

**T.C.
BÜLENT ECEVİT ÜNİVERSİTESİ
TIP FAKÜLTESİ
GENEL CERRAHİ ANABİLİM DALI**

**RATLARDA İNTESTİNAL İSKEMİ REPERFÜZYON HASARI
MODELİNDE HUMANİNİN OLASI ANTI-APOPTOTİK VE ANTI-
İNFLAMATUAR ETKİLERİNİN ARAŞTIRILMASI**

Dr. Selçuk ÖZKAN

TIPTA UZMANLIK TEZİ

**TEZ DANIŞMANI
Prof. Dr. Mustafa CÖMERT**

ZONGULDAK

2016

**T.C.
BÜLENT ECEVİT ÜNİVERSİTESİ
TIP FAKÜLTESİ
GENEL CERRAHİ ANABİLİM DALI**

**RATLARDA İNTESTİNAL İSKEMİ REPERFÜZYON HASARI
MODELİNDE HUMANİNİN OLASI ANTI-APOPTOTİK VE ANTI-
İNFLAMATUAR ETKİLERİNİN ARAŞTIRILMASI**

Dr. Selçuk ÖZKAN

TIPTA UZMANLIK TEZİ

**TEZ DANIŞMANI
Prof. Dr. Mustafa CÖMERT**

ZONGULDAK

2016

TEZ ONAY TUTANAĞI

Tezin Teslim Edildiği Üniversite/Fakülte: Bülent Ecevit Üniversitesi Tıp Fakültesi

Tez Başlığı : Ratlarda intestinal iskemi reperfüzyon hasarı modelinde Humaninin olası anti-apoptotik ve anti-inflammatuar etkilerinin araştırılması


Tez Yazarı : Arş. Gör. Dr. Selçuk ÖZKAN

Tez Savunma Tarihi : 16/11/2016

Tez Danışmanı : Prof.Dr. Mustafa CÖMERT

Prof.Dr. Güldeniz KARADENİZ ÇAKMAK
Jüri Başkanı


Prof.Dr. Mustafa CÖMERT


Prof.Dr. Öge TAŞÇITAR

UYGUNDUR

Prof. Dr. Selçuk ÖZKAN
Dekan Vekili

ÖNSÖZ

Uzmanlık eğitim süresince eğitimimde büyük katkıları olan, tezimin hazırlanmasında bilgi ve tecrübeleri ile bana destek olan tez danışmanım Prof. Dr. Mustafa CÖMERT'e, Genel Cerrahi Anabilim Dalı Başkanı Prof. Dr. Güldeniz KARADENİZ ÇAKMAK'a ve değerli hocalarım; Prof. Dr. Öge TAŞCILAR, Doç. Dr. Hamdi Bülent UÇAN, Doç. Dr. Ali Uğur EMRE, Doç. Dr. Kemal KARAKAYA ve Doç. Dr. Fatma Ayça GÜLTEKİN'e teşekkür ederim.

Tezimin hazırlanmasındaki değerli katkıları için Bülent Ecevit Üniversitesi Patoloji Anabilim Dalı Öğretim Üyesi Doç. Dr. Burak BAHADIR, Biyoistatistik Anabilim Dalı Öğretim Üyesi Yrd. Doç. Dr. Fürüzan Köktürk ve Muğla Sıtkı Koçman Üniversitesi Tıbbi Biyokimya Anabilim Dalı Öğretim Üyesi Doç. Dr. Ümmühan ÖZEL TÜRKÇÜ'ye teşekkürü bir borç bilirim.

Bülent Ecevit Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinatörlüğü'ne 2013-86982119-02 nolu tez projeme verdikleri destek için teşekkür ederim.

Ayrıca asistanlık eğitimim süresince birlikte çalışma şansı bulduğum kardeşlerim; Dr. Ali GENÇOĞLU, Dr. Sezgin MUTLU, Dr. Turan Eray SEVEN, Dr. Yücel KARADERE'ye ve tüm genel cerrahi personeline ayrı ayrı teşekkür ederim.

Tüm hayatım boyunca beni destekleyen değerli aileme, asistanlık dönemimde zaman zaman ihmal ettiğim çocuklarım Elif ve Ahmet Barlas'a ve desteğini daima hissettiğim eşim Kudret ÖZKAN'a göstermiş oldukları anlayış ve hoşgörülerini için çok teşekkür ederim.

Dr. Selçuk ÖZKAN

Zonguldak, 2016

ÖZET

Selçuk Özkan, Ratlarda İntestinal İskemi Reperfüzyon Hasarı Modelinde Humaninin Olası Anti-apoptotik ve Anti-inflamatuar Etkilerinin Araştırılması, Bülent Ecevit Üniversitesi Tıp Fakültesi, Genel Cerrahi Uzmanlık Tezi, Zonguldak, 2016.

İntestinal iskemi/Reperfüzyon (İ/R) hasarı, mezenter arter embolisi, ciddi travmalar, majör vasküler ve abdominal cerrahiler sırasında/sonrasında görülebilmektedir. Özellikle akut mezenter iskemi sonrasında yüksek oranlarda mortalite bildirilmiştir.

İn-vitro ve in-vivo çalışmalarda, Humaninin (HN) anti-apoptotik, anti-inflamatuar ve anti-oksidatif etkileri gösterilmiştir. HN'in 14. pozisyonda serin/glisin değişikliği ile elde edilen analogu (HNG) daha fazla sitoprotektif etkiye sahiptir. HN'nin intestinal İ/R hasarı üzerindeki etkileri ile ilgili yayınlanmış herhangi bir çalışma bulunmamaktadır. Bu çalışmada HNG'in deneysel intestinal İ/R hasarına etkileri araştırılmıştır.

Çalışma her grupta 8 rat olacak şekilde 4 grupta yapıldı. Tüm gruplarda süperior mezenterik arter (SMA) diseke edildi. Kontrol grubunda (Grup K) ek işlem yapılmadan 3. saatte ince bağırsak doku örneği alındı. İ/R grubunda SMA klemplenerek 60 dk iskemi, ardından 120 dk reperfüzyon sağlandıktan sonra ince bağırsak doku örneği alındı. 3. gruba İ/R grubundan farklı olarak iskemiden 1 saat önce 2 mg/kg dozdan (HİR grubu), 4. gruba ise HİR grubundan farklı olarak reperfüzyondan 10 dk önce 2 mg/kg dozdan HNG intraperitoneal olarak verildi (HİHR grubu).

Reperfüzyon hasarının belirlenmesinde histopatolojik analizde Chiu'nun mukozal iskemi skalası, apoptozisin değerlendirilmesinde apoptotik hücre sayımı, biyokimyasal analizde doku süperoksit dismutaz (SOD) aktivitesi ve ileri düzey oksidasyon protein ürünleri (AOPP) düzeyi değerlendirildi. $p < 0,05$ değeri anlamlı kabul edildi.

Mukozal hasar HİR ve HİHR gruplarında İ/R grubuna göre azalmış olsa da, fark istatistiksel olarak anlamlı değildi ($p=0,088$). Anti-apoptotik etki HİR ve HİHR gruplarında gözlenmesine rağmen, istatistiksel olarak sadece HİHR ve İ/R

gruplarının karşılaştırılmasında anlamlı fark görüldü ($p<0.05$). SOD ve AOPP düzeyleri açısından gruplar arasında anlamlı fark izlenmedi ($p=0.620/p=0,690$).

Bu çalışmada İ/R modelinde uygulanan HNG'nin İ/R hasarını önlemede koruyucu etkileri olduğunu, ancak istatistiksel anlama ulaşmadığını gördük. HN'in intestinal İ/R hasarına etkilerinin daha geniş örneklem gruplarında çalışılması uygun olacaktır.

Anahtar Sözcükler: İntestinal, İskemi, İskemi reperfüzyon hasarı, Humanin, Apoptozis.

Bu çalışma Bülent Ecevit Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinatörlüğü tarafınca desteklenmiştir. (Bilimsel Araştırma Proje No: 2013-86982119-02)

ABSTRACT

Özkan Selçuk, The Evaluation of Possible Anti-inflammatory and Anti-apoptotic Effects of Humanin in a Rat Model of Intestinal Ischemia/Reperfusion Injury, Thesis of the Bulent Ecevit University Medical School, Department of General Surgery, Zonguldak, 2016.

Intestinal ischemia/reperfusion (I/R) injury can be seen during/after mesenteric artery embolism, severe trauma, major vascular and abdominal procedures. High mortality rates have been reported, especially after acute mesenteric ischemia.

