



**T.C.
SAKARYA ÜNİVERSİTESİ
TIP FAKÜLTESİ
ANESTEZİYOLOJİ VE REANİMASYON
ANABİLİM DALI**

**RATLARDA ALT EKSTREMİTE İSKEMİ REPERFÜZYON
HASARINDA AMANTADİNİN FARKLI DOZLARININ
AKCİĞER DOKUSUNDAKİ ETKİLERİNİN
KARŞILAŞTIRILMASI**

**UZMANLIK TEZİ
DR. NEVCİHAN ŞAHUTOĞLU BAL**

OCAK 2020

T.C.
SAKARYA ÜNİVERSİTESİ
TIP FAKÜLTESİ
ANESTEZİYOLOJİ VE REANİMASYON
ANABİLİM DALI

RATLARDA ALT EKSTREMİTE İSKEMİ REPERFÜZYON
HASARINDA AMANTADİNİN FARKLI DOZLARININ
AKCİĞER DOKUSUNDAKİ ETKİLERİNİN
KARŞILAŞTIRILMASI

UZMANLIK TEZİ
Dr. NEVCİHAN ŞAHUTOĞLU BAL

DANIŞMAN
Doç. Dr. AYÇA TAŞ TUNA

OCAK 2020



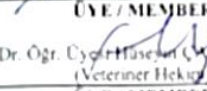


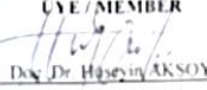


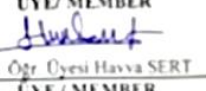

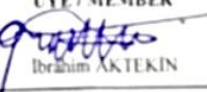
Sevgili eşim ve meslektaşım Dr. Ali BAL'a...

Kızımız Nisan'a...

ONAY

SAKARYA ÜNİVERSİTESİ HAYVAN DENEYLERİ YEREL ETİK KURULU ARAŞTIRMA ONAY BELGESİ

SAKARYA UNIVERSITY ANIMAL EXPERIMENTS LOCAL ETHIC COMMITTEE RESEARCH APPROVAL CERTIFICATE

Araştırmanın Adı <i>Title of the Research</i>	Ratlarda Alt Ekstremitte İskemi Reperfüzyon Hasarında Amantadinin Farklı Dozlarının Akciğer Dokusundaki Koruyucu Etkilerinin Karşılaştırılması. Comparison of protective effect of different dose of amantadine on lung tissue in low extremity ischemia/reperfusion injury in rats	
Yürütücü <i>Chief investigator</i>	Doç. Dr. Ayça TAŞ TUNA	
Yrd. Araştırmacı(lar) Co-investigator(s)	Araş. Gör. Nevcihan ŞAHUTOĞLU BAL., Uzm. Dr. Sezen IRMAK GÖZÜKARA	
Araş. Başlama Tarihi/Research Starting Date		
Proje Süresi/Total Time of Project	6 ay	
Kullanılan Hayvan Türü/Animal Species	Rat	
Kullanılan Hayvan Cinsiyeti ve Sayısı/Animal Sex and number	Erkek- 36 adet	
Araş. Destekleyen Kuruluş (varsa) <i>Funding institution(s) (if available)</i>	-	
Destek Şekli ve Miktarı <i>Type and amount of funding</i>	-	
Karar: Sakarya Üniversitesi Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu'nun 06/ 02 / 2019 tarih ve 05 sayılı kararı ile; yukarıda bilgileri verilen araştırma projesinin <input checked="" type="checkbox"/> gerçekleştirilmesinin Uygun Olduğuna Karar Verilmiştir. <input type="checkbox"/> Yeniden düzenlenmesine Karar Verilmiştir. <input type="checkbox"/> gerçekleştirilmesinin Uygun Olmadığına Karar Verilmiştir.		
Decision: With the decision of the Local Ethics Committee of Animal Experiments of Sakarya University dated 06/02/2019 and numbered 05 ; it has been decided that above mentioned research project is <input checked="" type="checkbox"/> Appropriate to carry out. <input type="checkbox"/> Rearranged <input type="checkbox"/> Not Appropriate to carry out.		
	BASKAN/CHAIR  Prof. Dr. M. Ramazan ŞEKİROĞLU	
ÜYE / MEMBER  Prof. Dr. Ali Fuat ERDEM	ÜYE / MEMBER  Dr. Öğr. Üyesi Hüseyin ÇAKIROĞLU (Veteriner Hekim)	ÜYE / MEMBER  Doç. Dr. Pelin TANYERI
ÜYE / MEMBER  Doç. Dr. Kerem KARAMAN	ÜYE / MEMBER  Doç. Dr. Hüseyin AKSOY	ÜYE / MEMBER  Dr. Öğr. Üyesi Sengül DOĞANAY
ÜYE / MEMBER  Dr. Öğr. Üyesi Ahmet KARA	ÜYE / MEMBER katılmadı Dr. Öğr. Üyesi Murat ÇILLI	ÜYE / MEMBER  Dr. Öğr. Üyesi Havva SERT
ÜYE / MEMBER katılmadı Dr. Öğr. Üyesi Mustafa Zahit YILDIZ	ÜYE / MEMBER  Murat YILDIRIM	ÜYE / MEMBER  İbrahim AKTEKİN

BEYAN

Bu çalışma Sakarya Üniversitesi Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu'ndan 06/02/2019 tarihinde onay alınarak hazırlanmıştır. Bu tezin kendi çalışmam olduğunu, planlanmasından yazımına kadar hiçbir aşamasında etik dışı davranışımın olmadığını, tezdeki bütün bilgileri akademik ve etik kurallar içinde elde ettiğimi, tez çalışmasıyla elde edilmeyen bütün bilgi ve yorumlara kaynak gösterdiğimi ve bu kaynakları kaynaklar listesine aldığımı, tez çalışması ve yazımı sırasında patent ve telif haklarını ihlal edici bir davranışımın olmadığını beyan ederim.

Tarih:

01/01/2020

Dr. Nevcihan Şahutoğlu Bal

İmza

TEŞEKKÜR

Tez olarak sunduğum bu çalışma için, değerli destekleri ve katkıları ile tezimin her aşamasında yardımlarını esirgemeyen kıymetli hocam Sayın Doç. Dr. Ayça TAŞ TUNA'ya saygı ve şükranlarımı sunarım.

Meslek hayatımın ilk yıllarını birlikte geçirdiğim ve beni her konuda koşulsuz destekleyen Süleyman Demirel Üniversitesi Tıp Fakültesi Anesteziyoloji ve Reanimasyon Anabilim Dalı'nda görevli saygıdeğer hocalarıma ve mesai arkadaşlarıma sonsuz teşekkürlerimi sunarım. Uzmanlık eğitimim süresince bilgilerinden ve tecrübelerinden yararlandığım, bize her konuda destek olan, yardımlarını ve sonsuz anlayışını bizlerden esirgemeyen Sakarya Üniversitesi Anesteziyoloji ve Reanimasyon Bölümü Klinik ve Eğitim Sorumlusu Sayın Hocam Prof. Dr. Ali Fuat ERDEM'e; ihtisasım boyunca her aşamada sürekli desteğini gördüğüm, üstün bilgi ve deneyimlerinden faydalandığım Sayın Hocam Prof. Dr. Yakup TOMAK'a; bütün tecrübelerini ve bilgi birikimini bize aktaran; anlayışını ve desteğini bizden hiç esirgemeyen Sayın Hocam Doç. Dr. Serbülen Gökhan BEYAZ'a; birlikte çalıştığımız süre boyunca bize her konuda destek olan; saygısı ve eğitmenliğiyle her zaman bize örnek olan Sayın Hocam Prof. Dr. Ümit KARADENİZ'e; her zaman yanımda olan, bilgi ve tecrübelerinden yararlandığım Sayın Hocam Dr. Öğr. Üyesi Onur PALABIYIK'a; desteklerini bizden esirgemeyen Sayın Hocam Dr. Öğr. Üyesi Havva SAYHAN KAPLAN'a en içten teşekkür ve saygılarımı sunarım.

Asistanlığa başladığım ilk günden itibaren uyum içinde çalıştığımız; özellikle tez sürecinde her problemin üstesinden gelmeye yardım eden sevgili meslektaşlarım Dr. Mustafa ORHAN ve Dr. Fatih ŞAHİN başta olmak üzere tüm değerli asistan arkadaşlarıma, bilgi ve tecrübeleriyle eğitimime katkıda bulunan tüm uzmanlarıma, anestezi tekniker ve teknisyenlerine, değerli yoğun bakım ekibine ve ameliyathane çalışanlarına en içten dileklerle teşekkür ederim. Desteğini her konuda hissettiğim, tüm ailesiyle birlikte koşulsuz yanımda olan, kardeşim ve meslektaşım sevgili Tuğçe EBİLOĞLU ŞAHİN'e sonsuz teşekkürler...

Tüm tıp eğitimim boyunca maddi ve manevi olarak desteklerini her zaman yanımda hissettiğim annem ve babama; hayatımın her döneminde sevgi, sabır ve desteği ile daima yanımda olan, varlığı ile bana güç veren sevgili meslektaşım, eşim Dr. Ali BAL'a ve canım kızım Nisan'a sonsuz teşekkürlerimle...

Dr. Nevcihan ŞAHUTOĞLU BAL

SAKARYA, 2020

İÇİNDEKİLER

ONAY.....	i
TEŞEKKÜR	iii
İÇİNDEKİLER	iv
KISALTMALAR	vi
ŞEKİLLER LİSTESİ.....	viii
TABLolar LİSTESİ.....	ix
RESİMLER LİSTESİ.....	x
ÖZET.....	xi
ABSTRACT	xiv
1. GİRİŞ	1
2. GENEL BİLGİLER.....	3
2.1. İSKEMİ	3
2.2. REPERFÜZYON	5
2.3. İSKELET KASINDA İSKEMİ/REPERFÜZYON HASARI	7
2.4. AORTİK İSKEMİ/REPERFÜZYONA BAĞLI GELİŞEN UZAK ORGAN HASARI.....	8
2.5. İSKEMİ/REPERFÜZYON HASARININ FİZYOpatOLOJİSİ	9
2.5.1. Serbest Oksijen Radikalleri	11
2.5.2. Polimorf Nüveli Lökositler (PMNL).....	14
2.5.3. Kompleman Sistemi ve Sitokinler.....	14
2.5.4. Endotel hücresinin rolü	15
2.6. ANTiOKSİDANLAR	15
2.6.1. Antioksidan enzimler	16
2.7. MALONDİALDEHİT (MDA).....	18
2.8. N-METİL D-ASPARTAT (NMDA) ANTAGONİZMASI VE İ/R HASARI.....	19
2.9. AMANTADİN	19
3. GEREÇ VE YÖNTEM.....	21
3.1. DENEK SEÇİMİ.....	21
3.2. KULLANILAN YÖNTEMLER	21
3.3. HOMOJENİZASYON	25
3.4. LİPİD PEROKSİDASYON ANALİZİ	26

3.5. ANTİOKSİDAN ENZİMLERİN ANALİZİ.....	27
3.6. HİSTOPATOLOJİK DEĞERLENDİRME.....	27
3.7. İSTATİSTİKSEL ANALİZ	28
4. BULGULAR	29
5. TARTIŞMA	399
6. SONUÇ.....	466
KAYNAKLAR	477
ÖZGEÇMİŞ.....	622



KISALTMALAR

ADP	: Adenozin difosfat
AMP	: Adenozin monofosfat
ATP	: Adenozin trifosfat
C	: Kompleman
Ca⁺²	: Kalsiyum
CAPE	: Kafeik asit fenil ester
CAT	: Katalaz
CO₂	: Karbondioksit
EAA	: Eksitator aminoasit
ET	: Endotelin
FAD	: Flavin adenin dinükleotid
GAPDH	: Gliseraldehit-3-fosfat dehidrogenaz
GIS	: Gastrointestinal sistem
GM-CSF	: Granulosit makrofaj koloni stimüle faktör
GR	: Glutasyon redüktaz
GSH	: Glutasyon
GSH-Px	: Glutasyon peroksidaz
GSSG	: Glutasyon disülfid
GST	: Glutasyon S-tranferaz
H₂O	: Su
H₂O₂	: Hidrojen peroksit
Ig	: İmmünglobulin
IL	: İnterlökin
İ.P.	: İnteraperitoneal
İ/R	: İskemi/reperfüzyon
KDH	: Ksantin dehidrogenaz
KO	: Ksantin oksidaz
LDH	: Laktat dehidrogenaz
LTB₄	: Lökotrien B ₄
MCP	: Monosit kemoatraktan protein

MDA	: Malondialdehit
MIP	: Makrofaj inflamatuvar protein
Na⁺	: Sodyum
Na⁺-K⁺ ATPaz	: Sodyum-potasyum ATPaz
NAD⁺	: Nikotinamid adenin dinükleotid
NADH	: NAD ⁺ nin indirgenmiş hali
NADPH	: Nikotinamid adenin dinükleotid fosfat
NMDA	: N-Metil D-Aspartat
NO	: Nitrik oksit
NOS	: Nitrik oksit sentetaz
O₂	: Oksijen
O₂^{•-}	: Süperoksit serbest radikali
OH[•]	: Hidroksil radikali
PAF	: Platelet aktive edici faktör
PG	: Prostaglandin
PMNL	: Polimorf nüveli lökositler
ROS	: Reaktif oksijen türleri
-SH	: Sülfhidril
SOD	: Süperoksit dismutaz
SOR	: Serbest oksijen radikalleri
SR	: Serbest radikal
TNF-α	: Tümör nekrozis faktör- α
TOS	: Total oksidan status
Tx	: Tromboksan

ŞEKİLLER LİSTESİ

Şekil 1: İntrasellüler Ca'nın toksik etkileri (Kumar et al. 2017)	4
Şekil 2: Doku oksijenasyonunun azalmasının sonuçları (Mc Cance et al. 2013).....	5
Şekil 3: Serbest oksijen radikallerinin hücre hasarındaki etkileri (Kumar et al. 2017)	6
Şekil 4: İskemi/reperfüzyon hasarı (Şener ve ark. 2007)	8
Şekil 5: İskemide pürin metabolizmasının gelişimi ve ksantin dehidrogenazın ksantin oksidaza çevrilmesi, reperfüzyonda oksijen radikalinin oluşumu (Schoenberg 1993).....	11
Şekil 6: Bilinen bazı radikaller (Andreescu et al.2016, Dünder 2000).....	12
Şekil 7: Serbest radikal kaynakları (Aksoy 2002)	13
Şekil 8: Serbest radikaller, hücre metabolizmasına etkileri ve temizlenmeleri (Kumar et al. 2017).	13
Şekil 9: Akciğer doku SOD düzeyleri	30
Şekil 10: Akciğer doku CAT düzeyleri	31
Şekil 11: Akciğer doku MDA düzeyleri.....	32
Şekil 12: Akciğer dokusu Nötrofil/Lenfosit İnfiltrasyon Skorları.....	33
Şekil 13: Akciğer dokusu alveol duvar kalınlaşma skorları	34

TABLULAR LİSTESİ

Tablo 1: Gruplardaki ratların ağırlıkları.....	29
Tablo 2: Akciğer doku SOD düzeyleri.....	30
Tablo 3: Akciğer doku CAT düzeyleri.....	31
Tablo 4: Akciğer doku MDA düzeyleri	32
Tablo 5: Akciğer dokusu Nötrofil/Lenfosit İnfiltrasyon Skorları	33
Tablo 6: Akciğer dokusu alveol duvar kalınlaşma skoru.....	34



RESİMLER LİSTESİ

Resim 1: Rat'ın tıraşlanması ve cerrahi alan antisepsisi	22
Resim 2: Kuyruk veni kanülasyonu	23
Resim 3: Orta hat abdominal insizyon	24
Resim 4: İnfrarenal abdominal aorta diseksiyonu ve klemplenmesi.....	25
Resim 5: Doku homojenatları.....	26
Resim 6: Homojenizasyon işlemi.....	26
Resim 7: ELİSA çalışma aşaması	27
Resim 8: Grup Sham; hematoksilen-eozin; A-X40; B-X100; C-X400.....	35
Resim 9: Grup İ/R; hematoksilen-eozin; A-X40; B-X100; C-X400.....	36
Resim 10: Grup A-90; hematoksilen-eozin; A-X40; B-X100; C-X400.....	36
Resim 11: Grup A-135; hematoksilen-eozin; A-X40; B-X100; C-X400.....	37
Resim 12: Grup İ/R-A 90; hematoksilen-eozin; A-X40; B-X100; C-X400.....	37
Resim 13: Grup İ/R-A 135; hematoksilen-eozin; A-X40; B-X100; C-X400.....	38

ÖZET

RATLARDA ALT EKSTREMİTE İSKEMİ REPERFÜZYON HASARINDA AMANTADİNİN FARKLI DOZLARININ AKCİĞER DOKUSUNDAKİ ETKİLERİNİN KARŞILAŞTIRILMASI

AMAÇ: İskemi/reperfüzyon (İ/R) hasarı, abdominal aort cerrahisi sonrasında sıkça görülen bir komplikasyondur. Literatürde N-Metil D-Aspartat (NMDA) antagonistlerinin çeşitli doku ve organlarda, iskemi/reperfüzyon hasarına karşı koruyucu etkileri gösterilmiştir. Çalışmamızda, bir NMDA antagonisti olan amantadinin farklı dozlarda uygulanmasının ratlarda alt ekstremite İ/R hasarı sonrasında akciğer dokusu üzerindeki etkilerinin araştırılmasını amaçladık.

METOD: Etik kurul onayı alındıktan sonra, ağırlıkları 250-330 gram (g) arasında değişen toplam 36 adet wistar cinsi rat rastgele 6 gruba ayrıldı. Gruplar; Sham grubu (Grup Sham, n=6), Amantadin 90 grubu (Grup A-90, n=6), Amantadin 135 grubu (Grup A-135, n=6) İskemi/Reperfüzyon grubu (Grup İ/R, n=6), İ/R+Amantadin 90 grubu (Grup İ/R-A 90, n=6), İ/R+Amantadin 135 grubu (Grup İ/R-A 135, n=6) olarak belirlendi. Anestezi uygulamadan önce tartılan tüm ratlara 100 mg/kg ketamin, 15 mg/kg ksilazin intraperitoneal (i.p) uygulanarak anestezileri sağlandıktan sonra intravenöz kanülasyon yapıldı ve abdominal bölgeleri cerrahi insizyondan önce tıraş edildi. Tüm gruplarda anestezi uygulandıktan sonra ve cerrahi uygulamadan önce 15 dk beklendi. Grup Sham'da orta abdominal insizyon yapıldı fakat herhangi bir müdahale yapılmadı. Grup A-90'da amantadin 90 mg/kg intraperitoneal yolla verildikten sonra orta abdominal insizyon yapıldı fakat herhangi bir müdahale yapılmadı. Grup A-135'de amantadin 135 mg/kg i.p. yolla verildikten sonra orta abdominal insizyon yapıldı fakat herhangi bir müdahale yapılmadı. Grup İ/R'de orta abdominal insizyon yapılarak infrarenal abdominal aorta eksplore edildi. Aortaya atravmatik mikrovasküler klemp uygulandı. 120 dakikalık iskemi süresinden sonra atravmatik vasküler klemp uzaklaştırıldı ve 120 dakika reperfüzyon uygulandı. Grup İ/R-A 90'da amantadin 90 mg/kg i.p. yolla uygulandıktan sonra orta abdominal insizyon yapılarak infrarenal abdominal aorta eksplore edildi. Aortaya atravmatik

mikrovasküler klemp uygulandı. 120 dakikalık iskemi süresinden sonra atravmatik vasküler klemp uzaklaştırıldı ve 120 dakika reperfüzyon uygulandı. Grup İ/R-A 135’de amantadin 135 mg/kg i.p. yolla uygulandıktan sonra, orta abdominal insizyon yapılarak infrarenal abdominal aorta eksplere edildi. Aortaya atravmatik mikrovasküler klemp uygulandı. 120 dakikalık iskemi süresinden sonra atravmatik vasküler klemp uzaklaştırıldı ve 120 dakika reperfüzyon uygulandı. Deneyin sonunda ratlar sakrifiye edilerek akciğer doku örnekleri alındı. Akciğer dokusunda, katalaz (CAT), süperoksit dismutaz (SOD), malondialdehit (MDA) düzeyleri çalışıldı. Ayrıca akciğer dokusunda histopatolojik olarak nötrofil/lenfosit infiltrasyon ve alveol duvar kalınlığı skorları incelendi.

BULGULAR: Toplam 36 denekten oluşan 6 gruptaki ratların ağırlıkları benzerdi. SOD ve CAT düzeyleri Grup İ/R’de Grup Sham’a göre yüksek tespit edildi. Grup İ/R-A 90 ve Grup İ/R-A 135 SOD ve CAT düzeyleri, hem Grup İ/R’ye hem de Grup Sham’a göre yüksekti fakat akciğer doku SOD ve CAT düzeyleri bakımından gruplar arasında fark saptanmadı (sırasıyla $p=0.400$, 0.063). Doku MDA düzeyleri Grup İ/R’de tüm gruplara göre yüksek tespit edildi. Grup İ/R-A 90 ve Grup İ/R-A 135 MDA düzeyleri, hem Grup İ/R hem de Grup Sham’a göre düşüktü ancak enzim düzeyleri açısından hiçbir grup arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark yoktu ($p=0,209$).

Histopatolojik olarak yapılan incelemede; Grup İ/R nötrofil/lenfosit infiltrasyon skoru, Grup Sham, Grup A-90 ve Grup A-135’e göre istatistiksel olarak anlamlı derecede daha yüksekti (sırası ile $p=0.002$, 0.002 , 0.002). Grup İ/R-A 90 ve Grup İ/R-A 135’de ise Grup İ/R’ye göre daha düşüktü, fakat anlamlı farklılık tespit edilmedi. Akciğer doku alveol duvar kalınlaşma skor düzeyleri; Grup İ/R’de Grup Sham, Grup A-90, Grup A-135 ve Grup İ/R-A 135’e göre istatistiksel olarak daha yüksek tespit edildi (sırası ile $p=0.002$, 0.002 , 0.002 , 0.002). Grup İ/R-A 90 düzeyi de Grup İ/R’ye göre daha düşüktü fakat istatistiksel olarak anlamlı değildi.

SONUÇ: Biz bu çalışmada, akciğer dokusu biyokimyasal değerleri arasında istatistiksel olarak anlamlı fark bulamasak da akciğer dokusunun histopatolojik olarak İ/R hasarından etkilenmiş olduğunu ve amantadin kullanımıyla bu hasarın daha az olduğunu gözlemledik. Özellikle alveol duvar kalınlaşma skor düzeyleri incelendiğinde; Grup İ/R-A 135 ile İ/R hasarı oluşturmadığımız Grup Sham arasında istatistiksel bir fark bulamadık. Aynı zamanda Grup İ/R-A 135 alveol duvar kalınlaşma skor düzeylerini Grup İ/R'ye göre anlamlı derecede düşük bulduk. Bu sonuçlara göre çalışmamızda, İ/R hasarının düzeltilmesinde amantadinin 135 mg/kg uygulamasının 90 mg/kg uygulamasına göre daha faydalı olduğunu tespit ettik. Amantadin ile ilgili yapılan İ/R hasarına bağlı uzak organ hasarı çalışmalarında farklı sonuçlar olmakla birlikte bu konuyla ilgili daha çok çalışmaya ihtiyaç vardır.

Anahtar kelimeler: İskemi/reperfüzyon, amantadin, alt ekstremitte, akciğer dokusu

ABSTRACT

COMPARISON OF THE EFFECTS OF DIFFERENT DOSES OF AMANTADINE ON LUNG TISSUE IN LOWER EXTREMITY ISCHEMIA REPERFUSION INJURIES IN RATS

AIM: Ischemia/reperfusion (I/R) injury is a common complication after abdominal aortic surgery. In the literature, protective effects of N-Methyl D-Aspartate (NMDA) antagonists against ischemia/reperfusion injury in various tissues and organs have been shown. In our study, we aimed to investigate the effect of different doses of amantadine, an NMDA antagonist, on lung tissue after lower extremity I/R injury in rats.

