



**T.C.
ERCİYES ÜNİVERSİTESİ
TIP FAKÜLTESİ
GENEL CERRAHİ ANABİLİM DALI**

**SIÇANLARDA OLUŞTURULAN DENEYSEL
İNTESTİNAL İSKEMİ REPERFÜZYON MODELİNDE
BRADİKİNİN ÖNKOŞULLANDIRMASININ ETKİLERİ**

TIPTA UZMANLIK TEZİ

Dr. Fatih DAL

KAYSERİ – 2008



**T.C.
ERCİYES ÜNİVERSİTESİ
TIP FAKÜLTESİ
GENEL CERRAHİ ANABİLİM DALI**

**SIÇANLARDA OLUŞTURULAN DENEYSEL
İNTESTİNAL İSKEMİ REPERFÜZYON MODELİNDE
BRADİKİNİN ÖNKOŞULLANDIRMASININ ETKİLERİ**

TIPTA UZMANLIK TEZİ

Dr.Fatih Dal

**Danışman
Doç. Dr. K.Can KÜÇÜK**

KAYSERİ – 2008

İÇİNDEKİLER

KISALTMALAR.....	III
ŞEKİL VE TABLO LİSTESİ.....	VI
RESİM VE GRAFİK LİSTESİ.....	VII
TEŞEKKÜR.....	VIII
ÖZET	IX
ABSTRACT	XI
1. GİRİŞ VE AMAÇ.....	1
2. GENEL BİLGİLER	4
2.1. İSKEMİ REPERFÜZYON HASARI.....	4
2.1.1. Serbest oksijen radikallerinin oluşumu	7
2.1.2. Ksantin oksidaz reaksiyonu.....	7
2.1.3. Nötrofil aktivasyonu.....	10
2.1.4. Serbest radikaller	11
2.1.5. Serbest radikal giderici enzimler	13
2.1.6. Fosfolipaz A ₂ Aktivasyonu.....	15
2.2. İSKEMİK ÖNKOŞULLANDIRMA	17
2.2.1. Erken dönem koruma mekanizmaları.....	17
2.2.2. Geç dönem korunma mekanizmaları.....	19
2.3. KALLİKREİN KİNİN SİSTEMİ	20
2.3.1. Kininlerin sentezi.....	21
2.3.2. Kininlerin enzimatik yıkımı	21
2.3.3. Kinin reseptörleri.....	22

2.3.4. Hipertansiyon ve bradikininin	23
2.3.5. Sol ventrikül hipertrofisi ve bradikininin	23
2.3.6. Kardiyak yetmezlik ve iskemide bradikininin.....	23
3. GEREÇ VE YÖNTEM	25
3.1. DENEKLER.....	25
3.2. ANESTEZİ	25
3.3. CERRAHİ PROSEDÜR.....	26
3.3.1. Jugüler ven kateterizasyonu	26
3.3.2. Operasyon	26
3.4. DENEY GRUPLARI	26
3.5. KAN VE DOKU ÖRNEKLERİNİN ALINMASI	27
3.6. DEĞERLENDİRİLECEK PARAMETRELER	30
3.6.1. Biyokimyasal parametreler.....	30
3.6.2. Doku myeloperoksidaz aktivitesi tayini	30
3.6.3. Histopatolojik değerlendirme	30
3.7. İSTATİSTİKSEL ANALİZ	31
4. BULGULAR	32
4.1. BİYOKİMYASAL SONUÇLAR.....	32
4.1.1. LDH, Laktat sonuçları	32
4.2. MPO SONUÇLARI	32
4.3. HİSTOPATOLOJİK DEĞERLENDİRME.....	33
5. TARTIŞMA	40
6. SONUÇLAR.....	49
7. KAYNAKLAR.....	50
KABUL ONAY SAYFASI.....	64

KISALTMALAR

ADE	: Anjiyotensin Dönüştürücü Enzim
ADP	: Adenozin Difosfat
AMP	: Adenozin Monofosfat
AMPK	: Adenozin monofosfat ile aktive edilen protein kinaz
ATP	: Adenozin Trifosfat
BK	: Bradikinin
DAG	: Diakilgliserol
dk	: dakika
DK	: Doku Kallikreini
Fe	: Demir
FÖK	: Farmakolojik Önkoşullandırma
GP	: Glutasyon Peroksidaz
GSH	: Glutasyon
gr	: gram
H₂O₂	: Hidrojen Peroksit
HOCL	: Hipoklorik Asit
H&E	: Hemotoksilen-Eozin
IL	: İnterlökin
İÖK	: İskemik Önkoşullandırma
İR	: İskemi Reperfüzyon
iv	: intravenöz
KD	: Ksantin Dehidrogenaz

kg	: kilogram
KKS	: Kallikrein Kinin Sistemi
KO	: Ksantin Oksidaz
LTB₄	: Lökotrien B ₄
L	: litre
LDH	: Laktat Dehidrogenaz
µg	: mikrogram
MDA	: Malondialdehit
MPO	: Myeloperoksidaz
mmol	: milimol
NAD	: Nikotinamid Adenin Dinükleotid
NADP	: Nikotinamid Adenin Dinükleotid Fosfat
NEP	: Nötralendopeptidaz
NO	: Nitrik Oksit
O₂	: Oksijen
O₂·	: Süperoksit Radikali
OH·	: Hidroksil Radikali
p38 MAPK	: p38 mitojen ile aktive edilen protein kinaz
PGE₂	: Prostaglandin E ₂
PGI₂	: Prostatiklin
PKC	: Protein Kinaz C
PLA₂	: Fosfolipaz A ₂
PLC₂	: Fosfolipaz C ₂
PMNL	: Polimorfonükleer Lökosit
SMA	: Süperior Mezenterik Arter

SOD	: Süperoksit Dismutaz
TNF	: Tümör Nekroz Faktör
TXA₂	: Tromboksan A ₂
VWF	: Von Willebrand Faktör
Ü	: ünite

ŞEKİLLER LİSTESİ

Şekil 1. İskemi ve reperfüzyon.....	8
Şekil 2. Serbest oksijen radikallerinin etkisi	12
Şekil 3. Serbest oksijen radikallerini giderici enzimler.....	14
Şekil 4. Erken ve geç önkoşullandırmada sinyal ve iletim yolları	20
Şekil 5: Deney düzeni	27

TABLolar LİSTESİ

Tablo 1.Chiu histopatolojik hasar skorlaması	31
Tablo 2. Serum LDH ve laktat değerlerinin karşılaştırılması.....	33
Tablo 3. MPO değerlerinin karşılaştırılması	35
Tablo 4. Chiu skorunun karşılaştırılması.....	36

RESİMLER LİSTESİ

Resim 1. Anestezi uygulaması	29
Resim 2. Juguler ven kateterizasyonu.....	29
Resim 3. SMA klempenmesi	29
Resim 4. İnferior vena kavadan kan alınması	29
Resim 5. a,b,c,d,e. İntestinal mukoza hasarının histopatolojik görünümü.....	37

GRAFİKLER LİSTESİ

Grafik 1. Serum laktat düzeylerinin karşılaştırılması.....	34
Grafik 2. Serum LDH düzeylerinin karşılaştırılması	34
Grafik 3. MPO değerlerinin karşılaştırılması	35
Grafik 4. Chiu skorunun karşılaştırılması	36

TEŞEKKÜR

Asistanlık eğitim dönemim boyunca beni fedakarca destekleyen sevgili eşim Ayşe DAL'a, ihtisasıyla yaşıt olan biricik kızım Ayşe İnci DAL'a,

Çalışmalarımın tüm aşamalarında her türlü akademik desteği veren tez danışmanım sayın Doç.Dr.Can KÜÇÜK'e,

Bana cerrahi sevgisini aşıl原因; cerrahinin fedakarlık, sevgi, insanlık olduğunu öğreten saygıdeğer hocalarım; Prof. Dr. Yücel ARITAŞ, Prof.Dr. Zeki YILMAZ, Prof.Dr. Erdoğan SÖZÜER, Doç.Dr. Engin OK, Yrd.Doç.Dr.Tarık ARTIŞ , Yrd.Doç.Dr. Alper AKCAN ve Yrd.Doç.Dr. Hızır AKYILDIZ'a,

Tüm asistan arkadaşlarıma,

Deneysel aşamada her türlü desteklerini gördüğüm DEKAM personeline,

Patolojik spesmenlerin incelenmesinde emeği geçen Yrd. Doç. Dr. Kemal DENİZ'e,

Tablo, grafik vs. hazırlanması ve tez redaksiyonunda yardımını aldığım Cihan ER'e sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

SIÇANLARDA OLUŞTURULAN DENEYSEL İNTESTİNAL İSKEMİ REPERFÜZYON MODELİNDE BRADİKİNİN ÖNKOŞULLANDIRMASININ ETKİLERİ

ÖZET

Amaç: Beyin, spinal kord, kalp gibi organları iskemi reperfüzyon (İR) hasarına karşı koruduğu gösterilmiş olan bradikinini (BK) deneysel intestinal iskemi reperfüzyon modelinde farmakolojik önkoşullandırıcı ajan olarak kullanıp reperfüzyon hasarı üzerine etkilerini araştırmak.

Materyal ve Metod: Çalışmada 32 adet Wistar–Albino sıçan kullanıldı. Her biri 8 rattan oluşan 4 grup oluşturuldu. Sham grubu dışındaki tüm ratlara juguler venöz kateter yerleştirildi. Sham grubundaki ratlar laparotomiye takiben 100 dk gözlem sonrası sakrifiye edildiler. Kontrol grubuna 20 dakika gözlem sonrası 50 dakika iskemi ve takiben 30 dakika reperfüzyon uygulandı. Çalışma gruplarından birine iskemik önkoşullandırma (İÖK) yapıldı. Diğer gruba ise 10 µg/kg/dk dozunda bradikinin iv infüzyon şeklinde verilerek farmakolojik önkoşullandırma (FÖK) yapıldı. Histopatolojik inceleme ve doku myeloperoksidaz (MPO) aktivitesi ölçümü için jejunum rezeksiyonu yapıldıktan sonra Laktat ve LDH için kan örneği alınarak ratlar sakrifiye edildi.

Bulgular: Serum Laktat ve LDH düzeyleri kontrol ve çalışma gruplarında sham grubuna göre anlamlı olarak yüksek bulundu ($p<0.001$). Çalışma gruplarında bu düzeyler; kontrol grubuna göre anlamlı olarak düşük bulundu ($p<0.001$). Ancak çalışma grupları arasında istatistiksel olarak anlamlı fark tespit edilmedi ($p>0.05$). Benzer sonuçlar, MPO düzeylerinde de elde edildi. Histopatolojik olarak kontrol grubunda belirgin hücre hasarı tespit edilirken; çalışma gruplarında bu hasarın farklı düzeylerde azalmış olduğu görüldü. Ancak çalışma grupları arası karşılaştırmada istatistiksel olarak anlamlı fark görülmedi ($p>0.05$).

Sonuç: Hem iskemik önkoşullandırma hem de bradikinin kullanılarak yapılan farmakolojik önkoşullandırma jejunumdaki iskemi reperfüzyon hasarını azaltmaktadır. Ancak bu önkoşullandırma yöntemleri arasında anlamlı bir fark saptanamamıştır.

Anahtar Kelimeler: iskemi-reperfüzyon, bradikinin, iskemik ön koşullandırma, ince barsak

EFFECTS OF BRADYKININ PRECONDITIONING IN EXPERIMENTAL INTESTINAL ISCHEMIA REPERFUSION MODEL ON RATS

ABSTRACT

Aim: To use of bradykinin that known the protective effect on such as brain, spinal cord, heart etc. from ischemia and reperfusion injury as a pharmacological agent in experimental intestinal ischemia reperfusion model on rats and to investigate the effects of it.

Material and Method: We used 32 Wistar-Albino rats. We composed 4 groups each containing 8 rats. We placed jugular venous catheter to all of the rats except sham group. Rats in sham group were sacrificed at 100 minutes observation after laparotomy. Thirty minutes reperfusion was performed following 50 minutes ischaemia in control group after observing 20 minutes. Ischemic preconditioning was performed in one group of the study. We performed the other study group pharmacologic preconditioning by infusional administration of 10 µg/kg/minute bradykinin intravenously. We sacrificed all of the rats by taking blood samples to evaluate of the lactate and LDH after resection of jejunum for detecting tissue myeloperoxidase activity.

Results: Lactate and LDH levels were significantly higher in control and study groups than sham group ($P < 0.001$). These levels were significantly lower in study groups than control group ($P < 0.001$). There is no difference between the study groups statistically. ($P > 0.05$). The results were same for MPO levels. Although definitive cell damage was determined in the control group hystopatologically evaluation, the damage in the study groups observed that lower in different levels. However there is no significant difference between the study groups statistically ($p > 0.05$).

Conclusion: Either ischeamic preconditioning or pharmacologic preconditioning was made by bradykinin reduced the ischemia reperfusion injury at jejunum. On the other hand there is no significant difference between this preconditioning models.

Key words: ischemia reperfusion, bradykinin, ischemic preconditioning, small intestine

1. GİRİŞ VE AMAÇ

İskemik dokuya kan akımının yeniden sağlanması enerji temini ve hücrenin yaşamını sürdürmesi için gereklidir. İskemik hasarın ilerlemesini azaltmak için en önemli koşul iskemik hasar süresini en aza indirmektir ancak iskemik dokuların reperfüze edilmesi ile birlikte doku hasarını başlatan bir dizi paradoksal kompleks reaksiyonlar serisi başlar (1,2). Parks ve Granger ilk kez 1983 yılında reperfüzyonda olan hasarın iskemiden daha fazla olduğunu göstermiştir (3). Böylece reperfüzyon hasarı ile ilgili çalışmalar son yıllarda üzerinde en çok araştırma yapılan patolojilerden biri olmuştur.

Oksijen (O_2) kaynaklı serbest radikaller intestinal iskemi ile birlikte görülen vasküler permeabilite değişikliklerinin primer mediatörleridir. İskemik barsakta ksantin oksidaz (KO) enziminin hipoksantin ve moleküler O_2 ile reaksiyona girmesi sonucu serbest O_2 radikalleri oluşur. Ancak iskemiye bağlı intestinal kapiller permeabilite artışında süperoksit radikallerin rolü tam olarak anlaşılamamıştır (3). İskemi reperfüzyon (İR) hasarının patogenezinin açıklanmasında birçok mekanizma olmasına rağmen üzerinde en çok durulan faktörler; reaktif O_2 metabolitleri ve inflamatuvar lökositlerdir (1).

Reperfüzyon; iskemi ile yapısı, fonksiyonları ve metabolizması bozulmuş dokuya oksijenin tekrar ulaşması şeklinde tanımlanabilir. Bir kural olarak bu şartlar altında reperfüzyon sırasında süperoksit radikali (O_2^{\cdot}), hidrojen peroksit (H_2O_2) ve hidroksil radikali (OH^{\cdot}) oluşur. Bu radikaller hücrelerde subsellüler düzeyde mitokondrial şişme,

mitokondrial bütünlüğün kaybı ve primer olarak enzimatik sistemde destrüksiyona yol açar. Ansatüre yağasidleri ile reaksiyon sonucu lipid peroksidasyonu artar. Peroksidasyonun artması ile membran enzimleri inhibe edilir ve mitokondri hasarı ilerler. Bunun sonucu olarak Adenozintrifosfat (ATP) üretimi azalır (4).

İR patogenezinde hem iskemi sırasında doku hipoksisine bağlı olarak hücrenel enerji kaynaklarının tüketilmesi hem de bundan daha önemli olarak reperfüzyon sırasında oluşan O₂ kökenli serbest radikaller rol oynamaktadır. İR süreci yalnızca yer aldığı organda değil bir dizi medyatörler aracılığı ile uzak organlarda da işlev bozuklukları ve hasara neden olabilir (5). Yapılan çalışmalar reperfüzyon hasarının iskemide görülen hasardan daha fazla olduğunu göstermektedir(6).

Ateroskleroz, serebrovasküler hasar, yaşlanma, karsinogenezis, prematürlerde görülen retinopati, erişkin respiratuar yetmezlik sendromu gibi patolojilerde serbest radikallerin rolü olduğu ve bu radikalleri tutucu maddelerin tedavide oldukça yararlı oldukları gösterilmiştir (7).

Süperoksit Dismutaz, Katalaz, Dimetilsülfoksid, Allopürinol, Desferroksamin, Fosfolipaz A₂ inhibitörleri, Üriner Tripsin inhibitörü, Somatostatin, N-Asetilsistein, E ve C vitamini, Kalsiyum antagonistleri, Ginkgo Biloba ekstresi gibi ajanlar serbest O₂ radikallerini detoksifiye edebilen ve radikallerin düzensiz artışını engelleyebilme fonksiyonları olduğu düşünülen ajanlardır. Bu ajanlar antioksidan etkilerinden dolayı bugüne kadar İR modellerinde kullanılmışlardır. Herbirinin değişik mekanizmalarla antioksidan etki gösterdiği düşünülmektedir ancak hiç biri İR hasarını tam olarak engelleyememiştir (2,3,8,9).

Son yıllarda reperfüzyon hasarını önlemek üzere iskemik önkoşullandırma (İÖK) olarak bilinen bir cerrahi yöntem geliştirilmiştir. Bu yöntemin amacı; uzun iskemi öncesi uygulanan kısa iskemi ve reperfüzyon epizotları ile organda İR hasarına karşı direnci arttırmaktır (10).

İÖK ilk kez Murry ve arkadaşları tarafından tanımlanmıştır. Araştırmacılar köpek kalp kasında daha geniş bir infarkt alanı oluşturmayı hedeflemişler ancak bu amaçla uzun iskemi öncesine ekledikleri birkaç kısa iskemi ve reperfüzyon epizodunun infarktı genişletmediğini aksine % 75 geriletmediğini gözlemlemişlerdir (11).

İÖK gibi son yıllarda gündemde olan ve İR hasarına karşı koruyucu etkileri olduğu bilinen farmakolojik önkoşullandırma (FÖK); intestinal modellerde farklı mekanizmalarla etkili olduğu düşünülen bir çok ajanla çalışılmaktadır (12).

Kallikrein Kinin Sistemi (KKS); kallikreinler, kininojenler, kininler, kinin yıkıcı enzimler ve kinin reseptörlerinden oluşan bir sistemdir (13). Farmakolojik olarak aktif polipeptid olan kininler; kininojenlerden kallikreinlerin enzimatik etkileri sonucu olarak doku ve vücut sıvılarından salınırlar. Kinin ailesi; BK, kallidin, methionyllsyl-BKden oluşur (14). Kininler iki tip reseptörleri aracılığıyla etkirler. Tip1(B1) ve Tip2 (B2) reseptörler. Geniş spektrumlu bir aktiviteye sahip olan kininler güçlü vazodilatatörlerdir. Natriürezis ve diürezisi desteklerler ayrıca postiskemik lökositlerin endotele yapışmasını, mikrovasküler bariyerdeki bozulmayı ve doku hasarını azaltarak İR hasarında koruyucu rol oynarlar (15).

Biz çalışmamızda bir endojen vazodilatör peptid olan ve kardiovasküler hastalıkların patogeneğinde ön plana çıkan BK’i farmakolojik önkoşullandırıcı ajan olarak kullanmayı tasarladık. BK’in İR hasarındaki koruyucu etkilerine antilökosit etkisi ve İÖK mekanizmalarındaki endojen tetikleyici etkileri aracılık eder. Bu etki mekanizmalarından yola çıkılarak reperfüzyon hasarına karşı koruyucu etkileri beyin, spinal kord, kapiller endotel hücresi ve kalpte gösterilmiştir.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. İSKEMİ REPERFÜZYON HASARI

Mezenterik hipoperfüzyon; hemorajik şok, sepsis, septik şok, myokard enfarktüsü, şiddetli yanıklar, nekrotizan enterokolit, mezenterik trombus gibi birçok hastalığın fizyopatolojisi ile ilişkili klinik bir patolojidir (16,17). Barsağın beslenmesini azaltan yada ortadan kaldıran bu tür patolojiler kollateral sirkülasyonla kompanse edilemez ise barsağın irreversibl hasarı söz konusu olur. Kısa süreli kan akımı düşüşleri bile iskemik doku hasarını başlatabilir (8). İR hasarı klinikte myokard infarktüsü, serebrovasküler hastalıklar, periferik vasküler hastalıklar ve organ transplantasyonları gibi birçok hastalıkla ilgili klinik bir patolojidir. İR hasarında gerçek mekanizma tam olarak bilinmemekle birlikte değişik etyolojik faktörler suçlanmaktadır. Genel olarak bu faktörler; proteaz ve fosfolipaz aktivasyonu, Ca^{++} konsantrasyonundaki değişiklikler, ATP depleasyonu, serbest radikaller tarafından oluşturulan hücre hasarı, nitrik oksit sentezinin inhibisyonu, sitokinler ve bunlara ek olarak hücrenin immun sisteminde aktif rolü olan nötrofillerdir (18).

Reperfüzyon sonrası intestinal kapillerlerde osmotik yansıma katsayısı artar. Bu permeabilite artışı süperoksit radikallerinin spesifik gidericisi olan süperoksit dismutaz'ın (SOD) uygulanımı ile büyük ölçüde önlenmiştir (3). İskemik barsakta süperoksit radikallerin kaynağının Ksantin Oksidaz (KO) enzimi olduğu ileri sürülmektedir. İskemi süresince veya hipokside Ksantin Dehidrogenaz (KD) hızlıca süperoksit üreten oksidaza dönüşür. İntestinal mukoza en zengin KO kaynaklarından

biridir ve bu enzim en sık olarak villusun ucunda yoğun olarak bulunur. Bu nedenle villuslar iskemik hasara oldukça duyarlıdır (19).

