C alpha. *Exp Gerontol* 2004;39(3): 395-405.
134. Song-Ming C, Yu-Guang L, Hong-Xuan Z, Guo-Hong Z, Jia-Ru L, Chun-Jiang T, Dong-Ming W, Xiao-Yi F, Rui-Qin M. Hypoxia-inducible factor-1alpha induces the coronary collaterals for coronary artery disease. *Coron Artery Dis* 2008;19(3):173-9.
135. 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.
136. Wei W, Wei FC, Hung LM. Diazoxide ameliorates microcirculatory disturbances through PKCdependent pathway in I/R-injured rat cremaster muscles. *J Biomed Sci* 2005;12(3):521-9.
137. 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.

138. 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.
139. 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. *Tokyo:Leg Med* 2003 Mar;5 Suppl 1:S271-4.
140. Katircioglu SF, Saritas Z, Ulus AT, Yamak B, Yücel D, Ayaz S. Iloprost added to the cardioplegic solutions improves myocardial performance. *Prostaglandins Other Lipid Mediat* 1998;55;51-65.

EKLER

Ek 1

T.C.

TRAKYA ÜNİVERSİTESİ
HAYVAN DENEYLERİ YEREL ETİK KURULU KARARLARI

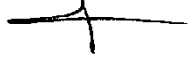
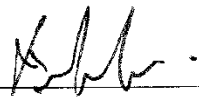
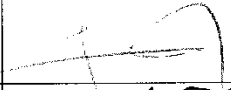
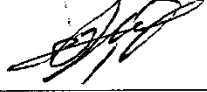
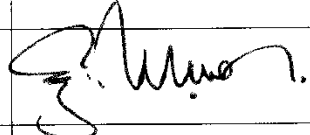
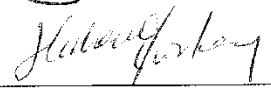
EDİRNE

Oturum Sayısı: 02

Karar Tarihi: 30.03.2012

KARAR NO: 2012.02.09

Yürütücülüğünü Tıp Fakültesi öğretim üyesi Prof.Dr. Suat CANBAZ'ın yaptığı , Arş.Gör.Dr. Volkan AKSU'nun Tıpta uzmanlık tezi olarak planlanan TÜHDYEK-2012/24 protokol nolu "Deneysel Aortik İskemi-Reperfüzyon Modelinde Sildenafil ve N-Asetil Sistein' in Femoral Arter Endoteli ve Gastroknemius Kası Hasarı Üzerine Etkisi ası" başlıklı çalışma görüşme başlıklı çalışma hakkında görüşüldü; araştırmanın amaç, yaklaşım, gereç ve yöntemler dikkate alınarak incelenmesi sonucunda: Hayvan Hakları Evrensel Bildirgesi ve etik kurallara uygun olarak hazırlandığına ve Radyasyon Güvenlik Komitesi olurundan sonra çalışmanın yapılabileceğine mevcudun oy birliği ile karar verilmiştir

Ünvanı/Adı/Soyadı	Araştırma ile İlişki	Toplantı Katılımı	İmza
Yrd.Doç.Dr. Burhan AKSU Tıp Fakültesi Öğretim Üyesi	<input type="checkbox"/> var <input type="checkbox"/> yok	<input type="checkbox"/> evet <input type="checkbox"/> hayır	
Yrd.Doç. Dr. Hayati ARDA Fen-Edebiyat Fakültesi Öğretim Üyesi	<input type="checkbox"/> var <input type="checkbox"/> yok	<input type="checkbox"/> evet <input type="checkbox"/> hayır	
Vet.Hek. Ziya ÇUKUR Veteriner Hekim	<input type="checkbox"/> var <input type="checkbox"/> yok	<input type="checkbox"/> evet <input type="checkbox"/> hayır	
Hüseyin KOÇ Sivil Toplum Örgütü Üyesi Sivi Üye	<input type="checkbox"/> var <input type="checkbox"/> yok	<input type="checkbox"/> evet <input type="checkbox"/> hayır	
Yrd.Doç.Dr. Beytullah ÖZKAN Fen-Edebiyat Fakültesi Öğretim Üyesi	<input type="checkbox"/> var <input checked="" type="checkbox"/> yok	<input checked="" type="checkbox"/> evet <input type="checkbox"/> hayır	
Yrd.Doç.Dr. Y. Atakan SEZER Tıp Fakültesi Öğretim Üyesi	<input type="checkbox"/> var <input type="checkbox"/> yok	<input type="checkbox"/> evet <input type="checkbox"/> hayır	
Doç. Dr. Enis ULUÇAM Tıp Fakültesi Öğretim Üyesi	<input type="checkbox"/> var <input type="checkbox"/> yok	<input type="checkbox"/> evet <input type="checkbox"/> hayır	
Yrd.Doç.Dr.Hakan GÜRKAN Tıp Fakültesi Öğretim Üyesi	<input type="checkbox"/> var <input type="checkbox"/> yok	<input type="checkbox"/> evet <input type="checkbox"/> hayır	
Osman GÜLTEKİN Sivil Üye	<input type="checkbox"/> var <input type="checkbox"/> yok	<input type="checkbox"/> evet <input type="checkbox"/> hayır	