METHOD: After approval of the ethics committee, 36 wistar rats weighing between 250-330 grams (g) were randomly divided into 6 groups. Groups were defined as; Sham group (Group Sham, n=6), Amantadine 90 group (Group A-90, n=6), Amantadine 135 group (Group A-135, n = 6) Ischemia/Reperfusion group (Group I/R, n=6), Ischemia/Reperfusion + Amantadine 90 group (Group I/R-A 90, n=6), Ischemia/Reperfusion + Amantadine 135 group (Group I/R-A 135, n=6). All rats weighed before anesthesia were anesthetized with 100 mg / kg ketamine, 15 mg / kg xylazine intraperitoneally (i.p) and then intravenous cannulation was performed and abdominal areas were shaved before surgical incision. Waiting for 15 minutes after anesthesia in all groups and before surgery. A middle abdominal incision was performed in Group Sham but no intervention was performed. In Group A-90, a mid abdominal incision was made after amantadine 90 mg/kg was given intraperitoneally, but no intervention was performed. In Group A-135, a mid abdominal incision was made after amantadine 135 mg/kg was given intraperitoneally, but no intervention was performed. In Group I/R, infrarenal abdominal aorta was explored by a mid abdominal incision. Atraumatic microvascular clamp was applied to the aorta. Atraumatic vascular clamp was removed after 120 minutes of ischemia and reperfusion was performed for 120 minutes. In Group I/R-A 90 after 90 mg/kg i.p amantadine was administered, a mid abdominal incision was made and the infrarenal abdominal aorta

was explored. Atraumatic microvascular clamp was applied to the aorta. Atraumatic vascular clamp was removed after 120 minutes of ischemia and reperfusion was performed for 120 minutes. In Group I/R-A 135 after 135 mg/kg i.p amantadine was administered, a mid abdominal incision was made and the infrarenal abdominal aorta was explored. Atraumatic microvascular clamp was applied to the aorta. Atraumatic vascular clamp was removed after 120 minutes of ischemia and reperfusion was performed for 120 minutes. At the end of the experiment, rats were sacrificed, and lung tissue samples were taken. In lung tissue, catalase (CAT), superoxide dismutase (SOD), malondialdehyde (MDA) levels were studied. In addition, neutrophil/lymphocyte infiltration and alveolar wall thickness scores were evaluated histopathologically.

RESULTS: The weights of the rats were similar in 6 groups of 36 subjects. SOD and CAT levels were higher in Group I/R than Group Sham. SOD and CAT levels in Group I/R-A 90 and Group I/R-A 135, were higher than Group I/R and Group Sham, but no difference was found between the groups in terms of lung tissue SOD and CAT levels ($p=0.400$, 0.063 , respectively). Tissue MDA levels were higher in Group I/R than in all groups. MDA levels of Group I/R-A 90 and Group I/R-A 135 were lower than both Group I/R and Group Sham, but there was no statistically significant difference between the groups in terms of enzyme levels ($p=0,209$).

Histopathological examination of the lung tissue has revealed the fact that the Group I/R neutrophil/lymphocyte infiltration score was significantly higher than Group Sham, Group A-90 and Group A-135 ($p=0.002$, 0.002 , 0.002 , respectively). Group I/R-A 90 and Group I/R-A 135 were lower than Group I/R, but no significant difference was detected. Lung tissue alveolar wall thickening score levels; Group I/R was significantly higher than Group Sham, Group A-90, Group A-135 and Group I/R-A 135 ($p=0.002$, 0.002 , 0.002 , 0.002 , respectively). Group I/R-A 90 level was also lower than Group I/R but it was not statistically significant.

CONCLUSION: In this study, although we could not find a statistically significant difference between lung tissue biochemical values, we observed that lung tissue was

histopathologically affected by I/R damage and that the damage was less with amantadine use. Especially when the alveolar wall thickening score levels were examined; We could not find any statistical difference between Group I/R-A 135 and Group Sham in which we did not cause I/R damage. At the same time, we found that Group I/R-A 135 alveolar wall thickening scores were significantly lower than Group I/R. According to these results; in the correction of I/R damage, 135 mg/kg administration of amantadine was more beneficial than 90 mg/kg. Although there were different results in the studies of distant organ damage due to I/R damage related to amantadine, further studies are needed on this subject.

Keywords: Ischemia/reperfusion, amantadine, lower extremity, lung tissue.

1. GİRİŞ

İskemi, dokunun oksijen ve diğer metabolitlere olan ihtiyacının dolaşım tarafından sağlanamaması ve oluşan artık ürünlerin uzaklaştırılmaması olarak tanımlanır (Majino and Jorris 1995). Reperfüzyon, iskemi sonucu doku veya organda oluşan enerji ihtiyacının giderilmesi ve zararlı metabolitlerin uzaklaştırılması için doku ya da organa yeniden kan akımının sağlanması olayına denir. Ancak, iskemik dokunun reperfüzyonu dokuda paradoksal olarak sadece iskemi ile oluşan hasara göre çok daha ciddi zarara yol açar (Zimmerman and Granger 1992, Montalvo-Jave et al 2008). Alt ekstremitelerde iskemi ve reperfüzyonu sık karşılaşılan ve klinik açıdan önemli bir olaydır. Reperfüzyonla birlikte serbest oksijen radikalleri ve inflamatuvar mediatörlerin etkisiyle hem lokal hem de sistemik hasar oluşumu başlamış olur (Prem et al. 1999, Klausner et al. 1989). Reperfüzyonda çok çeşitli serbest oksijen radikalleri (SOR) üretilir. En sık gözlenen süperoksit, hidrojen peroksit (H₂O₂) ve peroksinitrit gibi reaktif azot türlerinin artışıdır (Datta et al. 2013).

Alt ekstremitelerde akut İ/R hasarı, özellikle aort cerrahisinde abdominal aortaya geçici süre kros-klomp uygulanması sırasında, tek veya çift taraflı akut femoral arter tıkanıklıklarında ortaya çıkmaktadır (Yardım Akaydın S. ve ark. 2006, Carden and Granger 2000). Özellikle alt ekstremitelerde iskemi/reperfüzyon (İ/R) sonrasında oluşan uzak organ hasarında, akciğerler hedef organ konumundadır ve bu durum klinik olarak önem taşımaktadır (Yassin et al. 2002). İ/R sırasında oluşan akciğer hasarının etyopatogenezine ve önlenmesine yönelik çalışmalar günümüzde devam etmektedir. İ/R'ye bağlı akciğer hasarının patogenezinde serbest radikal ve antioksidan enzimlerin rolünün belirlenmesi; antioksidan tedavi denemelerini gündeme getirmiştir (Özer ve ark. 2005, Koltuksuz ve ark. 1999).

Amantadin NMDA reseptör antagonistleri grubundan bir ajandır. NMDA reseptör antagonistlerinin çeşitli dokularda (beyin, böbrek, myokard, iskelet kasında) İ/R hasarına karşı koruyucu etkileri olduğu gösterilmiştir (Himmelseher and Durieux 2005, Lee et al. 2004, Kato and Foex 2002). Amantadinin farklı dozlarının alt ekstremitelerde İ/R hasarında akciğer dokusuna olan etkilerine dair literatürde yapılmış çalışma bulunmamaktadır.

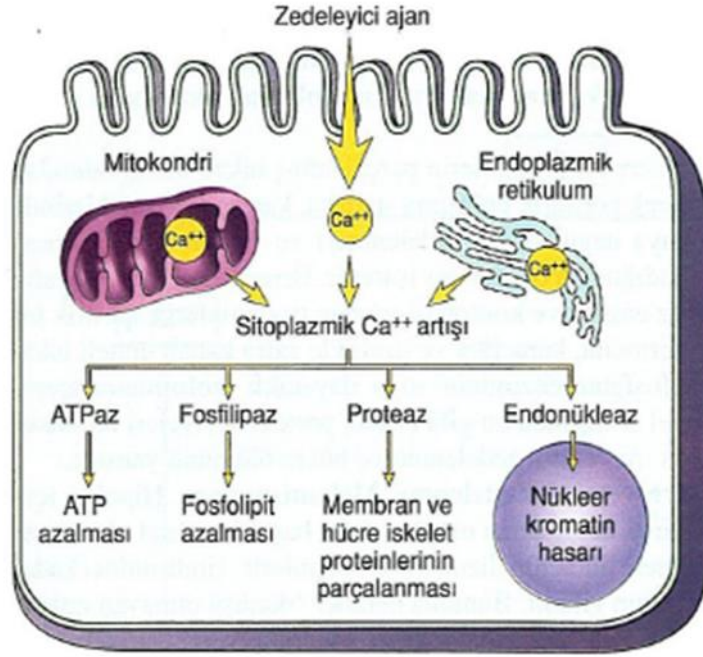
Çalışmamızda; amantadinin 135 mg/kg ve 90 mg/kg dozlarının ratlarda oluşturulan alt ekstremite İ/R hasarından sonra akciğer dokusundaki etkisi biyokimyasal olarak dokuda CAT, SOD, MDA düzeyleri üzerinden değerlendirildi. Histopatolojik hasarı belirlemek için dokular hematoxilen-eozin boyası ile boyanıp ışık mikroskopunda değerlendirildi.



2. GENEL BİLGİLER

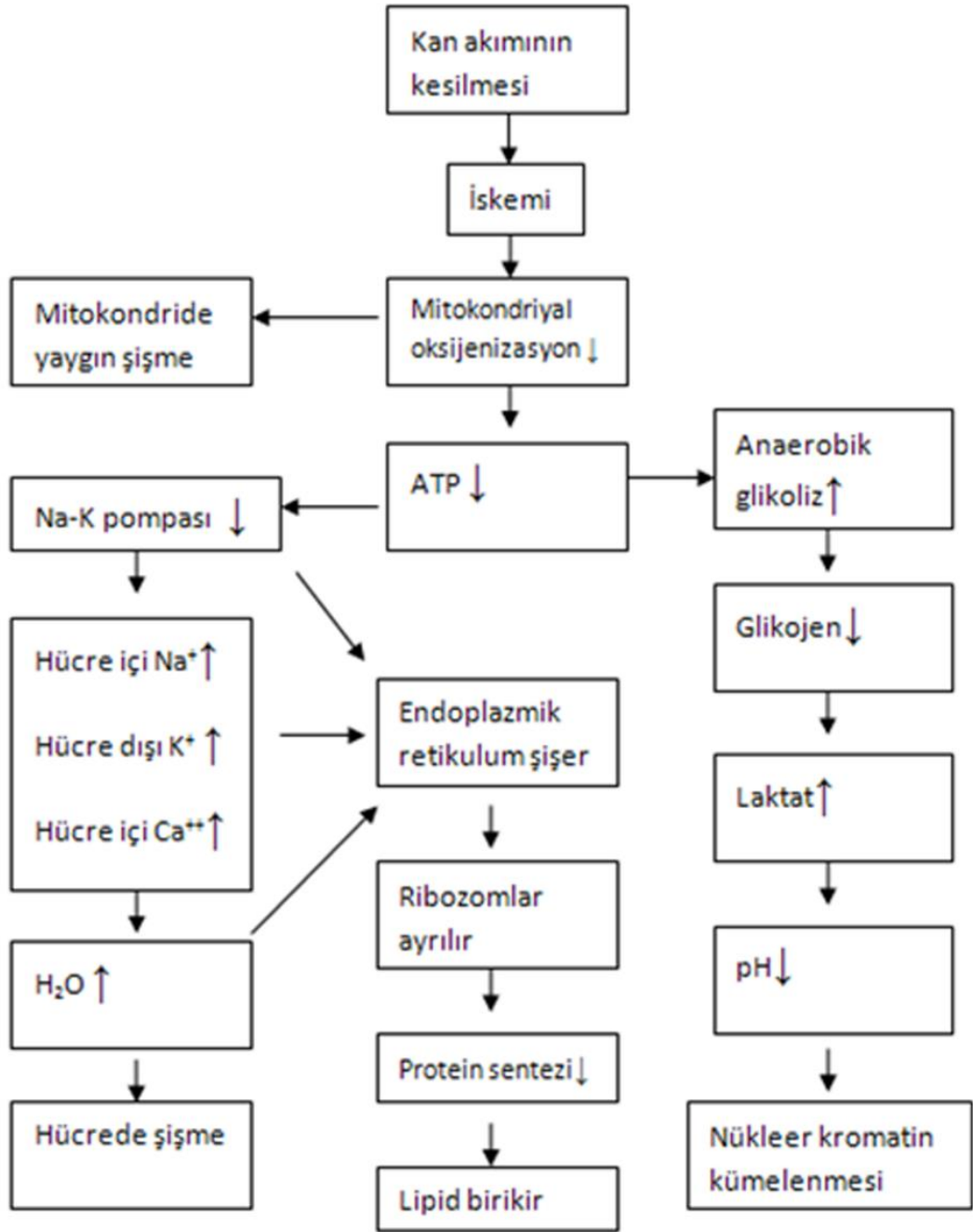
2.1. İSKEMİ

Klinik tıpta hücre zedelenmesinin en sık görülen tipidir (Kumar et al. 2007). İskemi, arteriyel veya venöz kan akımının azalmasına ya da tamamen kesilmesine bağlı olarak organların ve dokuların yetersiz perfüzyonu sonucu oksijenden yoksun kalmasıdır (Jennings and Reimer 1991). İskemi sonucu hücrel enerji depolarının tükenmesi, iskemik kaskat denilen olaylar zincirini başlatır. Oksijensiz kalan hücrede, mitokondrial elektron transportu ve oksidatif fosforilasyon kapasitesi giderek azalır. Adenozin trifosfat (ATP) sentezi durmasına karşın, ATP kullanımı ve ATP hidrolizi sonucu oluşan adenozin difosfat (ADP) düzeyi artmaktadır (Zimmerman et al. 1992, Grace 1994). Hücre içi ATP'deki azalma adenozin monofosfat (AMP) düzeylerinin artmasına, o da fosfofruktokinaz enzim aktivitesini arttırarak aerobik glikolizde elde edilen enerjinin %7'sini ancak sağlayabilen anaerobik glikolizi arttırır. Bu da hücre içinde laktik asit ve inorganik fosfatların artışıyla hücrel asidoza neden olur. Granüllü endoplazmik retikulumdaki ribozomların ayrılması ile protein sentez fonksiyonu bozulur. Enerji açığı ve membran geçirgenliğinin bozulması ile hücre membran yapısında bozulmalar meydana gelir. AMP yıkımı ile sırasıyla adenozin, inozin ve hipoksantin oluşur (Ichimiya et al. 1998). ATP depoları tükenen hücrede aktif sodyum (Na^+) transport pompaları (Na^+/K^+ ATPaz, $\text{Na}^+/\text{Ca}^{+2}$ ve Na^+/H^+ değişim sistemleri) bozulur ve hücre içine Na^+ , Cl^- , Ca^{+2} girişi başlar. Ca^{+2} un hücre içi artışı toksik etkiler doğurur (Şekil-1). Na^+ beraberinde izoosmotik etkiyle suyu hücre içine çekerek hücrel şişmeye sebep olur (Kumar et al. 2017, Chan et al. 2018).



Şekil 1: İntrasellüler Ca⁺⁺'nın toksik etkileri (Kumar et al. 2017)

İskemi döneminde ATP üretimi durduğu halde kullanımı devam ettiği için ATP'den AMP ve adenosin oluşur. Adenosin, hızla hücre dışına difüze olur, inozin ve hipoksantine parçalanır. Dolayısıyla, iskemi sonucu yüksek enerjili fosfat bileşiklerinin (ATP) yıkımı, dokuda ksantin ve hipoksantin gibi pürin metabolitlerinin birikimine ve ksantin dehidrojenazın (KDH) ksantin oksidaza (KO) dönüşümüne yol açar. Normal şartlarda hipoksantin ürik asite metabolize olur ve bu reaksiyonda elektron alıcı NAD^{+} 'dir (NAD 'ın okside formu). Ancak hipoksi ya da iskemi nedeniyle KDH, KO'ya dönüştüğünden hipoksantin ürik asite dönüşümü KO tarafından gerçekleşir ve bu reaksiyonda ise elektron alıcı olarak moleküler oksijen kullanılır (Parks et al. 1988). Hipoksantin dokuda aşırı seviyelere çıkar. Reperfüzyonla oksijen tekrar sunulduğunda fazla miktardaki hipoksantin KO tarafından dönüştürülmesi toksik serbest radikal oluşumu ile sonuçlanır (Toyokuni 1999). İskeminin düzelmesine rağmen mitokondri fonksiyonlarında kalıcı kayıp ve hücre membranı fonksiyonlarında ileri seviyede bozulma irreversibl hasar oluştuğunun göstergesidir (Hensley et al. 2000, Droge 2002) (Şekil-2).

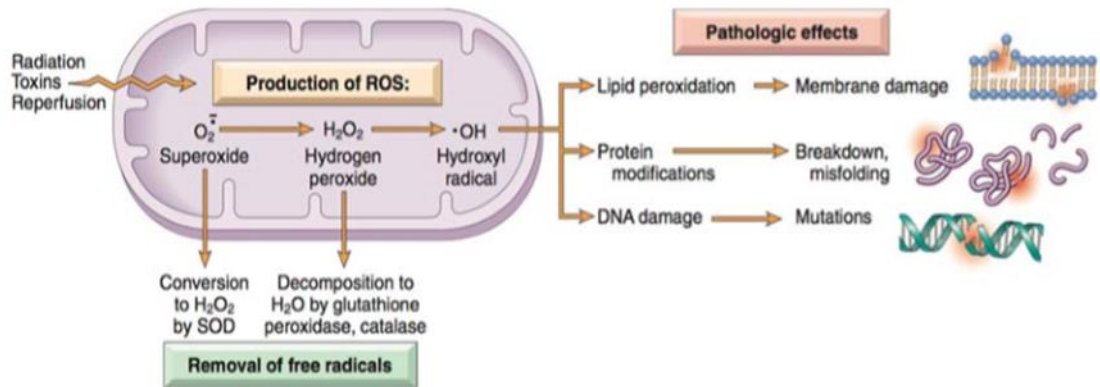


Şekil 2: Doku oksijenasyonunun azalmasının sonuçları (Mc Cance et al. 2013)

2.2. REPERFÜZYON

Bir organ veya dokuda bozulmuş kan akımının normal hale gelmesine reperfüzyon denir (Carden and Grander 2000) fakat, iskemik dokunun reperfüzyonu dokuda yalnızca iskemi ile oluşan hasara göre çok daha ciddi bir hasara neden olur

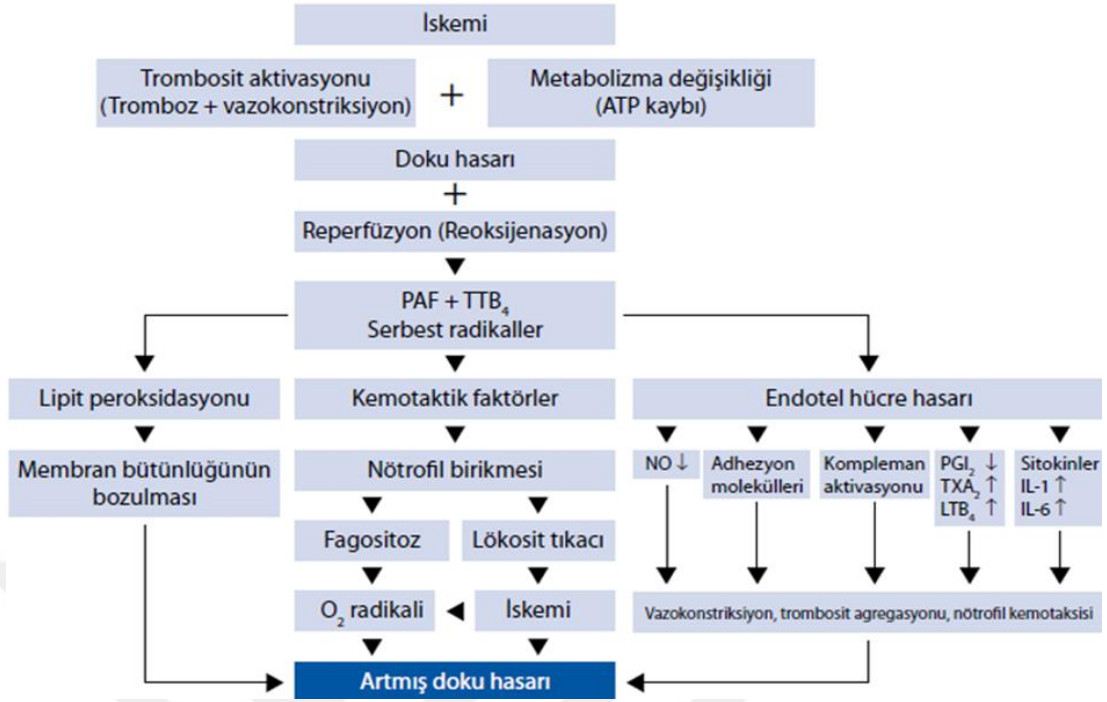
(Zimmerman and Granger 1992). Reperfüzyonla birlikte inflamatuvar yanıt başlar. Bu inflamatuvar sürece makrofajlar, endotel hücreleri, nötrofiller, lenfositler, trombositler, parankimal hücreler ve ayrıca hücre olmayan kompleman sistemi, kan pıhtılaşma kaskadı, reaktif oksijen türleri (ROS), nitrik oksit (NO), proinflamatuvar ve antiinflamatuvar sitokinler, elementler, mediatörler dahil olur ve mikrovasküler perfüzyon bozulur (Buja 2010, Jaeschke 2003). Oluşan serbest radikaller sistemik dolaşıma yayılarak, çoklu organ hasarına neden olur (Zhao et al. 2008, İnan ve ark. 2013). Hasar reversibl seviyede ise enerji depoları tekrar doldurularak, hücre sel dejenerasyon düzeltilir ve homeostazis sağlanır. Ancak reperfüzyonun kendisi, iskeminin neden olduğu hasardan daha ciddi hasarlara neden olarak irreversibl hasara yol açabilir (Collard and Gelman 2001). İskemi sonrasında, iskemik dokudaki serbest radikallerin en önemli kaynağı KO enzimidir (Grace 1994, Terzi ve ark. 2000). Reperfüzyonla dokuya bolca O_2 molekülü gelir. Hücre içi Ca^{+2} iyonu artışı nedeni ile KDH enzimi KO'ya dönüşür. KDH hipoksantini ksantine ve daha sonrasında ürik aside çevirirken indirgeyici ajan olarak FAD (flavin adenin dinükleotid) kullanırken; KO O_2 'den süperoksit (O_2^-) ve hidrojen peroksit (H_2O_2) oluşumuna neden olur (Orrenius et al. 1996, Salvemini and Cuzzocrea 2002). Reperfüzyon hasarına en hassas yapılar; zar lipidleri, proteinler, nükleik asitler ve deoksiribonükleik asitlerdir (Wilhelm 1990) (Şekil 3).