ATP katabolizmasının sonucu olarak dokuda hipoksantin birikir. Hipoksantin KO enzimi için okside olabilecek bir substrattır. İndirgenebilecek bu substratla moleküler O₂ birleşince süperoksit oluşumunda bir patlama olur ve süperoksit radikali (O₂[•]) oluşur. O₂[•], dismutasyonla çok hızlı bir şekilde hidrojen peroksid (H₂O₂)'e dönüşebilir. SOD varlığında ise bu reaksiyon daha hızlı olur çünkü SOD süperoksit radikalini diğer reaktif radikallere dönüşmemesi için hızlıca H₂O₂'e dönüştürür. H₂O₂ relatif olarak toksik değildir ve ancak metal şelatların varlığında O₂ ile reaksiyona girerek yüksek reaktif hidroksil radikale (OH[•]) dönüşür (3).

Barsakta geçici iskemi sonrası sıvı resüsitasyonu yada reperfüzyon; yapısal ve fonksiyonel mukoza harabiyetine ve interstisiyel ödeme neden olur. İntestinal iskemi sırasında ortaya çıkan süperoksit anyonlar, reperfüze edilen dokuda O₂ ile reaksiyona girerek genel bir elektron alıcısı olan süperoksit radikallerini oluşturur. Serbest radikaller; hedef hücre membran yapısında yaptığı değişikliklerle demir bağımlı lipid peroksidasyonuna, nötrofil aktivasyonuna ve hücreye hızlı kalsiyum akışı ile birlikte araşidonik asit metabolitlerini arttırıp Fosfolipaz A2 aktivasyonuna neden olarak hücre membranında harabiyet ve mikrovasküler permeabilite artışına neden olur. Sonuçta intestinal İR hasarı; oluşan serbest radikaller, KO sistemi, lipid peroksidasyonu ve aktive olan nötrofillerden kaynaklanır (17).

Aerobik ortamda hayat O₂'in varlığına bağlıdır ancak O₂'in gereğinden fazla ve düzensiz olarak verilmesi sonucunda ortaya çıkan dekompanse organik olaylar uzun yıllar ihmal edilmiş yada gözden kaçmıştır. Organizmada O₂'in hücre koruyucu etkisi üzerine yapılan son çalışmalarda asıl olarak hücre hasarından oksijen ve metabolitlerinin sorumlu olduğu gösterilmiştir. Oksidasyon, O₂ ile diğer kimyasal maddeler arasındaki kimyasal reaksiyondur. Çünkü O₂, elektronları diğer atom ve moleküllerden ayırır. Oksidasyon bir atom veya molekülden elektron kaybı olarak da tanımlanabilir. Elektronları ortadan kaldıran bu kimyasal maddelere okside edici yada oksidan ajan denir. Bir organik molekül oksijenle reaksiyona girdiğinde oksijen moleküldeki karbon atomlarından elektronları ayırır. Bir yada daha fazla kovalent bağın bozulması ile ısı, ışık, bazen de ses şeklinde enerji açığa çıkar. O₂ normalde çift atomlu

(diatomik) moleküldür ve zayıf bir oksidandır ancak bazı metabolitleri letal hücre hasarı oluşturabilecek güçlü oksidanlardır. O₂ molekülünün atomik yapısına bağlı olarak oksijen metabolizmasında ana molekülden çok daha güçlü oksidanlar oluşabilir (20). Bir serbest radikal bir nonradikale reaksiyona girdiği zaman nonradikal bir elektron kaybederek serbest radikale dönüşür. Bu nedenle bir nonradikale bir serbest radikalın birleşimi yeni bir serbest radikali oluşturur ve böylece serbest radikalın yaşam süresi arttırılmış olur.

Son yıllarda yapılan çalışmalarda parsiyel intestinal iskemi ile birlikte olan erken mukozal lezyonlar ve vasküler permeabilitedeki artıştan serbest O₂ radikallerinin büyük ölçüde sorumlu olduğu kanıtlanmıştır. O₂ radikallerinin; hipoksantin ve moleküler O₂'in KO enzimi varlığında reaksiyona girmesi sonucu oluştuğu gösterilmiştir. Normal sağlıklı hücrelerde KO, Nikotinamid Adenin Dinükleotid'i (NAD) indirgeyici dehidrogenaz olarak kullanır ve oksijen radikali oluşturan bir oksidaz değildir. Barsakta iskeminin başlaması ile birlikte bir dakikadan daha kısa sürede dehidrogenazın oksidaza dönüştüğü bilinmektedir. Karaciğer ve barsaktaki biyokimyasal incelemelerde; "proteaz inhibitörleri gibi" iskemide ksantin dehidrogenazın oksidaza dönüşümünü engelleyen ajanların kullanımı ile oksijen radikallerinin oluşumunun azaldığı ve dolayısı ile sonraki oluşacak doku hasarının ilerlemesinin engellendiği gösterilmiştir (19,21).

Kısa süreli intestinal iskemilerde mukoza hücrelerinde mitokondrial şişme ve orta derecede interstisiyel ödem gibi çok önemli olmayan morfolojik değişiklikler olmasına rağmen mukozal membran sağlam kalır ancak intestinal permeabilite ve makromoleküllere olan geçirgenlik belirgin olarak artar. İskemi süresi 3 saat gibi daha uzun bir zaman biriminde gerçekleştiğinde histolojik olarak mukozal lezyonlarda aşağı doğru uzanan masif epitel ayrılması görülür bazen de hasar ilerleyerek lamina propriada parçalanma, hemoraji ve ülserasyon ile birlikte villus kaybı olur (19).

İlk geçirilen İR atağının daha sonra gelecek olan ataklara yönelik adaptif bir cevap geliştirildiği düşünülmektedir (22). Yani daha önce kısa peryotlarla iskemiye maruz kalmak daha uzun süreli kan akımı kesintilerinde hücrel hasarı azaltabilir (1).

Reperfüzyonun iskemik dokularda yaptığı hasarı gösteren ve reperfüzyon hasarını destekleyen görüşler birkaç madde halinde sıralanabilir:

1. Kısa periyodlarla yapılan reperfüzyonda dokuda küçük histolojik değişiklikler görülürken uzun periyodlarla yapılan reperfüzyonda progressif hasarı gösteren değişiklikler mevcuttur.

2. 4 saatlik iskeminin oluşturduğu hasar, 3 saatlik iskemi ve 1 saatlik reperfüzyon sonrası görülen hasardan daha azdır.

3. Reperfüzyonun başında verilen tedavi, iskemi reperfüzyon hasarını azaltmak açısından iskemiden önce verilen tedavi kadar etkilidir.

4. Doku hasarının ortaya çıkabilmesi için, reperfüzyon sırasında iskemik dokuların moleküler oksijenle karşılaşmaları gerekir.

Böylece reperfüzyon yani oksijenli kanın dokulara tekrar sağlanması ile birlikte sitotoksik olaylar serisi başlar. Bu olayları başlatan faktörlerin en önemlisi reaktif oksijen metabolitleridir (1). Ayrıca reperfüzyonda arteriyel vazospazm, iskemiye bağlı interstisiyel ödem, hemoraji ve venöz konjesyon oluşarak mikrodolaşım bozulur (23).

Bugün için intestinal İR hasarı oluşumunda temel 2 mekanizma ortaya atılmıştır. Bunlar:

1. Serbest oksijen radikallerinin oluşumu
2. Fosfolipaz A₂ aktivasyonu (8,24, 25).

2.1.1. Serbest oksijen radikallerinin oluşumu

Barsakta İR hasarında rol oynayan serbest oksijen radikallerinin başlıca üç kaynaktan oluştuğu ileri sürülmektedir. Bunlar;

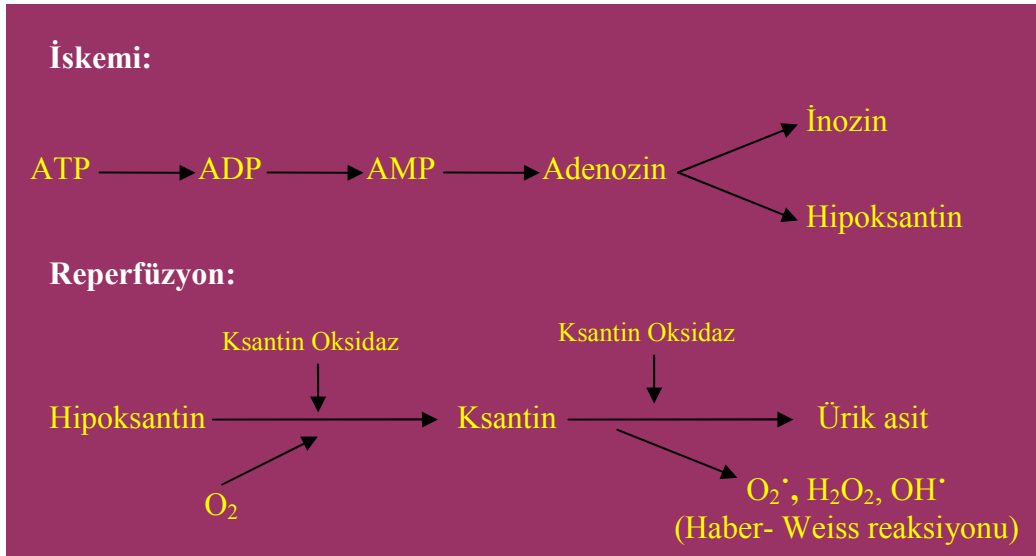
- 1) KO reaksiyonuna bağlı serbest oksijen radikalleri oluşumu
- 2) Nötrofillerden kaynaklanan serbest oksijen radikalleri
- 3) Bilinmeyen sebeplerle oluşan serbest oksijen radikalleri

2.1.2. Ksantin oksidaz reaksiyonu

İskemi süresince hücrede ATP üretimi durur ancak tüketimi devam eder. ATP sırası ile enerjiden zengin fosfat bağları indirgenerek, ADP-AMP-Adenozin-İnozin ve Hipoksantin'e çevrilir. Adenozin hücre dışına çıkarak inozin ve hipoksantine ayrılır. Normal dokularda hipoksantin ürik aside dönüşür. Hipokside ise hipoksantin daha

fazla metabolize edilemez ve birikir. Yapılan çalışmalarda hipoksantin düzeyi, iskemik barsakta normal barsak dokusundan 5 kat fazla bulunmuştur. Aynı zamanda iskemide KD'nin büyük bir kısmı KO'a dönüşür. Bu dönüşümün büyük bir bölümü iskeminin başlaması ile birlikte ilk dakikada gerçekleşir. Reperfüzyon periyodunun başlaması ve oksijenin dokulara ulaşması ile KO; hipoksantini ksantin, sonra da ürik asid'e dönüştürür. Bu basamak önemlidir çünkü bu sırada serbest oksijen radikalleri oluşur. Bu reaksiyonlarda ürünler olarak ortaya çıkan H_2O_2 ve OH^* , hücre ve mitokondri membranlarında lipidlerin peroksidasyonunu ve nötrofil infiltrasyonunu başlatma özelliğine sahiptir (2).

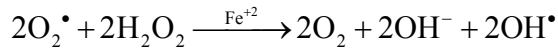
Serbest oksijen radikallerinin ilk oluşunu O_2^* tir. O_2^* , genellikle instabildir ve H_2O_2 ve O_2 'e dönüşür ancak O_2^* daha ciddi hasara neden olan oksijen radikallerinin prekürsörü olması nedeni ile de önemlidir. H_2O_2 zayıf ve yavaş bir oksidandır ve katalaz enzimi etkisi ile H_2O ve O_2 'e yıkılır. Ancak reperfüzyonda H_2O_2 süperoksit radikali ile reaksiyona girerek (Haber- Weiss reaksiyonu) hidroksil kökü (OH^-) ve hidroksil radikaline (OH^*) dönüşür. Reperfüzyon hasarından sorumlu olan ana radikal de hidroksil radikalidir. Ancak hidroksil radikalinin oluştuğu Haber-Weiss reaksiyonunun gerçekleşmesi için ortamda metal şelatların olması gereklidir (26).



Şekil 1. İskemi ve Reperfüzyon (8).

Hidroksil radikali çok reaktif ve kısa ömürlü bir radikaldir. Protein, polisakkarid, nükleik asit ve ansatüre yağ asitleri gibi bir çok biyolojik madde ile reaksiyona girer. Hidroksil radikallerinin karakteristik özelliği hidrojen atomlarını membrana bağlı poliansature yağ asitlerinden ayırmasıdır. Poliansature yağ asitleri hücre membranında yüksek konsantrasyonda bulunurlar ve radikaller tarafından kuşatılırlar (27). Lipid içerikli hücre membranları bu oksijen derivesi olan serbest radikallerin primer hedef noktasıdır. Hidroksil radikalının direkt olarak poliansature yağ asitleri ile reaksiyona girmesi ile hücre membranlarında çözülme ve buna bağlı hücre ölümü olur. Lipid peroksidasyonunun son ürünlerinden biri de Malondialdehittir (MDA) (24,27). Son çalışmalar moleküler oksijenden oluşan sitotoksik ve anstabil olan süperoksit radikalının iskemik barsakta kapiller permeabilite artışından sorumlu olduğunu göstermektedir (28).

Haber-Weiss Reaksiyonu: Reaktif O₂ metabolitlerinden en toksik ve en reaktif olan hidroksil radikali bu reaksiyonla oluşur. Haber- Weiss reaksiyonu demirin (Fe) katalizörlüğünde gerçekleşen ve süperoksit radikali ile hidrojen peroksitin Fe eşliğinde reaksiyona girip sonuçta hidroksil radikali, hidroksil kökü ve oksijenin olduğu bir reaksiyondur (29).



İskemi sırasındaki ATP katabolizmasının net sonucu hipoksantin ve ksantin konsantrasyonlarının artmasıdır. Bu reaksiyonlarla aynı anda iskemi KD'ın KO'a dönüşmesine neden olur. Çoğu canlıda barsak KO ve KD'ın ana kaynağıdır. KD normal sağlıklı bireylerde bulunan predominant enzimdir. KD hipoksantinün ürik aside metabolizasyonunu katalizler (8). Bu reaksiyonda NAD elektron akseptörüdür. Doku iskemisi sırasında KD, KO'a çevrilir. Yapılan çalışmalarda bu dönüşümün iskemi sırasında bir dakika içinde gerçekleştiği gösterilmiştir (19). Dehidrogenazın oksidaza dönüşme mekanizması tam olarak anlaşılammıştır. Bunun proteolizis veya enzime bağlı sülfidril gruplarının disülfidlere oksidasyonu sonucu olduğu düşünülmektedir (8). Reperfüzyon sırasında aniden O₂ konsantrasyonunun artması ve reaksiyonlara eklenmesi ile O₂[•] kaynaklı serbest radikallerin zincirleme reaksiyonu başlar. Bu radikaller direkt olarak hasara neden olurlar veya nötrofillerin aktivasyonu ya da lipid peroksidasyonu yolu ile hasarın etkisini arttırırlar. KD'ı içeren endotelial hücreler

serbest radikallerin neden olduğu doku hasarını başlatırlar. Radikallerin neden olduğu reperfüzyon hasarında mukozaya sınırlı hasarda serbest radikaller önemli iken; transmural infarktlarda herhangi bir rolleri yoktur (16).

2.1.3. Nötrofil aktivasyonu

Serbest radikallerin artışı ve Fosfolipaz A₂ aktivasyonu her ikisi birden intestinal dokuda nötrofillerin aktivasyonuna neden olurlar. Şiddetli mukozal lezyonların oluşumundan da bu hücreler büyük ölçüde sorumludur (27). Aktive olan nötrofiller fazla miktarlarda O₂ tüketimine neden olur ve hücre membranında Nikotinamid Adenin Dinükleotid Fosfat'ın (NADP) katalizörlük yaptığı bir reaksiyonla aşırı miktarlarda süperoksit anyonlar oluşur. Daha sonraki reaksiyonlar SDO ve MPO enzimlerinin katalizlediği reaksiyonlardır. Bunların sonucunda H₂O₂, OH[•] ve hipoklorik asid (HOCL) oluşur. Hücre membranında bulunan poliansature yağ asidi zincirleri serbest radikallere karşı son derece sensitiflerdir. Sepsiste lipid peroksidasyonunun artması ile birlikte serbest radikal üretiminin arttığı ve sonuçta oksidan bir patlamanın oluştuğunu gösteren kanıtlar mevcuttur (25). Nötrofillerde myeloperoksidaz enzimi kullanılarak H₂O₂'e klor eklenmesi ile HOCL oluşur.

Myeloperoksidaz (MPO) enzimi, dokularda polimorfnükleer lökositlere (PMNL) spesifik bir enzimdir ve dokulardaki lökosit düzeyinin tayinini yapmada yardımcıdır (30). MPO enzimi dokudaki biriken polimorfnükleer lökositlerin marker enzimi olarak kullanılır ve reperfüzyon hasarının bir göstergesi olarak değerlendirilir (31), ancak bazı çalışmalarda pyelonefritik lezyonlarda oldukça fazla miktarda nötrofil olmasına rağmen bu dokularda myeloperoksidaz varlığı gösterilememiştir. Bu nedenle reperfüzyon hasarında reperfüzyon yapılan organa göre bu enzimin değerleri değişebilir ve enzim değerlerindeki düşme dokudaki hasarın değerlendirilmesinde yanılgılara yol açabilir (30).

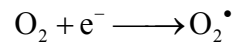
İnflamatuar olaylara erken cevapta immün sistem; makrofaj ve nötrofil granülositleri aktive eder. PMNL ile başlayan İR hasarında oluşan mukoza hasarı monoklonal antikorların kullanılması ile endotelial hücrelere lökosit tutunması engellenerek azaltılmıştır. H₂O₂, Fe⁺⁺ ve süperoksitin reaksiyonları sonucu barsakta granülosit infiltrasyonu oluşur ve daha sonra barsakta reperfüzyona bağlı hücre hasarı ilerler (2). Hücre membran hasarı sonucu hücre içine akışı kolaylaşan Ca⁺⁺; Fosfolipaz

A₂ (PLA₂) ve araşidonik asit salınımını aktive eder. PLA₂; dokudaki sitotoksik lizofosfolipidleri arttırma yeteneği olan hidrolitik bir enzimdir ve membrandaki yağ asitlerini fosfolipidlerden ayırır. Artmış fosfolipaz aktivitesi prostoglandin ve lökotrienlerin oluşumunu stimüle eder. Platelet aktive edici faktör, histamin, lizozomal enzimler, endotoksin, PGE₂, Lökotrien B₄ gibi metabolitlerin üretimlerinin artması ile inflamatuvar olaylar ilerler (8,24). Reperfüze olan barsakta ortaya çıkan serbest radikaller LTB₄ birikimi ve nötrofil aktivasyonuna neden olur. Böylece O₂ kaynaklı serbest radikallerin bozulmuş dağılımında ilk basamak oluşturulur ve PLA₂ aktivasyonu İR hasarını arttıran bir diğer faktör olarak patolojiye karışır (17).

İnce barsak İR hasarında lokal olarak üretilen serbest radikaller, araşidonik asit metabolitleri (platelet aktive edici faktör, lökotrien, prostoglandin) ve sitokinler hasarın olduğu bölgeye doğru dolaşımdaki nötrofillerin ulaşmasını kolaylaştırıp hasarı arttırmaları. Reperfüze olan barsakta hasarda nötrofiller ana medyatörlerdir. Bu kompleks reaksiyon nötrofillerle hasarın olduğu bölgelerdeki mikrovasküler yapıların endotel hücreleri arasında gerçekleşir. Bu olaylardaki diğer medyatörler hasarlı bölgeye nötrofillerin adhezyon ve göçünü aktive eden adhezyon molekülleridir (32). Ksantin oksidaz sistemi ve fosfolipaz A₂ aktivasyonu sonuçta şiddetli mukozal hasardan sorumlu olduğu düşünülen nötrofillerin hasarlı olan bölgeye ulaşmalarını ve aktivasyonunu arttırarak İR hasarının ilerlemesine neden olurlar (8).

2.1.4. Serbest radikaller

• **Süperoksit Radikali:** İlk reaksiyon O₂'e bir elektron (e⁻) eklenmesi ile oluşan süperoksit radikalidir.



Süperoksitin sembolü olan nokta şeklindeki işaret eşlenmemiş tek olan elektronu gösterir ve bu bir serbest radikal için bilinen semboldür. Süperoksit radikali bir tek eşlenmemiş elektrona sahip olması nedeni ile oksijenden daha zayıf bir serbest radikaldir. Süperoksit radikali güçlü oksidan ve yüksek reaktif bir radikal olmamasına karşın iskemiye takiben oluşan reperfüzyon ve yaygın doku hasarı ile birlikte olan durumlarda önemli rol oynar. Daha ciddi hasara neden olan oksijen radikallerinin prekürsörü olduğu için önemlidir (20,33).

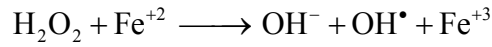
• **Hidrojen Peroksit:** Süperoksida bir elektron eklenmesi ile güçlü bir oksidan ajan olan hidrojen peroksit oluşur.