Anti-apoptotic, anti-inflammatory and anti-oxidative effects of humanin (HN) have been demonstrated in in vitro and in vivo studies. HNG is an analog obtained by serine/glycine substitution at the 14th position of HN and its cytoprotective effect is greater. There is no published study on the effects of HN on intestinal I/R injury. The effect of HNG on experimental intestinal I/R injury was investigated in this study.

The study was performed in 4 groups as 8 rats in each group. Superior mesenteric artery (SMA) was dissected in all groups. No additional treatment was performed in the control group (Group K) and a sample of small intestine tissue was taken at the 3rd hour. In the I/R group, small intestine tissue samples were taken after SMA clamping for 60 min and then 120 min reperfusion. Unlike I/R group, group 3rd was given intraperitoneal HNG 2 mg/kg dose 1 hour before ischemia (Group HIR). Group 4 was additionally administered intraperitoneally with HNG 2 mg /kg dose 10 minutes before reperfusion (Group HIHR).

In histopathological evaluation, Chiu's mucosal ischemia scale was used to determine reperfusion damage. Apoptotic cell count was used in the evaluation of apoptosis. Tissue superoxide dismutase (SOD) activity and advanced oxidation protein products (AOPP) levels were used in biochemical analysis. A value of $p < 0.05$ was considered significant.

Although the mucosal damage was decreased in the HIR and HIHR groups compared to the I/R group, the difference was not statistically significant ($p=0,088$). Anti-apoptotic effect was observed in HIR and HIRR groups, but statistically significant difference was observed in only comparison of HIRR and I/R groups ($p < 0.05$). There

was no significant difference between groups in terms of SOD and AOPP levels (p=0.620/p=0.690).

In this study, we observed that HNG had cytoprotective effects in preventing I/R injury, but the difference did not reach statistical significance. The effects of HN on intestinal I/R injury should be studied in larger sample groups.

Keywords: Intestinal, Ischemia, Ischemia Reperfusion Injury, Humanin, Apoptosis.



İÇİNDEKİLER

	<u>Sayfa</u>
ÖZET.....	iii
ABSTRACT.....	v
İÇİNDEKİLER	vii
SİMGELER VE KISALTMALAR.....	ix
ŞEKİL DİZİNİ	xi
TABLO DİZİNİ	xii
RESİM DİZİNİ	xiii
1. GİRİŞ	1
2. GENEL BİLGİLER	2
2.1. İnce Bağırsak Anatomisi	2
2.2. İnce Bağırsak Histolojisi	3
2.3. İskemi/Reperfüzyon	4
2.3.1. Serbest radikaller	6
2.3.2. Polimorf nüveli lökositler	9
2.3.3. Kompleman sistemi	13
2.3.4. Endotel hücrelerinin rolü.....	14
2.4. Antioksidanlar	16
2.4.1. Endojen antioksidanlar	17
2.4.2. Ekzojen antioksidanlar.....	17
2.5. Humanin	18
2.5.1. Etki mekanizması.....	18
2.5.2. Ratlarda doku dağılımı ve farmakokinetiği	19
3. MATERYAL VE METOD	20
3.1. Deney Hayvanları.....	20
3.2. Cerrahi Prosedür.....	20
3.3. Histopatolojik İnceleme	22
3.3.1. Mukozal iskemi tayini	22
3.3.2. Apoptozis tayini.....	22

3.4. Biyokimyasal Analiz.....	23
3.4.1. SOD aktivite tayini	23
3.4.2. AOPP tayini	23
3.4.3. Protein tayini.....	23
3.5. İstatistiksel Analiz	24
4. BULGULAR.....	25
4.1. Histopatolojik Bulgular	25
4.1.1. Kontrol grubu.....	25
4.1.2. İskemi-Reperfüzyon grubu	25
4.1.3. Humanin-İskemi-Reperfüzyon grubu	25
4.1.4. Humanin-İskemi-Humanin-Reperfüzyon grubu.....	26
4.2. Apoptozis Tayini	30
4.3. Biyokimyasal Parametreler	32
4.3.1. SOD aktivite tayini	32
4.3.2. Aşırı okside olmuş protein ürünleri	32
5. TARTIŞMA	33
6. SONUÇ	39
7. KAYNAKLAR	40
8. EKLER.....	52
Ek 1: Etik Kurul Onayı.....	52

SİMGELER VE KISALTMALAR

AMİ	Akut mesenter iskemi
AMP	Adenozin monofosfat
AOPP	İleri düzey oksidasyon protein ürünleri
ATP	Adenozin trifosfat
Ca ²⁺	Kalsiyum
C3a	Kompleman 3a
ÇOY	Çoklu organ yetmezliği
DNA	Deoksiribonükleik asit
ET	Endotelin
GSH-Px	Glutasyon peroksidaz
Grup HİHR	Humanin+İskemi+Humanin+Reperfüzyon grubu
Grup HİR	Humanin+İskemi+Reperfüzyon grubu
Grup İR	İskemi reperfüzyon grubu
H&E	Hemotoksilen-Eozin
H ₂ O ₂	Hidrojen peroksit
HOCl	Hipoklor radikali
HN	Humanin
HOCl	Hipoklor radikali
ICAM-1	İntraselüler adezyon molekülü 1
IgG	İmmunoglobulin G
IL-1	İnterlökin 1
İÖK	İskemik ön koşullama
İ/R	İskemi/reperfüzyon
KDH	Ksantin dehidrojenaz
KO	Ksantin oksidaz
KPO ₄	Potasyum fosfat
LT-B ₄	Lökotrien B ₄
MDA	Malonildialdehit
MPO	Myeloperoksidaz
Na ⁺	Sodyum

NAD ⁺	Okside nikotinamid adenin dinükleotidi
NADPH	İndirgenmiş nikotinamid adenin dinükleotid fosfatı
Na ⁺ , K ⁺ ATPaz	Sodyum-potasyum pompası
NO	Nitrik oksit
NOMİ	Non-okluziv mezenterik iskemi
NOS	Nitrik oksit sentetaz
O ₂	Oksijen
O ₂ ⁻	Süperoksit radikali
OH ⁻	Hidroksil radikali
PAF	Trombosit aktive edici faktör
pAMPK	Fosforile adenzin monofosfat ile aktive olan kinaz
PECAM-1	Trombosit endotel hücresi adezyon molekülü 1
pENOS	Fosforile endotelial nitrik oksit sentetaz
PG	Prostaglandin
PMNL	Polimorf nüveli lökositler
ROS	Reaktif oksijen türleri
SIRS	Sistemik inflamatuvar cevap sendromu
SMA	Süperior mesenterik arter
SOD	Süperoksit dismutaz
SOR	Serbest oksijen radikalleri
TNF α	Tümör nekroz an faktör alfa

ŞEKİL DİZİNİ

Sayfa

Şekil 1. SMA dalları, İnce bağırsağın arteriyal beslenmesi	3
Şekil 2. Moleküler oksjienden serbest radikal oluşumu ve nitrik oksit ile ilişkisi	7
Şekil 3. Serbest oksijen radikallerinin doku hasarı oluşturma yolları.....	9
Şekil 4. Lökositlerin damar dışına çıkışının şematizasyonu	11
Şekil 5. İ/R hasarında yer alan olaylar dizisi.....	16



TABLO DİZİNİ

	<u>Sayfa</u>
Tablo 1. Chiu'nun Mukozal İskemi Skalası.....	22
Tablo 2. Chiu'nun iskemi skalasına göre grupların karşılaştırılması.....	26
Tablo 3. Apoptotik hücre sayımına göre istatistiksel analiz sonuçları.....	30
Tablo 4. Doku SOD aktivite tayinine göre istatistiksel analiz sonuçları	32
Tablo 5. Doku AOPP düzeylerine göre istatistiksel analiz sonuçları	32