Şekil 3: Serbest oksijen radikallerinin hücre hasarındaki etkileri (Kumar et al. 2017)

2.3. İSKELET KASINDA İSKEMİ/REPERFÜZYON HASARI

İskemi/reperfüzyon (İ/R) hasarı; yetersiz O₂ sunumu ile başlayan, nötrofil ve serbest oksijen radikalleri (SOR)'nin rol oynadığı steril inflamatuvar yanıtla devam eden patolojik bir durumdur (Dammers et al. 2001, Alizan et al. 2006, Tokito and Silva 2005, Duru ve ark. 2005) (Şekil 4). Abdominal aorta ve alt ekstremitte arterlerinin cerrahi girişimler sırasında klempenmesi distalde iskemiye neden olmaktadır. Klempin açılarak distal kan akımının tekrar sağlanması lokal, uzak doku ve organlarda reperfüzyon hasarıyla sonuçlanmaktadır (Boğa 2009). Organizmanın iskemiye verdiği cevap, hücre türüne ve iskemi süresine göre değişir. İnsan kas hücresinde hücreyel fonksiyon bozuklukların başladığı iskemi süresi yaklaşık 2 saat iken, ince barsakta bu süre yaklaşık 30 dk'dır. Fizyolojik ve anatomik çalışmalarda kas dokusunda 3 saatlik iskemi sonrası geri dönüşümsüz hücreyel hasarın başladığı ve yaklaşık olarak 6. saatte neredeyse tamamlandığı gösterilmiştir (Alizan et al. 2006, Arasa and Dilsizian 2007). Ekstremitelerde meydana gelen akut arteriyel oklüzyon sonrası reperfüzyonun yeniden başlaması ile metabolik asidoz, hiperkalemi, miyoglobininüri ve böbrek yetmezliğinin geliştiği bildirilmiştir (Haimovici 1979). İskemik alanın genişliği ve süresi iskemik hasarın derecesini belirleyen en önemli faktörlerdir (Alizan et al. 2006, Blaisdell 2002, Schlag et al. 2001).



Şekil 4: İskemi/reperfüzyon hasarı (Şener ve ark. 2007)

2.4. AORTİK İSKEMİ/REPERFÜZYONA BAĞLI GELİŞEN UZAK ORGAN HASARI

Akciğer dokusu alt ekstremitte iskemi/reperfüzyon (İ/R) hasarının en çok etkilediği hedef organdır. Bunun etyolojisi tam olarak bilinmemekle birlikte, reperfüzyon sırasında bazı humoral mediatörlerin bu hedef organ hasarında rol oynadığı düşünülmektedir (Fantini and Conte 1995, İsbir ve ark. 2000). Moleküler olarak, akut alt ekstremitte İ/R hasarı sonrası vücutta lokal ve sistemik inflamatuvar bir yanıt ortaya çıkmakta ve buna bağlı plazmada artmış proinflamatuvar ajanlarla birlikte (sitokinler, araşidonik asit deriveleri, trombosit aktive edici faktör, kompleman) artmış SOR ve nötrofil infiltrasyonu, oluşan uzak organ hasarında rol oynamaktadır (Nakamura et al. 2001). Zimon ve arkadaşları, akut alt ekstremitte iskemisi gelişen ve cerrahi tedavi uygulanan 70 hastada, erken postoperatif dönemde %64 oranında pulmoner komplikasyon bildirmişler ve preoperatif iskemi süresi ile oluşan akciğer hasarının şiddeti arasında belirgin bir korelasyon göstermişlerdir (Zimon and Mavlianova 1997). Sekonder akciğer hasarı hafif düzeyli disfonksiyondan, akut respiratuvar distrese kadar değişebilir. Alt ekstremitte oluşturulan İ/R sonrası akciğer dokusunda belirgin nötrofil göçü ve kardiyak kökenli olmayan akciğer ödeminin geliştiği bildirilmiştir

(Goldman et al. 1992). İskemi ile birlikte tümör nekroz faktör alfa (TNF- α), interlökin-1-beta (IL-1 β) artışı ve polimorf nüveli nötrofil (PMN) aktivasyonu ile karakterize inflamatuvar yanıt, bu hasarda en önemli rolü oynamaktadır (Yassin et al. 2002, Fujii et al. 2003, Goldman et al. 1992, Groeneveld et al. 1997). SOR, akciğerlerde doğrudan solunum yolu düz kas kontraksiyonuna, doku harabiyetine, damar geçirgenliğinde artışa, bronş aşırı duyarlılığına ve mediatör salınımına neden olmaktadır (Kumar et al. 2000). Ayrıca mast hücrelerinden histamin salınımına ve hava yolu epitel hücrelerinden mukus salgılanmasına neden olmaktadır (Hatch 1995).

2.5. İSKEMİ/REPERFÜZYON HASARININ FİZYOLOJİSİ

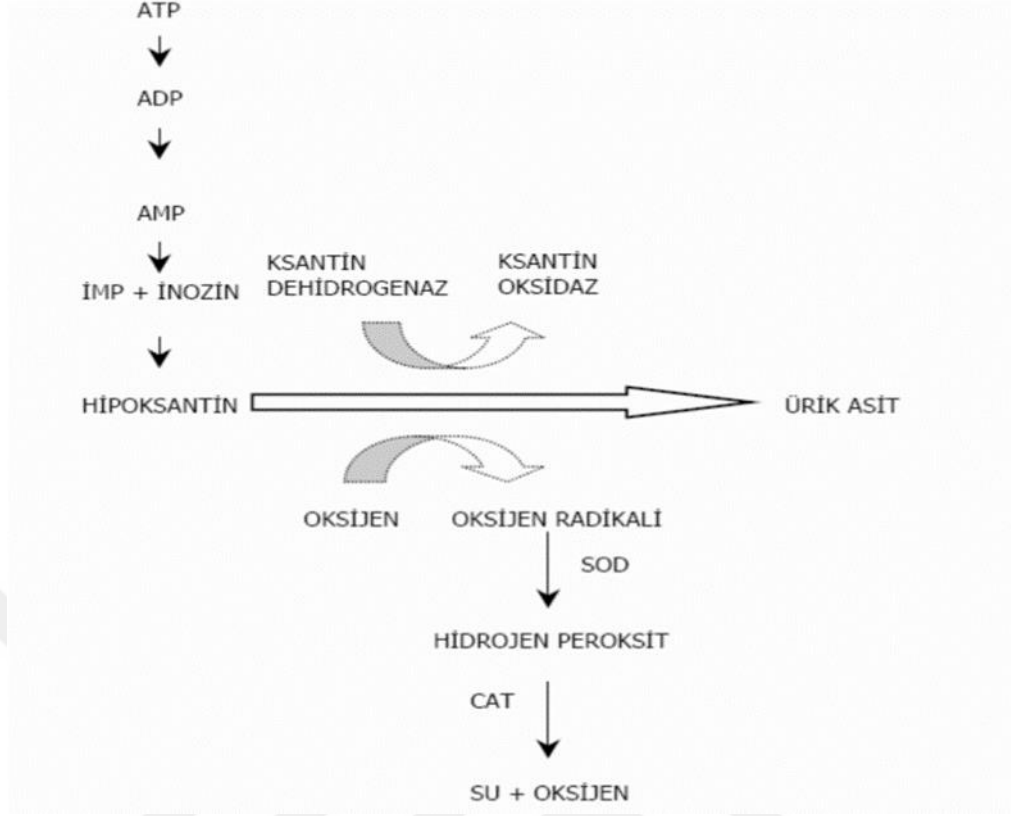
İskeminin başlaması ile birlikte normalde var olan aerobik metabolizma hızla anaerobik metabolizmaya dönüşerek doku ve organ işlevlerinde bozulmaya neden olmaktadır. İskemi ve hipokside aerobik metabolizmanın devam edememesi sebebiyle dokuda mevcut ATP'ler tükenmeye başlar ve yeni ATP üretimi yetersizliği sebebiyle enerji ihtiyacı için gerekli olan olayların devamlılığı sağlanamaz (Dick et al. 2008, Bilal ve Sarıoğlu 1992). Aerobik glikoliz yolu durunca hücre büyük oranda ATP kaybeder, çünkü glukoz sadece pirüvata kadar yıkılabilmiş, yani 38 ATP yerine sadece 2 ATP üretilmiştir. İskeminin ilk dakikalarında aşırı uyarılan glikolitik yol, ortamda sitrat, laktat, nikotinamid adenin dinükleotid (NADH) birikimi ve doku asidozunun oluşması ile durur. İskemik dokuda bulunan O₂ ise oksidatif fosforilasyonu devam ettirebilmek için yetersiz kalır ve glikoliz sonucu oluşan piruvatın laktata dönüşümü gerçekleşir. Böylece glikojenden ATP oluşumu ile hücre enerji kaynakları korunur. Glikoliz, laktik asit ve fosfat türevlerinin hidrolizi sonucu oluşan inorganik fosfat birikimine neden olur. Sonuç olarak hücre içi pH düşer ve buna bağlı olarak asidoz gelişir (Kumar et al. 2000).

ATP kaybı intraselüler çok sayıda ve birbiriyle ilişkili sistemi aynı anda etkiler. Bunlar;

- **Na⁺-K⁺ ATPaz pompasının bozulması:** ATP aktivitesinin azalması membranda aktif Na⁺ pompasının yetersizliğine yol açarak intraselüler Na⁺ artışı ve hücreden K⁺ dışarı atılımına neden olur. Solid materyalin birikimine

izoozmotik su birikimi eşlik eder ve akut hücrel şişme oluşur (Kumar et al. 2000).

- **İntraselüler asidoz oluşumu ve buna bağlı olarak pH'nın düşmesi:** Doku O_2 düzeylerindeki azalma laktat birikimine neden olur ve doku pH'sı düşer.
- **İntraselüler ortamda Ca^{+2} birikimi:** İskemi veya toksinler erken dönemde sitozolik Ca^{+2} seviyelerinde artış oluşturur, bu durum mitokondri ve endoplazmik retikulumdan Ca^{+2} salınımı ve plazma membranından Ca^{+2} geçişi ile ilişkilidir. Hücrede Ca^{+2} artışı membran geçirgenliğinde spesifik olmayan artışla desteklenir. Artmış Ca^{+2} çok sayıda enzimin aktivasyonuna yol açar. Bunlar; fosfolipaz (membran hasarını başlatır), proteaz (membran ve hücre iskeleti proteinlerini parçalar), ATPaz (ATP'nin azalmasını hızlandırır) ve endonükleaz (kromatin parçalanması ile birlikte) dır (Yıldar 2008).
- **Pürin metabolitlerinin birikimi:** Ortamdaki ATP nin yıkılması sonucu oluşan ADP'ler önce AMP daha sonra adenosin, inozin ve sonunda hipoksantine dönüşmektedir. Hipoksantin reperfüzyonun sağlanması halinde oksijen ve KO enziminin etkisi ile ksantine dönüşür. Ksantin ortamdaki O_2 ile reaksiyona girerek ürik asite parçalanır. Bu siklus neticesinde hasardan sorumlu SOR oluşmaktadır. Hipoksinin devam etmesi durumunda ortamda O_2 bulunmadığından ksantin, NAD ve hidrojen ile reaksiyona girerek ürik asit, NAD fosfat (NADP), H^+ , hidrojen peroksit (H_2O_2) ve süperoksit radikalleri (O_2^-) oluşur (Dick et al. 2008) (Şekil 5).



Şekil 5: İskemide pürin metabolizmasının gelişimi ve ksantin dehidrogenazın ksantin oksidaza çevrilmesi, reperfüzyonda oksijen radikalinin oluşumu (Schoenberg 1993).

İskemi/reperfüzyon hasarında fizyopatolojik değişikliklere yol açan faktörler aşağıdakilerdir (Woodfin et al. 2007):

- Serbest oksijen radikalleri,
- Polimorf nüveli lökositler,
- Kompleman sistemi,
- Endotel hücreleri.

2.5.1. Serbest Oksijen Radikalleri

Serbest radikaller, dış yörüngesinde bir ya da daha fazla eşlenmemiş elektron içeren atom ya da moleküllerdir (Altan ve ark. 2006). Oksijenin redüksiyonu ve aerobik hücrelerin enzimatik oksidasyonu sırasında negatif yüklü bir ara ürün olan O_2^- oluşur. Süperoksit radikalinden enzimatik yolla veya spontan dismutasyonla ikinci bir ara ürün olan H_2O_2 oluşur. Daha sonra özellikle mitokondride diğer bir ürün olan hidroksil radikali (OH^-) oluşur. Organizmada bu serbest radikaller dışında hidrojen peroksit,

hipoklorik asit gibi radikal olmayan, bununla birlikte serbest radikal oluşturma potansiyelinde olan zararlı oksijen türleri de oluşabilmektedir. Diğerleriyle karşılaştırılığında O_2 radikali yüksek elektron aktivitesine sahiptir ve çok reaktiftir. Ancak oksijen radikallerinden en aktif olanı OH^\bullet radikalidir (Grace 1994, Ertan ve ark. 2001). Organizma, oksidana maruz kalmayı minimum düzeye indirmek için antioksidanlara sahiptir, ancak serbest oksijen radikallerinin aşırı üretiminde ya da varlığında, bu koruyucu sistem yetersiz kalmakta ve oksidan hasar meydana gelmektedir (Cantürk ve Sayek 2005).

Radikal	Simge	Tanımlama
Hidrojen	H^\bullet	Bilinen en basit radikal
Süperoksit	$O_2^{\bullet-}$	Oksijen metabolizmasının ilk ara ürünü
Hidroksil	OH^\bullet	En toksik (reaktif) oksijen metaboliti radikal
Hidrojen peroksit	H_2O_2	Reaktivitesi çok düşük, moleküler hasar yeteneği zayıf
Singlet oksijen	O_2^1	yarılanma ömrü hızlı, güçlü oksidatif oksijen formu
Perhidroksi radikal	HO_2^\bullet	Lipidlerde hızlı çözünerek lipid peroksidasyonunu artırır
Peroksil radikal	ROO^\bullet	Perhidroksile oranla daha zayıf etkili, lipidlere lokalize olur
Triklorometil	CCl_3	CCl_4 metabolizması ürünü karaciğerde üretilen bir radikal
Thyl radikali	RS^\bullet	Sülfürlü ve çiftlenmemiş elektron içeren türlerin genel adı
Alkoksil	RO^\bullet	Organik peroksitlerin yıkımı ile üretilen oksijen metaboliti
Nitrojen oksit	NO	L- arjinin amino asitinden in vivo üretilir.
Nitrojen dioksit	NO_2	NO 'in oksijen ile reaksiyonundan üretilir.

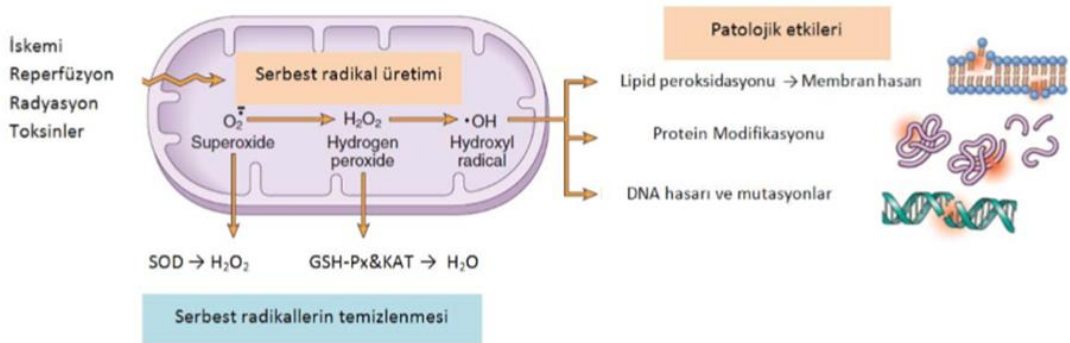
Şekil 6: Bilinen bazı radikaller (Andreescu et al.2016, Dünder 2000).

Biyolojik sistemlerde oluşan serbest radikaller endojen ve eksojen kaynaklı olabilirler (Aksoy 2002) (Şekil 7).

Endojen Kaynaklar	Eksojen Kaynaklar
<ul style="list-style-type: none"> • Mitokondriyal elektron transport zinciri • Mikrozomal elektron transport zinciri • Oksidan enzimler • Ksantin oksidaz • Indolamin dioksijenaz • Galaktoz oksidaz • Siklooksijenaz • Lipoksijenaz • Monoamin oksidaz • Fagositik hücreler • Nötrofiller • Monositler ve makrofajlar • Eozinofiller • Endotelyal hücreler • Otooksidasyon reaksiyonları (ör, Fe^{+2}) 	<ul style="list-style-type: none"> • Redoks siklus bileşikleri (ör, paraquat) • İlaç oksidasyonları (ör, parasetamol) • Sigara • Güneş ışığı • Isı şoku • Okside glutatyon

Şekil 7: Serbest radikal kaynakları (Aksoy 2002).

Bu reaktif moleküller, membran lipidlerini peroksidasyona uğratar, nonperoksidatif mitokondri hasarına yol açar, genetik materyal ve hücre proteinlerine hasar verir (McCance and Huether 2013, Rodwel et al. 2015) (Şekil-8).



Şekil 8: Serbest radikaller, hücre metabolizmasına etkileri ve temizlenmeleri (Kumar et al. 2017).

- **Lipid Peroksidasyonu:** Serbest oksijen radikalleri, plazma ve organel membranlarında lipid peroksidasyonuna neden olurlar. Hidroksil radikali, membran lipidleri ile çift bağ yapar ve böylece lipid-radikal etkileşimi ile zincirleme reaksiyon sonucu pek çok lipid peroksidasyon ürünü (malondialdehit, dien konjugatları gibi) oluşur.
- **Proteinlerin Oksidatif Modifikasyonu:** Serbest radikaller proteinlerin sülfhidril aracılığıyla çapraz bağlanmasını arttırlar. Bu da enzimlerin parçalanması veya enzimatik etkinliğin azalmasına neden olur. Ayrıca, polipeptidlerin doğrudan fragmentasyonuna da yol açabilirler.
- **DNA fragmentasyonu:** Serbest radikallerin çekirdek veya mitokondri DNA'sındaki timin ile reaksiyonları, tek zincir kırılmalarına neden olur (Kumar et al. 2007).

2.5.2. Polimorf Nüveli Lökositler (PMNL)

İskemi/reperfüzyon hasarı sonrasında aktif hale gelen ilk hücreler PMNL olup, mikrovasküler permeabilitede artışından başlıca sorumlu tutulan ana hücrelerdir (Serizawa et al. 1996, Kumar et al. 2007). Reperfüzyon hasarını önlemeye yönelik antinötrofil serumlarla ya da lökosit adhezyon moleküllerine karşı monoklonal antikörlerle yapılan çalışmalar, reperfüzyonda mikrovasküler permeabilitedeki artıştan başlıca nötrofillerin sorumlu olduğunu göstermiştir (Lopez-Neblina et al. 1996). İ/R hasarında PMNL'nin rolü ile ilgili bazı mekanizmalar ileri sürülmüştür (Eltzschig and Collard 2004). Bunlar; mikrovasküler oklüzyon; SOR salınması, sitotoksik enzim salınması, vasküler permeabilite artışı ve sitokin salınmasında artıştır.

Hasar yapıcı etkeni ortadan kaldırmaya veya yoğunluğunu azaltmaya yönelik bu inflamatuvar yanıt sonucu; mikrovasküler permeabilite artışı, ödem, tromboz ve parankim hücre ölümü de gerçekleşir. Görevini tamamlayan lökositler apoptotik hücre ölümüne uğrarlar ve makrofajlar aracılığıyla lenfatik dolaşım yoluyla ortamdan uzaklaştırılırlar (Schoenberg and Beger 1993).

2.5.3. Kompleman Sistemi ve Sitokinler

Kompleman(C) sistemi hem konakçı savunmasında hem de inflamasyonda önemli rolleri olan plazma proteinleridir. Aktivasyonlarıyla çeşitli kompleman proteinler,

fagosite edip yok etmek için mikroplar gibi partiküllerin üzerini kaplar (opsonize eder), vasküler permeabiliteyi ve lökosit kemotaksisini arttırarak inflamatuvar yanıtta katkıda bulunur (Kumar et al. 2007). C3a ve C5a anaflatoksinlerdir ve lökositleri aktive ederler. Lökosit aktivasyonu ve kemotaksisin uyarılmasına ek olarak C5a, 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 amplifiye eder (Thrane et al. 2007). C5b9 endotelde IL-1a, IL-8 ve MCP-1 salgısını uyararak lökosit aktivasyonu ve kemotaksisi arttırır. Aynı zamanda endotel bağımlı vazodilatasyonu inhibe ederek ve endotelde siklik guanozin monofosfatı azaltarak vasküler tonusu bozar (Suzuki et al. 1991, Zhang et al. 1999). Kalp kasında reperfüzyon sırasında C aktivasyonunu gösteren bir çalışmada C'nin klasik yolu C1 inhibitörü kullanılarak inhibe edilmiş ve iskemik miyokardın reperfüzyon hasarından efektif olarak korunduğu gözlenmiştir (Buerke et al. 1995).

2.5.4. Endotel hücresinin rolü

Oksidatif stres endotel hücrelerinin aktivasyonuna ve işlevlerinin bozulmasına neden olur. Endotel hücreleri; SOR için hem potansiyel hedef hem de üretim kaynağıdır. Endotel, mikrovasküler homeostazdan sorumlu olan endotelin (ET)'i ve NO'yu üretir. NO arteriyel dolaşımda ET'in vazokonstriktör etkisini tersine çevirme eğilimindedir. Venlerde ise bunun tersi söz konusudur. İ/R hasarında ET/NO oranı ET lehine bozulur. Sonuçta arteriyel vazokonstriksiyon, venlerde vazodilatasyon olur (Oğuz 2010). Endotel hücrelerinin oksidatif stresi sonucu C aktive edilir; lökosit adhezyon moleküllerinin üretimi artar. SOR etkisi ile endotel hücreleri hasara yanıt olarak IL-1, PAF, PG'ler (PG I2, PG E2), GM-CSF, büyüme faktörleri, ET, NO ve tromboksan A2 (TXA2) salgırlar. Aktive olan endotel hücreleri ek olarak kendi bazal membranlarını sindiren kollajenazlar salgılama yeteneğindedir (Weight et al. 1996).

2.6. ANTİOKSİDANLAR

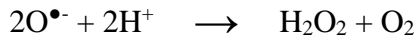
Antioksidanlar, serbest radikalleri etkisiz hale getirmek amacıyla geliştirilmiş savunma sistemleridir (Dick et al. 2008) Etkilerini lokal O₂ konsantrasyonunu azaltarak, hidroksil radikallerini temizleyip lipid peroksidasyonunun başlamasını önleyerek, geçiş metal iyonlarını bağlayıp etkisizleştirerek, peroksitlerin alkol gibi

non-radikal ürünlere dönüşümünde etkin rol oynayarak ve zincir reaksiyonlarına neden olan tüm radikallerle reaksiyona girip zinciri kırarak gösterebilirler. En belirgin özellikleri okside olan substratlara oranla çok daha az konsantrasyonlarda bile, substratın oksidasyonunu geciktirmeleri ve inhibe etmeleridir (Halliwell and Gutteridge 1990). Oksidan moleküller belirli düzeyde kaldıkları sürece, organizmanın yabancı maddelere ve enfeksiyon ajanlarına karşı önemli savunma molekülleridir. Ancak belirli düzeyin üzerinde oluştuklarında veya antioksidan sistemin yetersizliğinde serbest radikal molekülleri, organizmanın yapı elemanları olan protein, lipit, karbonhidrat, nükleik asitler ve enzimleri bozarak zararlı etkilere yol açarlar (Yalçın 1998). Antioksidanlar heterojen bir molekül ailesidir. Kökeni (doğal ya da sentetik), doğası (enzimatik ya da nonenzimatik), özellikleri (hidrofilik ya da lipofilik), mekanizması (ROS'un katalitik olarak ortadan kaldırılması, metal şelasyon) ve etki alanı (hücre içi, hücre zarı ve hücre dışı) dikkate alınarak geçmişte çeşitli sınıflandırmalar yapılmıştır (Glatzounis et al. 2005).

2.6.1. Antioksidan enzimler

Süperoksit dismutaz (SOD)

Süperoksit dismutaz süperoksit serbest radikalinin ($O_2^{\bullet-}$), H_2O_2 ve moleküler oksijene (O_2) dönüşümünü katalizleyen antioksidan enzimdir.