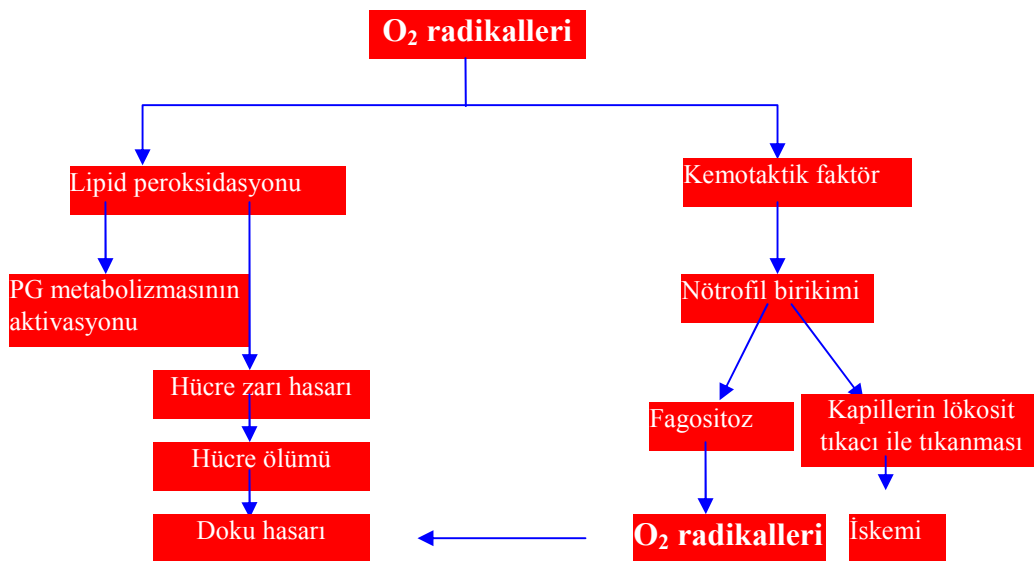
H_2O_2 hücre membranlarından kolaylıkla geçebilen oldukça hareketli bir radikaldir. Ayrıca endotelial hücreleri hasarlama yeteneği vardır ve güçlü bir sitotoksindir.

H_2O_2 'in hemen hemen tamamı zayıf oksijen bağı ile bir araya gelme eğilimindedir. Oksijen ile oluşturduğu bu bağ kolayca kopar ve her biri eşleşmemiş bir elektron ihtiva eden iki hidroksil radikali ortaya çıkar. Hidroksil radikallerinin birinin elektron vermesi ile bir hidroksil iyonu (OH^-) ve bir hidroksil kökü oluşur. Reaksiyonlar için gereken elektronlar katalizör olarak bulunan indirgenmiş demirden sağlanır (Fe^{+2}). Fe serbest radikal reaksiyonlarının çoğunda yer alır ve güçlü bir prooksidandır.

• **Hidroksil Radikali:** Fe ile H_2O_2 'in birleşmesi ile oluşur.



Serbest radikallerin en güçlüsüdür ve doku hasarından sorumlu olan ana radikaldir. Vücutta herhangi bir molekülü okside edebilmesi nedeni ile her zaman tehlikeli bir radikaldir(20).

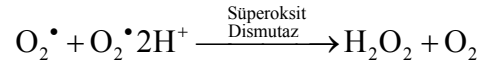


Şekil 2. Serbest Oksijen Radikallerinin Etkisi (8).

2.1.5. Serbest radikal giderici enzimler

• Süperoksit Dismutaz:

1969 yılında SOD'ın keşfi ile serbest radikal aktivitesi gösterilmiştir ve bu dönemden itibaren serbest radikallere karşı ilgi de artmıştır. SOD'ın antioksidan olarak rolü tam olarak açık değildir. SOD süperoksit radikalının hidrojenperoksite dönüşümünü hızlandırarak süperoksit radikalını ortadan kaldırır (33,31).

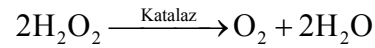


Yapılan çalışmalarda SOD'ın reperfüzyonda artmış vasküler permeabilite durumunu düzeltmiş olduğu görülmüştür. Ayrıca reperfüzyon öncesi uygulanan SOD barsak lümenine olan net sıvı kaybını önler ve mukozal lezyonların progresyonunu engeller. SOD'ın süperoksit radikallerini gidermede oldukça spesifik olmasından dolayı yapılan çalışmalarda barsağın reperfüzyon hasarının medyatörünün serbest oksijen radikalleri olduğu ortaya çıkmaktadır (8).

SOD hücrelerde iki şekilde bulunur; birisi primer olarak stoplazmada bulunur bakır ve çinko ihtiva eder, diğeri de manganez içeren mitokondrial SOD'dır (34). SOD süperoksit anyonlarının H₂O₂'e dismutasyonunu katalizler. H₂O₂ de Glutasyon Peroksidaz ve Katalaz ile metabolize edilir. Glutasyon peroksidaz; glutasyon redüktazın katalizlediği reaksiyonda oluşan indirgenmiş glutasyonu tekrar okside glutasyon haline dönüştürür (35).

• Katalaz:

Katalaz, demir içeren ve hidrojen peroksiti su ve oksijene dönüştüren bir proteindir.



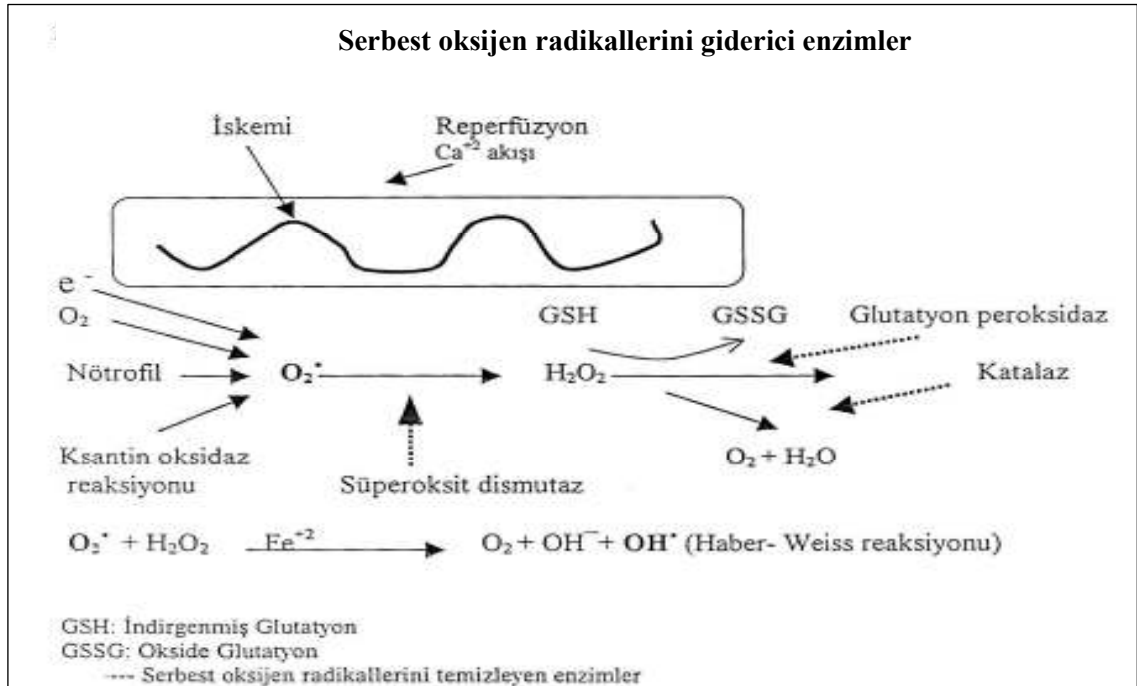
Birçok hücrede bulunur ancak nöron ve kardiyak hücrelerde en azdır. Katalaz enziminin inhibisyonu endotelial hücrelerde hidrojen peroksit toksitlenmesini arttırmaz. Bu nedenle bu enzimin bir antioksidan olarak rolü açık değildir (20,29).

• Glutatasyon Peroksidaz:

Glutatyon sistemi oksidatif hasarın azaltılmasında rol oynayan en önemli mekanizmalardan biridir. Glutatyon (GSH) serbest radikallerin hücre içinde detoksifikasyonuna neden olan ve lipid peroksidasyonunu önleyen en önemli endojen mekanizmalardandır (35,36). İntrasellüler GSH antioksidan olarak bulunan en güçlü tiol bileşiğidir. GSH oksidatif stresin bir şekilde dengelenmesi ve daha az hasarın oluşmasına yardımcı olabilir (37,38). Septik şokta glutatyon düzeylerinin azaldığı gösterilmiştir ve intrasellüler glutatyon depolarının azalması ile birlikte mortalite oranlarında artış görülmektedir (25).

Glutatyon Peroksidaz (GP) glutatyonun elektronları ayırarak H_2O_2 'i, H_2O 'ya dönüştürür. Selenyuma bağlı sitoplazmik bir enzimdir.

GP'nin H_2O_2 'e bağlı hücre hasarında hücreyi koruyucu etkisinin katalazdan daha fazla olduğu bilinmektedir. Sitozolda bulunan E vitamini gibi glutatyonla ilgili enzimler lipid peroksidasyonunu engeller. Glutatyon peroksidaz yağ açıl hidroksiperoksidlerin alkole bağlanmasını azaltarak peroksidasyon ürünlerinin detoksifikasyonunu sağlar. GP'nin antioksidan aktivitesini göstermesi, hücre içinde yeterli konsantrasyonda glutatyon redüktaz, glutatyon ve NADPH bulunmasına bağlıdır (29,39).



Şekil 3. Serbest oksijen radikallerini giderici enzimler (40).

2.1.6. Fosfolipaz A₂ Aktivasyonu

Reperfüzyon sırasında hücre içine Ca⁺⁺ akışının artması yada endojen fosfolipaz A₂ (PLA₂) inhibitörlerinin inaktivasyonu, PLA₂ aktivasyonuna neden olur. PLA₂ membranlardaki fosfolipidlerden yağ asitlerini ayırarak lesitinden lizolesitin, sefalinden lizosefalin ve fosfatidilkolinden lizofosfatidilkolin oluşturan hidrolitik bir enzimdir. Bu ürünlerin çoğu iskemi ile hasarlanmış dokuya toksiktir. Özellikle lizofosfatidilkolin konsantrasyonu reperfüzyon sonrası fosfolipaz aktivasyonundaki artışla paralellik gösterir. Yüksek konsantrasyonlarda oldukça sitotoksiktir ve iskemi sonrası oluşan hiperpermeabiliteyi artırır (8,29). Ca⁺⁺ iyonları KD'ın KO'a dönüşümünde gereklidir ve reperfüzyon sırasında serbest kalsiyum dramatik bir şekilde yükselmektedir. Bu da fosfolipaz A₂'nin aktivasyonunda önemli bir basamaktır. İR hasarını önlemek için kullanılan Ca⁺⁺ antagonistleri ile hücre içine Ca⁺⁺ akışı inhibe edilerek PLA₂ aktivasyonu engellenir(2). PLA₂ aktivasyonu; siklooksijenaz yolundan prostoglandinler, lipooksijenaz yolundan Lökotrien B₄ (LTB₄) ve diğer araşidonik asit metabolitleri olan Tromboksan A₂ (TXA₂) oluşur. TXA₂ ve LTB₄ güçlü kemotaktik ajanlardır ve elastaz gibi proteolitik enzimleri arttırarak oksijen radikallerinin artışına neden olurlar. Ayrıca reperfüze olan dokuda nötrofil aktivasyonu ve birikimine neden olurlar (2).

Araşidonik asit metabolitlerinden ilki olan ve fosfolipaz aktivasyonu ile endotelial hücreler tarafından salınan Prostaglandin (PGI₂) platelet agregasyonunu önleyen güçlü bir vazodilatatördür. İR hasarı ile birlikte endotelial hücrelerden salınan PGI₂ düzeyi azalır ve neticede hasarlanan dokularda artan ödem sonucu mikrodolaşımın giderek bozulur. (26).

TXA₂ ise prostosiklinin aksine platelet agregasyonunu arttıran ve vazospazmın başlamasına neden olacak bir endotelial faktördür. Endojen araşidonik asitten trombositler tarafından sentezlenir. Fizyolojik şartlarda PGI₂ sentezi ile korele olarak sentezlenir ancak reperfüzyon ile birlikte her ikisinin salınımındaki düzensizliklere eklenen nötrofil infiltrasyonu mikrosirkülasyonu bozar ve PLA₂ aktivasyonu TXA₂ düzeyinin giderek artışına katkıda bulunur (26).

LTB₄ araşidonik asitten lipooksijenaz yolu ile salınan ve İR sırasında endotelial disfonksiyonda önemli rolü olan bir metabolittir. LTB₄ nötrofil yüzeyindeki spesifik

reseptörlere bağlanarak CD18 gibi adhezyon moleküllerinin aktivasyonuna yol açarak serbest radikal ve proteazların artışına katkıda bulunur. Ayrıca nötrofillerin kemotaktik aktivitesinde artışa neden olur (26).

İR ile ilgili yapılan çalışmalarda nötrofil aktivasyonunu yansıtan MPO ve lipid peroksidasyonu değerleri hakkında bilgi veren MDA düzeylerinin iskemiden fazla etkilenmediği, ancak reperfüzyondan 10 dk sonra enzim düzeylerinin yaklaşık iki katına kadar çıktığı gösterilmiştir (24). Bu da hücre hasarının reperfüzyonda iskemiden daha çok olduğunu gösteren bir olaydır. Serbest radikaller dokuya direkt zarar vermekle birlikte fosfolipaz A₂ aktivasyonu da granülositlerin dokularda artmasına ve nötrofillerin kapiller duvara tutunmasına yol açıp kapiller dolaşımın tıkanmasına neden olur (8).

Aktive nötrofiller myeloperoksidaz, elastaz, proteaz, kollegenaz, laktoferin ve kationik proteinler gibi bir çok proteini ortama verip prostoglandin ve serbest radikalleri oluşturarak mikrovasküler hasarı başlatırlar (24). Endotel hücreleri tarafından üretilen bir plazma proteini olan Von Willebrand faktör (VWF) düzeyi, akut vasküler endotel hasarlarında hızla artmaktadır (5). Hasarlı endotelial hücrelerden salınan VWF düzeyi reperfüzyonda belirgin olarak artar. Reperfüzyon hasarını belirlemede bazı çalışmalarda bu faktörün marker olarak kullanılabileceği gösterilmektedir (41).

Lenfosit, nötrofil ve villus epitel hücreleri tarafından yapılan CD44 adlı protein; hematopoezis, lenfosit aktivasyonu, hücre sel migrasyon, tümör progresyonu ve metastazında, lökosit göçünde önemli etkileri olan bir proteindir. İR'da bu proteinin yapımı azalır ve villus bütünlüğünün kaybı ve barsak bariyer fonksiyonlarında bozulma meydana gelir (42).

Serbest radikallerin en zararlı etkisi lipid peroksidasyonudur. Hücre membranı poliansatüre yağ asidi ve fosfolipidlerden oluşur. Serbest radikaller lipid peroksidasyonunu başlatarak yapısal ve fonksiyonel hücre hasarına neden olurlar. Peroksidasyonun son ürünü MDA'dır ve lipid peroksidasyonunda bir marker olarak kullanılabilir (26). MDA membran bileşiklerinin polimerizasyonu ve peroksidasyonu sonucu oluşur. Oksidasyon membran yağ asitlerinin erime noktasını artırır ve membran akışkanlığını azaltır. Sonunda bu membranlar geçirgenlik özelliğini kaybeder ve sızıntılı hale gelerek osmotik parçalanmaya yatkın hale dönüşür.

Lipid membranlarının peroksidasyonunda reaksiyon serisi hidroksil radikali gibi güçlü bir oksidanla başlar ve bir poliansature yağ asitindeki karbon atomlarının birinden bir hidrojen atomunun tamamını ayırır. Bu reaksiyon karbon merkezli bir radikal oluşturur ve bu da yeni bir reaksiyon serisi başlatan ve yanındaki bir yağ asidinden hidrojen atomu açığa çıkarabilen oksijen merkezli bir peroksiradikale dönüşür. En son yayılma reaksiyonu sürekli devam eden bir reaksiyon zinciri oluşturur ki bu da yağ asidi yıkılıncaya veya yayılma reaksiyonu engelleninceye kadar devam eder (20,31). Yüksek reaktif hidroksil radikalleri endoteldeki lipid bileşiklerinin peroksidasyonuna neden olarak bazal membrandaki kollajen ve hyalüronik asid yapısının bozulmasına yol açıp membran ve kapiller bütünlüğü bozar (3). Ayrıca peroksidasyon sonucu intrinsek membranda deformateler, iyon transport bozuklukları ve enzim aktivitesinde bozukluklar görülür (43).

2.2. İSKEMİK ÖNKOŞULLANDIRMA

İskemik önkoşullandırma (İÖK) deneysel ve klinik çalışmalarda İR hasarına karşı doku direncini artırdığı gösterilmiş az sayıdaki yöntemlerden biridir. Ön koşullandırmadaki biyolojik kural yaklaşan bir tehlikeye karşı hücre savunma mekanizmalarının doğal bir akış içinde önceden ve topyekün harekete geçirilmesidir. Bu da asıl tehditten önce tehdit unsuruna benzer veya ondan farklı bir “örnek” stresin uygulanması ile sağlanmaktadır. Bu örnek stres, hücredeki mekanizmaları tetikleyecek ancak yaralamayacak kadar olmalıdır.

Bugün için İÖK hemen tüm cerrahi disiplinleri ilgilendirmektedir. Örneğin; koroner revaskülerizasyonun morbiditesini azaltmak yanında, transplantasyonda greft ve hasta sağkalımını iyileştirmek, majör rezeksiyonlar sonrası karaciğeri, damar cerrahisi sırasında da barsak ve böbreği korumak, deri ve kas fleplerinde sağkalımı iyileştirmek gibi hedefler önkoşullandırmanın gelecek için umut verdiği alanlardır. İÖK, erken ve geç dönem koruyucu etkilere sahiptir. İlki kısa iskemi sonrası 2-3 saat kadar devam ederken, ikincisi 12-24 saat sonra başlar ve 3-4 güne kadar devam eder (10).

2.2.1. Erken dönem koruma mekanizmaları

Kısa süreli iskemi neticesi dokuda adenosin, nitrik oksid (NO), reaktif oksijen türleri noradrenalin ve bradikinin gibi her biri önkoşullandırmayı tetikleyebilen

mediyatörler oluşmaktadır. Bunlar içinde adenozin ve nitrik oksid İÖK'da öne çıkmakta ve parakrin yolla etki göstermektedirler (44).

İskemi ile beraber, ATP tüketimi hızla artar ve saniyeler içinde ekstrasellüler alanda yüksek miktarda adenozin birikir. Artan adenozin hücre membranındaki spesifik reseptörlere (A1, A2a, A2b, A3) bağlanarak bir dizi hücre içi sinyal ileti yolunu hareketlendirir. (44,45,46,47).

Adenozin reseptörünün aktivasyonu ile başlayan süreç sonunda, nitrik oksid sentetaz (NOS), protein kinaz C (PKC), adenozin monofosfat ile aktive edilen protein kinaz (AMPK) ve p38 mitojen ile aktive edilen protein kinaz (p38 MAPK) aktif hale geçer. Bu hücre içi sinyal yollarının harekete geçirilmesi yalnızca hücrelerin iskemiye karşı olan toleransını artırmakla kalmaz, rejenerasyonu da başlatır (48).

Organ ve hücre farklılıkları nedeni ile ileti yollarında bazı farklılıklar görülse de genel hatları ile bakıldığında İÖK'nın ilk ortak hedefi adenozin ve nitrik oksidin PKC'yi aktif hale geçirmesidir. Çalışmalardan elde edilen bulgular aktive olan adenozin reseptörlerinin G proteinleri ile birleşmesinin önkoşullandırmayı başlatan yol olduğunu göstermektedir (49).

Aktive olan G proteini, ayrılarak Fosfolipaz C'yi (PLC) aktive etmekte ve bu lipaz da, fosfotidilinozitol bifosfatı iki hücre içi iletiyi taşıyan moleküle; inozitol trifosfat ve diakilgliserole (DAG) ayırmaktadır. DAG daha sonra, PKC'yi aktive eder. Aktif hale geçen PKC, mitokondrilerdeki ATP'ye duyarlı potasyum kanallarını (K^+ -ATP) açarak ön koşullandırmanın koruyucu etkilerini başlatır (50).

Adenozin mitokondriyal K^+ -ATP kanallarını aktive ederek içeriye Ca^{++} girişini ve birikimini azaltabilmenin yanı sıra farklı mekanizmalarla da reperfüzyon hasarını sınırlayabilmektedir. Bunlar arasında, nötrofillerin oksidatif metabolizmasını ve endotel hücrelerine yapışmasını engelleme, membran stabilizasyonunu sağlama ve glukoz transportunu kolaylaştırarak enerji üretimini artırabilme gibi yollar bulunmaktadır (51).