RESİM DİZİNİ

	<u>Sayfa</u>
Resim 1. Laparatomisi.....	21
Resim 2. İnce bağırsak damarlanması.....	21
Resim 3. SMA'nın klemlenmesi.....	21
Resim 4. İskemiye giden bağırsaklar.....	21
Resim 5. K grubunda normal ince bağırsağın tam kat görünümü (Chiu 0) (H&E, x100).....	27
Resim 6. K grubunda kapiller konjesyon ile birlikte villusun tepe kısmında subepitelyal Gruenhagen boşluğu (oklar) (Chiu 1) (H&E, x200).	27
Resim 7. İR grubunda villusların her iki yanına da uzanacak şekilde epitelin lamina propriadan ayrılması (oklar) (Chiu 3) (H&E, x200).....	28
Resim 8. İR grubunda döşeyici epitelin dökülmesi ile karakterize çıplak villuslar (Chiu 4) (H&E, x200).	28
Resim 9. İR grubunda villusların ve döşeyici epitelin tamamen kaybı ile birlikte lamina propriada yaygın hemoraji (Chiu 5) (H&E, x200).	29
Resim 10. HİR ve HİHR grubunda daha belirgin subepitelyal boşluk (oklar) (Chiu 2) (H&E, x200).	29
Resim 11. Kontrol grubunda apoptotik hücre (ok) (H&E, x400).	31
Resim 12. HİR grubunda apoptotik hücreler (ok) (H&E, x400).....	31

1. GİRİŞ

İntestinal iskemi/reperfüzyon (İ/R) hasarı, mezenter arter embolisi, ciddi travmalar, major vasküler ve abdominal cerrahiler sırasında veya sonrasında görülebilmektedir. Mezenterik İ/R ise sepsis, sistemik inflamatuvar cevap sendromu (SIRS) ve çoklu organ yetmezliğine (ÇOY) neden olmaktadır. Özellikle akut mezenter iskemi (AMİ) sonrasında hastalarda %60-80 gibi çok yüksek oranlarda mortalite bildirilmiştir (1). İskemi sırasında kanın dağılımındaki bozulma, oksijen (O₂) ve glikozun dokulara dağılımında azalmaya, takibinde kan akımında düzelme ise serbest oksijen radikallerinin oluşmasına neden olmaktadır.

İntestinal lümen çok sayıda kommensal yaşayan bakteriye konak görevi görmekte ve bu bakterilerin vücuttan izolasyonu, intestinal lümende bulunan epitelyal hücrelerinin bariyer fonksiyonu ile sağlanmaktadır. Enterik bakteriler İ/R hasarına bağlı indüklenen lokal inflamasyon ve end-organ disfonksiyonunda hayati öneme sahiptirler (2). Enerji depleksiyonu ve hücre ölümüne bağlı olarak epitelyal hücre ve bariyer disfonksiyonu meydana gelmektedir. Hücre apoptozisi, İ/R hasarında intestinal mukozal bütünlüğü etkileyerek bariyer fonksiyonun bozulmasına buna bağlı olarak da bakteriyel translokasyona ve çoğu mortal seyreden komplikasyonların gelişimine neden olmaktadır (1).

Apoptozis, İ/R hasarıyla indüklenen intestinal epitelyal hücre hasarlanmasına neden olan hücre ölümlerinde altta yatan önemli nedenlerden biridir. Ayrıca, profilaktik anti-apoptotik tedavilerin İ/R hasarına karşı efektif bir tedavi seçeneği olabileceği çeşitli çalışmalarda gösterilmiştir (3).

Humanin (HN) insan vücudunda endojen olarak bulunan bir peptid olup, özellikle Alzheimer hastalığı ilişkili proteinlerin neden olduğu hasara karşı nöronları koruduğu çok iyi bilinmektedir. Bu etkiyi antia-poptotik mekanizmalar üzerinden sergilediği gösterilmiştir. Takip eden çalışmalarda HN'nin serebral ve miyokardiyal İ/R modellerinde anti-apoptotik etkilerin yanı sıra anti-oksidatif ve anti-inflamatuvar mekanizmalar üzerinden koruyucu etkisi olduğu gösterilmiştir (4-6).

Bu çalışmada, kalpte ve beyinde oluşan İ/R hasarında, anti-apoptotik, anti-oksidatif ve anti-inflamatuvar mekanizmalar ile koruyucu etkisi gösterilen HN'nin intestinal İ/R hasarında koruyucu etkisi araştırılmıştır.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. İnce Bağırsak Anatomisi

İnce bağırsaklar sindirim sisteminin pilor ile çekum arasındaki kısmını oluşturmaktadır. Ortalama 4-6 m uzunluğundadır. İnce bağırsaklar batin içinde orta, alt kısımda yer alır. Önde omentum majus ve karın duvarı ile komşudur (7,8).

Duodenum, jejunum ve ileum olmak üzere ince bağırsaklar üç kısımda incelenir. Duodenum ince bağırsağın en kısa parçası olup, pilor ile treitz ligamanı arasındaki ilk parçasıdır. Jejunum ve ileum ise treitz ligamanından sonraki kısım olup çekuma kadar devam ederler. Jejunum ve ileum mesenter isimli periton yaprağı ile retroperitona asılıdır. Jejunum ile ileumu ayırmaya yarayan belirgin bir yapı yoktur. İnce bağırsağın proksimal %40'ını jejunum, distal %60'luk kısmını ileum oluşturduğu kabul edilmektedir (7,8).

İnce bağırsaklar valvulae connivantes olarak adlandırılan, besinlerin geçişini yavaşlatarak emilimi artıran mukozal katlantılara sahiptir. Valvulae connivantes ince bağırsağın proksimal kısmında daha belirginken distalde giderek azalır ve ileum son kısımlarında tamamen kaybolur. İnce bağırsak mukozasında folliculi lymphatici aggregati (Peyer's plakları) adı verilen lenfoid foliküller vardır. Peyer's plakları ileumda jejunumdan daha fazla sayıda bulunmaktadır (8).

Mesenter ince bağırsakların batin içinde serbest şekilde hareketine izin verir. Mesenter karın arka duvarına radiks mesenterisi ile tutunur. Radiks mesenterisi 2. lumbal vertebranın sol tarafından sağ sakroiliak ekleme kadar uzanır. Mesenter içinde süperior mesenterik arter ve venin jejunal ve ileal dalları, lenfatikler, lenf nodları ve yağ doku bulunur.

Duodenumun kanlanması büyük oranda çölyak trunkus ve süperior mesenterik arterin dalları ile sağlanır. Jejunum ve ileum ise süperior mesenterik arterden (SMA) gelen jejunal ve ileal dallardan beslenmektedir (Şekil 1). Venleri, arterleri ile birlikte seyredip süperior mesenterik vene drene olur. Lenfatik akım ise süperior mesenterik lenf nodlarına olur.

İnce bağırsakların sempatik ve parasempatik uyarımı nervus vagus ve nervus splanchnikus tarafından sağlanır (7,8).

2.3. İskemi/Reperfüzyon

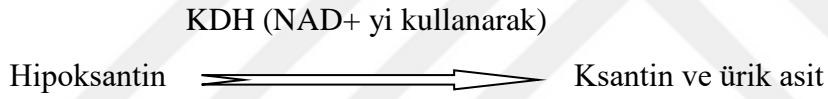
Dokunun canlılığını sürdürmesi için gerekli olan arteriyel veya venöz akımın bozulması sonucu, oksijen ve besinlerin dokuya ulaştırılmaması, metabolizma sonucu ortaya çıkan toksik metabolitlerin ortamdaki uzaklaştırılmaması iskemi olarak tanımlanmaktadır. Normal şartlarda hücre için gerekli enerji aerobik metabolizma ile sağlanırken, oksijen yetersizliğinde anaerobik metabolizma ile sağlanmaya çalışılır. Enerji üretiminin hücre tarafından efektif sağlanamaması sonucu hücre içi enerji depoları boşalır, toksik metabolitler ortamdaki uzaklaştırılmaz ve hücre hasarına neden olur. Reperfüzyon ile oksijenizasyon ve toksik metabolitlerin ortamdaki uzaklaştırılmasıyla iskemi düzeltilir. İlginç bir şekilde reperfüzyon hücrede sadece iskeminin yol açtığı hasara göre daha ciddi bir hasara neden olur (12-13). Reperfüzyon sonrası hasarda birçok mekanizma rol alsa da, hasardan başlıca serbest oksijen radikalleri (SOR) sorumludur. İskemi sırasında meydana gelen moleküler ve biyokimyasal değişiklikler SOR aracılı hasara zemin hazırlar. Hücrede bu hasara en duyarlı yapılar; hücre membran lipitleri, proteinler ve nükleik asit molekülleridir (14).