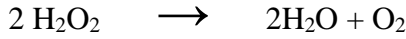
Normal metabolizma sırasında hücreler tarafından yüksek oranda O_2 üretilmesine rağmen hücre içi düzeyi SOD tarafında düşük tutulur. Ancak, H_2O_2 geçiş metalleri varlığında Fenton ve Haber Weiss reaksiyonu ile son derece aktif OH^{\bullet} radikaline dönüşmektedir. Bu durumda katalaz (CAT) ve glutatyon peroksidaz (GSH-Px) enzimlerinin aktivitesi artarak H_2O_2 düzeylerini kontrol altına almaktadır (Rodriguez et al. 2004).



Fenton reaksiyonu

Katalaz

Katalaz, dört hem proteini içeren bir hemoproteindir. Kan, kemik iliği, karaciğer, böbrek ve müköz membranlarda bol miktarda bulunmaktadır. CAT, iki H₂O₂ molekülünden birini elektron vericisi, diğerini de elektron alıcısı olarak kullanarak su ve O₂ meydana getirir (Aebi 1984).

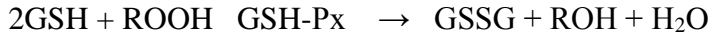
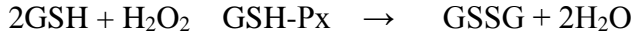


Glutatyon (GSH)

Glutamat, sistein ve glisinden sentezlenen bir tripeptiddir. Özellikle karaciğerde olmak üzere pek çok dokuda yüksek düzeyde bulunur. Hücre için en önemli antioksidan molekülü GSH olup serbest radikaller ve peroksitlerle reaksiyona girerek hücreleri oksidan hasara karşı korur. Bazı enzimlerin substratı veya kofaktörü olarak da görev yapmaktadır. GSH-Px, glutatyon redüktaz (GSH-R) ve GST gibi enzimlerin fonksiyonu için gereklidir. Ayrıca pek çok proteinin ve enzimin inaktivasyonunu hücrenin protein yapısındaki sülfhidril (-SH) gruplarını indirgenmiş halde tutarak engeller. GSH amino asitlerin membrandan transportunda da görev alır (Halliwell and Gutteridge 1999, Yalçın 1998). Spermatogenez ve sperm olgunlaşmasında önemli rol oynadığı, influenza enfeksiyonunu inhibe ettiği, T-lenfositlerin, PMNL'lerin ve sitokinlerin aktivasyonu için gerekli olduğu ve immün sistemin önemli bir elemanı olarak fonksiyon gösterdiği ortaya konmuştur. Yapılan araştırmalar GSH eksikliğinin oksidatif strese yol açtığını ve Alzheimer, Parkinson, epilepsi, karaciğer hastalıkları, kistik fibrozis, orak hücreli anemi, AIDS, kanser, koroner kalp hastalığı, inme, diyabet gibi pek çok hastalığın nedeni olabileceğini ortaya koymaktadır (Ross 1988).

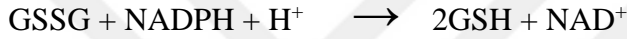
Glutatyon Peroksidaz

GSH-Px enzimi, iki monomeric glutatyon ile H₂O₂'den, su ve glutatyon disülfid molekülü oluşan enzimatik reaksiyonun katalizörüdür (Bhabak and Muges 2010). Koenzim olarak selenyuma ihtiyaç duyar. Hücre zarını, H₂O₂'nin toksik etkilerinden korur (Özben 2013). Eritrositlerde GSH-Px oksidatif strese karşı en etkin antioksidandır. GSH-Px aktivitesindeki azalma, H₂O₂'nin artmasına ve şiddetli hücre hasarına neden olur (Valko et al. 2006).



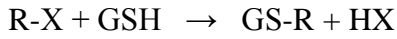
Glutasyon Redüktaz (GR)

Glutasyon redüktaz, bir flavin enzimidir ve koenzimi NADPH, prostetik grubu FAD'dır. Hem sitozol hem de mitokondride bulunmaktadır. Okside glutasyon hücreyi oksidanlara karşı koruyamaz. Hücre, elektron kaynağı olarak NADPH kullanan redüktazın katalizlediği bir reaksiyon ile indirgenmiş glutasyonu tekrar oluşturur. NADPH, H₂O₂'nin indirgenmesinde indirekt olarak elektronları sağlar. Oluşan NAD⁺ ise Glikoz 6 fosfat dehidrogenaz enzimi yardımıyla NADPH' a dönüştürülür (Paglia and Valentine 1967).



Glutasyon S-Transferaz (GST)

Glutasyon S-transferaz dimerik yapıda olup sitozolde bulunmaktadır. Yabancı maddelerin biyotransformasyonunda rolleri olan GST'ler çeşitli endojen ve eksojen bileşiklerin GSH ile konjugasyonunu katalize eder (Reiter et al. 1995).



2.7. MALONDİALDEHİT (MDA)

Non-enzimatik oksidatif lipit peroksitlerinin, membran poliansatüre yağ asitlerinin oksidasyonu sonucunda meydana gelip parçalanması sonucu oluşan toksik etkili son üründür (Bray 2000). Lipit peroksidasyonun en önemli göstergesi MDA'dır (Iwama 2004, Moraes 2004). MDA, hücre membranlarından iyon alışverişine etki ederek membrandaki bileşiklerin çapraz bağlanmasına yol açar ve iyon geçirgenliğinin ve enzim aktivitesinin değişimi gibi olumsuz sonuçlara neden olur. MDA bu özelliği nedeniyle, DNA'nın nitrojen bazları ile reaksiyona girebilir ve bundan dolayı mutajenik, hücre kültürleri için genotoksik ve karsinogeniktir (Kalender ve ark. 2004, Niki 1987, Placer et al. 1990).

2.8. N-METİL D-ASPARTAT (NMDA) ANTAGONİZMASI VE İ/R HASARI

Jeff Watkins ve arkadaşları NMDA reseptörlerini, NMDA reseptör antagonistlerinin sentezi sayesinde bulmuşlardır (Rea K et al. 2007). NMDA kanallarının aktivasyonu hücre içi kalsiyum artışına neden olur. Hücre içi kalsiyum birikimi de NO oluşumuna neden olan nitrik oksit sentaz (NOS) yolunun aktivasyonu ile SR oluşumunu uyarır. NMDA reseptörlerinin aşırı aktivasyonu da apoptozise giden olayları başlatmaya katkıda bulunur (Faden et al. 1990, Faden et al. 1988).

N-metil D-aspartat blokerleri'nin çeşitli dokularda (beyin, böbrek, myokard, iskelet kasında) İ/R hasarına karşı koruyucu etkileri olduğu gösterilmiştir (Himmelseher and Durieux 2005, Lee et al. 2004, Kato and Foex 2002). Anoksik hipoksik nöronal kültür çalışmalarında sinaptik aralığa salınan eksitatör aminoasit (EAA)'lerin nörotoksik seviyelere ulaştığı saptanmıştır. Bu hasar hem kompetitif hem de nonkompetitif NMDA antagonistleri ile azaltılabilmektedir (Boast et al. 1988, Happel et al. 1981). Memantin orta ve şiddetli Alzheimer hastalığının tedavisinde NMDA antagonisti olarak kullanılmaktadır. NMDA reseptörlerini bloke ederek yükselmiş glutamat düzeylerinin neden olduğu intraselüler kalsiyum birikimini azaltarak tedavide etkili olur (Sonkusare et al. 2005). Ketamin kuvvetli analjezik ve hafif narkotik özellikleri olan, hızlı etki ortaya koyan anesteziik bir ajandır (Tso et al. 2004). 1960' lı yılların sonuna doğru fensiklidin analogu bir madde olarak klinik kullanıma girmiştir (Hirota and Lambert 1996). Günümüzde ketaminin insanlarda terapötik amaçlı kullanımı çok yaygın olmamakla birlikte travmalar, acil operasyon gerektiren durumlarda ve özellikle pediatrik hasta grubunda, ayrıca veteriner hekimlikte kullanılmaktadır (Moore et al. 2001, Freese et al. 2002). Ketamin esas olarak NMDA reseptörlerini bloke ederek etki gösterir. Bileşik spesifik olarak NMDA reseptörlerindeki fensiklidin bağlanma bölgelerine zayıf olarak bağlanır ve yarışmasız olarak blokaj yapar (Shiue et al. 1997). Ketaminin aynı zamanda İ/R hasarından koruyucu etkiye sahiptir (Guzman-De et al. 2010, Camara-Lemarroy et al. 2009).

2.9. AMANTADİN

Amantadine Immediate Release 1966 yılında Asya İnfluenzasına karşı koruyucu bir ajan olarak Amerika Birleşik Devletleri'nde onaylanmıştır (Hubsher et al. 2012). Amantadin, bir glutamaterjik reseptör türü olan NMDA reseptörünün (Ki 5 10 1M)

yarışmasız (açık kanallı) bir antagonistidir, glutaminerjik reseptör tipidir, direk ve indirek glutaminerjik ve dopaminerjik sinyal etkisine sahiptir (Danysz et al 1997, Farnebo et al. 1971). Amantadinin ön görülebilir antikolinergik (örn; ağız kuruluğu, üriner retansiyon ve kabızlık) ve NMDA reseptörü antagonist etkinlikleri (örn; halüsinasyonlar) mevcuttur (Metman et al. 1999). Amantadin bilinç bozukluğu nedeniyle takip edilen nörorehabilitasyon sürecindeki hastalar için en sık kullanılan ilaçlardan biridir (Giacino et al. 2012). Glutamat antagonistik etki göstererek postsinaptik membranda inhibisyon sağlamak ve uyanıklığı arttırmaktadır (Saniova et al.2004). Bu nedenle Parkinson hastalığı, travmatik beyin hasarı, hipoksik iskemik ensefalopati, postoperatif dönemde uyanıklık ve emosyonel fonksiyonları arttırmak için kullanılmaktadır (Aksu ve ark 2013). Saniova ve ark. 74 hasta üzerinde yaptıkları retrospektif bir çalışmada amantadin tedavisi alanlarda almayanlara göre Glasgow skalasında belirgin düzelme ve daha düşük ölüm hızları (%51 vs %6) rapor etmişlerdir (Saniova et al.2004).

3. GEREÇ VE YÖNTEM

Sakarya Üniversitesi Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu tarafından 06.02.2019 tarih ve 05 sayılı kararı ile etik kurul onayı alan bu çalışma, Sakarya Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Başkanlığı tarafından 2019-7-25-29 kod numarası ile desteklenmeye uygun bulunmuştur. Çalışmamız Sakarya Üniversitesi Deneysel Tıp Uygulama ve Araştırma Merkezi'nde Eylül 2019 da gerçekleştirildi.

3.1. DENEK SEÇİMİ

Çalışmada 36 adet 250-330 g ağırlığında Wistar cinsi erişkin erkek ratlar kullanıldı. Ratlar, araştırma başlangıcına kadar 12 saat aydınlık 12 saat karanlık ortamda barındırılarak ratların ortama adaptasyonları sağlandı. Denekler ışık ve sıcaklığı standardize edilmiş ortamda bakıldı. Standart sıçan gıdası (pellet yemi) alan hayvanlara sıvı ve yem kısıtlaması uygulanmadı.

3.2. KULLANILAN YÖNTEMLER

Ratlar rastgele, her grupta 6 adet olacak şekilde 6 gruba ayrıldı.

Grup Sham: Sham grubu

Grup A-90: Amantadin- 90 grubu

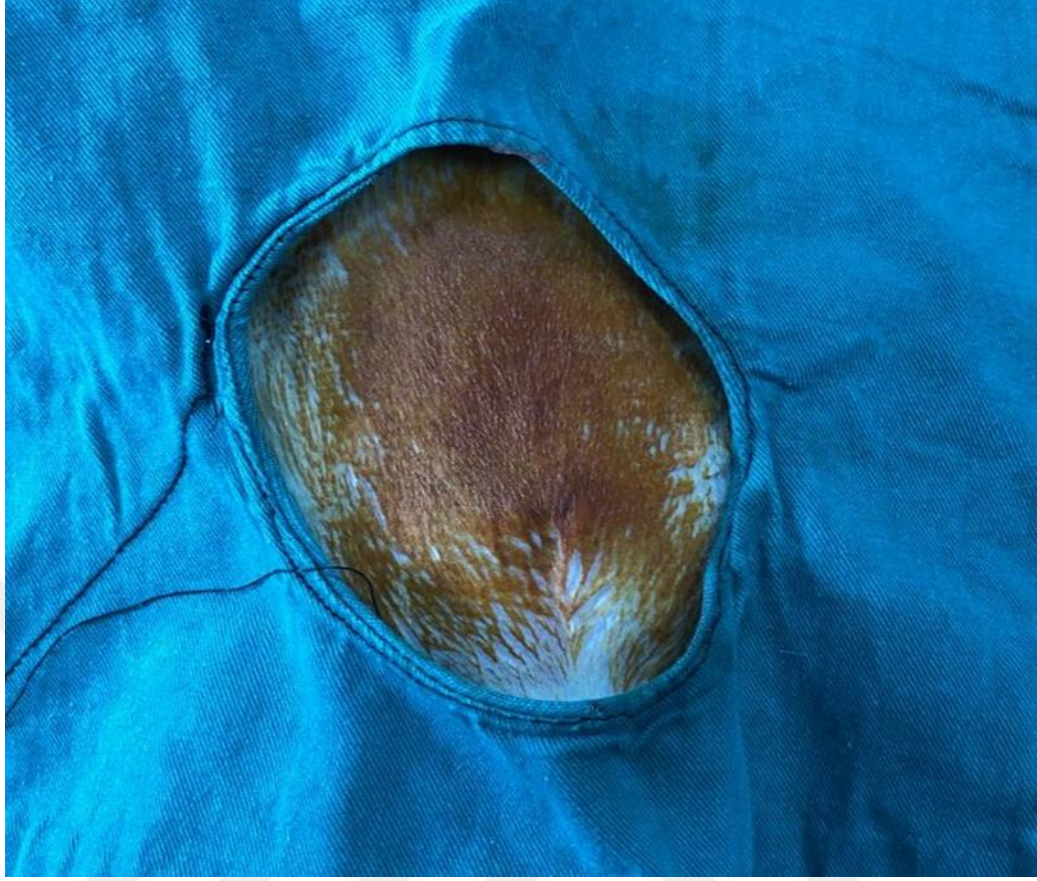
Grup A-135: Amantadin -135 grubu

Grup İ/R: İskemi-Reperfüzyon grubu

Grup İ/R-A 90: İskemi Reperfüzyon+Amantadin-90 grubu

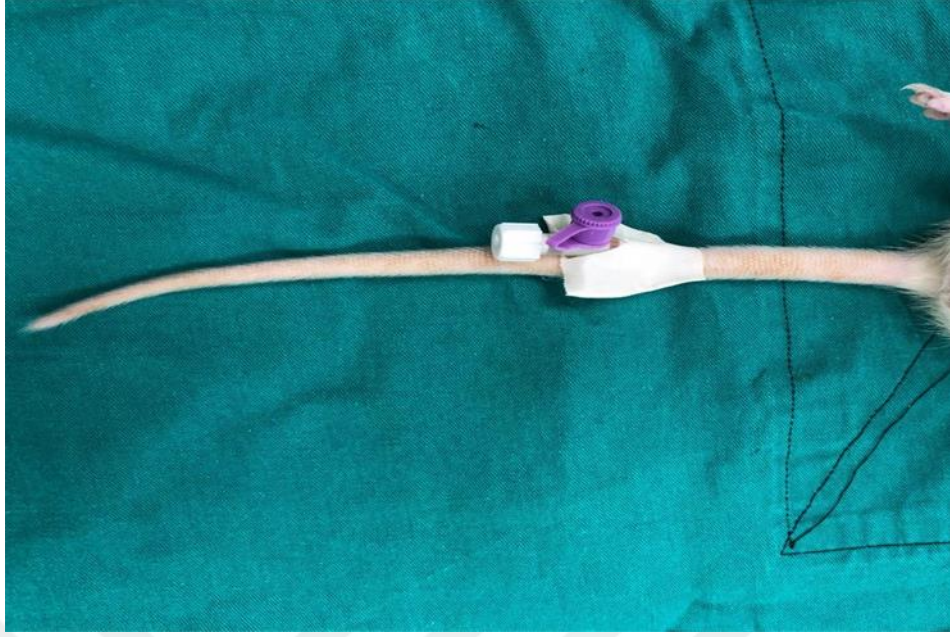
Grup İ/R-A 135: İskemi Reperfüzyon+Amantadin-135 grubu

Anestezi verilmeden önce ağırlıkları ölçülen ratlara 100 mg/kg ketamin (Ketalar® 1 ml:50 mg, Pfizer, İstanbul, Türkiye), 15 mg/kg ksilazin (Xylazinbio® %2, Bioveta, Çek Cumhuriyeti) intraperitoneal (i.p.) uygulanarak anestezileri sağlandı ve abdominal bölgeleri cerrahi insizyondan önce tıraş edildi. %10 povidon iyodin solüsyonu ile cerrahi alan antisepsisi sağlandı (Resim 1).



Resim 1: Ratın tıraşlanması ve cerrahi alan antisepsisi

Isı kaybının engellenmesi ve hipotermiden kaçınılması amacıyla ısıtıcı blanket ve ısı monitörizasyonu için de rektal termometre kullanıldı. Yeterli anestezi kriteri olarak ağrılı uyarana yanıtızsızlık sağlandıktan sonra hidrasyon sağlamak amacıyla kuyruk veninden 24 Gauge (G) intravenöz kanül (IV Flon Ar-Es, İzmir, Türkiye) ile kanülasyon yapıldı (Resim 2). Anestezi idamesinde ratlara düzenli aralıklarla i.p. ketamin enjeksiyonu uygulandı.



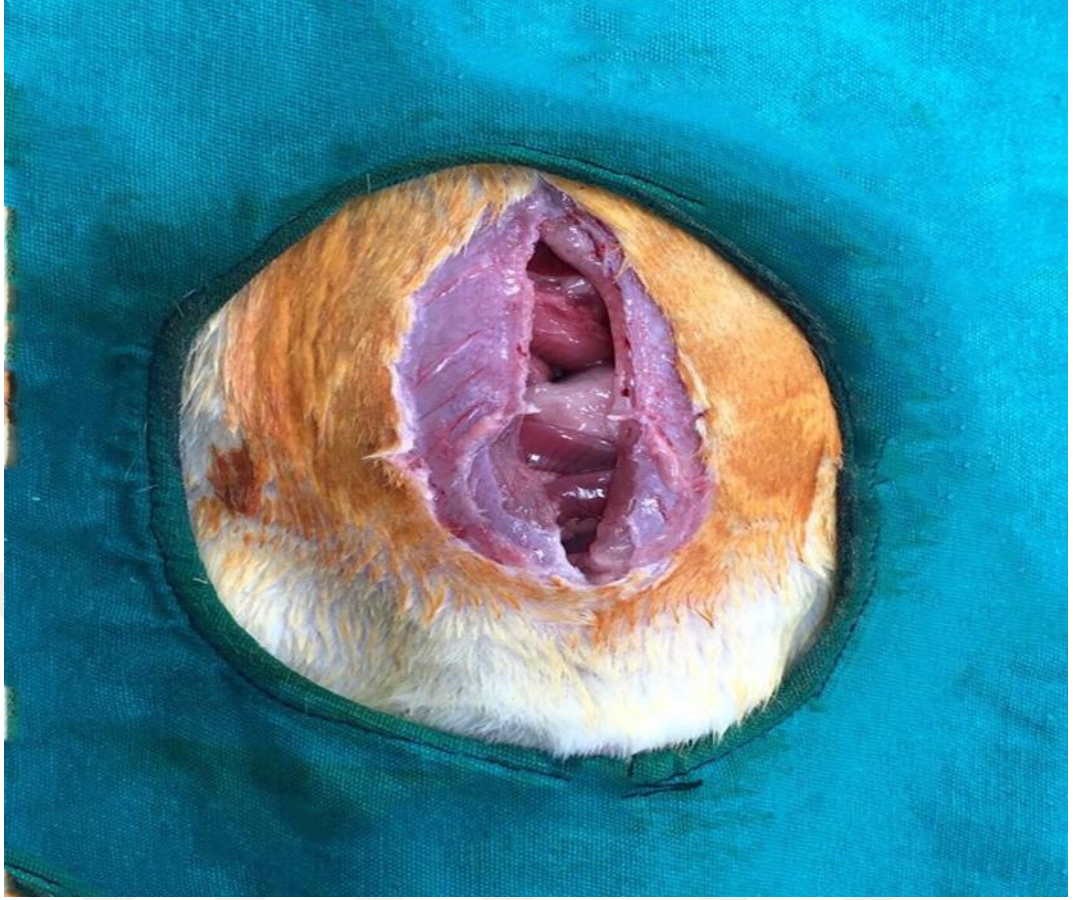
Resim 2: Kuyruk veni kanülasyonu

Grup Sham'da yeterli anestezi derinliği sağlandıktan ve i.v. kanülasyon yapıldıktan 15 dakika sonra orta abdominal insizyon yapıldı fakat herhangi bir müdahale yapılmadı (Resim 3).

Grup A-90'da yeterli anestezi derinliği sağlandıktan ve i.v. kanülasyon yapıldıktan sonra amantadin (Amantadine hydrochloride®, A1260-5G, Sigma-Aldrich, St. Louis, USA) 90 mg/kg i.p. yolla verildi. İşlem yapılmadan 15 dakika beklendi. Orta abdominal insizyon yapıldı fakat herhangi bir müdahale yapılmadı.

Grup A-135'de yeterli anestezi derinliği sağlandı. İntravenöz kanülasyon yapıldı. Amantadin 135 mg/kg i.p. yolla verildikten 15 dakika sonra orta abdominal insizyon yapıldı fakat herhangi bir müdahale yapılmadı.

Grup İ/R'de yeterli anestezi derinliği sağlandıktan ve i.v. kanülasyon yapıldıktan 15 dakika sonra orta abdominal insizyon yapılarak infrarenal abdominal aorta eksplore edildi. Aortaya atravmatik mikrovasküler klemp uygulandı (Resim 4). 120 dakikalık iskemi süresinden sonra atravmatik vasküler klemp uzaklaştırıldı ve 120 dakika reperfüzyon uygulandı.

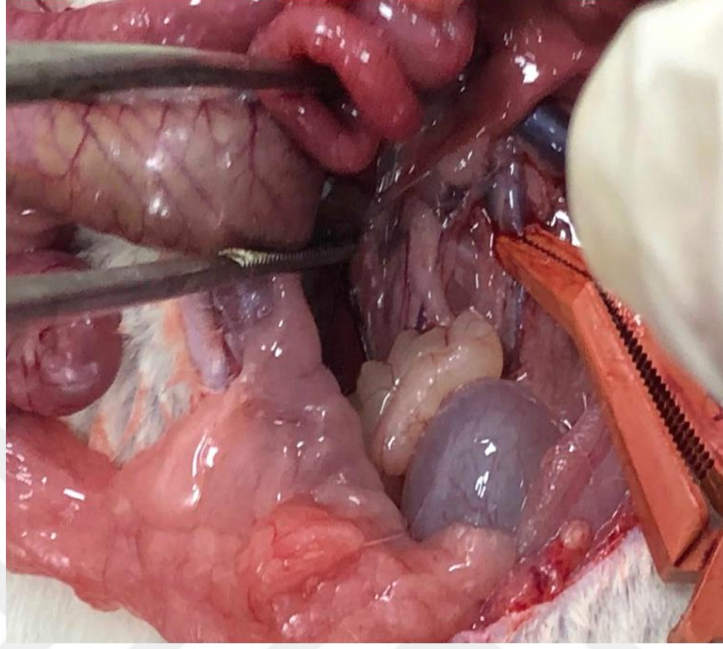


Resim 3: Orta hat abdominal insizyon

Grup İ/R-A 90’da yeterli anestezi derinliği sağlandıktan ve i.v. kanülasyon yapıldıktan sonra amantadin 90 mg/kg i.p. yolla uygulandı. İşlem yapılmadan 15 dakika beklendi. Orta abdominal insizyon yapılarak infrarenal abdominal aorta eksplere edildi. Aortaya atravmatik mikrovasküler klemp uygulandı. 120 dakikalık iskemi süresinden sonra atravmatik vasküler klemp uzaklaştırıldı ve 120 dakika reperfüzyon uygulandı.