Adenozin, İÖK'nın diğer önemli bir mediyatörü olan NO seviyesini, endotelial nitrik oksid sentetazı aktive ederek artırır. NO, potent bir vazodilatatör olmasının yanında nötrofil ve trombosit agregasyonunu da engelleyerek mikrosirkülasyonu düzenleyebilmektedir (52). Bu bağlamda, nitrik oksid sentetazı kompetatif olarak bloke eden N-nitro-L-arjinin metilester (L-NAME) kullanılarak nitrik oksid sentezinin

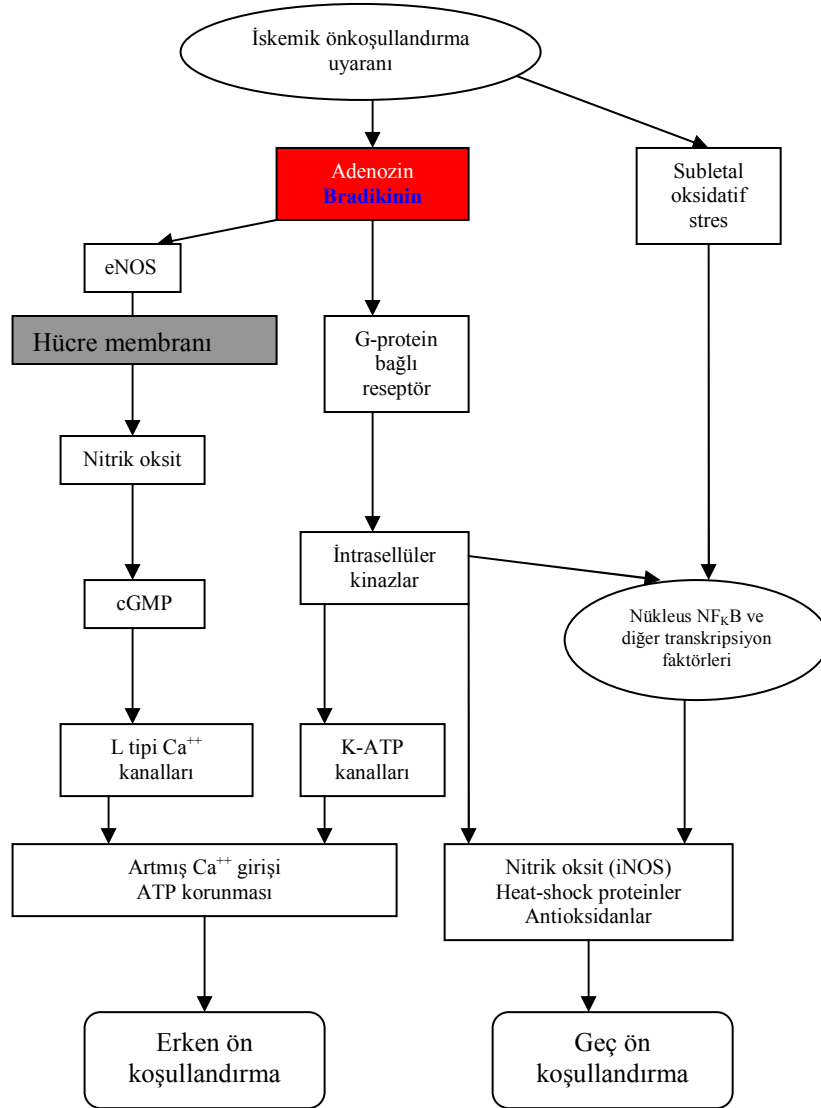
engellenmesi İÖK'nın koruyuculuk etkisini ortadan kaldırmaktadır. Aksine, nitrik oksid prekürsörü (L-arjinin) uygulandığında İÖK'ya benzer korunma sağladığı gösterilmiştir (53). DAG analogları ile stimüle edilen PKC hücrelerin hipoksik hasara karşı direncini artırırken, “chelerythrine” ile PKC' nin bloke edilmesi önkoşullandırma etkisinin ortadan kalkması ile sonuçlanmaktadır (54).

Son yayınlarda İÖK sırasında bilinenlerden farklı yeni PKC izoformlarının (Ca^{++} dan bağımsız aktive olabilen δ , ϵ ve η) rol aldığı görüşü mevcuttur. Aktive olan PKC potasyum kanallarını (K^+ -ATP) açarak mitokondriler içerisinde Ca dengesini ve ATP düzeyini korur ve hücre hayatiyetini artırır. Diğer taraftan, ATP tüketimi sonucu biriken adenzin monofosfat AMPK'yi aktive eder ve bu kinaz birçok molekülü fosforilize ederek ATP üretecek katabolik yolların açılmasına, ATP tüketen anabolik yolların ise kapatılmasına yardımcı olur (49). Böylece İÖK sırasında AMPK sayesinde ATP ve glikojen depolarının korunmasına yönelik enerji tasarrufunun mekanizmaları harekete geçirilmiş olur.

İÖK'nın erken korunma mekanizmalarından bir diğeri de, iskemi ile beraber sitoplazmada gelişen ve hücre içinde Na^+ akümüasyonu neticesi hacim regülasyon bozukluğu ve Ca^{++} artışı yaratarak hücre ölümüne neden olan hipoksik asiditenin protein kinaz C ve p38 MAPK tarafından düşürülmesidir (55).

2.2.2. Geç dönem korunma mekanizmaları

Geç dönem etkilerin açılma ve kapanma zamanlarına bakıldığında (12–24 saat ve 3–4 gün), bu süreler koruyucu proteinlerin yapım ve yıkım sürelerine de uygun düşmektedir. PKC ϵ izoenziminin aktive olduğu önkoşullandırma sonrası nükleusa yönelerek nükleer transkripsiyon faktörlerini indüklediği gösterilmiştir. Ayrıca siklooksijenaz-2, aldolaz redüktaz, antioksidan enzimler (özellikle Mn-süperoksid dismutaz) ve ısı şok proteinleri bu aşamanın olası etkin proteinleri olarak gösterilmiştir (56).



Şekil 4. Erken ve geç önkoşullandırmada sinyal ve iletim yolları (57).

2.3. KALLİKREİN KİNİN SİSTEMİ

KKS ve renin anjiyotensin sistemi kardiyovasküler ve renal fonksiyonların, kan basıncının düzenlenmesinde önemli rol oynarlar. Bu iki sistem fizyolojik şartlar altında birbirinden farklı etkiler gösterirken kalp ve böbrek hastalıkları gibi patolojik durumlarda uyum içinde fonksiyon gösterirler (58).Yapılan hayvan deneyleri kininlerin hem kısa dönem hem de uzun dönem kardiyoprotektif etkilere sahip olduklarını göstermiştir. Kısa dönem kalp koruyucu etkisi kalbin iskemi reperfüzyon hasarına karşı korunmasıyken uzun dönem etkileri kalp yetersizliğinin progresyonunun ve sol ventrikül hipertrofinin azaltılmasını içermektedir (59).

KKS'nin tüm komponentleri kalp ve vasküler dokularda lokalizedir (14,60). Kininler iskemi süresince salınır ve faydalı kardiyak etkilere neden olurlar. BK antagonistleri iskeminin etkilerini artırır ve kötüleştirir (14). Ayrıca BK önkoşullamanın faydalı etkilerine de katkıda bulunur. Tavşanlarda önkoşulama sonrası BK ile oluşan koruyucu etkinin BK antagonisti (HOE 140)'ın uygulanmasıyla ortadan kalktığı görülmüştür (61). BK hipertansiyonlu ratlar da sol ventrikül hipertrofisini önlemiştir(62).

2.3.1. Kininlerin sentezi

Kininler farmakolojik olarak aktif polipeptidlerdir. Doku ve vücut sıvılarında kininojenlere kallikreinlerin enzimatik etkileri sonucu salınırlar. Kinin ailesi BK, kallidin, methionyl-lysyl-BK den oluşur. BK den plazma ve idrarda aminopeptidazların etkisiyle Kallidin ve methionyl-lysyl-BK oluşur (14).KKS'nin ana medyatörü olan BK damar duvarında hem sistemik hemde lokal olarak üretildiğinden parakrin ve otokrin etkilere sahiptir (63).

İnsanlarda karaciğer, plazma ve diğer vücut sıvılarında sentezlenen iki tip kininojen bulunmaktadır; yüksek molekül ağırlıklı kininojen ve düşük molekül ağırlıklı kininojen (64). Bu kininojenler molekül ağırlığı, plazma ve doku kallikreinerine olan afiniteleri ve fizyolojik özellikleri bakımından birbirinden farklıdır (65).

Doku kallikreini (DK) böbrek, kalp ve sinovyal doku gibi çeşitli dokularda bulunur (14). DK hücrede inaktif olarak sentezlenir ve daha sonra aktif forma dönüştürülür (66). Aktive olan DK düşük molekül ağırlıklı kininojeni etkileyerek kallidin oluşturur. Plazma kallikreini ise dolaşımda inaktif formda bulunur ki prekallikrein olarak da bilinir (67). İnaktif prekallikrein aktive hageman faktör (XIIa) tarafından aktif kallikreine dönüştürülür (68). Aynı zamanda plazma kallikreini de pozitif feedback reaksiyonla inaktif olan faktör XII'yi aktif XIIa'ya dönüştürebilir (68,69).

2.3.2. Kininlerin enzimatik yıkımı

Vücutta kininlerin fizyolojik fonksiyonlarını düzenlemek amacıyla plazma, endotel hücreleri ve dokuda kininazlar olarak da bilinen, kininleri inaktive eden enzimler bulunmaktadır (70). Yapılan deneysel çalışmalar BK yıkımından sorumlu dört metallopeptidazın varlığını göstermiştir. Bu enzimler kininaz II veya anjiyotensin

dönüştürücü enzim (ADE), aminopeptidaz P (APP), nötral endopeptidaz 24.11 (NEP), karboksipeptidaz M ve N'dir (71). Yapılan deneysel çalışmalar kininlerin enzimatik yıkımının vasküler yatakta ve dokuların interstisyumunda farklı olabileceğini göstermiştir ki bu bulgu önemli terapötik anlama sahiptir (59).

BK'in yıkımında rol alan major enzim ADE'dir. Bununla beraber insan kalp interstisyumunda, kininlerin metabolizmasında ADE'nin minör düzeyde rol oynadığı gösterilmiştir. İzole insan kardiyak membranındaki çalışmalarda BK metabolizmasında rol oynayan major enzimin nötral endopeptidaz (NEP) olduğu gözlenmiştir (59,72).

2.3.3. Kinin reseptörleri

Kininler farmakolojik etkilerini B1 ve B2 olarak adlandırılan G reseptör ailesinin üyesi olan iki reseptör alt tipiyle gösterirler. BK reseptörlerinin uyarılması G proteinleri aracılığı ile fosfolipaz C'ye bağlı olarak inozitol fosfatın salınımını ve hücre içi kalsiyum seviyesinin artışı sağlar. Endotel hücresinde sitozolik Ca^{++} artışı PLA_2 aktivasyonu ile araziidonik asit ürünlerinin oluşumunu ve Ca^{++} -kalmoduline bağlı NO sentez yoluyla da NO sentezine neden olur. Bu ürünler kininlerin vasküler düz kas hücrelerinde gevşeme, hücre çoğalmasının inhibisyonu, anti iskemik ve farmakolojik önkoşullayıcı etkilerine aracılık ederler (73,74).

B1 reseptörü normal dokuda nadiren ekspresyona uğrar fakat inflamasyon ve doku hasarıyla ilgili patolojik durumlarda upregülasyona uğrar. B1 reseptörü C terminal ucunda argininin olmadığı kinin metabolitlerine yüksek afinite ve selektivite gösterir.

B1 reseptörünün uyarılması düz kaslarda kasılmaya, kollajen sentezi ve hücre proliferasyonunda artışa neden olur. Kininler B1 reseptörleriyle makrofajlardan tümör nekroz faktörü (TNF) ve interlökin (İL) salınımını uyarırlar (14).

B2 reseptörleri ağrı (75), inflamasyon (76,77), bronkokonstriksiyon (78), hipertansiyon (79) ve kardiyak aritmi (80,81) gibi patolojik durumlarda etkilidir. İnvitro ortamda B2 reseptörlerinin endotel hücrelerinden nitrikoksit (NO) ve prostasiklin (PGI_2) salınımını uyararak etkili olduğu gösterilmiştir (82). B2 reseptörleri BK ve kallidin için yüksek affinite gösterirler. B2 reseptörlerinin uyarılması vazodilatasyon, hipotansiyon, NO, PGI_2 ve PGE_2 salınımı ile antihipertrofik, antiiskemik özelliklere ve insülin sensitivitesinde iyileşmeye neden olmaktadır (14).

2.3.4. Hipertansiyon ve bradikininin

BK sistemik kan basıncı üzerindeki etkilerini; vazodilatasyonla periferik vasküler direnci düşürerek ve böbreklerden sodyum atılımını regüle etmek suretiyle gerçekleştirir (14). BK renal arter içine injekte edildiğinde renal kan akımını artırarak natriüresis ve diüresise neden olur (83). BK'inin bu etkilerine renal dolaşımdaki prostaglandin salınımı katkıda bulunur (84).

Bradikininin kan basıncını azaltıcı etkisinin B2 reseptörü ile ilgili olduğu ama özel durumlarda B1'in de olaya katılabileceği kabul edilmektedir (14)

2.3.5. Sol ventrikül hipertrofisi ve bradikinin

Ratlarda, aortik bandla oluşturulmuş hipertansiyonda BK'in sol ventrikül hipertrosine karşı koruyucu rol oynadığı gösterilmiştir (62). BK'nın antihipertrofik etkisi B2 reseptör antagonisti ve NO sentetaz inhibitörleriyle bloke edilebilir.(14,85).

2.3.6. Kardiyak yetmezlik ve iskemide bradikinin

Kininlerin endotelial B2 reseptörlerine bağlanması NO ve PGI₂ salınımına neden olmaktadır ki bu medyatörlerin de vazodilatatör, anti-iskemik, antiproliferatif etkileri, glukojen ve fosfat gibi enerjiden zengin miyokardiyal stoğu koruma gibi özellikleri vardır.

Diğer taraftan, iskemi süresince kalpte BK salgısının artışı ve reseptörlerinin de upregülasyona uğradığı gösterilmiştir (74). BK'nin iskemide koruyucu rol oynadığını gösteren çok sayıda çalışma mevcuttur (86). Köpek (87,88), tavşan (89) ve domuzlarda (90) koronerlere verilen BK iskemi reperfüzyon hasarını azaltmış ve bu etkisi BK B2 reseptör blokeri HOE140 ile ortadan kalkmıştır (88,89,91). BK'in iskemi sonrasında ventrikül fonksiyonlarında iyileşme sağladığı (87,90) ve bununda NO sentetaz inhibitörü L-NAME ve indometazin tarafından bloke edildiği gözlenmiştir(90). Ayrıca BK iskemi reperfüzyona bağlı aritmileri azaltmış (92-94) ve bu etkiside HOE140 (95) ve L-NAME (93) ile ortadan kalkmıştır. BK iskemik önkoşullamada da etkilidir (14,61). Çeşitli hayvan deneylerinde, BK B2 reseptör blokeri HOE140'ın verilmesi ile iskemik ön koşullamanın ventrikül aritmileri ve infarkt alanını azaltıcı etkisi ortadan kalkmıştır (96).

ADE inhibitörlerinin kalbi koruyucu etkilerinin mekanizmaları tamamen anlaşılmasa da bu etkisini ve BK'nin rolünü gösteren çok sayıda çalışma mevcuttur (97). ADE inhibitörü kaptoprilin iskemi reperfüzyon hasarını azaltması ve bunun BK seviyesindeki artışla açıklanması (89,98); tavşanlarda ramiprilatın kalp koruyucu etkisinin HOE140 ile antagonize edilmesi BK'nin rolünü gösteren çalışmalara örnektir(15). ADE inhibitörlerinin iskemi sonrasında kalbin kasılma fonksiyonları üzerindeki iyileştirici etkisi HOE140 ve siklooksijenaz inhibitörleriyle (99), apoptosis ve infarkt alanında sağladığı azalma da HOE140 (100) ile bloke edilmiştir.

AT1 reseptör blokeri losartanın iskemi reperfüzyon modelinde ventrikül fonksiyonu, infarkt alanı ve kalp hücrelerinde apoptosise etkileri ve BK'nin rolünün araştırıldığı bir çalışmada; losartanın infarkt alanı ve ventrikül fonksiyonları üzerindeki iyileştirici etkileri HOE140 ile kısmen bloke edilirken, antiapoptotik etkisi HOE140 ile tamamen bloke edilmiştir(101).

3. GEREÇ VE YÖNTEM

Bu deneysel çalışma, Erciyes Üniversitesi Tıp Fakültesi Hakan Çetinsaya Deneysel ve Klinik Araştırma Merkezi'nde (DEKAM) Kasım-Aralık 2007 tarihleri arasında Etik Kurul onayı ile yapıldı. Çalışma Erciyes Üniversitesi Araştırma Fonu tarafından desteklendi (Etik Kurul Karar Tarihi: 07.11.2006, Karar No: 399).

3.1. DENEKLER

Çalışmada ağırlıkları 250–300 gram arasında değişen 32 adet dişi Wistar–Albino tipi sıçan kullanıldı. Hayvanlar pleksiglas kafeslerde muhafaza edildi ve her kafese en fazla 5 hayvan konacak şekilde bakımları yapıldı. Hayvanlar penceresiz odalarda otomatik sıcaklık ($22 \pm 2^\circ \text{C}$) ve ışık (07.00-21.00 saatleri arasında 14 saat aydınlık ve 21.00 ile 07.00 arasında 10 saat karanlık periyodu) ortamında takibi yapılarak tutuldu. Tüm sıçanlar deney gününe kadar standart laboratuvar yemi ile beslendiler ve deney öncesi tartıldılar. Sıçanlar randomize olarak sham, kontrol ve çalışma (iskemik önkoşullandırma, farmakolojik önkoşullandırma) gruplarına ayrıldı.

3.2. ANESTEZİ

Çalışma öncesinde su içmelerine izin verilmek koşulu ile 12 saat aç bırakılan sıçanların tümünde cerrahi girişim, enjeksiyonlar, kan örneklerinin alınması intraperitoneal 50mg/kg ketamin (Ketalar[®], Pfizer-İstanbul) ve 10mg/kg xylazin anestezisi (Rompun[®], Bayer-İstanbul) altında yapıldı (Resim 1).

3.3. CERRAHİ PROSEDÜR

3.3.1. Jugüler ven kateterizasyonu

Sham grubu hariç diğer gruplara operasyondan bir saat önce sağ juguler ven kateterizasyonu yapılarak, majör cerrahi girişim öncesi sıvı replasmanı (%0.9 NaCl 10ml/kg/saat) yapıldı. Boyun bölgesi traş edildikten sonra povidon iyot ile boyandı. Kateterizasyon için 0.5x0.9 mm (Braun, Melsungen, Germany) kateter kullanıldı (Resim 2). Operasyon boyunca buradan sıvı replasmanına devam edildi, ayrıca grup IV'te BK bu kateterden İV infüzyon şeklinde verildi.

3.3.2. Operasyon

Laparotomi öncesi 25 mg/kg sefazolin sodyum (Sefazol® flakon, Mustafa Nevzat İlaç Sanayi A.Ş. İstanbul, Türkiye) juguler kateterden bakteriyel translokasyonu önlemek amacıyla uygulandı. Tüm ratlara 200 Ü/kg olacak şekilde juguler venden heparin (Nevparin® flakon, Mustafa Nevzat İlaç Sanayi A.Ş. İstanbul, Türkiye) subkütan olarak verildi. Karın cildi traş edildikten sonra povidon iyot ile temizlendi. Ksifoidden itibaren yaklaşık 6 cm lik longitudinal insizyon ile laparotomi yapıldı . İntestinal İR modeli için intestinal yapılar sola devie edildikten sonra SMA aortadan çıktığı yerden bulundu ve klempe edildi. Bu işlem için mikrovasküler klempe (Harvard Apparatus, Inc. Holliston, MA, USA) kullanıldı (Resim 3).

3.4. DENEY GRUPLARI

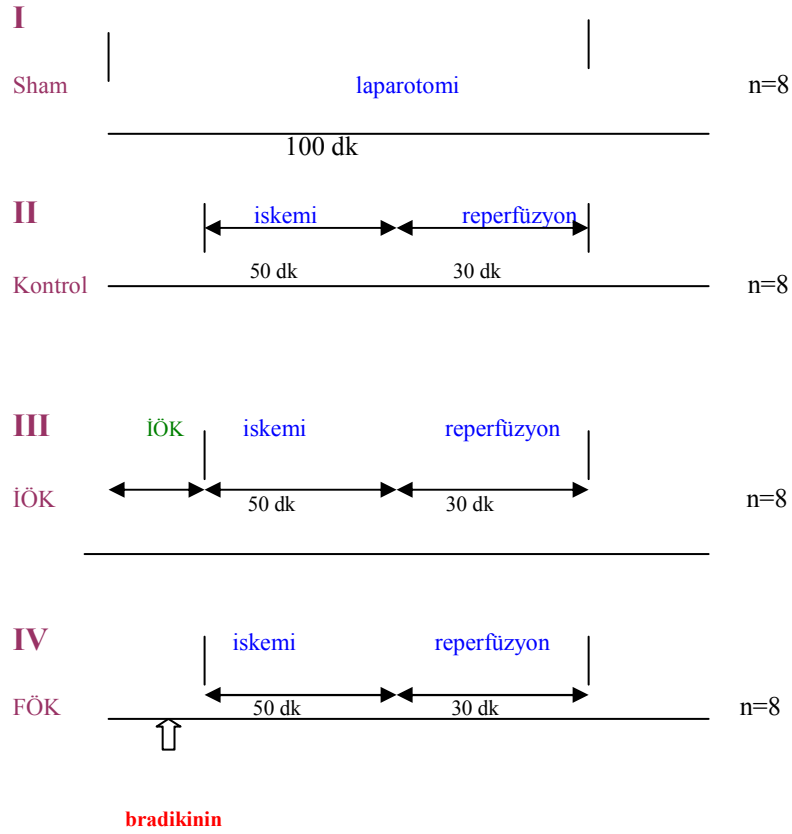
1.Grup I. Sham grubu (n=8): Bu gruptaki deneklere yukarda tariflendiği şekilde sadece laparotomi yapılarak 100 dk süreyle gözlem yapıldı.

2.Grup II. Kontrol grubu (n=8): Bu gruptaki deneklere ise laparotomi sonrası 20 dk. gözlem ve devamında SMA'nın klemplenmsi vasıtasıyla 50 dk. iskemi ve klempin açılmasıyla birlikte 30 dk. reperfüzyon yapılarak iskemi reperfüzyon hasarı oluşturuldu (102).

3.Grup III. İÖK(iskemik önkoşullandırma) grubu (n=8):İÖK grubundaki deneklere 10 dk. iskemi,10 dk. reperfüzyon ve sonrasında 50 dk. iskemi,30 dk.reperfüzyon yapıldı.

4.Grup IV. FÖK(farmakolojik önkoşullandırma) grubu (n=8): FÖK grubuna juguler venöz katater vasıtasıyla 15 dk. Süreyle 10 µg/kg/dk dozunda bradikinin

(Sigma B3259, Steinheim, Germany) uygulaması (bu doz; kalp hızı ve ritmi, kan basıncı, solunum ve periferik dolaşımda herhangi bir yan etki oluşturmadığı daha önce gösterilmiş olan dozdur)sonrası 50 dk. iskemi,30 dk.reperfüzyon sağlandı (103).