Septik, hemorajik ya da travmatik şok, ciddi yanıklar sonrası ya da aort anevrizma cerrahisi, ince bağırsak transplantasyonu, kardiyopulmoner bypass gibi uzamış ince bağırsak iskemisine yol açan cerrahi prosedürler sonrası meydana gelen intestinal İ/R hasarı yüksek morbidite ve mortaliteye neden olabilir. Batın içi organlar arasında ince bağırsaklar İ/R hasarına en duyarlı organdır (15-16). Bağırsaklar iskemi atakları ile kolayca hasarlanan labil hücrelerden oluşmaktadır. Reperfüzyon mukoza hasarı ile sonuçlanır. Ayrıca, bağırsak mukozası tarafından salgılanan akut faz proteinleri, sitokinler ve hormonlar sadece bağırsağı etkilemez, uzak organların fonksiyonlarını da etkileyebilir. (17).

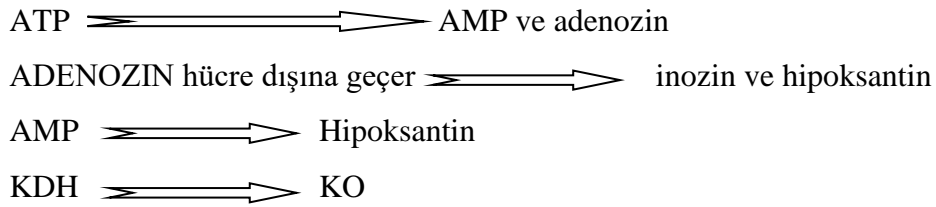
Hücre canlılığının sürdürülmesi için gerekli olan adenozin trifosfat (ATP) üretilen mitokondri, iskemik hücrede ilk etkilenen organdır. İskemi ile birlikte hücrede yüksek enerjili fosfat sentezi azalır. Enerji yetersizliği nedeni ile hücre zarındaki sodyum-potasyum pompası (Na^+ , K^+ ATPaz) inhibe olur ve hücre içi sodyum (Na^+) ve kalsiyum (Ca^{+2}) birikmesine yol açar. Hücre içi Ca^{+2} birikimi sitotoksiktir. Hücre içi Ca^{+2} artışı; fosfolipaz, proteaz, ATPaz ve endonükleazları aktive ederek hücre hasarına neden olur (18,19).

İskemi sürecinde ATP artmış enerji açığı nedeni yıkılarak adenozin monofosfat (AMP) ve adenozin oluşur. Adenozin ise hücre dışına çıkarak inozin ve hipoksantine metabolize olur. Hipoksik ortam ve artmış hücre içi Ca^{+2} 'un aktive ettiği proteazlar ksantin dehidrojenazın (KDH) SOR'un üretimine neden olan ksantin oksidaza (KO) dönüşümünü aktive eder. Normal şartlarda hipoksantin elektron alıcı olarak okside nikotinamid adenin dinükleotidi (NAD^+) kullanarak ürik asite metabolize olur. Reperfüzyonun sağlanması ile oksijen varlığında ise hipoksantin KO enzimiyle tepkimeye girerek süperoksit anyonu (O_2^-) ve hidrojen peroksit (H_2O_2) gibi SOR oluşumuna neden olur (19). Ayrıca iskemi süresince endotelin (ET), tromboksan A2 gibi bioaktif bileşiklerin ve proinflamatuvar sitokinlerin yapımında artış gözlenirken, yapısal nitrik oksit sentetaz (NOS) ve siklooksijenaz-2 gibi koruyucu gen ürünlerinin sentezinde azalma gözlenir. Sonuç olarak iskeminin yarattığı proinflamatuvar durum doku yaralanmasını daha da artırır (20).

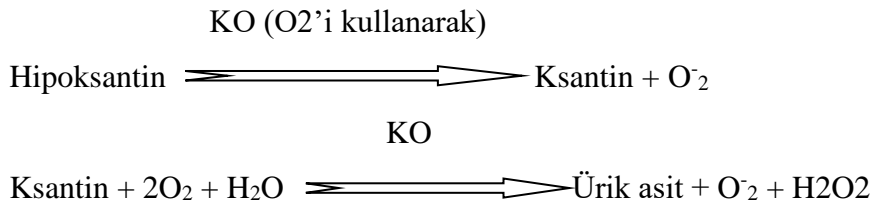
Normal şartlarda:



İskemide:



Reperfüzyon ile:



Geri dönüşsüz hücre hasarının gerçekleşmemesi için dokuya kan akımının tekrar sağlanması gerklidir. Fakat reperfüzyon sürecinde dokuda iskemik hasardan daha fazla hasar meydana gelebilmektedir. İskeminin süresi ve yoğunluğuna bağlı olarak reperfüzyon hasarı daha da artabilir (21).

İ/R hasarının fizyopatolojisinden karmaşık birtakım hücrel ve hümoral mekanizmalar sorumludur (22). İ/R hasarının oluşumunda serbest oksijen radikalleri, polimorf nüveli lökositlerin (PMNL) neden olduğu hasar, kompleman sistemi ve endotel hücreli sorumlu tutulmaktadır.

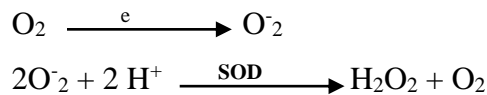
2.3.1. Serbest radikaller

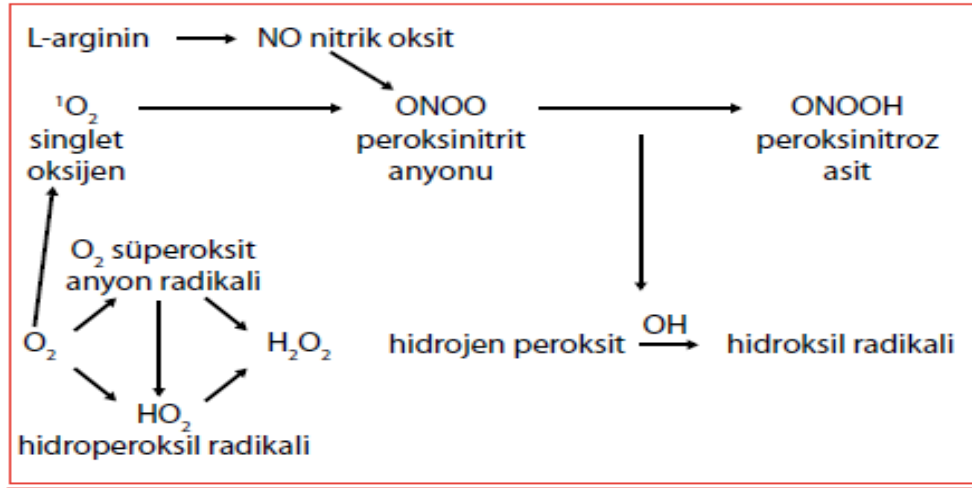
Serbest radikallerin biyolojik sistemlerde varlığı ilk defa 1956'da Denham Harman tarafından gösterilmiştir (23). Serbest radikallerin hücredeki lipid, protein, deoksiribonükleik asit (DNA) ve diğer biyomoleküller ile oksijenin etkileşimleri sonucu ortaya çıkan oksidatif hasarla ilgili çalışmalar yapılmıştır (24).

Oksijen yaşamın sürdürülmesi için gerekli bir molekül olmasına rağmen oksijen metabolizmasıyla ortaya çıkan reaktif oksijen türleri canlıya zarar verme potansiyeline sahiptir. Serbest radikaller yörüngelerinin son halkasında eşlenmemiş elektron içeren reaktif ve kısa ömürlü moleküllerdir. Canlıda, fizyolojik şartlarda serbest radikallerin kaynakları; oksijen, nitrik oksit (NO), mitokondriyal elektron transport sistemi, peroksizom, endoplazmik retikulum, hücre membranı ve aktive olmuş nötrofillerdir.

Organizmada oluşan serbest radikaller yüksek oranda oksijenden oluşmaktadır. Solunumla alınan oksijenin büyük kısmı mitokondrielerde enerji metabolizması için kullanılırken, %5'lik küçük bir kısmı toksik serbest oksijen radikallerine dönüşür. Yaşam süresince dokular sürekli olarak SOR ile karşılaşmaktadır (Şekil 2) (25). Mitokondrieler SOR'un esas üretildiği yer olup, aynı zamanda SOR'a en fazla maruz kalan organeldir (26).