Grup İ/R-A 135’de yeterli anestezi derinliği sağlandıktan ve i.v. kanülasyon yapıldıktan sonra amantadin 135 mg/kg i.p. yolla uygulandı. İşlem yapılmadan 15 dakika beklendi. Orta abdominal insizyon yapılarak infrarenal abdominal aorta eksplere edildi. Aortaya atravmatik mikrovasküler klemp uygulandı. 120 dakikalık iskemi süresinden sonra atravmatik vasküler klemp uzaklaştırıldı ve 120 dakika reperfüzyon uygulandı.

Tüm gruplardaki ratlara 4 saat sonunda doku (akciğer) örneklemeleri için ötenazi uygulandı.



Resim 4: İnfrenal abdominal aorta diseksiyonu ve klemplenmesi

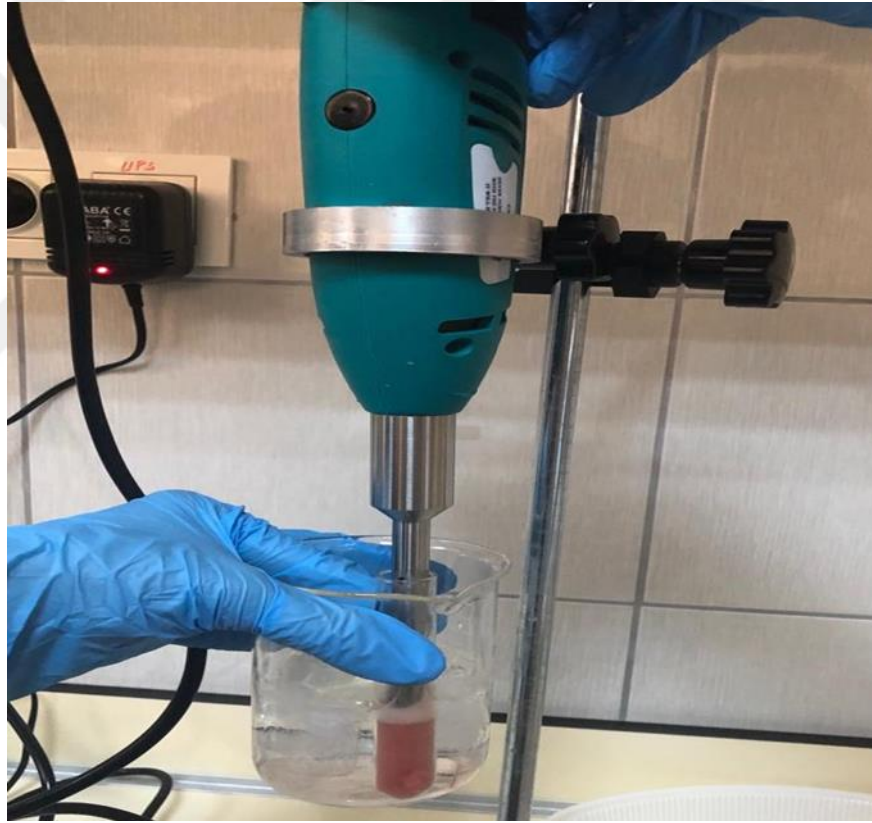
3.3. HOMOJENİZASYON

Sakarya Üniversitesi Eğitim ve Araştırma Hastanesi Biyokimya laboratuvarında, doku homojenizasyonu için -80°C 'de muhafaza edilen akciğer örneklerinin buz üzerinde yağ ve bağ dokuları uzaklaştırılarak küçük parçalara ayrıldı.

Örnekler tartıldı ve son konsantrasyonu 100 mg doku/mL olacak şekilde soğuk fosfat tamponu (pH 7.4, 50 mmol/L) içeren cam tüplere konuldu (Resim 5). Homojenizasyon işlemi mekanik homojenizatör (Isolab, Laborgerate GmbH, Germany) buz üzerinde yapıldı ve Isolab homojenizasyon cihazı kullanıldı (Resim 6). Elde edilen homojenat $10.000\text{ g}'de$, 4°C , 10 dk santrifüj edilerek debrisler ve diğer partiküllerinden ayrıldı. Tüm parametreler santrifüj sonrası elde edilen süpernatantlardan çalışıldı.



Resim 5: Doku homojenatları



Resim 6: Homojenizasyon işlemi

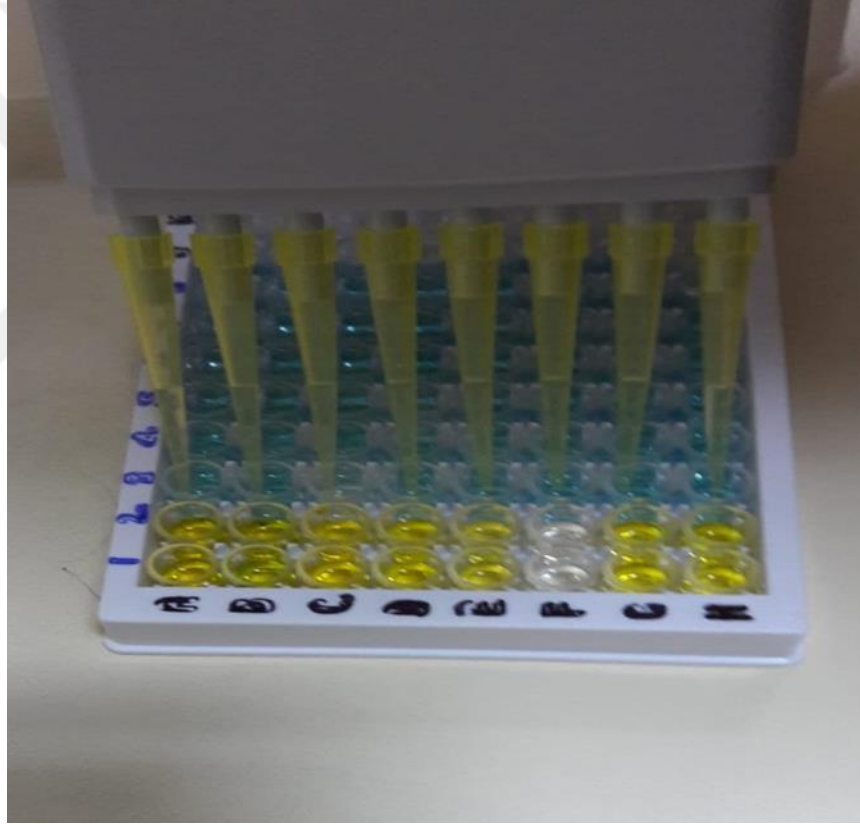
3.4. LİPİD PEROKSİDASYON ANALİZİ

Lipid peroksidasyon durumunu belirlemek için MDA parametresi kullanıldı. MDA düzeyleri Sakarya Üniversitesi Eğitim ve Araştırma Hastanesi Biyokimya laboratuvarında çalışılmıştır. MDA düzeyleri ELİSA (Elabscience Biotechnology Co. Ltd, Wuhan, China) yöntemi ile ölçüldü. Kite ait ölçüm içi varyasyon katsayısı (CV)

<%10 idi. Ölçümler üretici firma protokollerine uyularak otomatik ELİSA analizöründe (Triturus, Grifols, Spain) yapıldı. Elde edilen sonuçlar dilüsyon faktörü ile çarpılarak sonuçlar hesaplandı.

3.5. ANTIOKSİDAN ENZİMLERİN ANALİZİ

Antioksidan enzim düzeyleri Sakarya Üniversitesi Eğitim ve Araştırma Hastanesi Biyokimya laboratuvarında çalışılmıştır. SOD ve CAT düzeyleri ELİSA yöntemi ile ölçüldü. Kitlere ait ölçüm içi CV <%10 idi. Ölçümler üretici firma protokollerine uyularak otomatik ELİSA analizöründe (Triturus, Grifols, Spain) yapıldı. Elde edilen sonuçlar dilüsyon faktörü ile çarpılarak sonuçlar hesaplandı (Resim 7).



Resim 7: ELİSA çalışma aşaması

3.6. HİSTOPATOLOJİK DEĞERLENDİRME

Alınan akciğer doku örnekleri %10 formaldehit solüsyonu içerisinde +4 derecede muhafaza edildi. Dokular Sakarya Üniversitesi Eğitim ve Araştırma Hastanesi

Histoloji ve Embriyoloji Kliniği laboratuvarında hematoksilen-eozin boyası ile boyanıp ışık mikroskopunda değerlendirildi. Akciğer histopatoloji değerlendirmesinde n6trofil/lenfosit infiltrasyonu ve alveol duvar kalınlaşmasının derecelendirilmesi d6rt nokta skorlama sistemi [Grade 0 (Hasar belirtisi yok), Grade 1 (hafif hasar), Grade 2 (orta hasar), Grade 3 (ciddi hasar)] kullanılarak yapıldı.

3.7. İSTATİSTİKSEL ANALİZ

Veriler IBM SPSS Statistics 23 programı kullanılarak tamamlandı. Çalışma verileri sayısal değerkenler için ortalama \pm standart sapma (Ort \pm SS) biçiminde verildi. İki den fazla grup arasında fark olup olmadığına Kruskal Wallis testi ile bakıldı ve $p < 0,05$ anlamlı kabul edildi. Gruplar arasında farklılık olması durumunda Mann Whitney U testi ile bakıldı ve Bonferroni d6zeltmesi uygulanarak $p < 0,003$ anlamlı kabul edildi.

4. BULGULAR

Çalışmamızda incelenen toplam 36 denekten oluşan 6 grup arasında ratların ağırlıkları karşılaştırıldığında, gruplarda ağırlık medyanlarının benzer olduğu saptandı ($p=0,723$) (Tablo 1).

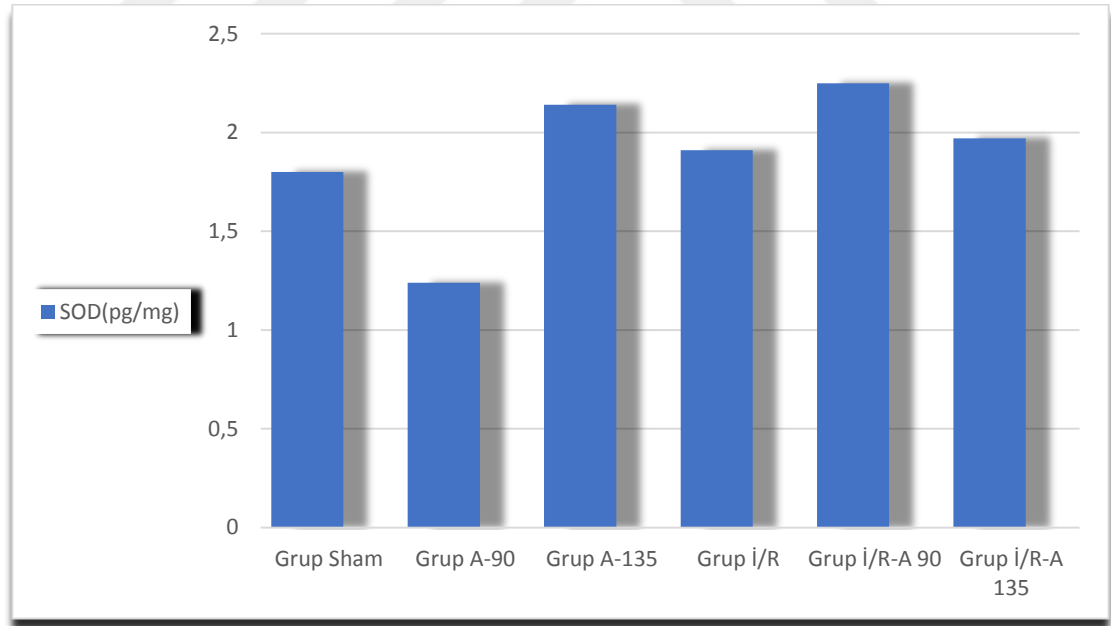
Tablo 1: Gruplardaki ratların ağırlıkları

		Ort	SS	Min	Max	P
Rat ağırlıkları (g)	Grup Sham	279,17	14,26	260,0	300,0	0,723
	Grup A-90	288,50	17,39	262,0	310,0	
	Grup A-135	287,83	10,32	274,0	302,0	
	Grup İ/R	289,50	12,14	275,0	310,0	
	Grup İ/R-A 90	285,83	18,97	265,0	320,0	
	Grup İ/R-A 135	284,67	22,41	262,0	325,0	

Gruplara ait akciğer doku SOD düzeyleri Tablo 2’de verildi. Akciğer doku SOD düzeyi bakımından gruplar arasında fark saptanmadı ($p=0,400$). Grup İ/R SOD düzeyi, Grup Sham’a göre daha yüksek iken; Grup İ/R-A 90 ve Grup İ/R-A 135 SOD düzeyleri hem Grup İ/R’ye hem de Grup Sham’a göre daha yüksekti fakat istatistiksel olarak anlamlı değildi ($p>0,05$).

Tablo 2: Gruplardaki ratların akciğer doku SOD düzeyleri

	Ort	SS	Min	Max	P
Grup Sham	1,80	0,37	1,4	2,3	0,400
Grup A-90	1,24	0,90	0,3	2,7	
Grup A-135	2,14	0,98	1,4	4,0	
Grup İ/R	1,91	0,97	0,7	2,9	
Grup İ/R-A 90	2,25	0,72	1,5	3,5	
Grup İ/R-A 135	1,97	0,61	1,4	3,0	

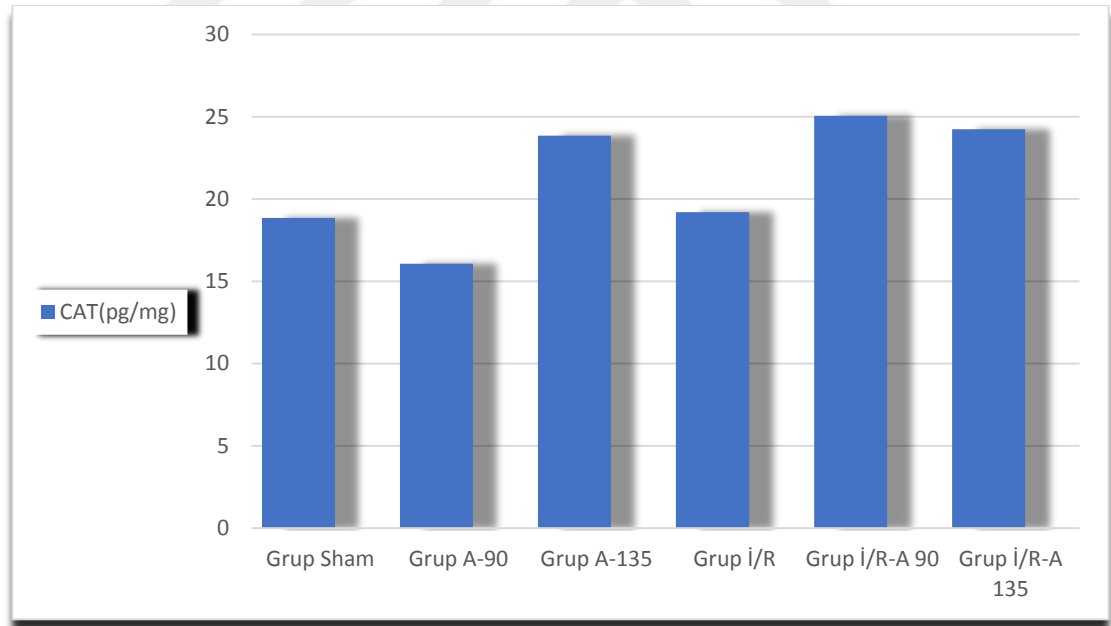


Şekil 9: Gruplardaki ratların akciğer doku SOD düzeyleri

Gruplara ait akciğer doku CAT düzeyleri Tablo 3’de verildi. Akciğer doku CAT düzeyi bakımından gruplar arasında fark saptanmadı ($p=0,063$). Grup İ/R CAT düzeyi, Grup Sham’a göre daha yüksek iken; Grup İ/R-A 90 ve Grup İ/R-A 135 CAT düzeyleri hem Grup İ/R’ye hem de Grup Sham’a göre yüksekti fakat istatistiksel olarak anlamlı değildi ($p>0,05$).

Tablo 3: Gruplardaki ratların akciğer doku CAT düzeyleri

	Ort	SS	Min	Max	P
Grup Sham	18,85	4,63	14,6	25,4	0,063
Grup A-90	16,06	8,78	1,3	27,5	
Grup A-135	23,84	3,44	21,6	30,3	
Grup İ/R	19,20	5,60	10,7	25,4	
Grup İ/R-A 90	25,05	4,99	18,3	32,8	
Grup İ/R-A 135	24,23	3,73	17,3	28,3	

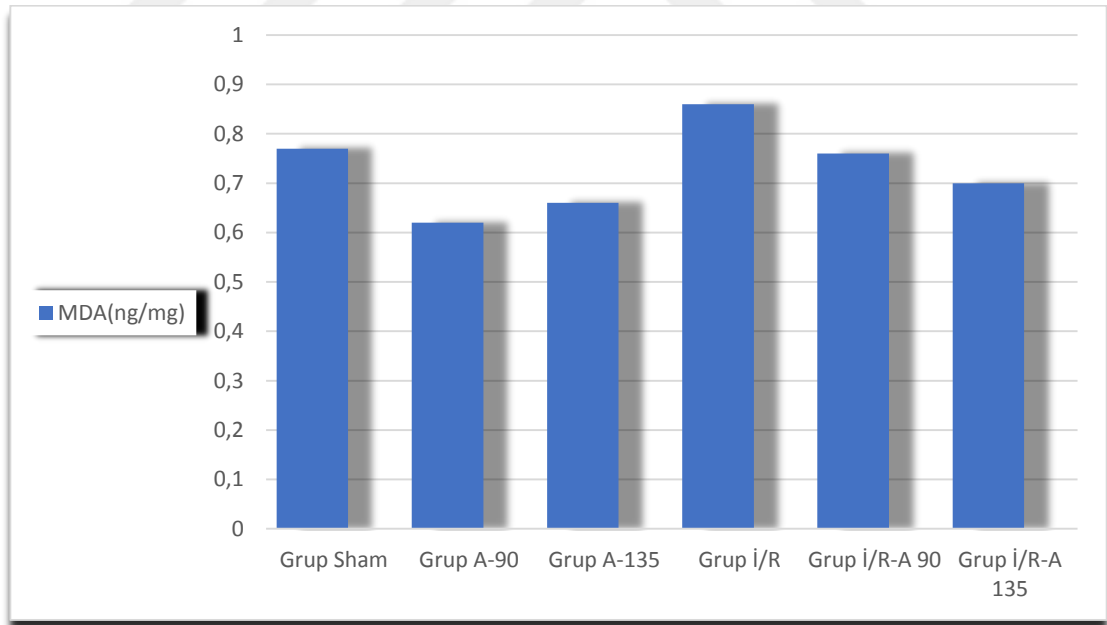


Şekil 10: Gruplardaki ratların akciğer doku CAT düzeyleri

Gruplara ait akciğer doku MDA düzeyleri Tablo 4’de verildi. Akciğer doku MDA düzeyi bakımından gruplar arasında fark saptanmadı ($p=0,209$). Doku MDA düzeyleri istatistiksel olarak anlamlı olmasada, Grup İ/R’de tüm gruplara göre yüksek tespit edildi. Grup İ/R-A 90 ve Grup İ/R-A 135 MDA düzeyleri, hem Grup İ/R hem de Grup Sham’a göre düşüktü ancak enzim düzeyleri açısından hiçbir grup arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark yoktu ($p>0,05$).

Tablo 4: Gruplardaki ratların akciğer doku MDA düzeyleri

	Ort	SS	Min	Max	P	
MDA (ng/mg)	Grup Sham	0,77	0,11	0,6	0,9	0,209
	Grup A-90	0,62	0,13	0,5	0,8	
	Grup A-135	0,66	0,27	0,2	0,9	
	Grup İ/R	0,86	0,19	0,6	1,1	
	Grup İ/R-A 90	0,76	0,25	0,3	0,9	
	Grup İ/R-A 135	0,70	0,17	0,5	0,9	



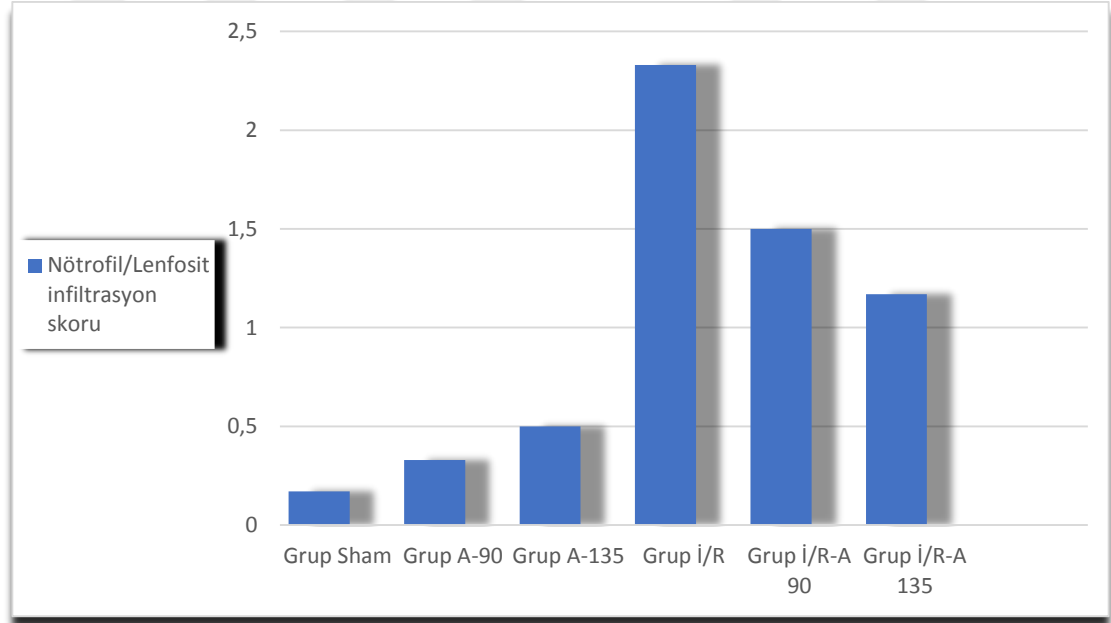
Şekil 11: Gruplardaki ratların akciğer doku MDA düzeyleri

Gruplara ait akciğer doku nötrofil/lenfosit infiltrasyon skor düzeyleri karşılaştırıldığında istatistiksel olarak anlamlı fark saptandı ($p=0,000$) (Tablo 5). Grup İ/R’de; Grup Sham, Grup A-90 ve Grup A-135’e göre istatistiksel olarak anlamlı derecede daha yüksekti (sırası ile $p=0,002$, $0,002$, $0,002$). Grup İ/R-A 90 ve Grup İ/R-A 135’de ise Grup İ/R’ye göre daha düşüktü, fakat anlamlı farklılık tespit edilmedi ($p>0,003$).