Şekil 5. Deney düzeni

Tüm ratlara operasyon boyunca sıvı replasmanı (%0,9 NaCl 10 mg/kg/saat) yapıldı. Çalışma esnasında mortalite olmadı. Sakrifikasyon; doku ve plazma örnekleme sonrası abdominal aort ve vena cavaya yapılan transvers kesi ile oluşan hemoraji ile sağlandı.

3.5. KAN VE DOKU ÖRNEKLERİNİN ALINMASI

Sham grubunda 100 dakikalık gözlem,diğer gruplarda ise reperfüzyon sonrası V.C.İ.'den 5 ml kan alındı.(Resim 4) Bunun 1 ml'si heparinize enjektörlere alınarak eşzamanlı laktat çalışması yapıldı. Geri kalan kan örneği ise biyokimyasal değerlendirme amacıyla 3000 devirde 5 dakika santrifüje edilerek plazması ayrıldı ve çalışma gününe kadar -80°C'de saklandı.Doku örnekleme için trietze ligamanından

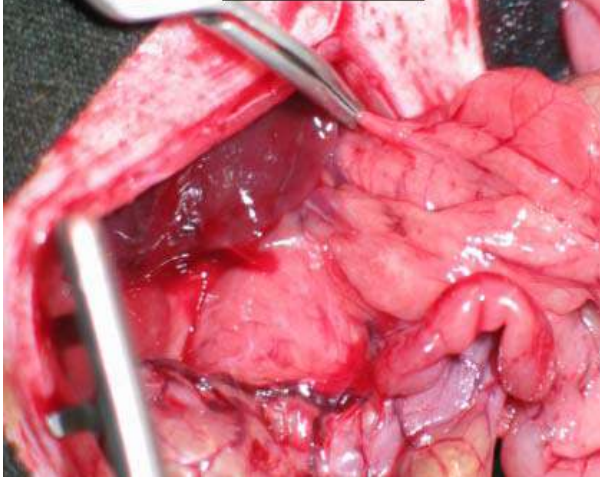
10 cm distaldeki yaklaşık 3 cm'lik jejunum segmenti rezeke edildi (102). Alınan jejunum rezeksiyon materyali longitudinal olarak açılıp fekal içerik %0.9 salin ile hafifçe temizlendi. Alınan spesmenin 2 cm'i histopatolojik değerlendirme amacıyla %10'luk formaldehit içerisinde saklandı. Geri kalan 1 cm'lik kısım ise doku MPO aktivitesi tayini için alimünyum folyo içerisinde -80°C'de saklandı.



Resim 1. Anestezi uygulaması



Resim 2. Juguler ven kateterizasyonu



Resim 3. SMA klemplenmesi



Resim 4. İnförior vena kavadan kan alınması

3.6. DEĞERLENDİRİLECEK PARAMETRELER

3.6.1. Biyokimyasal parametreler

LDH: Daha önce plazması ayrılarak –80°C’de saklanan kan örneğinden çalışma günü oda ısısında çözünen serumlarda LDH düzeyleri çalışıldı. LDH düzeyleri Beckman Coulter LX20 (USA) otoanalizör cihazında ölçüldü ve Ü/L olarak birimlendirildi.

Laktat: Deney günü heparinize enjektörlere alınan kan örnekleri eşzamanlı olarak (Rapidlab865, Bayer, Germany) kan gazı ölçüm cihazında çalışıldı. Örnekler laboratuvar ortamına +4°C ısıda transport edildi. Sonuçlar mmol/L olarak birimlendirildi.

3.6.2. Doku MPO aktivitesi tayini

Enzim tayini için Grisham tarafından tariflenen yöntem kullanıldı (104). Buna göre 300 mg barsak mukozası 5 ml soğuk 0.02 M EDTA ile homojenize edildi. Homojenat 20000 devirde 15 dk +4°C de santrifüj edilerek süpernatanı atıldı. Pellet eş hacim Ph’sı 5.4 olan % 0.5 hekzadesil trimetil amonyum bromid (HTAB) içeren 0.05 M potasyum fosfat tamponunda çözülüp yeniden santrifüj edildi. Süpernatanda 410 nm dalga boyunda spektrofotometrik olarak MPO tayini yapıldı. Sonuçlar gram doku başına ünite olarak değerlendirildi.

3.6.3. Histopatolojik değerlendirme

%10’luk formol içinde saklanan jejunum örnekleri histopatolojik takibe alındı. Parafin bloklara gömülen örneklerden 5 mikron kalınlığında kesitler alınarak H&E boyası ile boyandı. Boyanan preparatlar ışık mikroskopunda değerlendirildi. Tüm histopatolojik değerlendirmelerde bakılan preparatın hangi gruba ait olduğu patoloj tarafından bilinmemekteydi.

İR hasarına bağlı jejunumda oluşan histopatolojik değişiklikler Chiu ve arkadaşlarının değerlendirmesine göre yapıldı.

Tablo 1. Chiu histopatolojik hasar skorlaması (105).

Evre 0	Normal mukoza
Evre 1	Genellikle kapiller konjesyonla birlikte ve vilusların apeksinde subepitelyal Guenhagen boşluklarının oluşturulması
Evre 2	Subepitelyal alanın genişlemesi ve epitelin Lamina Propria'dan hafif derece ayrılması
Evre 3	Villusların üst kısımlarında yaygın epitelyal ayrılma
Evre 4	Lamina Propria ve villuslarda dökülme, kapiller dilatasyon, Lamina Propria'da artmış selülarite
Evre 5	Lamina Propria'da sindirilme ve bütünlüğünde bozulma, kanama ve ülserasyon

3.7. İSTATİSTİKSEL ANALİZ

Veriler ortalama \pm standart sapma ($X \pm SD$) ve/veya median (min.-max.) olarak gösterildi. Veriler SPSS 15.0 for Windows (Statistical Package for Social Sciences) istatistik paket programında değerlendirildi. Verilerin normal dağılım gösterip göstermediğine Shapiro-Wilk Normallik testi ile bakıldı. Normal dağılım gösteren değişkenler için gruplar arası farkın olup olmadığına Tek Yönlü Varyans Analizi ile bakıldı. Fark çıkan gruplarda çoklu karşılaştırmalar homojen varyans gösteren gruplar için Tukey testi ile, homojen varyans göstermeyen gruplar için Tamhane testi ile yapıldı. Normal dağılım göstermeyen değişken için gruplar arası farkın olup olmadığına Kruskal-Wallis Testi ile bakıldı. Fark çıkan gruplarda çoklu karşılaştırmalar Student-Newman-Keuls Testi ile yapıldı. $P < 0.05$ değeri istatistiksel olarak anlamlı kabul edildi.

4. BULGULAR

Bu deneysel çalışmadan elde edilen bulgular şu şekildedir.

4.1. BİYOKİMYASAL SONUÇLAR

4.1.1. LDH, Laktat Sonuçları

LDH, Laktat değerleri karşılaştırıldığında Sham grubu ile diğer üç grup arasında istatistiksel olarak anlamlı farklılık saptanmıştır ($p<0.001$). LDH değerlerinin kontrol grubunda istatistiksel olarak anlamlı derecede en yüksek değerlerde olduğu görüldü ($p<0.001$). Benzer şekilde laktat değerlerinin de kontrol grubunda istatistiksel olarak anlamlı en yüksek değerlerde olduğu görüldü ($p<0.001$). İÖK grubunda LDH, Laktat değerleri kontrol grubuna göre anlamlı olarak düşük iken ($p<0.001$), FÖK ve İÖK grupları arasında anlamlı fark yoktu ($p>0.05$). Benzer şekilde FÖK grubunda LDH, Laktat değerleri kontrol grubuna göre anlamlı olarak düşük bulunurken ($p<0.001$), İÖK ve FÖK grupları arasında istatistiksel olarak anlamlı fark bulunamadı ($p>0.05$). (Tablo 2, Grafik 1, Grafik 2)

4.2. MPO SONUÇLARI

MPO sonuçları karşılaştırıldığında, Sham grubu ile diğer tüm gruplar arasında ve kontrol grubu ile diğer tüm gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı farklılık saptandı ($p<0.001$). İÖK grubundaki MPO değerleri, kontrol grubuna göre anlamlı olarak düşük bulunurken ($p<0.001$), İÖK ve FÖK grupları arasında istatistiksel olarak anlamlı fark bulunamadı ($p>0.05$). Benzer şekilde FÖK grubundaki MPO değerleri de kontrol

grubuna göre anlamlı olarak düşük saptanırken ($p<0.001$), İÖK ve FÖK grupları ile arasında anlamlı fark saptanmadı ($p>0.05$). (Tablo 3, Grafik 3)

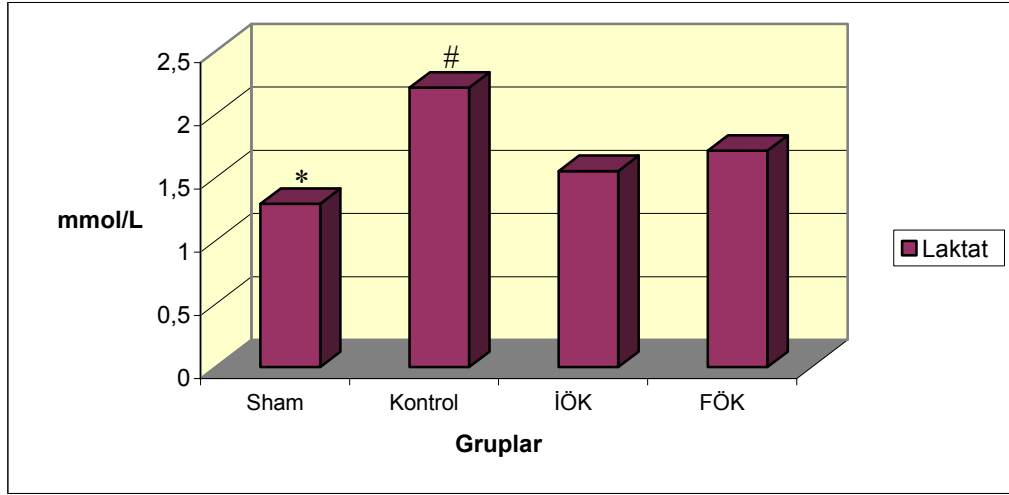
4.3. HİSTOPATOLOJİK DEĞERLENDİRME

Sham grubunda intestinal mukoza hasarının olmadığı görüldü. Kontrol ve çalışma gruplarında İR'dan sonra önemli histopatolojik değişiklikler meydana geldi. Özellikle kontrol grubunda Lamina Propria ve villuslarda dökülme, kapiller dilatasyon, Lamina Propria'da artmış selülarite ve yer yer Lamina Propria'da sindirilme ve bütünlüğünde bozulma, kanama ve ülserasyon alanları izlendi (Resim 5d,5e). İskemi-reperfüzyon hasarının neden olduğu histopatolojik değişiklikler en fazla kontrol grubunda gözlemlendi. Kontrol grubu ile diğer tüm gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı farklılık vardı. İÖK ve FÖK gruplarındaki histopatolojik değişikliklerde, sham ve kontrol grubuna göre anlamlı fark olduğu görüldü ($p<0.001$). Ancak bu iki çalışma grubu arasında istatistiksel olarak anlamlı fark görülmedi ($p>0.05$). (Tablo 4, Grafik 4).

Tablo 2. Serum LDH ve Laktat değerlerinin karşılaştırılması.

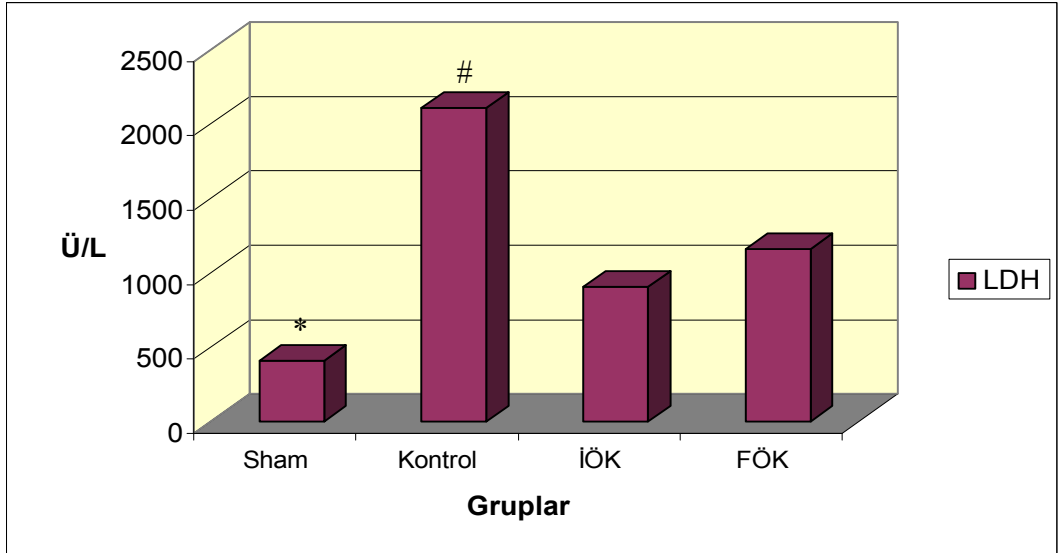
	Sham(n=8)	Kontrol(n=8)	İÖK(n=8)	FÖK(n=8)
Laktat(mmol/L)	1,29±0,12 ^a	2,21±0,28 ^b	1,55±0,15 ^c	1,71±0,19 ^c
LDH(Ü/L)	412,4±178,1 ^a	2107,8±386,2 ^b	904,6±221,1 ^c	1161,5±230,7 ^c

Farklı harfler gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı farkı ifade etmektedir. Değerler ortalama ± standart sapma ($X\pm SD$) olarak verilmiştir.



Grafik 1. Serum Laktat düzeylerinin karşılaştırılması

* $p < 0,001$ Sham grubunun Kontrol , İÖK ve FÖK grubundan farkını gösterir.
 # $p < 0,001$ Kontrol grubunun İÖK ve FÖK grubundan farkını gösterir.



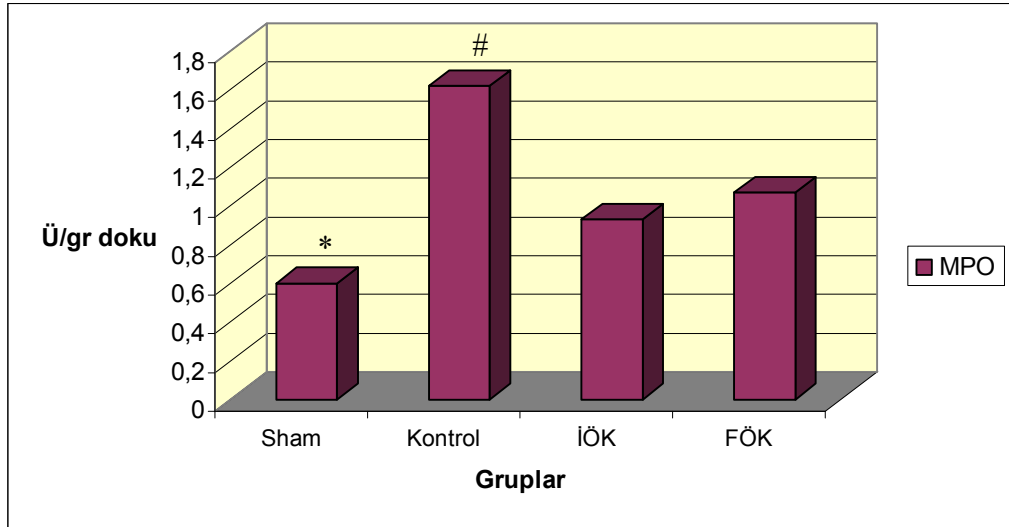
Grafik 2. Serum LDH düzeylerinin karşılaştırılması

* $p < 0,001$ Sham grubunun kontrol , İÖK ve FÖK grubundan farkını gösterir.
 # $p < 0,001$ Kontrol grubunun İÖK ve FÖK grubundan farkını gösterir.

Tablo 3. MPO değerlerinin karşılaştırılması

	Sham	Kontrol	İÖK	FÖK
MPO (Ü/gr doku)	0,60 ± 0,12 ^a	1,62 ± 0,13 ^b	0,93 ± 0,12 ^c	1,07 ± 0,10 ^c

Farklı harfler gruplar arasında istatistiksel anlamlı farkı ifade etmektedir. Değerler ortalama ± standart sapma (X±SD) olarak verilmiştir.



Grafik 3. MPO değerlerinin karşılaştırılması

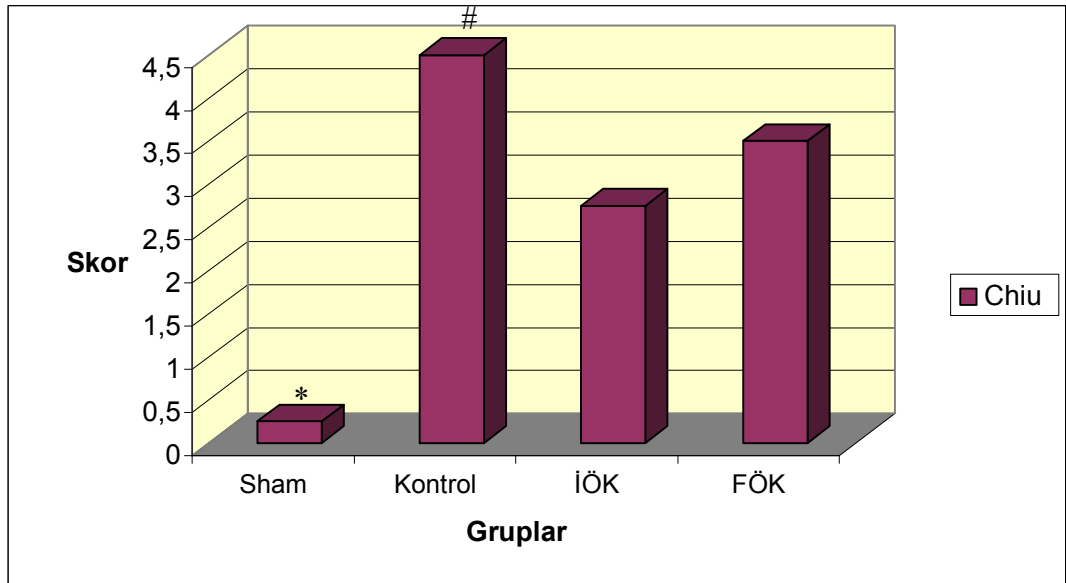
* p<0,001 Sham grubunun Kontrol , İÖK ve FÖK grubundan farkını gösterir.

p<0,001 Kontrol grubunun İÖK ve FÖK grubundan farkını gösterir.

Tablo 4. Chiu skorunun karşılaştırılması

	Sham	Kontrol	İÖK	FÖK
	Median (min-max)	median (min-max)	median (min-max)	median (min-max)
Chiu skoru	0,00(0,00-0,50) ^a	4,50(4,00-5,00) ^b	3,00(2,50-3,00) ^c	3,00(3,00-4,00) ^c

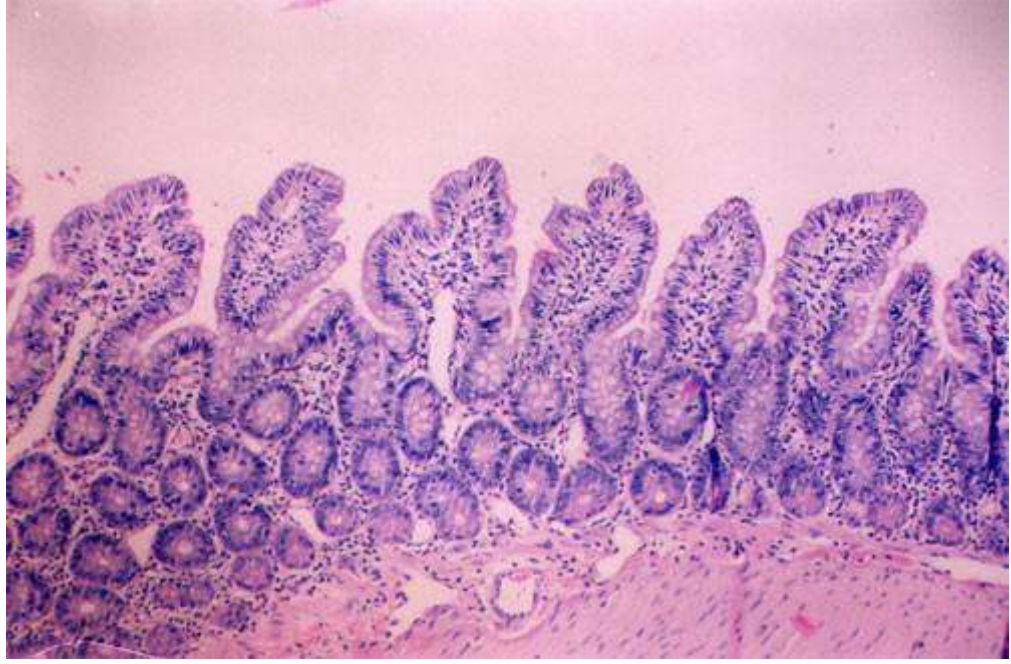
Farklı harfler gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı farkı ifade etmektedir. Değerler median(min-max) olarak verilmiştir.