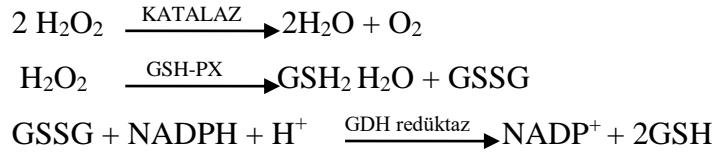
Oksijen molekülünün kısmi indirgenmesi ile reaktif oksijen türlerinden (ROS) O_2^- , H_2O_2 ve hidroksil radikali (OH^-) ortaya çıkar. Süperoksit radikali, moleküler O_2 'ye indirgeyici bir ajandan bir elektron ilavesi ile ortaya çıkmaktadır. O_2^- antioksidan bir enzim olan süperoksit dismutaz (SOD) ile H_2O_2 'ye indirgenmektedir (27).



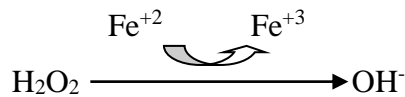


Şekil 2. Moleküler oksijenden serbest radikal oluşumu ve nitrik oksit ile ilişkisi (26).

O_2 'nin önemi serbest radikal olarak direk hasar verici etkisinden ziyade H₂O₂ için kaynak olması ve geçiş metal iyonlarının indirgeyicisi olmasından kaynaklanır. H₂O₂, yapısında eşlenmemiş elektron bulundurmadığı için serbest radikal değildir. Normal dokuda indirgenme sonucu oluşan H₂O₂ antioksidan enzimlerden glutatyon peroksidaz (GSH-Px) ve katalaz tarafınca toksik olmayan son ürünlere dönüştürülmektedir.



H₂O₂, geçiş metallerinin varlığında ise fenton reaksiyonu ile toksik hidroksil radikaline dönüştürülür (27).



OH[•], ortamda her türlü molekül ile etkileşime giren, bilinen en reaktif serbest radikaldir. OH[•], hücrede bulunan protein, karbonhidrat, lipidler ve DNA gibi makromoleküllerle etkileşime girerek oksitadif hasara yol açar. Makromoleküller hücrede az miktarda bulduklarından hasarlanmaları hücre için çok önemlidir. Organizmada hidroksil radikal süpürücüsünün etkili olabilmesi için dokuda yüksek

konsantrasyonlarda bulunması gerektiğinden hidroksil radikalının oluşumunun engellenmesi süpürülmesinden daha etkilidir (28).

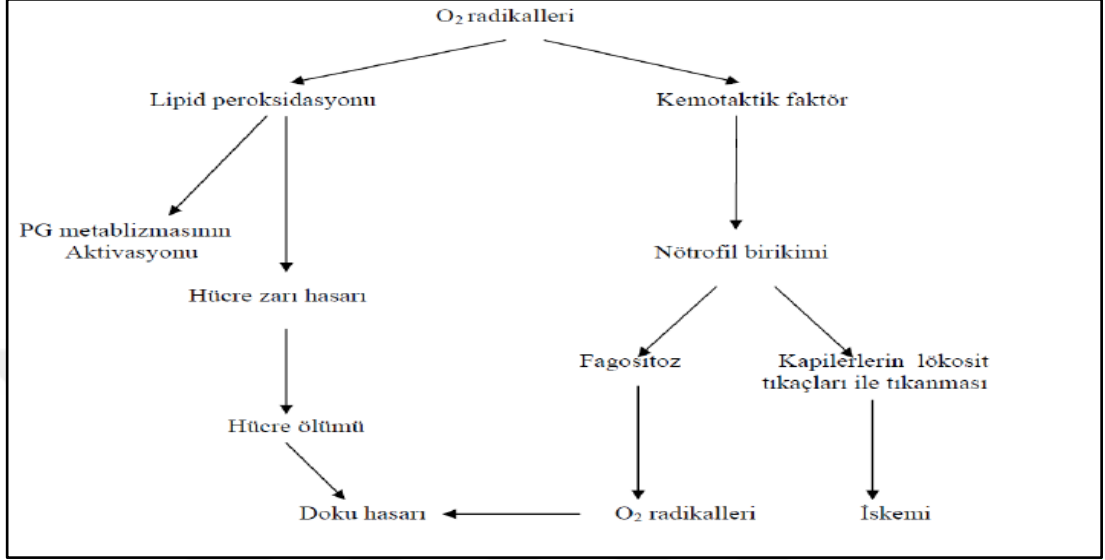
Serbest radikallere karşı en hassas hücre bileşeni lipitlerdir. Serbest radikaller hücre zarında bulunan kolesterol ve yağ asitlerinin doymamış bağları ile tepkimeye girerek peroksidasyon ürünleri oluşturur. Hücre için oldukça zararlı olan ve lipit peroksidasyonu olarak bilinen poliansatüre yağ asitlerinin oksidatif yıkımı zincir reaksiyonu şeklinde devam eder. Lipid peroksidasyonu ile oluşan yeni radikallerin etkisiyle fosfolipaz A₂ aktive olur ve lipid peroksidasyonu devam eder. Lipid peroksidasyonu sonucu ortaya aldehytler, ketonlar, alkanlar, alkenler ve karboksilik asitler çıkar (29). Malonildialdehit (MDA) gibi son ürünler ölçülerek peroksidasyon şiddeti belirlenebilir (30).

Proteinler, lipitler kadar olmasa da serbest radikallerden etkilenirler. Proteinlerin serbest radikal hasarı aminoasit kompozisyonları ile ilişkilidir. Serbest radikallerle etkileşen disülfid bağdan zengin yapıdaki immunoglobulin G (IgG), albumin ve hemoglobin gibi proteinlerin tersiyer yapıları bozulur. Hücrede bulunan enzim ve reseptör yapıdaki proteinlerin oksidasyonu nedeniyle yapılarının bozulması, önemli hücre fonksiyonlarında bozulmaya yol açar. Serbest radikaller nükleotid yapısında bulunan pürin ve pirimidin bazlarını etkilerler. Özellikle guaninin hidroksilasyonu ile mutasyonlar meydana gelmektedir. Mutasyonlar neticesinde hücre hasarı ile hücre ölümü gerçekleşebilir (29).

İleri düzey oksidasyon protein ürünleri (AOPP; Advanced oxidation protein products) ilk defa Witko-Sarsat ve ark. tarafınca 1996 yılında üremik hastalarda bulunmuştur (31). Ditirozin içeren çapraz bağlı protein ürünleri olarak tanımlanan AOPP, protein hasarının tespitinde güvenilir bir beliteçtir (32). AOPP organizmada miyeloperoksidaz (MPO) tarafınca oluşturulan hipoklorik asit (HOCl) ile proteinlerin amin gruplarının tepkimesi ile oluşur. Bakteri, virüs ve tümör hücrelerine karşı savunmada önemli bir ajan olan HCOI normal dokuda protein oksidasyonu ile hücre hasarına yol açar. Kloronize amino asitler spontan olarak aldehytlere yıkılırlar, amonyak ve karbondioksit olarak atılırlar (33). Oksidatif stres sonucu oluşan protein karbonil deriveleri oksidatif stresi değerlendirmede kullanılır. Oksidatif stres belirteci olarak protein karbonil derivelerinin kullanımı, daha erken oluşmaları ve daha stabil olmaları

nedeniyle yarı ömürleri çok kısa olan lipid peroksidasyon ürünlerine göre daha avantajlıdır (34).

SOR'un dokuda oluşturduğu hasar Şekil 3'te gösterilmiştir (35).



Şekil 3. Serbest oksijen radikallerinin doku hasarı oluşturma yolları.