Tablo 5: Gruplardaki ratların akciğer dokusu Nötrofil/Lenfosit İnfiltrasyon Skorları

		Ort	SS	Min	Max	P
Nötrofil/ Lenfosit İnfiltrasyon Skorları	Grup Sham*	0,17	0,41	0,0	1,0	0,000
	Grup A-90*	0,33	0,52	0,0	1,0	
	Grup A-135*	0,50	0,55	0,0	1,0	
	Grup İ/R	2,33	0,52	2,0	3,0	
	Grup İ/R-A 90	1,50	0,55	1,0	2,0	
	Grup İ/R-A 135	1,17	0,41	1,0	2,0	

* $p<0,003$; Grup İ/R ile karşılaştırıldığında



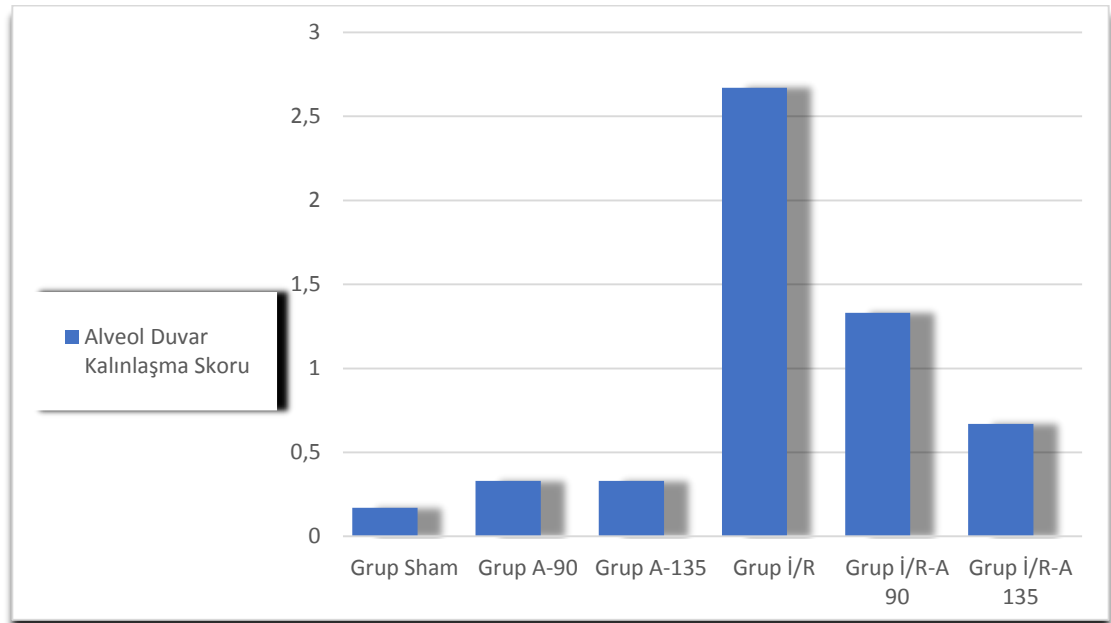
Şekil 12: Gruplardaki ratların akciğer dokusu Nötrofil/Lenfosit İnfiltrasyon Skorları

Gruplara ait akciğer doku alveol duvar kalınlaşması skor düzeyleri karşılaştırıldığında istatistiksel olarak anlamlı fark saptandı ($p=0,000$) (Tablo 6). Grup İ/R’de Grup Sham, Grup A-90, Grup A-135 ve Grup İ/R-A 135’e göre istatistiksel olarak daha yüksek tespit edildi (sırası ile $p=0,002$, $0,002$, $0,002$, $0,002$). Grup İ/R-A 90’da Grup İ/R’ye göre daha düşüktü fakat istatistiksel olarak anlamlı değildi ($p>0,003$).

Tablo 6: Gruplardaki ratların akciğer dokusu alveol duvar kalınlaşma skoru

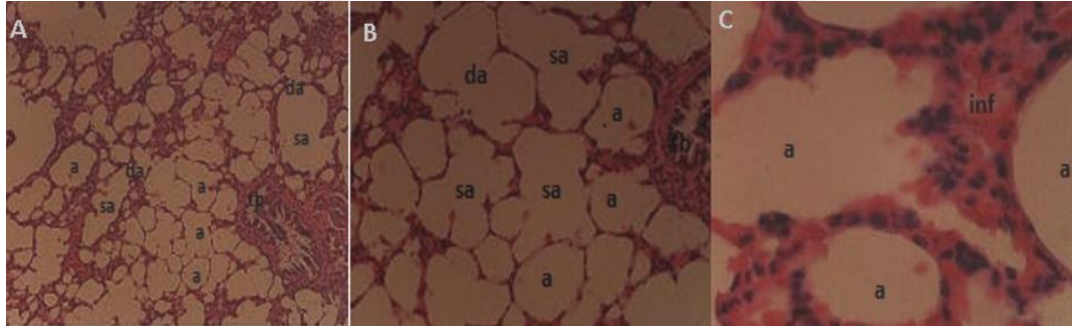
	Ort	SS	Min	Max	P	
Alveol duvar kalınlaşma skoru	Grup Sham*	0,17	0,41	0,0	1,0	0,000
	Grup A-90*	0,33	0,52	0,0	1,0	
	Grup A-135*	0,33	0,52	0,0	1,0	
	Grup İ/R	2,67	0,52	2,0	3,0	
	Grup İ/R-A 90	1,33	0,52	1,0	2,0	
	Grup İ/R-A 135*	0,67	0,52	0,0	1,0	

* $p<0,003$; Grup İ/R ile karşılaştırıldığında



Şekil 13: Gruplardaki ratların akciğer dokusu alveol duvar kalınlaşma skorları

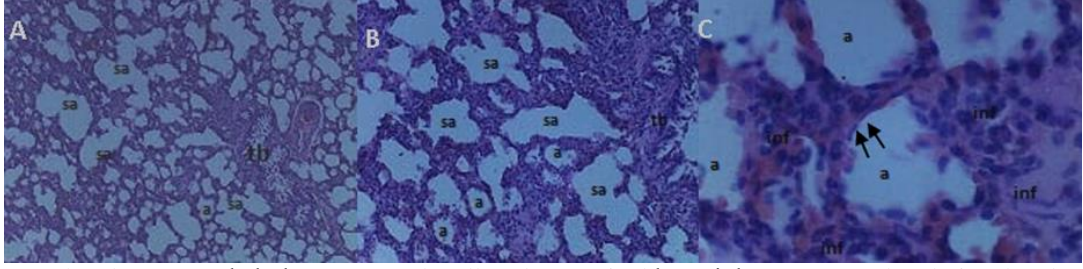
Gruplardan elde edilen akciğer doku preparatlarının yapılan histopatolojik incelemesi Resim 8, 9, 10, 11, 12, 13’de verilmiştir. Grup Sham’da normal akciğer dokusu parankimi gözlemlendi (Resim 8). Grup İ/R de yoğun nötrofil infiltrasyonu ve alveol duvar kalınlığında ciddi artış olduğu gözlemlendi (Resim 9). Grup A-90’da minimal infiltrasyon alanları ve minimal duvar kalınlaşması tespit edildi (Resim 10). Grup A-135’de Grup A-90’a benzer şekilde belirginleşmiş alanlar gözlemlendi (Resim 11). Grup İ/R-A 90’da infiltrasyon alanları belirginleşmiş olup alveol duvarının kalınlaşmış olduğu tespit edildi (Resim 12). Grup İ/R-A 135’de nadir infiltrasyon alanları gözlemlenmiş olup Grup İ/R-A 90’a göre alveol duvarında daha az kalınlaşma tespit edilmiştir (Resim 13).



a, Alveoller; tb, Terminal bronşiol; sa, Saccus alveolaris (alveol kesesi); da, Ductus alveolaris (alveol kanalı); inf, İnflamasyon

Resim 8: Grup Sham; hematoksilin-eozin; A-X40; B-X100; C-X400

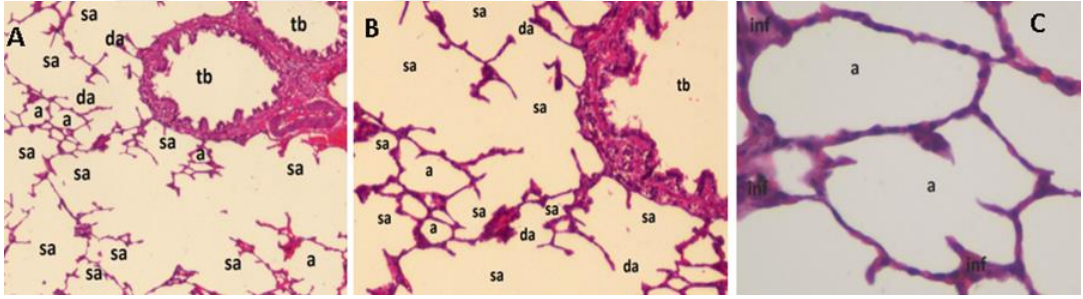
Grup Sham’da tüm akciğer dokusu bileşenleri normal yapıda izlendi. Doku genelinde lenfosit infiltrasyonu yoktu. Terminal bronşiyoller, respiratuar bronşiyoller, duktus alveolaris ve sakkus alveolarisler normal yapılarında görüldü. Alveoler hücreler normal görünümde olup, alveoler lümende hücre birikimi yoktu. Damar duvar yapısı normal görünümde izlenmekle birlikte damarlarda ödem izlenmedi.



↓↓, Alveoler septum kalınlaşması; a, Alveoller; tb, Terminal bronşiol; sa, Saccus alveolaris (alveol kesesi); inf, İnflamasyon

Resim 9: Grup İ/R; hematoksilen-eozin; A-X40; B-X100; C-X400

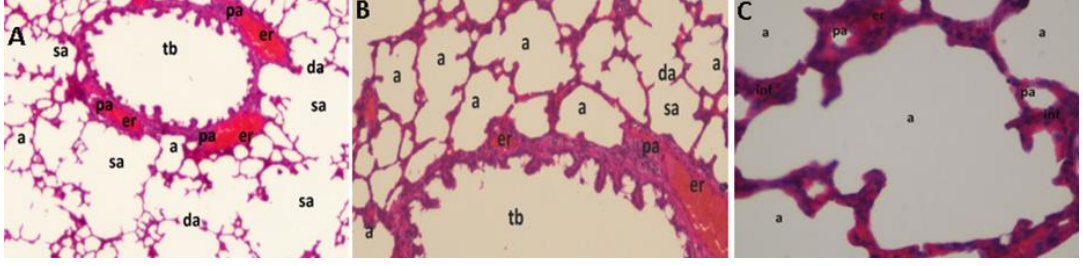
Grup İ/R akciğer doku örneklerinde, yoğun lenfosit infiltrasyonu görüldü ve kümelenmiş lenfosit toplulukları belirgindi. Respiratuar bronşiyollerin duvar yapısında bozulma ve dejenerasyon belirgindi. Epiteldeki kopmalara respiratuar bronşiyol lümenindeki az miktarda hücre debrisinin eşlik ettiği görüldü. Alveol lümeninde belirgin bir bozulma vardı. Damar duvarında kalınlaşma dikkati çekti.



a, Alveoller; tb, Terminal bronşiol; sa, Saccus alveolaris (alveol kesesi); da, Ductus alveolaris (alveol kanalı); inf, İnflamasyon

Resim 10: Grup A-90; hematoksilen-eozin; A-X40; B-X100; C-X400

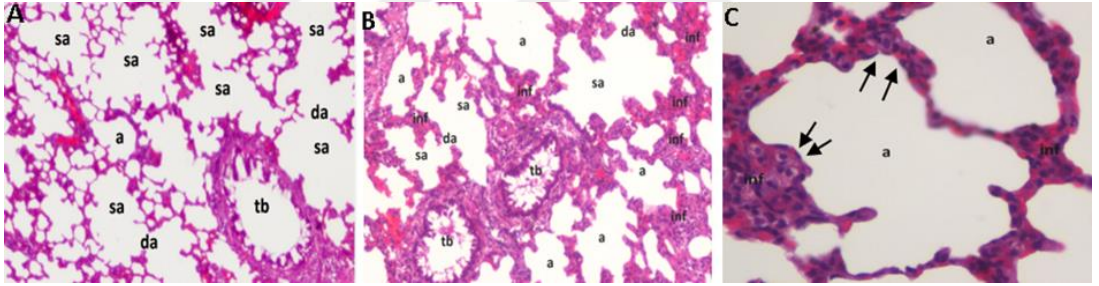
Grup İ/R'de görülen yoğun lenfosit infiltrasyon alanları Grup A-90'da çok nadir gözlemlendi. Terminal bronşiyol ve alveollerin lümeni parçalanmış hücre kümelenmesi içermiyordu. Alveol duvarlarında kalınlaşma nadir bölgelerde izlendi ve alveol duvarları Grup İ/R'ye göre daha ince gözlemlendi.



a, Alveoller; tb, Terminal bronşiol; sa, Saccus alveolaris (alveol kesesi); da, Ductus alveolaris (alveol kanalı); inf, İnflamasyon; pa, kan damarı arter duvarı (pulmoner arter dalları); er, Eritrosit

Resim 11: Grup A-135; hematoksilin-eosin; A-X40; B-X100; C-X400

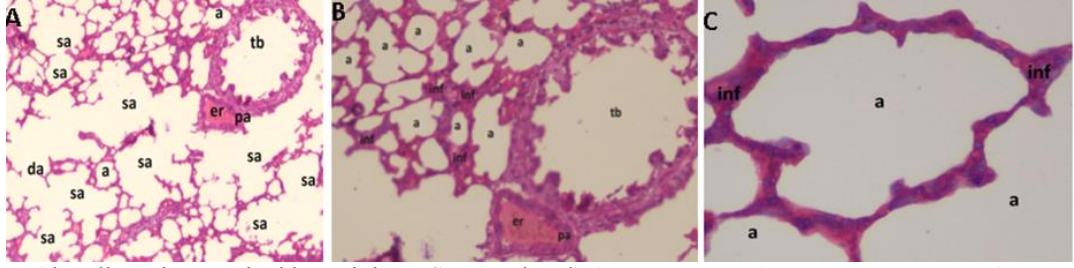
Grup A-90 ile arasında belirgin bir fark gözlenmedi. Grup İ/R’de gözlenen yoğun lenfosit infiltrasyon alanları Grup A-135’de çok nadir gözlemlendi. Terminal bronşiyol ve alveollerin lümeni parçalanmış hücre kümelenmesi içermiyordu. Alveol duvarlarında kalınlaşma nadir bölgelerde izlendi ve alveol duvarları Grup İ/R’ye kıyasla daha ince gözlemlendi. Genel olarak histopatolojik inceleme sonuçları Grup A-90’a benzerdi.



↓↓, Alveoler septum kalınlaşması; a, Alveoller; tb, Terminal bronşiyol; sa, Saccus alveolaris (alveol kesesi); da, Ductus alveolaris (alveol kanalı); inf, İnflamasyon

Resim 12: Grup İ/R-A 90; hematoksilin-eosin; A-X40; B-X100; C-X400

Grup İ/R-A 90’da Grup İ/R’ ye kıyasla yoğun lenfosit infiltrasyonu içeren bölgeler daha azdı ve bu bölgelerde bronkus ağacını çevreleyen düz kaslarda artış gözlemlendi. Terminal bronşiyol ve alveollerin lümeninde parçalanmış hücre yığımları gözlemlenmedi. Damarlardaki kalınlaşma ise Grup İ/R’ye göre daha ince gözlemlendi.



a, Alveoller; tb, Terminal bronşiol; sa, Saccus alveolaris (alveol kesesi); da, Ductus alveolaris (alveol kanalı); inf, İnflamasyon; pa, kan damarı arter duvarı (pulmoner arter dalları); er, Eritrosit

Resim 13: Grup İ/R-A 135; hematoksilen-eosin; A-X40; B-X100; C-X400.

Grup İ/R-A 135’de, Grup İ/R ve Grup İ/R-A 90’a oranla belirgin bir rejenerasyon dikkat çekti. Lenfosit infiltrasyonunda bu iki gruba göre belirgin bir azalma vardı. Terminal bronşiollerin normal histolojik görünümüne yakın olduğu görüldü. Bronşiol ve alveol lümenindeki hüresel kümelenme gözlenmedi. Damar duvarı düz kas yapıları normal histolojik yapıda izlenirken damar duvarındaki incelme, Grup İ/R ve Grup İ/R-A 90’a göre belirgindi.

5. TARTIŞMA

Çalışmamızda alt ekstremitte İ/R modeli oluşturularak İ/R hasarında amantadinin akciğer dokusu üzerindeki histopatolojik ve biyokimyasal etkilerini araştırdık. 135 mg/kg ve 90 mg/kg dozda uygulanan amantadinin biyokimyasal olarak CAT, SOD ve MDA değerleri üzerine etkisini göremememize rağmen; histopatolojik olarak yaptığımız incelemede İ/R hasarına, 135 mg/kg dozda uygulanan amantadinin 90 mg/kg'a göre daha etkili olduğunu gördük. Grup İ/R-A 135'de Grup Sham'a kıyasla alveol duvar kalınlığı düzeyleri açısından anlamlı bir farklılık yokken; Grup İ/R'ye göre duvar kalınlığında anlamlı bir incelmeye mevcuttu.

Akut ekstremitte iskemisi sonrasında, ekstremitenin tekrar kanlandırılması ve normal dolaşımın sağlanması, doku hasarı ve sistemik komplikasyonlar görülebilir. Literatürde alt ekstremitte İ/R hasarı sonrası mortalite oranı %15-52, amputasyon oranı ise %12-22 olarak belirtilmiştir. Cerrahi girişim sonrasında ancak %60-70 olguda tam düzelme sağlanabilmektedir. Uzun süre iskemik kalmış ekstremitenin tekrar kanlandırılmasıyla ortaya çıkan serbest oksijen radikallerinin, endotel ve nötrofillerle etkileşerek lipid peroksidasyonunu arttırması, lokal ve sistemik birçok etkinin ortaya çıkmasına neden olur. Hücre şişmesi, ödem, toksin ve miyogloblin salınımı ile beraber, SOR'lerin etkisi ile akut böbrek yetersizliği, akciğer ödemi, akut sıkıntılı solunum sendromu, şok karaciğeri gibi sistemik hasarlar gelişebilir (Pontoppidan et al. 1972, Dantzker and Scharf 1998) İskemik dokuda ATP üretimi durur, sonuç olarak hücre metabolizması esnasında hücrede oluşan serbest radikaller (SR) temizlenemez. Reperfüzyon, dokularda kompleman sistemi aktivasyonu, proteaz aktivasyonu ve araşidonik asit metabolizması gibi birçok mekanizma ile SR oluşumuna katkıda bulunarak, hasarın büyümesine neden olur (Huether and McCance 2016, McCance and Huether 2013). Yine reperfüzyon ile bölgeye nötrofil infiltrasyonu olması ve inflamatuvar sitokinlerin artması hasarı şiddetlendirir. İ/R hasarına en duyarlı hücre yapıları zar lipidleri, nükleik asitler ve hücre yapı proteinleridir (Kumar et al. 2017). İ/R sonrası hem iskemik alanda lokal hasar oluşmakta hem de iskemik alan dışındaki uzak organlarda hasar oluşabilmektedir. Uzak organ hasarında akciğer hedef organ durumunda olup klinik olarak büyük önem taşımaktadır (Fantini and Conte 1995). Bu

nedenle, biz de bu çalışmamızda ratlarda infrarenal aortayı klemplayerek alt ekstremitte İ/R modeli oluşturduk ve İ/R'nin akciğer dokusu üzerindeki etkilerini araştırdık.

SOR'ların etkisini önlemede mannitol, allopürinol, askorbik asit, süperoksit dismutaz, pentoksifilin, alfa tokoferol gibi bazı maddeler denenmiştir ve deneysel olarak İ/R hasarını önlemede etkili oldukları gösterilmiştir (Pepine 1991, Mueller et al. 1991, Köksoy et al. 2001, Halliwell 1989). Bu antioksidan maddelerin ya pulmoner mikrovasküler permeabilite artışı ve nötrofil akümülyasyonunu önleyerek ya da antioksidan sistemi aktive etmek suretiyle, İ/R sonrasında ortaya çıkan uzak doku-organ hasarına karşı koruyucu etkiye sahip oldukları gösterilmiştir (Joyce et al. 2001). SR temizleyicileri, reaktif oksijen parçaları ile reaksiyona girerek bunları zararsız maddeler haline dönüştüren ajanlardır. Bu ajanlar SOD, CAT ve GSH-Px olarak sıralanabilir. (Halliwell 1989). CAT in vivo olarak SOD ile kombine bir şekilde etki eder. CAT, H₂ O₂ yıkımını katalize eder. Bu enzimin yüksek kan düzeyleri antioksidan etkinliği gösterir. Deneysel çalışmaların birçoğunda yazarlar, İ/R hasarında doku ve serum örneklerinde, CAT aktivite düzeylerinin kontrol gruplarına göre azalmış olduğunu ve bu azalışın oksidan mekanizmaların baskın oluşundan kaynaklandığını düşünmüşlerdir (Atahan ve ark. 2010, Xiao et al. 2017). Caskurlu ve arkadaşları, böbrek İ/R hasarına karşı bir çörek otu bitkisi olan Nigella Sativa'nın koruyucu etkinliğini araştırdıkları çalışmada, İ/R hasarı sonucu böbrek dokusunda CAT aktivitesinde istatistiksel olarak anlamlı azalma olduğunu tespit etmişlerdir (Caskurlu ve ark. 2016). Sıçanlarda deneysel over torsiyonu oluşturulup tadalafil verilen grupta, ilaç verilmeyen gruba göre CAT aktivitesinin arttığı izlenmiştir (Arikan ve ark. 2010). Xiao ve arkadaşları, ratlardan elde ettikleri hippokampal kesitlerde kortikosteronla indüklenen CA3-CA1 yolağının anormal glutamaterjik sinaptik iletime amantadinin nöroprotektif etkisini araştırdıkları deneysel çalışmada, kortikosteron verilen grupta CAT aktivitesinin kontrol grubuna göre anlamlı derecede düşük olduğunu, kortikosteronla oksidatif stres oluşturulduktan sonra amantadin verilen grupta CAT aktivitesinin kortikosteron verilen gruba göre anlamlı derecede yüksek olduğunu göstermişlerdir (Xiao et al. 2017). Kiriş ve arkadaşlarının infrarenal aortik İ/R modelinde gadolinyum klorürün renal hasara etkisini araştırdıkları çalışmalarında; CAT aktivitesinin aortik İ/R grubunda kontrol grubuna göre anlamlı olarak arttığını ve gadolinyum klorür uygulaması ile azaldığını bildirmişler (Kiriş ve

ark. 2005). Kapan ve arkadaşları, rat alt ekstremitte İ/R hasarı modelinde, İ/R grubunda akciğer dokusu CAT aktivitesinin kontrol grubuna göre anlamlı derecede yüksek olduğunu, eritropoietin verdiklerinde CAT aktivitesinin İ/R grubuna göre anlamlı derecede düşük olduğunu göstermişlerdir (Kapan ve ark. 2009). Bizim çalışmamızda da Kapan ve arkadaşlarının çalışmasına benzer şekilde, İ/R grubunun CAT düzeyi Grup Sham'a göre yüksekti. İ/R hasarında CAT düzeylerindeki bu artışın, oksidatif stres durumunun bastırılabilmesi için bir cevap olduğu savunulmuştur. Amantadin uyguladıktan sonra CAT düzeyinin daha da artması ile bu yanıtın potansiyalize olduğunu düşündük.