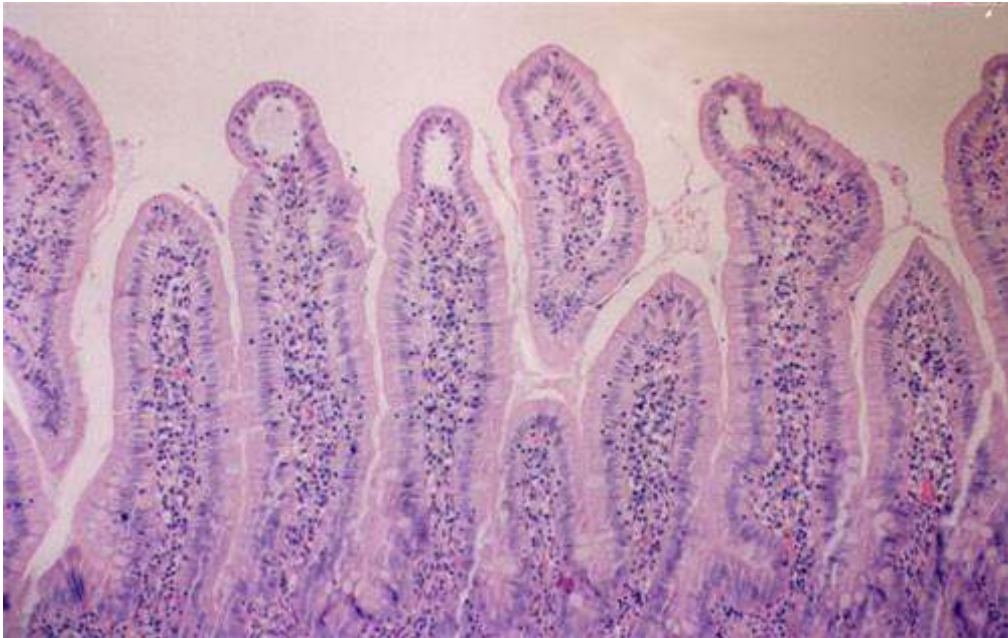
Grafik 4. Chiu skorunun karşılaştırılması

* $p < 0,001$ Sham grubunun Kontrol , İÖK ve FÖK grubundan farkını gösterir.

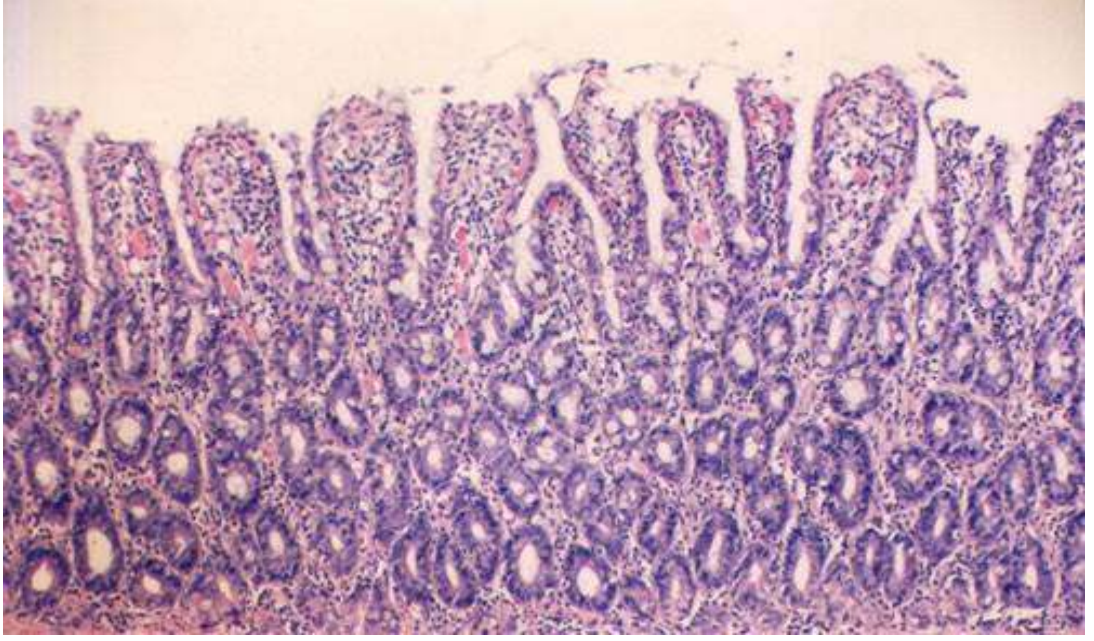
$p < 0,001$ Kontrol grubunun İÖK ve FÖK grubundan farkını gösterir.



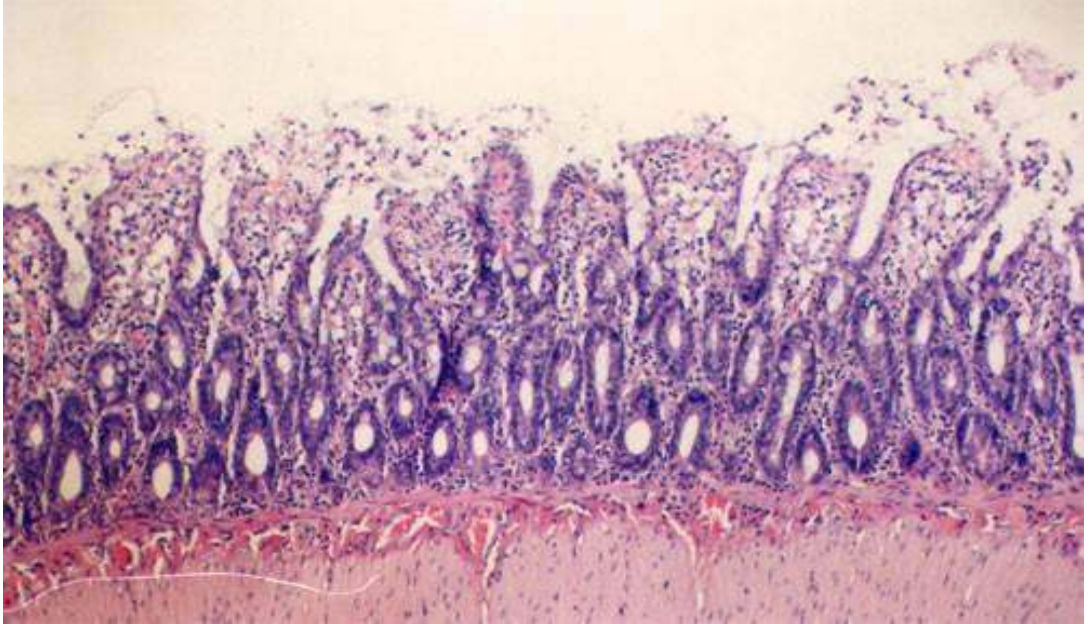
Resim 5.a:Normal intestinal mukoza. Evre 0 (Grup I,denek 5) (H&E, $\times 100$).



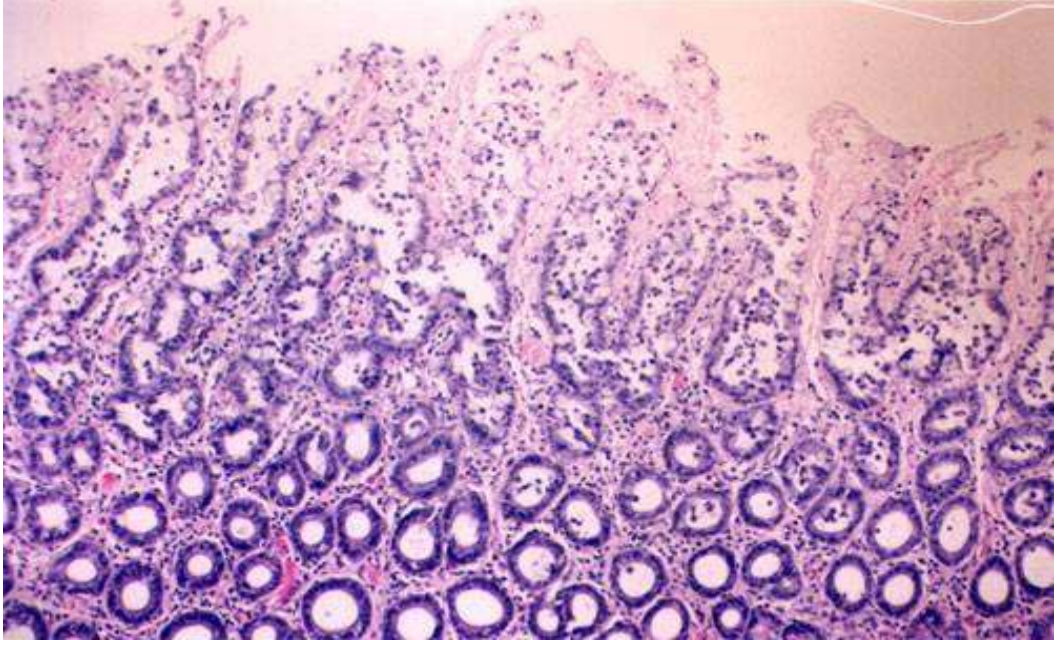
Resim 5.b.Kapiller konjesyon ve subepitelyal Guehagen boşlukları. Evre II (Grup III,denek 2) (H&E , $\times 100$).



Resim 5.c. Villus üst kısımlarında yaygın epitelyal ayrılma. Evre III
(Grup III,denek 3) (H&E, $\times 100$).



Resim 5.d. Villuslarda dökülme, Lamina Propria'da artmış selülarite. Evre IV
(Grup II,denek 1) (H&E, $\times 100$).



Resim 5.e. Mukozal ülserasyon ve nekroz. Evre V (Grup II,denek 5) (H&E, ×100).

5. TARTIŞMA

İR hasarı multifaktöryel fizyopatolojik mekanizmaların söz konusu olduğu ve özellikle de O₂ kaynaklı serbest radikaller, sitokinler, NO ve PMNL'lerin sürece katıldığı kompleks bir prosestir (12). İntestinal sistemde; nekrotizan enterokolit, inflamatuvar barsak hastalıkları, pull-through ameliyatları, serbest pediküllü barsak flebi kullanımı, kardiopulmoner bypas, strangüle herni ve barsak transplantasyonu durumlarında İR hasarı oluşabilmektedir (106).

İskemi süresince dokunun oksijensiz kalışı mitokondriyal fonksiyonları bozar ve enerji kaynağı olan ATP'nin tüketilmesine neden olur. Enerji eksikliği, H⁺, Na⁺ ve Ca⁺⁺ gibi iyonların hücre içi ve dışı dengelerini bozar. Hücre hacminin ve bütünlüğünün korunması giderek zorlaşır.

Reperfüzyonla birlikte ortam oksijenlenirken hızla artan reaktif oksijen radikalleri hücredeki oksidatif stresi artırır. Başta makrofajlar olmak üzere dolaşım ve parankimdeki diğer inflamatuvar hücrelerden reaktif oksijen radikallerinin yanında TNF- α , IL-6, IL-1 β ve IL-12 gibi proinflamatuvar sitokinler ortama salınır. Sitokinlerin de etkisi ile vasküler yatağı döşeyen endotel hücrelerinde adezyon moleküllerinin (ICAM-1 ve VCAM-1 ve E-selektin) ekspresyonu ve buna bağlı olarak nötrofillerin endotel yüzeyine karşı ilgisi artar. Endotele yapışan nötrofiller daha sonra hücre aralıklarından parankime doğru ilerleyerek fagositoz ve lizozomal enzimlerin de yardımı ile hasarın ilerlemesine neden olurlar. Reperfüzyon hasarı lokal olduğu kadar sitokinler yoluyla uzak organlarda da inflamatuvar yanıtı indükleyerek organ yetmezliklerine neden olabilir. Reperfüzyonun dokular üzerinde, öncesindeki iskemiden daha fazla zararlı olduğunu ve bu zararların reperfüzyon süresi uzadıkça arttığını bilmekteyiz (107).

Sıçanlarda deneysel intestinal İR modelinde SMA'nın obliterasyonu vasıtasıyla iskemi ve obliterasyonun giderilmesiyle reperfüzyon oluşturma süreleri literatürde hala tartışmalı bir konudur. Mallick ve ark. deneysel modellerinde bu süreleri iskemi

için 30 dk.,reperfüzyon için ise 120 dk. olarak uygulamışlardır (108). Vlasov ve ark. İÖK'da NO'in rolünü araştırdıkları bir çalışmada hasar modelini 90 dk. iskemi ve 30 dk.reperfüzyon üzerine kurmuştur (53).Biz çalışmamızda intestinal İR modelinde daha önce Abrahao ve ark.nın kullandığı ve reperfüzyon hasarının tüm aşamalarının histopatolojik olarak gösterilebildiği 50 dk. iskemi, 30 dk. reperfüzyon protokolünü kullandık (102).

Miner ve ark.nın yaptığı bir çalışmada tekrarlayan iskemi reperfüzyon ataklarının ince barsak üzerindeki etkileri incelenmiş; 30 dk iskemi, sonrasında 24 saat reperfüzyon yapılan ratlardan bir grubu tekrar 30 dk iskemi ve 2 saatlik reperfüzyona tabi tutulmuş ve sonuçlar kontrol grubu ile karşılaştırıldığında iki kez iskemi ve reperfüzyona maruz kalan grupta nötrofil infiltrasyonu, lökotrien B₄ seviyesi ve aktive nötrofillerin sayıca artmış olmasına rağmen oluşan mukozal hasarın bir kez iskemiye maruz kalan ratlardan daha az olduğu gösterilmiştir(22).

Bugüne kadar farklı cerrahi, farmakolojik ve genetik yöntemler kullanılarak İR hasarına karşı organların korunmasını amaçlayan yüzlerce deneysel çalışma planlanmıştır. Deneysel ortamda başarılı gibi görünen çalışmaların çok azı klinikte uygulama şansı bulmuştur. Bunda İR hasarının tek bir basamak veya mediatörün bloke edilmesi ile önlenemeyecek kadar karmaşık olmasının rolü büyüktür.Bu türden bir yaklaşım karşısında organizma kendine kolaylıkla yan yollar yaratmakta ve reperfüzyonla gelen oksidatif yüklenmenin yanı sıra proinflamatuvar sitokinlerin ve kan hücrelerinin aktivasyonu ile giderek büyüyen İR dizinini durdurma çabaları başarısız kalmaktadır.

Son 15 yıldır ince barsakta İR hasarını önlemeye ve yeni stratejiler oluşturmaya yönelik çalışmalar yoğun olarak devam etmektedir. Farklı hayvan modellerinde dokunun İR hasarından korunmasına yönelik çeşitli terapotik modaliteler başarıyla kullanılmıştır. Bunlar; (a)İÖK, (b)Antioksidan ajanlarla tedavi, (c)NO uygulamaları, (d) Antikompleman terapi, (e)Perflorokarbonlarla tedavi, (f)Enteral beslenme, (g)Glisin ve Glutamin uygulamalarıdır (12).

İÖK'nın İR hasarına karşı koruyucu etkisi bir fenomen olarak ilk defa 1986 yılında Murry ve ark. (11) tarafından köpek kalbinde tanımlandıktan sonra daha sonraki yıllarda farklı hayvan modellerinde benzer koruyucu etkiler; karaciğer (109), iskelet

kası (110), beyin (111),spinal kord (112),böbrek (113),akciğer (114),retina (115) ve ince barsakta (53,116,117,118) gösterilmiştir.

İÖK'nın koruyucu etkileri ince barsakta ilk defa 1996 yılında Hotter tarafından tanımlanmış ve bu tarihten itibaren çalışmalar yoğunluk kazanmıştır (119). Bu prosedüre göre SMA tıkaçıcı vasküler klemple klemlenerek 5-20 dk.lık iskemik interval sağlandıktan sonra klemp çıkarılmakta ve 5-15 dk.lık bir süreyle reperfüzyon sağlanmaktadır.Ancak bu süreler ve siklus sayısı konusunda net bir fikir oluşmamıştır.

Mc Callion ve ark. 3 siklus halinde 2 dk. İskemi, 5 dk. Reperfüzyon ile sıçanlarda İÖK oluşturmuşlar ve koruyucu etkinin adenosin seviyesindeki yükselmeye bağlı olduğunu iddia etmişlerdir (21). Sola ve ark. 10 dk. iskemi ve 5 dk. reperfüzyon önermişler ve koruyucu etkiyi NO sentezindeki artışa bağlamışlardır. (117). Vlasov ve ark. 10 dk. iskemi ,10 dk reperfüzyonla sıçanlarda İÖK'nın etkinliğini göstermişler ve bunu yine NO sentezindeki artışa bağlamışlardır (53).Benzer şekilde Aksoyek ve ark. da 10'ar dakikalık İR intervali ile çalışmışlar ve İÖK'nın koruyucu etkisini bu yöntemle kanıtlamışlardır(116).Wu ve ark. ise daha uzun bir iskemi periyodu (20dk.) sonrasında 5 dk reperfüzyonla yetinmiş ve koruyuculuğun antiapoptotik etkiye bağlı olduğunu göstermişlerdir (120). Son olarak Unal ve ark. 2 siklus halinde 5 dk. iskemi,5 dk. reperfüzyon kullanarak İÖK'nın koruyucu etki mekanizmasını nötrofil infiltrasyonunun azalması ve oksidatif stresin azalmasıyla antiapoptotik etkiye bağlamışlardır (121).

Biz de çalışmamızda İÖK yöntemi olarak daha önce İR hasarından incebarsağı koruduğu gösterilmiş ve sık kullanılmış olan 10 dk. iskemi,10 dk. reperfüzyon protokolünü kullandık.

İnce barsağı İR hasarından korumanın diğer bir stratejisi farmakolojik ajanlarla yapılan önkoşullama uygulamalarıdır. Son dekatta rat modellerinde farklı mekanizmalar üzerine etkili olan onlarca ajan kullanılmıştır. Reperfüzyon hasarın altında yatan önemli nedenlerden biri serbest radikallerin etkisi olduğundan antioksidanlar bu bağlamda ön plana çıkar. Bunlardan bazıları; allopürinol, SOD, desferroksamin, N-Asetil Sistein, etanol, askorbik asit, tokoferol, pentoksifilin, kaptopril ve verapamildir (12).

Sun ve ark. önkoşullayıcı ajan olarak N-Asetil Sistein'i kullanmışlar ve bunun nötrofil infiltrasyonunu engelleyici etkisinden yararlanarak sonuçta endotelial permeabilitenin azaldığını ve doku MPO aktivitesinin gerilediğini gözlemlemişlerdir

(122). Cicelase ve ark. deneysel intestinal İR modeli oluşturdıkları ratlarda önkoşullayıcı ajan olarak antioksidan pürüvatı kullanmışlardır. Pürüvatın serbest radikal temizleyici etkisiyle nötrofil infiltrasyonunun azaltıldığını ve hasar bölgesinden serbest radikallerin uzaklaştırıldığını göstermişlerdir (123). Günel ve ark. ise antioksidan etkinliğini lipid peroksidasyonunu azaltarak gösteren vitamin C ve vitamin E yi kullanmışlar ve her ikisinde ince barsağı reperfüzyon hasarından koruduğunu göstermişlerdir (27) .

Biz bu deneysel çalışmada farmakolojik önkoşullayıcı ajan olarak BK'i kullandık. BK'in intestinal İR'daki koruyucu asıl etkisi inflamatuvar lökositler üzerindedir. Aktive nötrofillerin endotele yapışmasını engelleyerek nötrofil aracılı reperfüzyon hasarına karşı koruyucu rol oynar. Ayrıca mikrovasküler bariyerdeki bozulmayı azaltarak kapiller permeabilite artışını engeller (15).

Nilsson ve ark. nötrofil adhezyonunu sağlayan CD11/CD8 gibi adhezyon molekülleri ile ilgili yaptıkları iskemi reperfüzyon çalışmalarında, bu moleküllere karşı geliştirilmiş IB4 gibi monoklonal antikörlerin, nötrofillerden kaynaklanan hipoklorik asit ve daha toksik olan N-kloraminlerin oluşumunu engelleyerek oluşan hasar üzerinde olumlu biyokimyasal ve morfolojik parametreler elde etmişlerdir (124). Ariceta ve ark. İR yaptıkları ratlarda sitoprotektif ajan olarak somatostatin kullanmışlar ve ilacın verildiği ratlarda intestinal İR hasarında ilacın lökosit infiltrasyonunu azaltıp doku myeloperoksidaz düzeyini düşürdüğünü belirtmişlerdir (125).

Riaz ve ark. benzeri etki mekanizmasından hareketle yaptıkları doz kontrollü deneysel çalışmada allopürinol ve SOD kullanmışlar ve her iki farmakolojik önkoşullayıcı ajanın hasar bölgesine lökosit migrasyonunu ve lökositlerin endotele adezyonunu engellediğini göstermişlerdir (126).

Aslında BK iskemik önkoşullama mekanizmalarında endojen olarak dokular tarafından üretilir ve koruyucu mekanizmalara diğer faktörler (adenzin, opioidler) gibi katkıda bulunur (127). BK endotel hücrelerinde B2 kinin reseptörleri aracılığıyla Gq ve Gi sinyal ileti proteinleri üzerinden PLC₂ yi aktive eder. Bu lipaz da fosfotidilinozitol bifosfatı iki hücre içi iletiyi taşıyan moleküle; inozitol trifosfat ve DAG'e ayırmaktadır. Bu esnada hücre içerisine Ca⁺⁺ girişi de artar. DAG, Ca⁺⁺ varlığında bunun kolaylaştırıcı etkisiyle PKC'yi aktive eder. Aktif hale geçen PKC,

mitokondrilerdeki ATP'ye duyarlı potasyum kanallarını açarak ön koşullandırmanın koruyucu etkilerini başlatır.

BK'in farklı organlarda reperfüzyon hasarına karşı koruyucu farmakolojik bir ajan olarak kullanıldığı yapılan deneysel çalışmalarda gösterilmiştir. Yan-Feng ve ark. ratlarda oluşturdukları spinal kord iskemik hasar modelinde BK'i kullanmışlar olumlu histopatolojik ve biyokimyasal parametreler elde etmişlerdir (128). Benzer şekilde Ping ve ark. önkoşullayıcı etkiyi fokal serebral iskemiyi oluşturdukları ratlarda araştırmışlar ve oluşan hasar üzerinde BK'in önkoşullayıcı etkisinin olumlu sonuçlar doğurduğunu göstermişlerdir (129). Liuba ve ark. da postiskemik arteriel endotel hücreindeki hasarlanmanın BK kullanımıyla gerilediğini morfolojik parametreler kullanarak göstermişlerdir (130).