2.3.2. Polimorf nüveli lökositler

Akut inflamasyonda rol alan başlıca lökositlerden olan PMNL'lerin reperfüzyon sonrası hasarın patofizyolojisinde de önemli rolleri vardır. Akut inflamasyonda lökositler ve plazma proteinleri hızla inflamasyon yerinde toplanırlar. Lökositler inflamasyon etkenini ortadan kaldırıp, nekroze dokuların sindirilmesini sağlarlar. Akut inflamasyonda bir takım vasküler değişiklikler ve hücre olayları olur. Vazodilatasyon ve permeabilite artışı başlıca vasküler değişiklikler olup, lökositlerin ve plazma proteinlerinin hasarlanmış dokuya toplanmasına hizmet ederler. Vazodilatasyonun gelişmesine sekonder kapiller yatak konjesyonu gerçekleşir. Öte yandan mikrovasküler permeabilitenin gelişmesi proteinden zengin sıvının damar dışına çıkmasına dolayısıyla da intravasüler staz gelişimine neden olur. Stazdan sonra PMNL'ler damar duvarında birikirler (marjinyasyon). Damar duvarında biriken

PMNL'lerin intersitisyel dokuya geçiři řu sırayla olur;

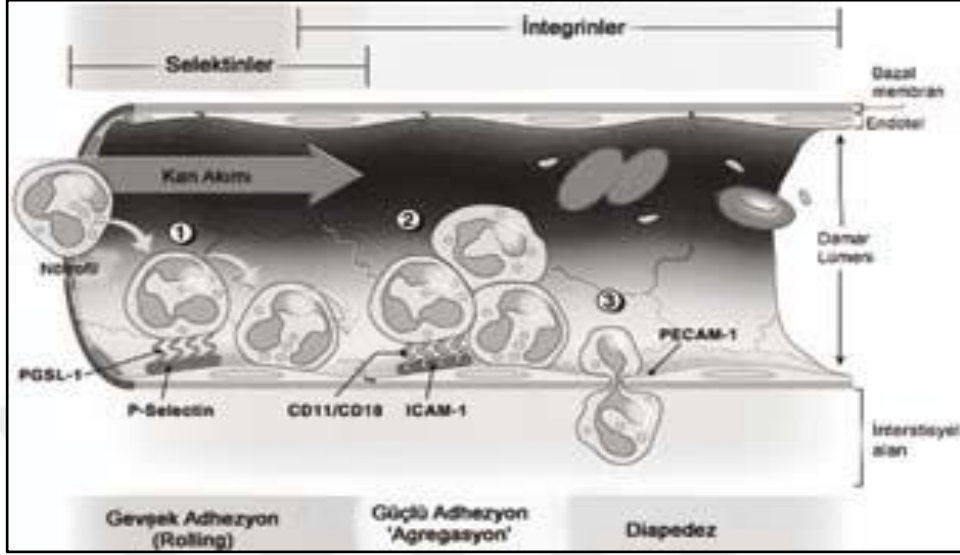
1. Marjinasyon ve damar duvarında yuvarlanma (Rolling),
2. Endotele sıkıca yapışmaları (Adezyon),
3. Endotel hücreleri arasından geçmeleri (Transmigrazyon),
4. İntersitisyel aralığa geçiş (Kemotaksis) (36-37).

PMNL'lerin aktivasyon ve migrasyonunda endotel hücreleri ve lökositlerde bulunan adhezyon molekülleri görevlidir. Selektinler endotelde ve lökosit üzerinde bulunan reseptörlerdir. Adhezyon moleküllerinin başlıcaları L-selektin (CD62L), P-selektin (CD62P) ve E-selektin (CD62E)'dir. Doku da gelişen İ/R endotelde bulunan P-selektin'in ekspresyonunda artışa neden olur. P-selektin, yuvarlanmayı sağlamak için (Rolling) damar duvarında biriken lökosit yüzeyindeki P-selektin glikoprotein 1 (PSGL-1) adı verilen reseptörü ile birleşerek düşük afiniteli reseptör bağlantısını oluşturur. İntegrinler, lökositlerin endotele yapışmasını sağlayan transmembran glikoproteinlerdir. Lökosit beta₂ integrinler (CD11a/CD18 ve CD11b/CD18) ile bağlanan intraselüler adhezyon molekülü 1 (ICAM-1) lökositlerin adezyon ve agregasyonunu sağlar.

Transmigrazyon lökositlerin intraselüler bağlantıları kullanarak endotel hücreleri arasından geçmesidir. Lökosit göçü kemokinler tarafınca yönetilir. Göç trombosit endotel hücresi adhezyon molekülü 1 (PECAM-1) ile endotel hücre bağlantıları arası etkileşimle sağlanır. Lökositler endotelden geçmeleri sonrasında, vasküler bazal membranı geçebilmek için kollejenaz salgırlar. Damar dışına çıkan lökositler, kemotaktik maddelerin de salgılanması ile hasarlı alana göç ederler (Şekil 4). Bakteri ürünleri, kemokinler, kompleman sistemi elemanları, araşidonik asit metabolizmasının lipooksijenaz yolu ürünleri lökositler için kemotaktik maddeleri oluşturur (36-37).

Lökositler için kemotaktik olan maddeler; kompleman 3a (C3a), lökotrien B4 (LT-B4), trombosit aktive edici faktör (PAF), interlökin 1 (IL-1), prostoglandin (PG) türleridir. Hasarlı alana göç eden lökosit tipi inflamatuvar olayın süresine ve uyarana göre değişmektedir. Akut inflamasyonda hasarlı dokuda ilk 6-24 saatte PMNL'ler hakimken, monositler 24-48 saatin sonunda PMNL'lerin yerini alır. PMNL'lerin diğer lökositlere sayıca üstünlüğü, kemokinlere daha hızlı yanıt vermeleri ve endotel

üzerindeki adhezyon moleküllerine daha sıkı tutunabilmeleri akut inflamasyonun başlangıcında PMNL'lerin hakim olmasının nedenleri arasında sayılabilir (36).



Şekil 4. Lökositlerin damar dışına çıkışının şematizasyonu (37).

Dokuya geç eden lökositlerin fonksiyone hale gelmeleri için aktive edilmeleri gereklidir. Aktivasyon; patojen mikroorganizmalar, nekrotik doku ürünleri ve bir takım mediyatörlerle sağlanır. Lökosit aktivasyonu ile öncelikle inflamasyona neden olan partiküller fagosite edilir. Ardından fagosite edilmiş yapılar fagozomlarda üretilen reaktif oksijen/azot türevleri ve lizozom enzimleri ile parçalanıp yok edilir. Ayrıca fagozomlarda üretilen maddelerin hücre dışına salınması, mikroorganizmaları yok etmek için kullanılan bir diğer yoldur. Lökositler yabancı maddelere spesifik yüzey reseptörleri vasıtası ile bağlanır ve bu maddeleri hücre içine alırlar. Yüzey reseptörlerinin bir kısmı direk olarak yabancı maddeyi algılayarak, bir kısmı da mikroorganizmaları kaplayarak fagositoz hedefi yapan opsonin adı verilen endojen proteinleri tanırlar. İnsan vücudunda ki en önemli opsonin IgG'dir (36).

Fagosite edilen partikülün hücre içinde parçalanmasında en önemli basamaklar lizozomal enzimlerin üretimi, lizozom ile fagozom kaynaşması ile fagolizozom oluşturulmasıdır. ROS ve lizozom enzimleri ile parçalanma sağlanır (36).

ROS fagositlerde belli aşamalardan geçilerek üretilir. Fagozom oluşmasıyla indüklenen glikojenaliz ve glikoz oksidasyonundaki artış SOR oluşmasıyla sonuçlanır. Bu aşamadan fagosit oksidaz olarak adlandırılan indirgenmiş nikotinamid

adenin dinükleotid fosfatı (NADPH) oksitleyen ve bu sırada O_2 'yi O_2^- 'ye dönüştüren NADPH oksidaz sorumludur. Oluşan O_2^- spontan dismutasyonla H_2O_2 'ye dönüşür. PMNL'lerde bulunan azurofil granüller MPO enzimi içerirler. Klor iyonu (Cl^-) gibi bir halid varlığında MPO, H_2O_2 'yi HOCl'e dönüştürür. HOCl çok güçlü bir antimikrobiyal ve oksidandır. Mikroorganizmaları halojenizasyon, protein ve lipit peroksidasyonu ile öldürür. Öldürülen mikroorganizmalar lizozomal asit hidrolazlar ile parçalanırlar. Elestaz bakteri öldürülmesinde rol oynayan önemli bir enzimdir (36).

Geçirgenliği artıran bakterisid protein, major basic protein, defensin ve lizozim lökositlerin konak savunmasında kullandıkları diğer maddelerdir (36). Lökositler görevlerini tamamladıklarında apoptozisle ölürlür. Makrofajlar vasıtasıyla lenfatik dolaşıma katılarak inflamasyon alanından uzaklaştırılırlar (12).

İ/R hasarında PMNL'nin rolü ile ilgili mekanizmalar ileri sürülmüştür (38).

Bunlar:

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

Aktive PMNL'ler salgıladıkları maddelerle yaptıkları doku hasarı dışında, damar içinde oluşan hücre agregatları ve aktif trombositlerle birlikte damar endoteline yapışıp mikrovasküler oklüzyona neden olmaktadır (12). Son çalışmalarla PMNL'lerin aktivasyon ve doku infiltrasyon derecesi ile reperfüzyona uğrayan dokuda gözlenen nekroz ve apoptozis derecesi arasında bir korelasyon tespit edilmiştir.