SOD, süperoksitin hidrojen perokside dönüşümünü katalizler (Halliwell 1989). Dimakakos ve arkadaşları abdominal aortada oklüzyon oluşturarak intestinal organlarda oksidan hasara karşı vitamin E'nin etkisini araştırdıkları deneysel çalışmalarında, E vitamininin SOD aktivitesinde azalmaya neden olduğunu ve post iskemik hasara karşı koruduğunu bildirmişlerdir (Dimakakos et al. 2002). Çavdar ve arkadaşları, ratlarda renal İ/R hasarı oluşturarak yaptıkları deneysel çalışmada, İ/R grubunda renal doku SOD aktivitesinin kontrol grubuna göre düşük olduğunu, İ/R ile birlikte taurin uygulanan grupta İ/R grubuna göre SOD aktivitesinin yüksek olduğunu göstermişlerdir (Çavdar ve ark. 2017). Bir başka çalışmada ise; 45 dakika renal iskemiyi takiben uygulanan 24 saatlik reperfüzyon sonrası serum SOD düzeylerinin azalmış olduğu ve hidrojen zengin tuz verildiğinde SOD aktivitesinin arttığı bildirilmiştir (Wang et al. 2011). Fakouri ve arkadaşları, testiküler İ/R hasarında testis dokusu SOD etkinliğinin önemli ölçüde azaldığını, folik asid uygulaması ile SOD aktivitesinin istatistiksel olarak anlamlı derecede arttığını bildirmişlerdir (Fakouri et al 2017). Kapan ve arkadaşları, ratlarda alt ekstremitte İ/R hasarı modelinde, İ/R grubunda akciğer dokusu SOD aktivitesinin kontrol grubuna göre yüksek olduğunu, İ/R ile birlikte eritropoietin verdikleri grupta SOD aktivitesinin İ/R grubuna göre düşük olduğunu göstermişlerdir (Kapan ve ark. 2009). Kiriş ve arkadaşlarının, infrarenal aortik İ/R modelinde gadolinyum klorürün renal hasara etkisini araştırdıkları çalışmalarında; SOD aktivitesinin aortik İ/R grubunda kontrol grubuna göre anlamlı olarak arttığını ve gadolinyum klorür uygulaması ile azaldığını bildirmişler (Kiriş ve ark. 2005). Literatürde birçok çalışmada, İ/R durumlarında SOD değerlerinin azaldığı, daha az olarak da arttığı hakkında farklı görüşler bulunmaktadır. Bizim çalışmamızda

ise, İ/R grubunun SOD düzeyi Grup Sham'a göre yüksekti. Bununla birlikte literatürün çoğunluğuna benzer şekilde, amantadin uyguladıktan sonra SOD değerlerinin istatistiksel olarak anlamlı olmasada; daha da yükseldiğini gözlemledik. İ/R hasarında SOD düzeylerindeki bu artışın, oksidatif stres durumunun bastırılabilmesi için bir yanıt olduğu savunulmuştur. Amantadin uyguladıktan sonra SOD düzeyinin daha da artması ile bu yanıtın potansiyalize olduğunu düşündük.

İ/R'de oluşan serbest radikaller, yüksek reaktiviteleri nedeniyle membranlardaki lipitlere saldırarak lipid peroksidasyonunu başlatırlar. Akciğerlerde İ/R hasarı sırasında akümüle olan lipid peroksidasyon ürünü MDA'nın, tiyobarbitürik asit reaktif maddeleri ile verdiği reaksiyon spektrofotometrik olarak ölçülerek, akciğer hasarının derecesi hakkında fikir edinilebilir (Sakamaki et al. 1997). Dokularda lipid peroksidasyon oluşumu ve buna bağlı olarak MDA artışı, hücrede membran bütünlüğünün yok olmasına, permeabilitenin artmasına, hücrelere kalsiyum ve sodyum gibi elektrolit geçişlerinin hızlanması sonucu ATP kaybına, DNA hasarına ve hücre ölümleri ile sonuçlanan fizyolojik, metabolik ve işlevsel bozukluklara yol açabilmektedir (Tarin et al. 1998). Bu sebeplerden dolayı çalışmamızda reperfüzyon hasarının ortaya konabilmesi için MDA ölçümü yapılmıştır. Literatürde alt ekstremite İ/R hasarı modeli oluşturulan ve MDA düzeyinin araştırıldığı birçok çalışma bulunmaktadır. Tekeli ve arkadaşlarının yapmış oldukları alt ekstremite İ/R modelinde reperfüzyon sonrası akciğer dokusunda MDA düzeylerinin yüksek olduğu, takrolimus verildiğinde ise MDA düzeylerinin düşük olduğunu tespit etmişlerdir (Tekeli ve ark. 2001). Uysal ve arkadaşları alt ekstremite İ/R hasarı sonrasında akciğer dokusu ve kanda MDA'nın yükseldiğini; eritropoietin verildiğinde ise MDA düzeyinin azaldığını saptamışlardır (Uysal ve ark. 2006). Alaçam ve arkadaşları, İ/R hasarı sonrası akciğer dokusu MDA seviyesinin kontrol grubuna göre yüksek olduğunu; karnozin verdiklerinde ise MDA seviyesinin azalmış olduğunu göstermişlerdir (Alaçam ve ark. 2010). Kapan ve arkadaşları, ratlarda alt ekstremite İ/R grubunda akciğer dokusu MDA seviyesini kontrol grubuna göre yüksek bulmuşlardır. İ/R ile birlikte eritropoietin verdikleri grupta akciğer dokusu MDA seviyesinin İ/R grubuna göre düşük olduğunu fakat istatistiksel olarak anlamlı olmadığını bildirmişlerdir (Kapan ve ark. 2009). Pehlivan ve arkadaşları intestinal iskemi oluşturulan sıçanlarda Diosmin Hesperidin' in etkisini araştırmış, Diosmin uygulanmayan İR grubunda MDA düzeyi,

Diosmin uygulanan gruba kıyasla anlamlı düzeyde yüksek bulunmuştur (Pehlivan ve ark. 2004). Biz de çalışmamızda literatürle uyumlu bir şekilde İ/R sonrasında MDA düzeylerinin Grup Sham'a göre yüksek olduğunu ve amantadin uygulaması ile MDA düzeylerinin Grup İ/R'ye göre azaldığını gördük. Bu azalma 135 mg amantadinde daha belirgindi. MDA düzeyindeki bu azalma istatistiksel olarak anlamlı olmasada, amantadinin İ/R'de koruyucu etkilerinin olabileceğini ve doz artışı ile bu etkinin daha belirgin olabileceğini düşündürdü.

NMDA reseptörü; membran kalsiyum kanalı olarak işlev gören, başlangıçta merkezi sinir sisteminde tanımlanan glutamat reseptör ailesinin bir üyesidir (De Resende et al. 2015). NMDA kanallarının aktivasyonu hücre içi kalsiyum artışına neden olur. Hücre içi kalsiyum birikimi de NO oluşumuna neden olan nitrik oksit sentaz (NOS) yolunun aktivasyonu ile SR oluşumunu uyarır. NMDA reseptörlerinin aşırı aktivasyonu da apoptozise giden olayları başlatmaya katkıda bulunur (Faden et al. 1990, Faden et al. 1988). NMDA antagonistlerinin, çeşitli organ ve dokularda İ/R hasarına karşı koruyucu etkileri olduğu bildirilmiş ve bu ajanların antioksidan aktiviteyi arttırdığı, oksidan etkiyi azalttığı gösterilmiştir (Camara-Lemarroy et al. 2009, Özdemir ve ark. 2013, Özsüer ve ark. 2005). Ke ve arkadaşlarının 104 adet rat ile oluşturduğu siyatik sinir İ/R modelinde bir NMDA reseptör antagonisti olan MK-801'in sistemik enjeksiyonunun TNF- α 'nın aktivasyonunu inhibe ettiği, hücre infiltrasyonunu ve demiyelinizasyonu hafiflettiği, iNOS ve NO aktivitesini azalttığı ve böylelikle rat sinir sistemini İ/R hasarına karşı koruyabileceği ortaya konmuştur (Ke et al. 2016). Ratlarda serebral İ/R hasarı modeli oluşturulan bir başka çalışmada, İ/R grubunda total oksidan durum (TOS) değerinin kontrol grubuna göre anlamlı derecede yüksek olduğu, İ/R ile birlikte NMDA reseptör antagonisti olan memantin verilen grupta TOS değerinin İ/R grubuna göre anlamlı derecede düşük olduğu bildirilmiştir (Özdemir ve ark. 2013). NMDA reseptör antagonisti ketaminin de İ/R hasarından koruyucu etkisi tespit edilmiştir (Guzman-De et al. 2010, Camara-Lemarroy et al. 2009).

Amantadin NMDA reseptör antagonistleri grubuna dahil bir ajandır. 1966 yılında Asya İnfluenzasına karşı koruyucu bir ajan olarak Amerika Birleşik Devletleri'nde onaylanmıştır (Hubsher et al. 2012). Literatüre baktığımızda İ/R hasarı modellerinde amantadin ile yapılmış herhangi bir çalışmaya rastlamadık. Ancak; amantadinin

nöroprotektif etki mekanizması ile ilgili olarak ratlardan elde edilen hippocampal kesitlerde kortikosteron ile indüklenen CA3-CA1 yolağının anormal glutamaterjik sinaptik iletiminde amantadinin oksidatif stresi azalttığı ve bunu antioksidan özellikteki SOD ve CAT aktivitelerini düzenleyerek oluşturduğunu bildiren tek bir çalışmaya rastladık. Ayrıca bu çalışmada amantadinin nöroprotektif etkisinin hücre içine Ca^{+2} girişini azaltarak ve apoptozisi önleyerek yaptığı öne sürülmüştür (Xiao et al. 2017). NMDA antagonisti olan amantadinin İ/R hasarına karşı koruyucu etkisinin olabileceğini düşünerek ve literatürde amantadinin farklı dozlarının İ/R hasarına karşı koruyucu etkisini gösteren bir çalışma olmaması sebebiyle bu çalışmayı planladık.

Akciğer dokusu alt ekstremitte İ/R hasarının en çok etkilediği hedef organdır. Bunun etyolojisi tam olarak bilinmemekle birlikte, reperfüzyon sırasında bazı hümorale mediatörlerin bu hedef organ hasarında rol oynadığı düşünülmektedir (Fantini and Conte 1995, İsbir ve ark. 2000). Akciğerlerde meydana gelen hasar histopatolojik olarak, alveol duvar kalınlaşması, nötrofil ve lenfositlerin infiltrasyonu, interstisyel ödem olarak kendini göstermektedir (Önem ve ark. 2011). Polimorfonükleer lökositlerin alt ekstremitelerin İ/R'si nedeniyle oluşan akciğer hasarında esas role sahip olduğu ve bu hücrelerin azalmasının akciğerler üzerinde koruyucu etkisi olduğu gösterilmiştir (Klausner et al. 1988). Alt ekstremitte İ/R uygulanan ratlarda akciğer reperfüzyon hasarını önlemek için takrolimus kullanılan bir çalışmada, takrolimusun akciğer dokusu ışık mikroskopisinde nötrofil infiltrasyonunda azalma oluşturduğunu tespit etmişler. Ayrıca yazarlar; daha az intraalveolar kanama, kan damarları etrafında daha az ödem ve intraalveolar septum kalınlığının normale yakın olduğunu bildirmişlerdir. Ancak takrolimus verilmeyen ratlarda ise alveolar yapının tamamen bozulduğunu, alveolar septada kalınlaşma ve interstisyel ödem olduğunu tespit etmişlerdir. Buna ek olarak alveoller etrafında büyük odaklar oluşturan lökositik infiltrasyonlar, intraalveolar fibrin depozitleri ve intraalveolar kanama tespit etmişlerdir (Tekeli ve ark. 2001). Köksel ve arkadaşları ratlara lipopolisakkarit enjekte ederek oluşturdukları sepsis modelinde kafeik asit fenil ester (CAPE)'nin akciğer hasarına olan koruyucu etkisini araştırmışlar; akciğer dokusunda histopatolojik olarak CAPE verildiğinde kontrol grubuna yakın bir seviyeye gerilediği gösterilmiştir (Köksel ve ark. 2006). Küçükebe ve arkadaşları, ratlarda alt ekstremitte İ/R hasarı oluşturarak deksmedetomidinin akciğer hasarına etkisini araştırdıkları bir çalışmada,

İ/R grubunda akciğer dokusu hasar skorunun kontrol grubuna göre yüksek olduğunu, İ/R ile birlikte deksmedetomidinin farklı dozlarını (50 mg/kg, 100 mg/kg) verdikleri gruplarda akciğer dokusu hasar skorunun İ/R grubuna göre düşük olduğunu göstermişlerdir (Küçükebe ve ark. 2015). Bizim çalışmamızda da, İ/R sonrasında akciğer dokusu nötrofil/lenfosit infiltrasyon skoru Grup Sham'a göre anlamlı derecede yüksek bulundu. Akciğer dokusunu histopatolojik olarak incelediğimizde, amantadinin nötrofil infiltrasyonunu azaltarak; İ/R'ye bağlı hasarı azalttığını gözlemledik. Bu azalma 135 mg/kg amantadin uygulanan grupta, 90 mg/kg amantadin uygulanan gruba göre daha belirgindi fakat anlamlı farklılık yoktu. İ/R hasarına bağlı olarak alveol duvar kalınlığında anlamlı derecede artış olduğunu ve amantadin ile bu hasarın düzeldiğini gözlemledik. Özellikle alveol duvar kalınlaşma skor düzeyleri incelendiğinde; 135 mg /kg amantadin ile değişikliklerin anlamlı olarak azaldığını, ancak bu etkinin 90 mg/kg'da belirgin olmadığını gördük. İ/R hasarının neden olduğu histopatolojik değişikliklerde yüksek doz amantadinin daha etkin olduğunu düşünüyoruz.

6. SONUÇ

Sonuç olarak; bir NMDA antagonisti olan amantadinin farklı dozlarının, alt ekstremitelerde İ/R hasarında akciğer dokusu üzerine olan etkilerini araştırdığımız çalışmamızda; akciğer dokusu CAT, SOD, MDA düzeyleri göz önüne alındığında diğer NMDA antagonisti ajanların etkisine benzer olarak İ/R hasarına karşı koruyucu etkisinin olduğunu düşünmekteyiz. Çalışmamızda, akciğer dokusu biyokimyasal değerleri arasında istatistiksel olarak anlamlı fark bulamasak da akciğer dokusunun histopatolojik olarak İ/R hasarından etkilenmiş olduğunu ve bu hasarın amantadin kullanımıyla düzeltilebileceğini gözlemledik. Bu durum 135 mg/kg amantadin verilen deneklerde 90 mg/kg amantadin verilen deneklere göre daha belirgindi.

KAYNAKLAR

- Aebi H. Catalase in vitro. *Methods Enzymol.* 1984; 105:121-6.
- Aksoy Y. Antioksidan mekanizmada glutatyonun rolü. *Türkiye Klinikleri Tıp Bilimleri Dergisi.* 2002;22: 442- 448.
- Aksu NM, Şenlikçi H, Akkaş M, Özmen MM. The neurological improvement of a patient after amantadine infusion. *JAEMCR* 2013; 4:161-3.
- Alaçam B, Ek RO, Yıldız Y, Serter M, Boylu NT, Temoçin S. (2010). Abdominal aorta iskemi-reperfüzyonuna bağlı gelişen akciğer hasarında karnozinin etkisi. *ADÜ Tıp Fakültesi Dergisi* 11(3): 41 – 47.
- Alizan A, Khalil C, Farah A, John C. (2006). Reperfusion injury. *Plastic and Reconstructive Surgery*, 117: 1024-1033.
- Altan N, Sepici Dinçel A, Koca C. Diabetes Mellitus ve Oksidatif Stres. *Türk Biyokimya Dergisi* 2006: 31; 51–56.
- Andreescu S, Hepel M, Chemistry ACSDoA. *Oxidative Stress: Diagnostics, Prevention, and Therapy: American Chemical Society; 2016.*
- Arasa O, Dilsizian V. (2007). Targeting ischemic memory. *Current Opinion in Biotechnology*, 18: 46-51. 86.
- Arikan DC, Bakan V, Kurutas EB. Protective effect of tadalafil on ischemia/reperfusion injury of rat ovary. *J Pediatr Surg* 2010;45: 2203–2209.
- Atahan E, Ergun Y, Kurutas EB, Alici T. (2010). Protective effect of zinc aspartate on long-term ischemia-reperfusion injury in rat skeletal muscle. *Biological Trace Element Research*, 137: 206-215.
- Bhabak KP, Mugesh G. Functional mimics of glutathione peroxidase: bioinspired synthetic antioxidants. *Accounts of chemical research.* 2010 Nov 16;43(11):1408-19. PubMed PMID: 20690615. Epub 2010/08/10. eng.

- Bilal M, Sarioğlu T. İskemik miyokard injurisi ve intraoperatif miyokard korunmasına genel bir bakış. *GKD Cer Derg* 1992; 1: 118-126.
- Blaisdell FW. (2002). The pathophysiology of skeletal muscle ischemia and the reperfusion syndrome: a review. *Cardiovascular Surgery*, 10: 620-630.
- Boast CA, Gerhardt SC, Pastor G, Lehmann J, Etienne PE, Liebman JM. The N-methyl-D-aspartate antagonists CGS 19755 and CPP reduce ischemic brain damage in gerbils. *Brain Res* 1988; 442: 345-348.
- Boğa M. Akut ekstremite iskemisi. *Türk Aile Hek Derg* 2009; 13: 11-15.
- Bray TM. Dietary antioxidants and assessment of oxidative stres, *Nutrition* 2000; 16: 578-581.
- Buerke M, Murohara T, Lefer AM. (1995). Cardioprotective effects of a C1 esterase inhibitor in myocardial ischemia and reperfusion. *Circulation*, 91: 393-402.
- Buja LM. (2005). Myocardial ischemia and reperfusion injury. *Cardiovasc Pathol. JulAug;14(4):170-5.*
- Cámara-Lemarroy CR, Guzmán-De La Garza FJ, Alarcón-Galván G, Cordero-Pérez P, Fernández-Garza NE. (2009). The effects of NMDA receptor antagonists over intestinal ischemia/reperfusion injury in rats. *European Journal of Pharmacology*. 621:78–85.
- Carden DL, Granger DN. Pathophysiology of ischaemia-reperfusion injury. *The Journal of pathology*. 2000 Feb;190(3):255-66. PubMed PMID: 10685060. Epub 2000/02/24. eng.
- Caskurlu T, Kanter M, Erboga M, Erboga ZF, Ozgul M, Atis G. (2016). Protective Effect of *Nigella Sativa* on Renal Reperfusion Injury in Rat. *Iran J Kidney Dis*, 10(3), 135-143.

- Cavdar Z, Ural C, Celik A, Arslan S, Terzioglu G, Ozbal S, Yildiz S, Ergur UB, Guneli E, Camsari T & Akdogan G. (2017). Protective effects of taurine against renal ischemia/reperfusion injury in rats by inhibition of gelatinases, MMP-2 and MMP-9, and p38 mitogenactivated protein kinase signaling. *Biotechnic & Histochemistry Early Online*: 1–12
- Chan TS, Cassim S, Raymond VA, Gottschalk S, Merlen G, Zwingmann C, ... & Bilodeau M (2018). Upregulation of Krebs cycle and anaerobic glycolysis activity early after onset of liver ischemia. *PloS one*, 13(6), e0199177.
- Collard CD, Gelman S. Pathophysiology, clinical manifestations, and prevention of ischemia-reperfusion injury. *Anesthesiology*, 2001, 94: 1133-1138.
- Dammers R, Wehrens XH, oude Egbrink MG, Slaaf DW, Kurvers HA, Ramsay G. (2001). Microcirculatory effects of experimental acute limb ischaemia-reperfusion. *British Journal of Surgery*, 88: 816-824.
- Dantzker DR, Scharf SM. *Cardiopulmonary Critical Care*. 3rd ed. Philadelphia, WB Saunders, 1998. 41-42,
- Danysz W, Parsons CG, Kornhuber J, Schmidt WJ, Quack G. (1997). Aminoadamantanes as NMDA receptor antagonists and antiparkinsonian agents--preclinical studies. *Neurosci Biobehav Rev*. 21(4):455-468.
- Datta G, Fuller BJ, Davidson BR. (2013). Molecular mechanisms of liver ischemia reperfusion injury: insights from transgenic knockout models. *World Journal Of Gastroenterology*. March 21;19 (11):1683-1698.
- De Resende MA, Pantoja AV, Barcellos BM, Reis EP, Consolo TD, Modolo RP, Domingues MA, Assad AR, Cavalcanti IL, Castiglia YM, Modolo NS. (2015). Ischemic Postconditioning and subanesthetic S (+) -ketamine infusion: effects on renal function and histology in rats. *Biomed Res Int*. 2015:1-8.
- Dick F, Li J, Giraud M-N, Kalka C, Schmidli J, Tevaearai H. Basic control of reperfusion effectively protects against reperfusion injury in a realistic rodent model of acute limb circulation. 2008; 118: 1920-1928.

- Dimakakos PB, Kotsis T, Kondi-Pafiti A, Katsenis K, Doufas A, Chondros K, Kouskouni E. Oxygen free radicals in abdominal aortic surgery. An experimental study. *J Cardiovasc Surg (Torino)*. 2002; Feb.; 43(1):77-82.
- Droge W. Free radicals in the physiological control of cell function. *Physiological reviews*, 2002, 82: 47-95.
- Duru S, Koca U, Oztekin S, Olguner C, Kar A, Coker C, Ulukus C, Tascl C, Elar Z. (2005). Antithrombin III pretreatment reduces neutrophil recruitment into the lung and skeletal muscle tissues in the rat model of bilateral lower limb ischemia and reperfusion: a pilot study. *Acta Anaesthesiologica Scandinavica*, 49: 1142-1148.
- Dünder Y. Hekimlikte oksidatif stres ve antioksidanlar: Afyon Kocatepe Üniversitesi; 2000.
- Eltzschig HK, Collard CD. (2004). Vascular ischaemia and reperfusion injury. *Br Med Bull* 70: 71-86.
- Ertan T, Soran A, Kılıç M, Aşlar AK, Koç M, Cengiz Ö. Kan Malondialdehid ve total antioksidan seviyesinin (TAS) önemi. *Cerrahi Tıp Bülteni* 2001,2;4: 154-167.
- Faden AI, Ellison JA, Noble LJ. Effects of competitive and non-competitive NMDA receptor antagonists in spinal cord injury. *Eur J Pharmacol* 1990; 175:165-174.
- Faden AI, Lemke M, Simon RP. N-methyl-D-aspartate antagonist MK801 improves outcome following traumatic spinal cord injury in rats: behavioral, anatomic, and neurochemical studies. *J Neurotrauma* 1988; 5: 33-45
- Fakouri A, Asghari A, Akbari G, Mortazavi P. (2017). Effects of folic acid administration on testicular ischemia/reperfusion injury in rats. *Acta Cirurgica Brasileira*. 32(9):755-766.
- Fantini GA, Conte MS. Pulmonary failure following lower torso ischemia: clinical evidence for remote effect of reperfusion injury. *Am J Surg* 1995; 61:316-9.