Biz bu deneysel çalışmada çeşitli yayınları gözden geçirerek hem reperfüzyon hasarının hem de gerek iskemik gerekse farmakolojik önkoşullamanın olası koruyucu etkilerinin gösterilmesinde biyokimyasal parametreler olarak serum laktat ve LDH değerlerini seçtik. Ayrıca İR hasarının göstergelerinden biri olduğu daha önce gösterilmiş olan ve hasar patogenezinde önemli rolleri olan inflamatuvar lökositlerden kaynaklanan MPO aktivitesi de doku düzeyinde çalışıldı. Son olarak deneysel İR hasarı ve buna karşı koruyucu mekanizmalar olarak öne sürdüğümüz iskemik ve farmakolojik önkoşullamanın etkileri intestinal doku düzeyinde histopatolojik olarak incelendi.

Sola ve ark (131,132). ve Vejchapit ve ark (133). İÖK düzenlemesini ve iskemiyi takip eden reperfüzyonun neden olduğu hasarı derecelendirmede laktatın güvenilir bir parametre olduğunu gözlemlemişlerdir. Buna göre plazma laktat seviyesi intestinal hasarı da İÖK ile hasardan korunmayı da yansıtır. Bu yazarlar İÖK'da NO'in altta yatan koruyucu mekanizma olduğunu öne sürmüşlerdir. Bu mekanizmaya göre önkoşullamayla artan NO gliseraldahit 3 fostat dehidrogenazı kompetitif olarak bloke ederek fruktoz 1,6 bifosfat birikimine neden olur. Böylece laktat artışına neden olan glikolitik yol bloke olur. Net etki önkoşullamayla plazma laktat seviyesinin düşmesidir. Abrahao ve ark. ince barsaklarda İR hasarlanmasını oluşturdukları deneysel sıçan modellerinde İÖK grubunda İR grubuna göre plazma laktat düzeylerinde istatistiksel olarak anlamlı düşüş rapor etmişlerdir (102).

Biz de çalışmamızda benzer sonuçlar elde ettik. Sham grubuyla kontrol ve çalışma gruplarımız arasında plazma laktat seviyeleri bakımından istatistiksel açıdan anlamlı fark vardı ($p < 0.001$). En yüksek laktat seviyeleri deneysel İR hasarı yaptığımız kontrol grubunda idi. Hem İÖK hem de FÖK grubunda kontrol grubuna göre laktat seviyeleri istatistiksel açıdan anlamlı olarak düşüktü. Ancak bu iki çalışma grubu arasında anlamlı bir fark saptanmadı ($p = 0.384$). (Tablo 2, Grafik 1)

LDH aktivitesi çeşitli hücre tiplerinin stoplazmalarında bulunduğundan beri bir sensitiv nonspesifik doku hasar göstergesi olarak kullanılmıştır. LDH'nın intestinal izoformu pürüvattan laktat oluşturan bir geri dönüşümlü reaksiyonu katalizler. Organizmanın bir bölgesinde birden fazla doku çeşidi hasar gördüğünde kandaki dehidrogenaz aktivitesi salınan izoformların desteği ile artar. Bununla birlikte orjin gösterilemez. İskemi, reperfüzyon ve İÖK'ya sekonder intestinal mukoza değişiklikleri dolaşan enzim konsantrasyonlarını değiştirmek için yeterlidir. Sonuç olarak iskemi sonrası reperfüzyonla ortam yeniden kanlanırken meydana gelen reaktif ürünlerle ilgili dış membran hasarına bağlı hücre parçalandığında enzim aktivitesi de kanda artmış olur. Hem iskemik hem de farmakolojik önkoşullandırma bir ölçüde intestinal mukoza hücrelerini bu dış membran hasarından korur.

Abraham ve ark. ince barsaklarda İR hasarlanması oluşturdukları deneysel modellerinde iskemi ve arkasından reperfüzyon yaptıkları sıçanlarla İÖK modeli oluşturdukları sıçanları LDH değerleri yönünden karşılaştırmışlar ve aralarında istatistiksel açıdan bir fark gösterememişlerdir (102). Bunu LDH'nın nonspesifik bir doku hasar göstergesi olmasına bağlamışlardır. Mallick ve ark. sıçan ince barsağında deneysel İR hasarı oluşturdukları çalışmalarında önkoşullayıcı ajan olarak bir hem oksijenaz prekürsörü prolidin ditiokarbamat kullanmışlar ve serum LDH seviyelerinde bu ajanı verdikleri grupta İR grubuna göre anlamlı düşüş tespit etmişlerdir (108).

Bizim çalışmamızda da hem İÖK hem de BK kullanılan FÖK grubunda kontrol grubuna göre LDH seviyelerinde istatistiksel anlamlı düşüş olmuştur ($p < 0.001$). En yüksek plazma değerleri kontrol grubunda saptanmıştır. Laktat parametresinde olduğu gibi bu parametrede de çalışma grupları arasında istatistiksel farklılık tespit edilmemiştir ($p = 0.279$). (Tablo 2, Grafik 2)

İnce barsak İR hasarında lokal olarak üretilen serbest radikaller, araşidonik asit metabolitleri ve sitokinler hasarın olduğu bölgeye doğru dolaşımdaki nötrofillerin ulaşmasını kolaylaştırıp hasarı arttırmaları. MPO enzimi dokularda PMNL'e spesifik bir enzimdir ve dokulardaki lökosit düzeyinin tayinini yapmada yardımcıdır (30). MPO dokuda biriken polimorfonükleer lökositlerin marker enzimi olarak kullanılır ve reperfüzyon hasarının bir göstergesi olarak değerlendirilir (31).

Postiskemik durumda PMNL de içerdikleri MPO enzimi ile İR hasarında rolü olan serbest oksijen radikallerinin oluşumuna neden olurlar. Grisham ve ark. kedi barsağında reperfüzyonun PMN birikimi ile mukozal MPO düzeylerinde 18 kat artışa neden olduğunu göstermişlerdir (134). Ferrer ve ark. antioksidan olarak Allopürinol kullandıkları sıçan intestinal İR modelinde serbest radikallerin etkisinin giderilmesiyle doku MPO düzeylerinde anlamlı düşüşler tespit etmişlerdir (135). Özden ve ark. Anti-trombin III kullanarak bunun intestinal İR hasarındaki lipid peroksidasyonu üzerindeki etkilerini incelemişler ve lipid peroksidasyonunun bir dereceye kadar engellenmesiyle anlamlı MPO düşüşleri tespit etmişlerdir (136). Büyükgebiz ve ark. ise yine serbest radikal temizleyici etkilerini ön plana çıkardıkları kaptopril kullandıkları intestinal İR çalışmalarında söz konusu ajanla doku hasarının ve MPO aktivitesinin azaldığını göstermişlerdir (137).

Nötrofil infiltrasyonunu inhibe edici ajanlar kullanılarak yapılan birçok deneysel çalışmada doku MPO düzeyindeki düşüşler rapor edilmiştir. Lee ve ark (138). Glisin, Stroh ve ark (139). L-propiyonil karnitin, Cuzzocrea ve ark (140). ise Lipokortin-1'i inhibitör ajan olarak kullanmışlar ve tümü de doku MPO aktivitesindeki anlamlı düşüşleri rapor etmişlerdir.

Bizim çalışmamızda kontrol grubunda sham grubuna göre yaklaşık 2,5 katlık bir MPO aktivitesi artışı olmuştur. İstatistiksel olarak da bu fark anlamlıdır ($p < 0.001$). Bu sonuç; reperfüzyonla intestinal mukozada oluşan hasarı yansıtmaktadır. En yüksek MPO değerleri yine kontrol grubunda mevcuttur. Gerek İÖK gerekse FÖK gruplarında kontrol grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı düşük doku MPO düzeyleri saptanmıştır ($p < 0.001$). Ancak çalışma gruplarında (İÖK, FÖK) birbiri arasında anlamlı bir farklılık saptanmamıştır ($p = 0.09$). (Tablo 3, Grafik 3)

İntestinal İR hasarının histopatolojik değerlendirilmesinde birçok skorlama sistemi geliştirilmiştir. Chui ve ark (105)., Yoshida ve ark. (141)., Hierholzer ve ark (142). ve Park ve ark. (143) farklı sınıflamalar yapmışlardır. Chui ve ark. tarafından tanımlanan histopatolojik sınıflama intestinal İR hasarı ve buna karşı kullanılan önkoşullayıcı ajanların etkisinin histopatolojik olarak değerlendirilebildiği sık kullanılan, basit ve sade bir morfolojik skorlama sistemidir.

Mallick ve ark. sıçan ince barsağında deneysel İR hasarı oluşturdukları çalışmalarında önkoşullayıcı ajan olarak prolidin ditiokarbamat kullanmışlar ve intestinal morfoloji değişikliklerini Chiu ve ark.nın tarif ettiği skorlama sistemine göre incelemişlerdir. Histopatolojik skorda İR grubuna göre çalışma grubunda anlamlı düşüş tespit etmişlerdir (108). Mallick ve ark. İR hasarının mikrovasküler perfüzyonla ilişkisini araştırdıkları diğer bir çalışmalarında İR hasarına karşı İÖK'nin koruyucu etkilerini histopatolojik düzeyde intestinal morfolojideki hasarlanmanın gerilediğini göstererek kanıtlamışlardır (144). Abrahao ve ark. intestinal İR hasarlanmasına karşı İÖK'nin koruyucu etkilerinin biyokimyasal ve morfolojik açıdan değerlendirdiği deneysel çalışmalarında İR grubuyla İÖK grubu arasında morfolojik açıdan istatistiksel bir farklılık gösterememişlerdir (102). Jun ve ark. PKC'nin intestinal İÖK'daki etkilerini araştırdıkları çalışmada İÖK'nin İR hasarındaki koruyucu etkilerini morfolojik düzeyde göstermişlerdir (145).

Bizim çalışmamızda deneysel İR hasarı oluşturduğumuz grupta villuslarda dökülme, lamina propriada artmış selülarite, mukozal ülserasyon ve nekroz gözlemlendi. Bu histopatolojik bulgular Chiu skorlamasına göre ileri evre reperfüzyon hasarını yansıtır (Resim5.d,Resim5.e). Çalışma gruplarında ise kapiller konjesyon ve villus üst kısımlarında yaygın epitelyal ayrılma görüldü (Resim5.b,Resim5.c). Histopatolojik hasar yönünden gruplar değerlendirildiğinde en fazla hasarın kontrol grubunda olduğu görüldü. İÖK ve/veya BK uygulanması ile histopatolojik değişikliklerde anlamlı düzelmeye kaydedildi. Ancak bu iki çalışma grubu arasında istatistiksel açıdan anlamlı bir farklılık yoktu (Tablo 4,Grafik 4).

Bu çalışmanın sonucunda; ince barsak cerrahisi sırasında sıkça karşılaşılan İR hasarını azaltmak için hem İÖK hem de BK ile yapılan FÖK'nin etkili birer yöntem olduğu ancak birbirlerine üstünlüklerinin olmadığı değerlendirilen biyokimyasal ve

morfolojik parametrelerle anlaşılmıştır. BK'in İÖK'da endojen bir peptid olarak rolü artık bilinmektedir. Buradan hareketle BK'i farmakoljik bir ajan olarak dışarıdan vererek önkoşullayıcı ajan olarak kullanmayı tercih ettik. BK endojen koruyucu mekanizmaları harekete geçirmesinin yanı sıra nötrofil adezyonunun inhibisyonuyla reperfüzyon hasarından intestinal mukozayı koruyabilir. Ayrıca BK'in potent vazodilatör etkisi reperfüzyon hasarında ön plana çıkan ve önemli bir mekanizma olan vazokonstrüksiyonu dengeliyor olabilir. Nitekim BK ile daha önce etkinliği ince barsakta kanıtlanmış İÖK'ya benzer sonuçlar elde ettik. Ancak reperfüzyon hasarının birbiri içerisine geçmiş ve hayli kompleks mekanizmaları akla getirildiğinde BK ile ince barsaklarda muhtemel farklı etki mekanizmalarını ortaya çıkarmaya yönelik ve özellikle diğer başka parametrelerin kullanılacağı çalışmalara ihtiyaç vardır.

6. SONUÇLAR

Erciyes Üniversitesi Tıp Fakültesi Hakan Çetinsaya DEKAM’nde gerçekleştirilen “Sıçanlarda oluşturulan deneysel intestinal iskemi reperfüzyon modelinde bradikinin önkoşullandırmasının etkileri ” adlı çalışmamızın sonuçları şu şekilde sıralanabilir:

1. İR hasarı 50 dk. iskemi-30 dk. reperfüzyon periyodu, İÖK ise 10 dk. iskemi-10 dk reperfüzyon periyoduyla gerçekleştirilmiş ve her iki uygulama periyodunun etkinliğini göstermede morfolojik ve biyokimyasal kanıtlar elde edilmiştir.
2. Biyokimyasal olarak serum Laktat ve LDH düzeyleri karşılaştırıldığında İÖK ve BK ile yapılan FÖK’nın ince barsaktaki İR hasarını azalttığı görülmektedir. Ancak iki yöntemin birbirine karşı üstünlüğü saptanmamıştır.
3. İR hasarında nötrofillerin patofizyolojik mekanizmada etkinliğini gösteren doku MPO düzeyinde sham grubuna göre kontrol grubunda yaklaşık 2,5 kat artış saptanmış, İÖK ve BK ile doku MPO düzeyinin azaltıldığı gösterilmiştir.
4. Histopatolojik değerlendirmede; reperfüzyona bağlı hasarın farklı aşamaları gösterilmiş, gerek İÖK gerekse BK ile yapılan FÖK’nın intestinal mukoza hasarını azalttığı gösterilmiştir.
5. BK’in ince barsakta bir farmakolojik ajan olarak önkoşullayıcı etkinliği gösterilmiş ve bunun İÖK’ya benzer koruyucu etkiler sağladığı kullanılan morfolojik ve biyokimyasal parametrelerle kanıtlanmıştır.

7. KAYNAKLAR

1. Granger DN, Korthuis RJ. Physiologic mechanisms of postischemic tissue injury. *Annu Rev Physiol* 1995;57:311-332.
2. Mustafa NA, Yandi M et al. Role of diltiazem in ischemia-reperfusion injury of the intestine. *Eur Surg Res* 1994; 26: 335-341.
3. Parks DA, Granger DN. Ischemia-induced vascular changes: role of xanthine oxidase and hydroxyl radicals. *Am J Physiol* 1983;245: 285-289.
4. Sochman J, Kolc J, Vrana M et al. Cardioprotective effects of N-acetylcysteine: the reduction in the extent of infarction and occurrence of reperfusion arrhythmias in the dog. *Int J Card* 1990; 28: 191-196.
5. Koçak S, Koyuncu A, Dizbay Sak S ve ark. Intestinal iskemi- reperfüzyonda vasküler endotel hücresi hasarının göstergesi olarak plazma von Willebrand faktor düzeyi değişiklikleri. *Klinik Bilimler Cerrahi* 1996;2: 52-55
6. Weixiong H, Aneman A ,Nilsson U et al. Quantification of tissue damage in the feline small intestine during ischaemia-reperfusion: the importance of free radicals. *Acta Physiol Scand* 1994;150:241-250.
7. Ramas SK, Chagos E. Responses of the heart and vascular systems. In Klaossen DC(ed). *Mc Graw-Hill Fifth edition. Toxicology* 1996;17: 487-493.
8. Schoenberg MH, Beger HG. Reperfusion injury after intestinal ischemia. *Crit Care Med* 1993; 21:1376-1386.
9. Okuhama Y, Shiraishi M, Higa T et al. Protective effects of ulinastatin against ischemia-reperfusion injury. *J Surg Res* 1999; 82:34-42
10. Ishida T, Yarimuzu K, Gute DC et al. Mechanism of Ischemic Preconditioning. *Shock* 1997;8:86-94
11. Murry CE, Jennings RB, Reimer KA. Preconditioning with ischemia: a delay of lethal cell injury in ischemic myocardium. *Circulation* 1986; 74:1124-1136.

12. Mallick IH, Yang W, Winslet MC, Seifalian AM. Ischemia-reperfusion injury of the intestine and protective strategies against injury. *Dig Dis Sci*. 2004 ;49:1359-1377.
13. Emanuelli C, Madeddu P. Targeting kinin receptors for the treatment of tissue ischemia. *Trends pharmacol Sci* 2001; 22: 478-484.
14. Sharma JN. Does the kinin system mediate in cardiovascular abnormalities? An Overview. *J Clin Pharmacol* 2003;43:1187-1195.
15. Campbell DJ. The kallikrein-kinin system in humans. *Clin Exp Pharmacol Physiol* 2001; 28: 1060-1065.
16. Haglund U, Bergqvist D. Intestinal ischemia--the basics. *Langenbeck's Arch Surg* 1999;384: 233-238.
17. Stojadinovic A, Smallridge R et al: Anti-inflammatory effects of U743S9F in a rat model of intestinal ischemia-reperfusion injury. *Crit Care Med* 1999; 27:764-770.
18. Bilbao G, Contreras JL, Eckhoff DE et al. Reduction of ischemia-reperfusion injury of the liver by in vivo adenovirus-mediated gene transfer of the antiapoptotic Bcl-2 gene. *Ann Surg* 1999;230: 185-193.
19. Parks DA, Granger DN, Bulkley GB et al. Soybean trypsin inhibitor attenuates ischemic injury to the feline small intestine. *Gastroent* 1985; 89:6-12.
20. Dryden J. The threat of oxidant injury. Marino PL (ed). *Williams&Wilkins Comp. Second edition in the ICU Book* 1998;3:32-49.
21. Mc Callion K, Wattanasirichaigoon S, Gardiner KR et al. Ischemic preconditioning ameliorates ischemia- and reperfusion-induced intestinal epithelial hyperpermeability in rats. *Shock*. 2000;14: 429-434.
22. Miner TJ, Tavaf-Motamen H, Stojadinovic A et al. Ischemia-reperfusion protects the rat small intestine against subsequent injury. *J Surg Res* 1999; 82: 1-10.
23. Urbaniak JR, Seaber AV, Chen LE. Assessment of ischemia and reperfusion injury. *Clin Orthop Relat Res* 1997;334: 30-36
24. Savaş C, Aras T, Cakmak M et al. Pentoxifylline inhibits overflow and reduces

intestinal reperfusion injury . J Pediatr Surg 1997; 32: 905-910

25. Molnar Z, Shearer E, Lowe D. N-acetylcysteine treatment to prevent the progression of multisystem organ failure: a prospective, randomized, placebo-controlled study. Crit Care Med 1999;27: 1100-1104
26. Grace PA: Ischemia- reperfusion injury Br J Surg.1994; 81:637-647
27. Günel E, Caglayan F, Caglayan O et al. Treatment of intestinal reperfusion injury using antioxidative agents. J Pediatr Surg 1998; 33:1536-1539.
28. Parks DA, Bulkley GB, Granger DN et al. Ischemic injury in the cat small intestine: role of superoxide radicals. Gastroenterology 1982;82: 9-15.
29. Reilly PM, Schiller HJ, Bulkley GB. Pharmacologic approach to tissue injury mediated by free radicals and other reactive oxygen metabolites. Am J Surg 1991;161:488-503.
30. Ormrod DJ, Harrison GL, Miller TE. Inhibition of Neutrophil Myeloperoxidase activity by selected tissues. J Pharm Met 1987; 18: 137-142
31. Zimmerman BJ, Granger DN. Mechanisms of reperfusion injury. 1994;307: 284-292.
32. Conner CW, Gallagher CM . Neutrophil priming state predicts capillary leak after gut ischemia in rats. J Surg Res 1999; 84: 24-30
33. Halliwell B. Drug antioxidant effects a basis for drug selection? Drugs 1991;42:569-605.
34. Sun YI, Oberley LW, Li Y. A simple method for clinically assay of superoxide dismutase. Clin Chemistry 1998; 34: 497-500.
35. Demir S, Erden MI. Pentoxifylline and N-acetylcysteine in hepatic ischemia-reperfusion injury. Clinica Chimica Acta 1998; 275: 127-135
36. Todisco T, Polidori R, Rossi F et al. Effect of N-acetylcysteine in subjects with slow pulmonary mucociliary clearance. Eur J Respir Dis 1985;139: 136-141.
37. Redondo P, de Felipe I, de la Pena A et al. Drug-induced hypersensitivity syndrome and toxic epidermal necrolysis. Treatment with N-acetylcysteine. Br J Derm 1997; 136:645-646.