Apoptozis hücrenin kendi DNA'sının, nükleer ve sitoplazmik proteinlerini yıkacak enzimleri aktive ederek gerçekleşen bir hücre ölüm mekanizmasıdır. Apoptozis, organizmanın canlılığını sürdürebilmesi için gerekli olan vazgeçilmez bir parçasıdır. Fizyolojik olarak ya da patolojik durumlarda ortaya çıkabilir (36).

Fizyolojik apoptozis nedenleri;

1. Embriyogeneizde programlı hücre ölümü,
2. Hormon eksikliği,
4. Çoğalan hücre popülasyonlarında sabit hücre sayısının korunması,

5. Yararlı hizmetleri sona eren hücrelerin uzaklaştırılması,
6. Reaktif lenfositlerin eliminasyonu,
7. Sitotoksik T hücresi tarafınca başlatılan hücre ölümüdür.

Patolojik apaopitozis nedenleri;

1. DNA hasarı,
2. Hatalı katlanmış protein birikimi,
3. Viral enfeksiyonlar,
4. Parankim hücrelerinde duktus obstrüksiyonuna bağlı atrofi.

Lökositler; reperfüzyon sonrası, fosfolipaz A₂ aktivasyonu ile araşidonik asit metabolitleri oluşturarak, degranülasyonla lizozomal enzimlerin salınmasıyla ve SOR üretimi ile doku hasarı oluştururlar (39,40). Endotel hasarı ve doku zedelenmesine neden olan bu ürünler aynı zamanda inflamatuvar uyarının etkisini de güçlendirirler. Dokuda inflamatuvar yanıt sonucu mikrovasküler permeabilite artışı, ödem, tromboz ve parankim hücre ölümü gerçekleşir. İskemik dokuya kan akımının sağlanması ile arteriyollerde endotel bağımlı dilatasyon bozulur, kapiller lökosit tıkaçları oluşur ve sıvı filtrasyonu artar, post-kapiller venüller düzeyinde ise plazma proteinlerinin damar dışına geçişiyle mikrovasküler fonksiyon bozukluğu ortaya çıkar. Reperfüzyonla birlikte mikrosirkülasyonun tüm segmentlerinde aktive edilmiş endotel hücrelerinde O₂ radikali yoğun olarak üretilirken NO üretiminde ise azalma olur. O₂ ile NO arasındaki dengenin bozulması; endotel hücrelerinden tümör nekrozan faktör alfa (TNF α) ve PAF gibi mediyatörler salınmasına ve lökosit adezyonu sağlayacak adezyon molkeüllerinin sentezinde artışa neden olur (39).

Reperfüzyon sonrası özellikle PMNL kaynaklı SOR, lizozomal enzimler, prostoglandinler, lökotrienler, sekonder granüllerden salınan; apolaktoferrin, PAF, kompleman aktive eden enzim, elastaz, kollejenaz ve jletinaz gibi maddelerle endotel ve doku hasarı oluşur (40).

2.3.3. Kompleman sistemi

İ/R hasarında komplemanın rolü tam olarak anlaşılamamıştır. Kompleks ve karmaşık bir sistem olan kompleman sistemi en az 25 proteinden oluşur. Kompleman plazmada 3 farklı yoldan etkinleşir;

1. Klasik kompleman yolu,
2. Alternatif kompleman yolu,
3. Lektin kompleman yolu.

Kompleman sisteminin etkinleşmesiyle ortaya çıkan küçük fragmanlar proinflatuar bileşenler olarak bilinir. Proinflatuar bileşenler C3a, C5a, iC3b ve C5b-9'dur. C3a ve C5a güçlü anaflatoksik etki gösterirler. Düz kas kasılması, mast/bazofil hücrelerin degranülasyonu ve salgılanan histamin anaflatoksik etkiye neden olur. C3a ve C5a'nın hücrel immünite ve T hücreler üzerine düzenleyici etkileri vardır. C5a nötrofil ve makrofajlar için kemotaktiktir. C5a aynı zamanda makrofaj inflamatuar protein (MIP)-2, MIP-1a, MIP-1B, monosit kemoatraktan protein-1 (MCP-1), TNF α , IL-1 ve IL-6 üretimini artırarak inflamatuar yanıtı artırır.

E-selektin, P-selektin, vasküler hücre adezyon molekülü 1 (VCAM-1) ve ICAM-1 kompleman tarafından sentezi uyarılan lökosit adezyon molekülleridir (41).

C5b9'nun lökosit aktivasyonunu ve kemotaksisi artırma yeteneği, endotelde IL-1a, interlökin-8 ve monosit kemoatraktan protein-1 sekresyonunu artırmasından kaynaklanmaktadır. C5b9 diğer yandan endotel bağımlı vazodilatasyonu baskılayarak ve endotelde siklik guanozin monofosfatı azaltarak vasküler tonusu bozar (42,43).

2.3.4. Endotel hücresinin rolü

Endotel, vasküler sistem içinde yer alan, fizyolojik ve patolojik olaylarda rol alan, damarların iç yüzünü döşeyen tek sıra epitel tabakasıdır. Yüzeyinde bulunan glikozaminoglikan ve glikoproteinlerce negatif yük kazanan endotel hücreleri, hücrel ve hümoral moleküllerle etkileşim içinde olması nedeniyle yüzeylerinde çok sayıda reseptör taşımaktadırlar. Trombosit agregasyonunun ve koagülasyon aktivasyonunun inhibisyonu, fibrinolizis fonksiyonları ile koagülasyonu engelleme, doku ile kan arasında madde alışverişini sağlama, vasküler tonusun düzenlenmesi, lökosit ve trombosit adezyonunun regülasyonu gibi önemli görevleri vardır (44).

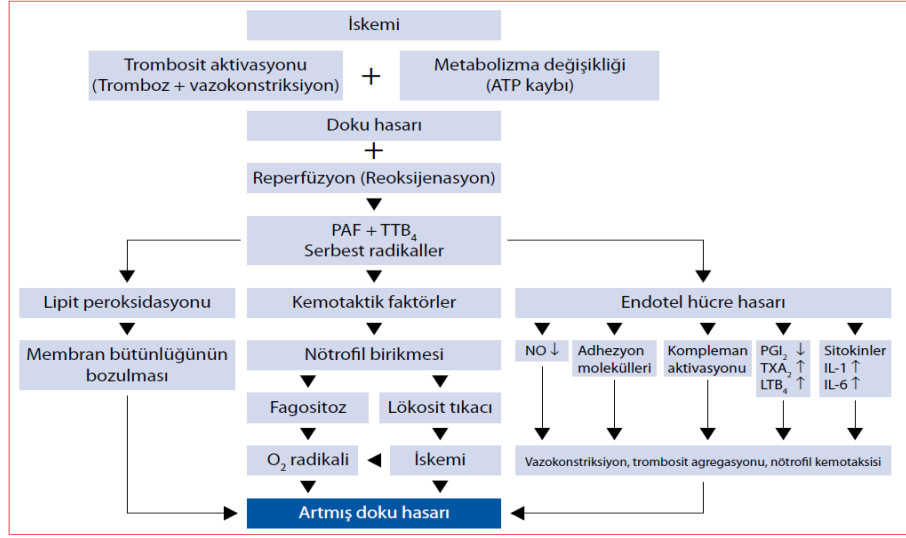
İ/R hasarının oluşmasında da endotel hücrelerinin önemli rolü vardır. Oksidatif stres endotel hücresini aktive ederek işlevlerinin bozulmasına neden olur. Endotel hücreleri bir yanda SOR için hedef konumundayken, diğer yandan SOR

üretimi yaparlar. Mikrovasküler hemostazdan sorumlu NO ve ET, endotel hücresi tarafınca sentezlenen iki mediyatördür. NO arteriyel dolaşımında ET'nin vazokonstriktör etkisini antogonize ederken, venlerde durum bunun tersidir. İ/R hasarında ET/NO dengesi ET lehine bozulur ve arteriyel vazokonstriksiyon, venlerde vazodilatasyon meydana gelir (45).

Oksidatif strese maruz kalan endotel hücreleri tarafından komplemanın aktive edilmesiyle lökosit adhezyon moleküllerinin ekspresyonunda artış olur. SOR maruziyetindeki endotel hücrelerinden IL-1, PAF, prostoglandinler (PG I₂, PG E₂), GM-CSF, büyüme faktörleri, ET, NO ve tromboksan A₂ salgılanır. Aktive endotel hücrelerinden kendi bazal membranlarını sindiren kollejenazlar da salınmaktadır (40).