- Farnebo LO, Fuxe K, Goldstein M, Hamberger B, Ungerstedt U. (1971). Dopamine and noradrenaline releasing action of amantadine in the central and peripheral nervous system: a possible mode of action in Parkinson's disease. *Eur J Pharmacol.* 16(1):27-38.
- Fujii T, Takaoka M, Muraoka T, Kurata H, Tsuruoka N, Ono H, Kiso Y, Tanaka T, Matsumura Y. Preventive effect of L-carnosine on ischemia/reperfusion-induced acute renal failure in rats. *Eur J Pharmacol* 2003; Aug 8;474(2-3):261-7.
- Giacino JT, Whyte J, Bagiella E, Kalmar K, Childs N, Khademi A, et al. Placebo-controlled trial of amantadine for severe traumatic brain injury. *N Engl J Med* 2012; 366: 819-26.
- Glatzounis GK, Salacinski H, Yang W, Davidson BR, Seifalian AM. (2005). The Contemporary Role of Antioxidant Therapy in Attenuating Liver Ischemia/Reperfusion Injury: A Review. *Liver Transpl.* 11:1031-1047.
- Goldman G, Welbourn R, Klausner JM, Kobzik L, Valeri CR, Shepro D. Mast cells and leukotrienes mediate neutrophil sequestration and lung edema after remote ischemia in rodents. *Surgery* 1992; 112: 578-86.
- Grace PA. Ischaemia-reperfusion injury. *The British journal of surgery.* 1994 May;81(5):637-47. PubMed PMID: 8044536. Epub 1994/05/01. Eng.
- Groeneveld AB, Raijmakers PG, Rauwerda JA, Hack CE. The inflammatory response to vascular surgery-associated ischaemia and reperfusion in man: effect on postoperative pulmonary function. *Eur J Vasc Endovasc Surg* 1997; 14: 351-9.
- Guzmán-De La Garza FJ, Cámara-Lemarroy CR, Ballesteros-Elizondo RG, AlarcónGalván G, Cordero-Pérez P, Fernández-Garza NE. (2010). Ketamine reduces intestinal injury and inflammatory cell infiltration after ischemia/reperfusion in rats. *Surgery Today.* 40(11):1055–1062.
- Haimovici H. Muscular, renal, and metabolic complications of acute arterial occlusions: myonephropathic-metabolic syndrome. *Surgery.* 1979; Apr.; 85 (4): 461-8.

- Halliwell B. Superoxide, iron, vascular endothelium and injury. *Free Radic Res Common* 1989; 5:315-18.
- Halliwell B, Gutteridge JM. The antioxidants of human extracellular fluids. *Arch Biochem Biophys*. 1990 Jul;280(1):1-8.
- Happel RD, Smith KP, Banik NL. Ca²⁺-accumulation in experimental spinal cord trauma. *Brain Res* 1981; 211: 476-479.
- Hatch GE Asthma, inhaled oxidants, and dietary antioxidants. *Am J Clin Nutr*. 1995; Mar.; 61(3 Suppl):625S-630S.
- Hensley K, Robinson KA, Gabbita SP, Salsman S, Floyd RA. Reactive oxygen species, cell signaling, and cell injury. *Free Radical Biology and Medicine*, 2000, 28: 1456-1462.
- Himmelseher S, Durieux, M.E. (2005). Revising a dogma: ketamine for patients with neurological injury. *Anesth. Analg.* 101, 524–553.
- Hirota K and DG Lambert. "Ketamine: its mechanism (s) of action and unusual clinical uses." *British journal of anaesthesia* 77.4 (1996): 441-444.
- Hubsher G, Haider M, Okun MS. (2012). Amantadine: the journey from fighting flu to treating Parkinson disease. *Neurology*. 78(14): 1096-1099.
- Huether SE, McCance KL. *Understanding Pathophysiology-Text and Study Guide Package*: Elsevier; 2016.
- Ichimiya M, Chang SH, Liu H, Berezesky IK, Trump BF, Amstad PA. Effect of Bcl-2 on oxidant-induced cell death and intracellular Ca²⁺ mobilization. *Am J Physiol*, 1998, 275: C832-839.
- Inan M, Uz YH, Kizilay G, Topcu-Tarlacalisir Y, Sapmaz-Metin M, Akpolat M, et al. Protective effect of sildenafil on liver injury induced by intestinal ischemia/reperfusion. *Journal of pediatric surgery*. 2013 Aug;48(8):1707-15. PubMed PMID: 23932610. Epub 2013/08/13. eng.
- Iwama KG. Stress in fish. *Fish Biology Fisheries* 2004; 8: 35-56.

- İsbir S, Akgün S, Ak K, Zeybek Ü, Aydın M, Civelek A, Tekeli A, Çobanoğlu A. Akut alt ekstremite iskemi/ reperfüzyon hasarının akciğer serbest oksijen radikalleri üzerine olan etkisi. *TGKDCD* 2000; 8: 2,629-31.
- Jaeschke H. (2003). Molecular mechanisms of hepatic ischemia-reperfusion injury and preconditioning. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol.* 284: G15–G26.
- Jennings RB, Reimer KA. (1991). The cell biology of acute myocardial ischemia. *Annu Rev Med* 42: 225-246.
- Joyce M, Kelly CJ, Chen G, Bouchier-Hayes DJ. (2001). Pravastatin attenuates lower torso ischaemia-reperfusion-induced lung injury by upregulating constitutive endothelial nitric oxide synthase. *Eur J Vasc Endovasc Surg.* 21: 295-300.
- Kalender S, Kalender Y, Ogutcu A, Uzunhisarcikli M, Durak D, Acikgoz F. (2004). Endosulfan-induced cardiotoxicity and free radical metabolism in rats: the protective effect of vitamin E. *Toxicology*, 202: 227-235.
- Kapan Ş, Kiriş İ, Kılbaş A, Altuntaş İ, Karahan N, Okutan H. (2009) The effect of erythropoietin on lung injury in rat aortic ischemia-reperfusion. *Turkish J Thorac Cardiovasc Surg* 17(2): 110-116.
- Kato R, Foëx P. (2002). Myocardial protection by anesthetic agents against ischemia–reperfusion injury: an update for anesthesiologists. *Can. J. Anaesth.* 49(8), 777–791.
- Ke T, Li R, Chen W. (2016). Inhibition of the NMDA receptor protects the rat sciatic nerve against ischemia/reperfusion injury. *Experimental and Therapeutic Medicine.* 11:1563-1572.
- Kiriş İ, Okutan H, Savaş Ç, Yönden Z, Delibaş N. Deneysel aortik iskemi-reperfüzyon modelinde renal hasara gadolinyum klorürün etkisi. *Damar Cerrahisi Dergisi* 2005; 14: 13-8.
- Klausner JM, Anner H, Paterson IS, Kobzik L, Valeri CR, Shepro D, Hechtman HB. Lower torso ischemia-induced lung injury is leukocyte dependent. *Ann Surg* 1988; Dec.; 208 (6): 761-7.

- Koksel O., Özdülger A., Tamer L., Cinel L., Ercil M., Değirmenci U., Ünlü S., Kanık A. Effects of CAPE on lipopolisaccharide-induced lung injury in rats. *Pulmonary Pharmacology and therapeutics* 19:90-95, 2006.
- Koltuksuz U., Özen S., Uz E., Aydınç M., Karaman A., Gültek A., Akyol Ö., Gürsoy MH., Aydın E. CAPE prevents intestinal reperfusion injury in rats. *J Ped Surg.* 34:10, 1458-1462, 1999.
- Köksoy C, Kuzu MA, Ergün H, Gürhan I. Role of tumor necrosis factor in lung injury caused by intestinal ischemia-reperfusion. *Br J Surg* 2001; 88:464-468.
- Kumar V, Abbas A, Fausto N, Mitchell R. Robbins Temel Patoloji, 8. Baskı Türkçe Çevirisi, Çevikbaş U (ed), Nobel Tıp Kitabevi, 2007; s: 13-19.
- Kumar V, Abbas AK, Aster JC. Robbins Basic Pathology E-Book: Elsevier Health Sciences; 2017.
- Kumar V, Cotran R, Robbins SL. Temel patoloji (Basic Pathology), 6. edisyon, Temmuz 2000 (6-10, 30-36).
- Küçükebe ÖB, Özzybek D, Abdullayev R, Ustaoglu A, Tekmen I, Küme T. (2017). Effect of dexmedetomidin on acute lung injury in experimental ischemia-reperfusion model.
- Lee, HT, Ota-Setlik A, Fu Y, Nasr SH, Emala CW. (2004). Differential protective effects of volatile anesthetics against renal ischemia–reperfusion injury in vivo. *Anesthesiology.* 101, 1313–1324.
- Lopez-Neblina F, Paez-Rollys AJ, Toledo-Pereyra LH. (1996). Mechanism of Protection of Verapamil by Preventing Neutrophil Infiltration in the Ischemic Rat Kidney. *J SurgRes* 61: 469-472.
- Majino G, Jorris I. Apoptosis, oncosis, and necrosis. An overview of the cell death. *Am J Pathol* 1995; 146: 3-9.
- McCance KL, Huether SE. Pathophysiology: The Biologic Basis for Disease in Adults and Children: Elsevier; 2013.

- McGuire, Liu P, Jaeschke H. Neutrophil-included lung damage after hepatic ischemia and endotoxemia. *Free Radic Biol Med* 1996;20: 189-97.
- Metman LV, Del Dotto P, LePoole K, Konitsiotis S, Fang J, Chase TN. (1995). Amantadine for levodopa-induced dyskinesias: a 1-year follow-up study. *Arch Neurol.* 56(11):1383-1386.
- 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: 153-159.
- Moore KA, Sklerov J, Levine B, Jacobs AJ (2001). Urine concentrations of ketamine and norketamine following illegal consumption. *Journal of analytical toxicology*, 25(7), 583-588.
- Moraes G, Metabolical responses in adaptation to stress in fish. Brazil: International Congress on the Biology of Fish 2004: 47.
- Mueller HW, Nollert MU, Eskin SG. Synthesis of structural analog of platelet activating factor, by vascular endothelial cells. *Biochem Biophys Res Commun* 1991;176: 1557-64.
- Nakamura T, Vollmar B, Winning J, Ueda M, Menger MD, Schäfers HJ. Heparin and the nonanticoagulant N-acetyl heparin attenuate capillary no-reflow after normothermic ischemia of the lung. *Ann Thorac Surg* 2001; Oct.;72(4):1183-8.
- Nakazawa H, Genka C, Fujishima M. Pathological aspects of active oxygens/free radicals. *Jpn J Physiol* 1996; 46: 15-32.
- Niki E. (1987). Antioxidant in relation to lipid peroxidation. *Chemistry and Physics of Lipids*, 44: 227-253.
- Nuh Zafer Cantürk, İskender Sayek. Cerrahi araştırma kitabı. 2005 nobel tıp kitabevleri.

- Oğuz A. Hepatik İskemi Reperfüzyon Hasarında Curcuminin Karaciğer Ve Uzak Organ Üzerine Etkilerinin Araştırılması. Genel Cerrahi Uzmanlık Tezi, Dicle Üniversitesi Tıp Fakültesi, 2010.
- Orrenius S, Ankarcrona M, Nicotera P. Mechanisms of calcium-related cell death. *Adv Neurol*, 1996, 71: 137-149; discussion 149-151.
- Önem G, Saçar M, Aybek H, Kocamaz E, Adalı F, Saçkan KG, Baltalarlı A, (2012). Alt ekstremitte iskemi reperfüzyonuna bağlı akciğer hasarında silostazol ve levosimendanın koruyucu etkisi. *Türk Göğüs Kalp Damar Cerrahisi Dergisi* 20(3): 577-583.
- Özben T. *Free Radicals, Oxidative Stress, and Antioxidants: Pathological and Physiological Significance*: Springer US; 2013.
- Özdemir HH, Demir CF, Berilgen MS, Akgün B, Kuloğlu T, Kapan O, İlhan S, Balduz M. (2013). Protective Effects of Memantine Induced by Cerebral Ischemia and Reperfusion Injury in Rats. *Turkish Journal of Neurology* 19: 3
- Özer MK., Çiçek E., Gökalp O., Koyu A., Parlakpınar H., Acet A. Myokardiyal iskemi reperfüzyon sonrası böbrek hasarında nitrik oksit rolü ve CAPE'nin etkisi *S.D.Ü Tıp Fak. Dergisi* 2005: 12(4) / 23-27.
- Özsüer H, Görgülü A, Kırış T, Çobanoğlu S. (2005). The effects of memantine on lipid peroxidation following closed-head trauma in rats. *Neurosurg Rev.* 28: 143–147.
- Paglia DE, Valentine WN. Studies on the quantitative and qualitative characterization of erythrocyte glutathione peroxidase. *J Lab Clin Med* 1967;70 (1):158-69.
- Parks DA, Williams TK, Beckman JS. Conversion of xanthine dehydrogenase to oxidase in ischemic rat intestine: a reevaluation. *Am J Physiol.* 1988;254(1):768-774.
- Pehlivan M, Hazinedaroglu SM, Kayaoglu HA, Erkek AB, Keklik T, Canbolat O, et al. The effect of diosmin hesperidin on intestinal ischaemia--reperfusion injury. *Acta chirurgica Belgica.* 2004 Nov-Dec;104(6):715-8. PubMed PMID: 15663281. Epub 2005/01/25. eng.

- Pepine CJ. The therapeutic potential of carnitine in cardiovascular disorders. *Clin Ther* 1991; 13(1):2-21.
- Placer CA, Cushman LL, Johnson BC. (1990). Estimation of product of lipid peroxidation (Malondy Dialdehyde) in biochemical systems. *Analytical Biochemistry*, 16: 259-264.
- Pontoppidan H, Geffin B, Lowenstein E. Acute respiratory failure in the adult. *N Engl J Med* 1972; 287:690-806.
- Prem JT, Eppinger M, Lemmon G, Miller S, Nolan D, Peoples J. The role of glutamine in skeletal muscle ischemia/reperfusion injury in the rat hind limb model. *Am J Surg* 1999;178: 147-150.
- Punch J, Rees R, Cashmer B. Acute lung injury following reperfusion ischemia in the hind limbs of rats. *J. Trauma* 1991; 31: 760-5.
- Rea K, Roche M, Finn DP. Supraspinal modulation of pain by cannabinoids: the role of GABA and glutamate. *British Journal of Pharmacology* 2007; 152: 633–48.
- Reiter RJ, Melchiorri D, Sewerynek E, Poeggeler B, Barlow-Walden L, Chuang J, Ortiz GG, Acuna-Castroviejo D. (1995). A review of the evidence supporting melatonin's role as an antioxidant. *Journal of Pineal Research*, 18: 1-11.
- Rodriguez C, Mayo JC, Sainz RM, Antolin I, Herrera F, Martin V, Reiter RJ. (2004). Regulation of antioxidant enzymes: a significant role for melatonin. *Journal of Pineal Research*, 36: 1-9.
- Rodwell VW, Weil PA, Botham KM, Bender D, Kennelly PJ. *Harpers Illustrated Biochemistry* 30th Edition: McGraw-Hill Education; 2015.
- Ross D. (1988). Glutathione, free radicals and chemotherapeutic agents. Mechanisms of free-radical induced toxicity and glutathione-dependent protection. *Pharmacology and Therapeutics*, 37: 231-249.
- Sakamaki F, Hoffmann H, Muller C, Dienemann H, Messmer K, Schildberg FW. Reduced lipid peroxidation and ischemiareperfusion injury after lung

- transplantation using low-potassium dextran solution for lung preservation. *Am J Respir Crit Care Med* 1997; 156(4): 1073-81.
- Salvemini D, Cuzzocrea S. Superoxide, superoxide dismutase and ischemic injury. *Current opinion in investigational drugs* (London, England: 2000), 2002, 3: 886-895.
- Saniova B, Drobny M, Kneslova L, Minarik M. The outcome of patients with severe head injuries treated with amantadine sulphate. *J Neurol Transm (Vienna)* 2004; 111: 511-4.
- Schlag MG, Harris KA, Potter RF. (2001). Role of leukocyte accumulation and oxygen radicals in ischemia-reperfusion-induced injury in skeletal muscle. *American journal of physiology. Heart and circulatory physiology*, 280: 1716-1721.
- Schoenberg MH, Beger HG. Reperfusion injury after intestinal ischemia. *Crit Care Med* 1993; 21: 1376-1386.
- Sener G, Sakarcan A, Yegen BC. (2007). Role of garlic in the prevention of ischemia-reperfusion injury. *Mol Nutr Food Res*. 51: 1345-1352.
- 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: 1656-1663.
- Shiue CY, Vallabhahosula S., Wolf AP, Dewey SL, Fowler JS, Schlyer DJ, Zhou YG (1997). Carbon-11 labelled ketamine—Synthesis, distribution in mice and PET studies in baboons. *Nuclear medicine and biology*, 24(2), 145-150.
- Sonkusare SK, Kaul CL, Ramaro P. Dementia of Alzheimer's disease and other neurodegenerative disorders--memantine, a new hope. *Pharmacological Research* 2005; 51: 1-17.
- Suzuki M, Asako H, Kubes P, Jennings S, Grisham MB, Granger DN. (1991). Neutrophil-derived oxidants promote leukocyte adherence in postcapillary venules. *Microvasc Res*. 42: 125-138.

- Tarin JJ, Brings J, Cano A. Serbest radikalleri antioksidanlar ve infertilite ile klinik ilişkiler, *Human Reproduction*, 1998; 13: 2371-2376.
- Tekeli A, Akgün S, Civelek A, İşbir S, Ak K, Demirbaş G, Şirvancı S, Arbak S, yaylım İ, Çobanoğlu A. Alt Ekstremitte İskemi Reperfüzyonu sonucunda Gelişen Akciğer Hasarının Önlenmesinde Farklı Bir Ajan: FK 506 (Takrolimus). *Turkish J Thorac Cardiovasc Surg*, 2001, 9: 242-246.
- Terzi C, Kuzu A, Tanık A, Kale T, Aşlar K, Elhan A. (2000). Sıçanlarda intestinal iskemi modelinde proflaktik kısa ve uzun süreli yüksek doz Allopurinol kullanımının mortaliteye etkisi. *Klinik ve Deneysel Cerrahi*, 8: 10-16.
- Thrane AS, Skehan JD, Thrane PS. (2007). A novel interpretation of immune redundancy and duality in reperfusion injury with important implications for intervention in ischaemic disease. *Med Hypotheses* 68: 1363-1370.
- Tokito A, Silva J. (2005). Ischemia and reperfusion syndrome of hind limbs functional and histological renal changes in rats. *Medicine Riberio Preto*, 38: 294300.
- Toyokuni S. Reactive oxygen species-induced molecular damage and its application in pathology. *Pathol int* 1999; 49: 91-102.
- Tso MM, Blatchford KL, Callado LF, McLaughlin DP, & Stamford JA (2004). Stereoselective effects of ketamine on dopamine, serotonin and noradrenaline release and uptake in rat brain slices. *Neurochemistry international*, 44(1), 1-7.
- Uysal A, Akar İ, Özsin KK, Rahman A, Üstündag B, Özeran Hİ. Alt ekstremitte iskemi reperfüzyonunun yol açtığı akciğer hasarında eritropoietinin koruyucu etkinliği. *Türk Göğüs Kalp Damar Cerrahisi Dergisi Ekim 2006*, Cilt: 14, Sayı 4, 308-314.
- Wang F, Yu G, Liu SY, Li JB, Wang JF, Bo LL, Qian LR, Sun XJ, Deng XM. Hydrogen-rich saline protects against renal ischemia/reperfusion injury in rats. *J Surg Res*, 2011, 167: e339-344.
- Weight SC, Bell PR, Nicholson ML. (1996). Renal ischaemia-reperfusion injury. *Br J Surg*. 83: 162-170.

- Wilhelm J. (1990). Metabolic aspects of membrane lipid peroxidation. *Acta Univ Carol Med Monogr* 137:1-53.
- Woodfin A, Voisin MB, Nourshargh S. PECAM-1: a multi-functional molecule in inflammation and vascular biology. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2007; 27: 25142523.
- Xiao X, Zhang H, Wang H, Li Q, Zhang T. (2017). Neuroprotective effect of amantadine on corticosteron-induced abnormal glutamatergic synaptic transmission of CA3-CA1 pathway in rat's hippocampal slices. *Synapse*. 71: e22010.
- Yalçın AS: Antioksidanlar. *Klin Geliş*. 1998; 11: 342-6
- Yardıın Akaydın S, Sepici A, Özkan Y, Simsek B, Sepici V. Evaluation of allantoin levels as a new marker of oxidative stress in Behçet's disease. *Scandinavian Journal of Rheumatology* 2006; 35(1), 61-64.
- Yassin MM, Harkin DW, Barros D'Sa AA, 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.
- Yıldar M. (2008). Deneysel Renal İskemi/Reperfüzyon Hasarında Splenektomi ve Gadolinium Chloride (GdCl₃)'in Koruyucu Etkisi. Eğitim ve Araştırma Hastanesi, Genel Cerrahi Kliniği, Uzmanlık Tezi, İstanbul: Sağlık Bakanlığı Haydarpaşa Numune Eğitim Ve Araştırma Hastanesi.
- Zhang W, Smith C, Shapiro A, Monette R, Hutchison J, Stanimirovic D. (1999) Increased expression of bioactive chemokines in human cerebrovascular endothelial cells and astrocytes subjected to simulated ischemia in vitro. *J Neuroimmunol* 101:148-160.
- Zhao J, Yu S, Tong L, Zhang F, Jiang X, Pan S, et al. Oxymatrine attenuates intestinal ischemia/reperfusion injury in rats. *Surgery today*. 2008;38(10):9317. PubMed PMID: 18820869. Epub 2008/09/30. eng.

Zimmerman BJ, Granger DN. Reperfusion injury. The Surgical clinics of North America. 1992 Feb;72(1):65-83. PubMed PMID: 1731390. Epub 1992/02/01. eng.

Zimon IN, Mavlianova NA: Respiratory disorders in patients with acute arterial occlusion of legs and ischemic syndrome. Khirurgiia 1997;16-8.



ÖZGEÇMİŞ

Ad:	NEVCIHAN
Soyad:	ŞAHUTOĞLU BAL
Doğum Yeri:	Samandağ/Hatay
Doğum Tarihi:	08.08.1986
Görev Yeri:	Sakarya
Yabancı Dil:	İngilizce
E-Posta Adresi	nevc_i_sahut@hotmail.com

Tarih	Eğitim
2005-2009	Tiflis Devlet Üniversitesi Tıp Fakültesi
2009-2012	Selçuk Üniversitesi Meram Tıp Fakültesi
2013-2015	Süleyman Demirel Üniversitesi Tıp Fakültesi Anesteziyoloji ve Reanimasyon AD
2015-2020	Sakarya Üniversitesi Tıp Fakültesi Anesteziyoloji ve Reanimasyon AD
Varsa, İyi Klinik Uygulamalar Kapsamında Aldığı Eğitimler	
2017	İleri Yaşam Desteği Uygulayıcı Kursu (ERC); Uygulayıcı Sertifikası
Akademik Ünvanları	
2013 - 2020	Araştırma Görevlisi
İş Tecrübesi	
2012 - 2013	Kars sarıkamış TSM
2013 - 2015	Süleyman Demirel Üniversitesi Tıp Fakültesi Anesteziyoloji ve Reanimasyon AD
2015-2020	Sakarya Üniversitesi Tıp Fakültesi Eğitim ve Araştırma Hastanesi Anesteziyoloji ve Reanimasyon AD
Varsa, Araştırmacı Olarak Katıldığı Klinik Araştırmalar	
Varsa, Monitör/İzleyici Olarak Katıldığı Klinik Araştırmalar	
Varsa, Saha Görevlisi Olarak Katıldığı Klinik Araştırmalar	

YAYIN LİSTESİ

1. Beyaz SG, Sahutoglu Bal N. (2017). Spinal cord stimulation for a patient with neuropathic pain related to congenital syringomyelia. The Korean Journal of Pain. 30(3): 229–230.

KATILDIĞI KONGRE VE SEMİNERLER

1. Uluslararası Yoğun Bakım Sempozyumu, İstanbul, Mart 2015.
2. Abant Anestezi Sempozyumu, Bolu, Nisan 2016.
3. Ulusal Türk Anesteziyoloji ve Reanimasyon Kongresi, İstanbul, 26-30 Ekim 2016 (TARK).
4. Türk Kalp ve Damar Cerrahisi Derneği 14.Kongresi (uluslararası katılımlı), Antalya, 3-6 Kasım 2016.
5. 9. Ulusal Fleboloji Kongresi ile birlikte gerçekleştirilen 18. Ulusal Vasküler ve Endovasküler Cerrahi Kongresi, Kıbrıs, 9-12 Kasım 2017.