38. Prem JT, Eppinger M, Lemmon G et al. The role of glutamine in skeletal muscle ischemia-reperfusion injury in the rat hind limb model. *Am J Surg* 1999; 178:147-150.
39. Forman MB, Puett DW, Cates CU et al: Glutathione redox pathway and reperfusion injury effect of N-acetylcysteine on infarct size and ventricular function. *Circulation* 1998; 78:202- 213.
40. Opie LH. Reperfusion injury and its pharmacologic modification point of view. *Circulation* 1989;80: 1049-1061.
41. Abu-zidan FM, Winterbourn CC, Bonham MJ et al. Small bowel ischemia-reperfusion increases plasma concentrations of oxidised proteins in rats. *Eur J Surg* 1999;165: 383-389.
42. Heel K, Blennerhassett L, Kong SE et al. Influence of ischemia- reperfusion injury on CD44 expression in rat small intestine. *Br J Surg* 1998;85:1086-1089
43. Freeman BA, Crapo JD. Biology of disease free radicals and tissue injury. *Lab Invest* 1982;47: 412-425.
44. Lee HT, Emala CW. Protective effects of renal ischemic preconditioning and adenosine pretreatment: role of A(1) and A(3) receptors. *Am J Physiol Renal Physiol* 2000;278:380-387.
45. Nakayama H, Yamamoto Y, Kume M et al. Pharmacologic stimulation of adenosine A2 receptor supplants ischemic preconditioning in providing ischemic tolerance in rat livers. *Surgery* 1999; 126:945-954.
46. Liu GS, Thomson J, Van Winkle DM et al. Protection against infarction afforded by preconditioning is mediated by A1 adenosine receptors in rabbit heart. *Circulation* 1991;84:350-356.
47. Cohen MV, Baines CP, Doveney JM. Ischemic preconditioning ; from adenosine receptor of K-ATP Channel *Annu Rev Physiol* 2000;62:79-109.
48. Peralta C, Holter G, Closa D et al. The protective role of adenosine in inducing nitric oxide synthesis in rat liver ischemia preconditioning is mediated by activation of adenosine A2 receptors. *Hepatology* 1999;29:126-132.

49. Simkhovich BZ, Prizykienk K, Kloner RA. Role of protein Kinase C as a cellular mediator of ischemic preconditioning: a critical review. *Cardiovasc Res* 1998;40:9-22.
50. Sasaki N, Sato T, Ohler A et al. Activation of mitochondrial ATP-dependent potassium channels by nitric oxide. *Circulation* 2000; 101:439-445.
51. Schulz R, Cohen MV, Behrends M et al. Signal transduction of ischemic preconditioning. *Cardiovasc Research* 2001;52:181-198.
52. Serracino-Inglott F, Virlos IT, Habib NA et al. Adenosine preconditioning attenuates hepatic reperfusion injury in the rat by preventing the down-regulation of endothelial nitric oxid synthase. *BMC Gastroenterol* 2002;20:2-22
53. Vlasov TD, Smirnov DA, Nutfullina GM. Preconditioning of the small intestine to ischemia in rats. *Neurosci Behav Physiol.* 2002;32:449-53.
54. Ricciardi R, Meyers WC, Schaffer BK et al. Protein Kinase C Inhibition Abrogates Hepatic Ischemic Preconditioning Responses. *J Surg Res* 2001;97:144-149.
55. Nakano A, Baines CP, Kim SO et al. Ischemic preconditioning activates MAPKAPK2 in the isolated rabbit heart: evidence for involvement of p38 MAPK. *Circ Res* 2000;86:144-151.
56. Ishikawa Y, Yamamoto Y, Kume M et al. Heat shock preconditioning on mitochondria during warm ischemia in rat livers. *J Surg Res* 1999;87:178-184.
57. Banga NR, Homer-Vanniasinkam S, Graham A et al. Ischaemic preconditioning in transplantation and major resection of the liver. *Br J Surg* 2005; 92: 528-538.
58. Tan Y, Hutchison FN, Jaffa AA. Mechanisms of angiotensin II-induced expression of B2 kinin receptors. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2004;286: 926-932.
59. Kokkonen JO, Lindstedt KA, Kuoppala A et al. Kinin-degrading pathways in the human heart. *Trends Cardiovasc Med* 2000;10:42-45
60. Nolly HL, Carretero OA, Sclicli AJ. Kallikrein release by vascular tissue. *Am J*

Physiol 1993;265:H1209-H1214.

61. Walls TM, Sheehy R, Hartman JC. Role of bradykinin in myocardial preconditioning. *J Pharmacol Exp Ther* 1994;270:681-689.
62. Linz W, Wiemer G, Scholkens BA. Contribution of bradykinin to the cardiovascular effects of ramipril. *J Cardiovasc Pharmacol* 1993;22 Suppl 9:S1-8. Review.
63. Cargnoni A, Ceconi C, Bernocchi P et al. Changes in oxidative stress and cellular redox potential during myocardial storage for transplantation: experimental studies. *J Heart Lung Transplant*. 1999;18: 478–487
64. Nagayasa T, Nagasawa S. Studies of human kininogen: isolation, characterization, and cleavage by plasmakallikrein of highmolecular weight (HMW) kininogen. *J Biochem* 1979;85:249-258.
65. Muller-Esterl W, Iwanaga S, Nakanishi S. Kininogens revisited. *Trend Pharmacol Sci* 1986;11:336-339.
66. Takada Y, Skidgel RA, Erdos EG: Purification of human urinary prokallikrein: identification of the site of activation by the metalloproteinase thermolysin. *Biochem J* 1985;232:851-856.
67. Weiss AS, Gallin JL, Kaplan AP. Fletcher factor deficiency: a diminished rate of Hageman factor activation caused by absence of prekallikrein with abnormalities of coagulation, fibrinolysis, chemotactic activity and kinin generation. *J Clin Invest* 1974;53:622- 633.
68. Cochrane CG, Revak SD, Wuepper D. Activation of Hageman factor in solid and fluid phase: a critical role of kallikrein. *J Exp Med* 1973;138:1564-1583.
69. Griffin JH, Cochrane CG. Mechanism for the involvement of high molecular weight kininogen in surface-dependent reactions of Hageman factor. *Proc Natl Acad Sci* 1976;73:2554-2558.
70. Erdos EG. Some old and some new ideas on kinin metabolism. *J Cardiovasc Pharmacol* 1990;15:20-24.
71. Erdös E, Skidgel R. Metabolism of bradykinin by peptidases in health and disease.

- Farmer S (ed). in the kinin system. San Diego Academic Press; 1997;111–141.
72. Dendorfer A, Wolfrum S, Wellhoner P, Korsman K, Dominiak P. Intravascular and interstitial degradation of bradykinin in isolated perfused rat heart. *Br J Pharmacol* 1997;122:1179–87.
 73. Austin KE, Faussner A, Robinson HE et al. Stable expression of the kinin B1 receptor in Chinese hamster ovary cells. *J Biol Chem* 1997; 271:11420-11425.
 74. Tschöpe C, Heringer-Walther S, Walther T . Regulation of the kinin receptors after induction of myocardial infarction: a mini-review. *Braz J Med and Biol Res* 2000;33: 701-708.
 75. Whalley ET, Clegg S, Stewart JM, Vavrek RJ. The effect of kinin agonists and antagonists on the pain response of human blister base. *Arch Pharmacol* 1987;336:652-655.
 76. Sharma JN, Yusof APM. Pro-inflammatory properties of the kallikrein-kinin system: potential for new drug therapy. *Inflammopharmacology* 1998;6:289-296.
 77. Sharma JN, Yusof APM, Wirth KJ. The kinin antagonist HOE 140 reduces acute paw oedema in rats caused by carrageenan, bradykinin and kaolin. *Inflammopharmacology* 1988;6:9-17.
 78. Jin LS, Seeds E, Page C, Schachter M. Inhibition of bradykinin-induced bronchoconstriction in guinea-pig by a synthetic B2 receptor antagonist. *Br J Pharmacol* 1989;97:598-602.
 79. Sharma JN, Stewart JM, Mohsin SSJ, Katori M, Vavrek R. Influence of a kinin antagonist on acute hypotensive responses induced by bradykinin and captopril in spontaneously hypertensive rats. *Agents Actions* 1992;38:258-269.
 80. Abbas SA, Sharma JN, Yusof APM. Effect of bradykinin and its antagonist on survival time after coronary artery occlusion in rats. *Gen Pharmacol* 1999;33:243-247.
 81. Abbas SA, Sharma JN, Yusof APM. The effect of bradykinin and its antagonist on survival time after coronary artery occlusion in hypertensive rats. *Immunopharmacology* 1999;44:93-98.

82. D'Orleans-Juste P, de Nussi G, Vane JR. Kinins act on B1 or B2 receptors to release conjointly endothelium-derived relaxing factor and prostacyclin from bovine aortic endothelial cells. *Br J Pharmacol* 1989;96:920-926.
83. Webster ME, Gilmore JP. Influence of kallidin-10 on renal function. *Am J Physiol* 1964;206:714-718.
84. McGiff JC, Itskovitz HD, Terrango NA. The action of bradykinin and eledoisin in the canine isolated kidney: relationship to prostaglandins. *Clin Sci Mol Med* 1975;49:125-131.
85. Sharma JN, Kesavarao U, Yusof AP. Altered cardiac tissue and plasma kininogen levels in hypertensive and diabetic rats. *Immunopharmacology* 1999;34:129-132.
86. Shigematsu S, Ihsida S, Gute DC et al. Bradykinin prevents postischemic leukocyte adhesion and emigration and attenuates microvascular barrier disruption. *Am J Physiol* 1999;277:161-171.
87. Linz W, Schölkens BA. Role of bradykinin in the cardiac effects of angiotensin-converting enzyme inhibitors. *J Cardiovasc Pharmacol* 1992;20: 83–90.
88. Martorana P, Kettenbach AB, Breipohl G et al. Reduction of infarct size by local angiotensin-converting enzyme inhibition is abolished by a bradykinin antagonist. *Eur J Pharmacol* 1990;182: 395–396.
89. Hartman JC, Wall TM, Hullinger TG, Shebuski RJ. Reduction of myocardial infarct size in rabbits by ramiprilat: reversal by the bradykinin antagonist HOE 140. *J Cardiovasc Pharmacol* 1993;21: 996–1003.
90. Zhu P, Zaugg CE, Simper D et al. Bradykinin improves postischemic recovery in the rat heart: role of high energy phosphates, nitric oxide, and prostacyclin. *Cardiovasc Res* 1995; 29: 658–663.
91. Kanner J, Harel S, Granit R. Nitric oxide as an antioxidant. *Arch Biochem Biophys* 1991; 289: 130–136.
92. Linz W, Wiemer G, Schölkens BA et al. Role of kinins in the pathophysiology of myocardial ischemia. In vitro and in vivo studies. *Diabetes* 1996; 45: 51–58.
93. Vegh A, Papp JG, Szekeres L, Parratt JR. Prevention by an inhibitor of the L-

- arginine-nitric oxide pathway of the antiarrhythmic effects of bradykinin in anaesthetized dogs. *Br J Pharmacol* 1993;110: 18–19.
94. Vegh A, Szekeres L, Parratt JR. Local intracoronary infusions of bradykinin profoundly reduce the severity of ischemia-induced arrhythmias in anaesthetized dogs. *Br J Pharmacol* 1991; 104: 294–295.
 95. Schuijt MP, Basdew M, van Veghel R et al. AT(2) receptor-mediated vasodilation in the heart: effect of myocardial infarction. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2001; 281: 2590-2596
 96. Schulz R, Post H, Vahlhaus C, and Heusch G. Ischemic preconditioning in pigs, a graded phenomenon: its relation to adenosine and bradykinin. *Circulation*1998;98: 1022–1029.
 97. Zughaib ME, Sun JZ, Bolli R. Effect of angiotensin converting enzyme inhibitors on myocardial ischemia-reperfusion: an overview. *Basic Res Cardiol* 1993;88:155–67.
 98. Hartman JC, Hullinger TG, Wall TM, Shebuski RJ. Reduction of myocardial infarct size by ramiprilat is independent of angiotensin II synthesis inhibition. *Eur J Pharmacol* 1993;234:229–36.
 99. Zhu-Qui Jin, Xiu Chen. Ramipril-induced delayed myocardial protection against free radical injury involves bradykinin B2 receptor-NO pathway and protein synthesis. *Br J Pharmacol* 1998; 125:556-562.
 100. Wang LX, Ideshi M, Yahiro E et al. Mechanism of the cardioprotective effect of inhibition of the renin-angiotensin system on ischemia/reperfusion-induced myocardial injury. *Hypertens Res* 2001;24:179-87.
 101. Sato M, Engelman RM et al. Myocardial Protection by Preconditioning of heart with Losartan, an angiotensin II type 1-receptor blocker: implication of bradykinin-dependent and bradykinin-independent mechanisms. *Circulation* 2000;102:346-351.
 102. Abrahao MS,Montero EF, Jungiera VB, Giavarotti L, Juliano Y, Fagundes DJ. Biochemical and Morphological Evaluation of Ischemia-Reperfusion injury in Rat Small Bowel Modulated by Ischemic Preconditioning. *Transplantation Proc*

2004;36: 860-62.

103. Sun W, Wainwright CL. The potential antiarrhythmic effects of exogenous and endogenous bradykinin in the ischaemic rat heart in vivo. *Coron Artery Dis* 1994;5:541-50.
104. Grisham MB, Everse J, Jansssen HF. Endotoxemia and neutrophil activation in vivo. *Am J Physiol* 1988;254:1017-1022.
105. Chiu CJ, McArdle AH, Brown R et al. Experimental surgery intestinal mucosal lesion in low-flow states a morphological, hemodynamic and metabolic reappraisal. *Arch Surg* 1970; 101:478-483.
106. Collard CD, Gelman S. Pathophysiology, clinical manifestations, and prevention of ischemia-reperfusion injury. *Anesthesiology* 2001;94: 1133-1138.
107. Ladipo JK, Seidel SA, Bradshaw LA et al. Histopathologic changes during mesenteric ischaemia and reperfusion. *West Afr J Med* 2003;22:59-62.
108. Mallick IH, Yang WX, Winslet MC et al. Pyrolidine dithiocarbamate reduces ischemia-reperfusion injury of the small intestine. *World J Gastroenterol* 2005;11:7308-7313.
109. Koti RS, Seifalian AM, McBride AG, Yang W, Davidson BR. The relationship of hepatic tissue oxygenation with nitric oxide metabolism in ischemic preconditioning of the liver. *Faseb J* 2002;16:1654-1656.
110. Pang CY, Neligan P, Zhong A, He W, Xu H, Forrest CR: Effector mechanism of adenosine in acute ischemic preconditioning of skeletal muscle against infarction. *Am J Physiol* 1997;273:8S7-895.
111. Glazier SS, O'Rourke DM, Graham DI, Welsh FA: Induction of ischemic tolerance following brief focal ischemia in rat brain. *J Cereb Blood Flow Metab* 1994;14:545-553.
112. Sakurai M, Hayashi T, Abe K, Aoki M, Sadahiro M, Tabayashi K. Enhancement of heat shock protein expression after transient ischemia in the preconditioned spinal cord of rabbits. *J Vasc Surg* 1998;27:720-725.
113. Turman MA, Bates CM. Susceptibility of human proximal tubular cells to hypoxia:

- effect of hypoxic preconditioning and comparison to glomerular cells. *Ren Fail* 1997; 19:47-60.
114. Du Y, Hicks M, Winlaw D, Spratt P, Macdonald P: Ischemic preconditioning enhances donor lung preservation in the rat. *J Heart Lung Transplant* 1996;15:1258-1267.
 115. Li Y, Roth S, Laser M, Ma JX, Crosson CE: Retinal preconditioning and the induction of heat-shock protein 27. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2003 ; 44: 1299-1304
 116. Aksoyok S, Cinel I, Avian D et al. Intestinal ischemic preconditioning protects the intestine and reduces bacterial translocation. *Shock* 2002;18:476-480.
 117. Sola A, De Oca J, Gonzalez R et al. Protective effect of ischemic preconditioning on cold preservation and reperfusion injury associated with rat intestinal transplantation. *Ann Surg* 2001;234:98-106.
 118. Davis JM, Gute DC, Jones S, Krsmanovic A, Korthuis RJ. Ischemic preconditioning prevents postischemic P-selectin expression in the rat small intestine. *Am J Physiol* 1999;277:2476-2481
 119. Hotter G, Closa D, Prados M et al. Intestinal preconditioning is mediated by a transient increase in nitric oxide. *Biochem Biophys Res Commun* 1996; 222:27-32.
 120. Wu B, Ootani A, Iwakiri R et al. Ischemic preconditioning attenuates ischemia-reperfusion-induced mucosal apoptosis by inhibiting the mitochondria-dependent pathway in rat small intestine. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 2004; 286:580-587.
 121. Unal S, Demirkan F, Arslan E et al. Comparison of ischemic and chemical preconditioning in jejunal flaps in the rat. *Plast Reconstr Surg* 2003; 112:1024-1031.
 122. Sun Z, Glanders K, Lasson A et al. Effective treatment of gut barrier dysfunction using an antioxidant, a PAF inhibitor and monoclonal antibodies against the adhesion molecule PEC AM-1. *J Surg Res* 2002;105:220-233.
 123. Cicalese L, Lee K, Schraut W et al. Pyruvate prevents ischemia-reperfusion

- mucosal injury of rat small intestine. *Am J Surg* 1996; 171:97-100.
124. Nilsson A, Schoenberg MH, Aneman A et al. Free radical and pathogenesis during ischemia and reperfusion of the cat small intestine. *Gastroenterology* 1994; 106: 629-636.
 125. Ariceta J, Ferrer JV, Guerrero D et al: Metabolism of the intestine with intermediate ischemia after intestinal ischemia- reperfusion injury: therapeutic effects of somatostatin *Trans Pro* 1999; 31: 2572.
 126. Riaz AA, Wan MX, Schafer T et al. Allopurinol and superoxide dismutase protect against leucocyte-endothelium interactions in a novel model of colonic ischaemia-reperfusion. *Br J Surg* 2002;89: 572-1580
 127. Downey JM, Cohen MV. Mitochondrial K(ATP) channel opening during index ischemia and following myocardial reperfusion in ischemic rat hearts. *J Mol Cell Cardiol.* 2001;33:651-653.
 128. Yan-Feng W, Gang L, Yan-Ting G. Bradykinin preconditioning induces protective effects on the spinal cord ischemic injury of rats. *Neurosci Lett.* 2008 ; 433:114-118.
 129. Ping A, Chun ZX, Xue XY. Bradykinin preconditioning induces protective effects against focal cerebral ischemia in rats. *Brain Res.* 2005;1059:105-112.
 130. Liuba P, Batra S, Pesonen E, Werner O. Bradykinin preconditions postischemic arterial endothelial function in humans. *J Card Surg* 2005;20:420-424.
 131. Sola A, Rosello-Catafau J, Alfaro V et al.. Modification of glyceraldehyde 3 phosphate dehydrogenase in response to nitric oxide in intestinal preconditioning. *Transplantation.* 1999;67:1446-1452
 132. Sola A, Alfaro V, Pesquero J et al. CO₂ in static mesenteric venous blood during intestinal ischemia and ischemic preconditioning in rats. *Shock.* 2001;16:403-408.
 133. Vejchapitap P, Williams SR, Spitz L et al. Intestinal metabolism after ischemia-reperfusion. *J Ped Surg.* 2000;5:759-764.
 134. Grisham MB, Hernandez CA, Granger N. Xanthine oxidase and neutrophil

- infiltration in intestinal ischemia. *Am J Physiol* 1986;251: 567–574.
135. Ferrer JV, Ariceta J, Guerrero D et al. Allopurinol and N-acetylcysteine avoid 60% of intestinal necrosis in an ischemia-reperfusion experimental model. *Transplant Proc.* 1998; 30:2672.
 136. Ozden A, Tetik C, Bilgihan A, Calli N, Bostanci B, Yis O, Duzcan E. Antithrombin III prevents 60 min warm intestinal ischemia reperfusion injury in rats. *Res Exp Med* 1999;198:237–246.
 137. Buyukgebiz O, Aktan AO, Yegen C et al. Captopril increases endothelin serum concentrations and preserves intestinal mucosa after mesenteric ischemia-reperfusion injury. *Res Exp Med* 1994; 194:339–348.
 138. Lee MA, McCauley RD, Kong SE, Hall JC. Influence of glycine on intestinal ischemia-reperfusion injury. *JPEN J Parenter Enteral Nutr* 2002; 26:130–135.
 139. Stroh R, Christopher TA, Lopez BL et al. L-Propionyl carnitine, an endogenous ester in fatty acid metabolism, exerts anti-shock and endothelial protective effects in rat splanchnic ischemia-reperfusion injury. *Shock* 1998;9:216–222.
 140. Cuzzocrea S, Tailor A, Zingarelli B et al. Lipocortin 1 protects against splanchnic artery occlusion and reperfusion injury by affecting neutrophil migration. *J Immunol* 1997;159:5089–5097.
 141. Yoshida WB, Alasio T, Mazziotta R et al. Effect of alphatocopherol, taurine and selenium on the attenuation of ischemia reperfusion injury of splanchnic organs. *Cardiovasc Surg* 1998;6:178-87.
 142. Hierholzer C, Kalff JC, Audolfsson G et al. Molecular and functional contractile sequelae of rat intestinal ischemia-reperfusion injury. *Transplantation.*1999;15:1244-1254.
 143. Park P.O, Haglund U, Bulkley G.B et al. The sequence of development of intestinal tissue injury after strangulation ischemia and reperfusion. *Surgery.* 1990;107:554.
 144. Mallick IH, Yang W, Winslet MC et al. Ischaemic preconditioning improves microvascular perfusion and oxygenation following reperfusion injury of the

intestine. *B J Surg.* 2005;92:1169-1176.

145. Um JW, Matthews JB, Song JC et al. Role of Protein Kinase C in intestinal ischemic preconditioning. *J Surg Res.* 2005; 124:289-296.

T.C.
ERCIYES ÜNİVERSİTESİ
TIP FAKÜLTESİ DEKANLIĞI'NA

Dr.Fatih DAL'a ait "Sıçanlarda Oluşturulan Deneysel İntestinal İskemi Reperfüzyon Modelinde Bradikinin Önkoşullandırmasının Ekileri 'adlı uzmanlık tezi, jürimiz tarafından Genel Cerrahi Ana Bilim Dalı'nda Tıpta Uzmanlık Tezi olarak kabul edilmiştir.

Tarih : 06 / 06 / 2008

İmza

Başkan : Prof. Dr. Yücel ARITAŞ

Üye : Prof. Dr. Erdoğan SÖZÜER

Üye : Prof. Dr. Turhan ÖKTEN

Üye : Doç. Dr. Engin OK

Üye : Doç. Dr. Can KÜÇÜK