Nitrik oksitlerin radikal olarak reaktivitesi düşük olmasına rağmen metal içeren bileşikler ve radikaller ile büyük bir hızla tepkimeye girmeye eğilimlidirler. Lipit radikallerle tepkimeye girmesi durumunda NO antioksidan bir etki kazanır. NO'nun aktivitesi oksihemoglobin tarafından nitrata (NO₃) oksitlenmesiyle son bulur. Oksijen radikallerinde olduğu gibi temizleyen bir enzim mekanizması yoktur. İndüklenebilir NOS enziminin indüksiyonu ile NO derişiminin artması ile oksidasyonu da hızlanır, oksidasyonu sırasında reaktif nitrojen oksit türleri meydana gelir. Bu moleküller NO'un dolaylı etkilerinden sorumlu olup hücrel moleküllerin nitrozilasyonuna, nitrasyonuna, nitrozasyonuna yol açıp protein ve enzim aktivitelerini sonlandırabilirler (46).

İ/R hasarında meydana gelen ve doku hasarı ile sonuçlanan olaylar dizisi Şekil 5'te şematize edilmiştir (47).



Şekil 5. İ/R hasarında yer alan olaylar dizisi.

2.4. Antioksidanlar

Organizmada antioksidan savunma sistemi olarak bilinen, radikal hasarı sonrası DNA'yı onarabilen, hasarlı proteinleri yıkabilen ve lipit peroksidleri metabolize eden sistemler bulunmaktadır. Yaşamın sağlıklı bir şekilde sürdürülebilmesi için pro-oksidan/antioksidan dengesinin sağlanması çok önemlidir.

Antioksidan savunma sistemi dört yolla etki göstermektedir:

I. Süpürücü etki; serbest oksijen radikallerini etkileyip, tutma ve yok etme şeklinde faaliyet gösterir. Antioksidan enzimler ve küçük moleküller bu yolla etki gösterir (27,48).

II. İnaktif şekle dönüştürücü etki; SOR ile etkileşip radikale bir hidrojen aktararak aktivitelerini azaltma veya inaktif hale getirme. Vitaminler ve flavanoidler bu şekilde etki gösterirler (49).

III. Zincir kırıcı etki; serbest radikali bağlayarak zincirlerini kırarak fonksiyonlarını engelleme. Hemoglobin, seruloplazmin ve mineraller bu grupta etki gösterirler (50).

IV. Onarıcı etki; radikallerin yapmış olduğu hasrın onarılmasıdır (51).

Antioksidanlar endojen antioksidanlar ve eksojen antioksidanlar olmak üzere 2 grupta incelenmektedir.

2.4.1. Endojen antioksidanlar

Endojen antioksidanlar da iki alt grupta incelenmektedir.

I. Enzim olan endojen antioksidanlar (52):

- SOD
- GSHP_x
- Glutasyon S-Transferaz (GST)
- Katalaz
- Mitokondriyal sitokrom oksidaz sistemi
- Hidroperoksidaz

II. Enzim olmayan endojen antioksidanlar (53):

- | | | |
|-------------|----------------|-------------------------|
| -Melatonin | -Seruloplazmin | -Transferrin |
| -Miyoglobin | -Hemoglobin | -Ferritin |
| -Bilirubin | -Glutasyon | -Sistein |
| -Metiyonin | -Ürat | -Laktoferrin ve Albumin |

2.4.2. Ekzojen antioksidanlar

I. Vitamin antioksidanlar:

- α -tokoferol (vitamin E), β -karoten, Askorbik asit (vitamin C), folik asit (folat).

II. İlaç olarak kullanılan ekzojen antioksidanlar:

- Ksantin oksidaz inhibitörleri (allopürinol, oksipürinol, pterin aldehit, tungsten)
- NADPH oksidaz inhibitörleri (adenozin, lokal anestezipler, kalsiyum kanal blokerleri, nonsteroid antiinflatuar ilaçlar)
- Rekombinant süperoksit dismutaz
- Trolox-C (Vitamin E analogu)
- Endojen antioksidan aktiviteyi artıranlar (GSH-P_x aktivitesini artıran ebselen ve asetilsistein)
- Nonenzimatik serbest radikal toplayıcılar (mannitol, albümin)
- Demir redoks döngüsü inhibitörleri (desferroksamin)

- Nötrofil adezyon inhibitörleri
- Sitokinler (TNF ve IL-1)
- Barbitüratlar
- Demir şelatörleri

2.5. Humanin

HN 24 aminoasitten oluşan, mitokondriyal 16s RNA ile transkripte olan mitokondriyal kaynaklı bir proteindir. Hashimoto ve ark. HN'yi ilk olarak Alzheimer Hastalığı olan bir kişinin beyninden elde edilen tamamlayıcı DNA Kütüphanesi taraması ile tanımlamıştır (54). Bu çalışmada HN' nin β amiloid sitotoksitesine maruz kalmış nöronlar üzerindeki nöroprotektif etkisi keşfedilmiştir (55). Guo ve ark. HN'yi ultraviyole ışınmasına maruz kalan duyarlı hücrelerde sağkalımı artıran bir Bax antagonisti olarak tarif etmiştir (56). Keşfinden bu yana HN'in kalp, beyin, testis ve böbrek gibi çok sayıda organ sisteminde çeşitli sitoprotektif etkileri gösterilmiştir (5,57-59).

2.5.1. Etki mekanizması

Humanin'in etki mekanizması reseptöre bağlanma ve sitoproteksiyonu sağlamaya yönelik intraselüler sinyal kaskadını başlatmayı içerir. Humanin etkisini hem intraselüler hem de ekstraselüler mekanizmalarla göstermektedir. Ekstraselüler etkilerini formylpeptid reseptör (FPR) ve glikoprotein 130 (gp130), silier nörotrofik factor reseptör (CNTF), IL-27 reseptör (WSX-1)'den oluşan sitokin reseptör kompleksine bağlanarak gerçekleştirmektedir (60,61).

Hücre içinde etkisini birçok değişik proteinle etkileşerek gösterir. Bcl-2 ailesinden olan Bax, tBID proteinleri ile insülin benzeri büyüme faktörü bağlayıcı protein 3 (IGFBP3) ve üç parça motif içeren protein 11 (TRIM11) bu proteinlerdendir (62).

Sentetik HN analogları endojen HN ile karşılaştırıldıklarında daha yüksek etkinliğe sahiptir (63,64). HN'in 14. Pozisyonda serin glisin değişikliği ile elde edilen analogu (HNG) ve HN'den daha fazla sitoprotektif etkiye sahiptir (65).

Endojen olarak insan vücudunda bulunan HN'nin kendisinden 1000 kat daha güçlü anti-apoptotik özellik gösteren HNG'in üretilmesi konuyla ilgili çalışmalara hız ve çeşitlilik kazandırmıştır. Böylece ortaya çıkan önemli bir çalışmada, HN'nin kardiovasküler sistem üzerine etkileri miyokardial iskemi reperfüzyon modelinde HN'in güçlü analogu olan HNG'nin etkileri araştırılmıştır. Çalışma sonucunda 2 mg/kg dozunda HNG in-vivoda fare deneysel İ/R modelinde miyokardiyal infarkt alanını azaltmıştır. HNG tedavisi kalp dokusunda fosforile adenosin monofosfat ile aktive olan kinaz (pAMPK) ve fosforile endotelial nitrik oksit sentetaz (pENOS) ekspresyonunu anlamlı olarak arttırmış ve Bax ve Bcl-2 düzeylerini azaltmıştır. HNG, in-vitro ortamda miyokardiositlerin yaşam sürelerini arttırmış ve apoptozisi azaltmıştır (5). İnsanlarda yapılan bir çalışmada elde edilen sonuçlar doğrultusunda HN'nin ateroskleroz plaklarında apoptozis ve inflamatuvar sürece endojen cevap olarak aterosklerozda rol oynadığını desteklemiştir (6). Yapılan bir başka çalışmada HNG'nin in-vivo olarak farelerde İ/R hasarına nöroprotektif etkileri araştırılmıştır. Çalışma sonucunda; HN'nin ekstraselüler sinyalle düzenlenen kinaz (ERK) aktivasyonunun ve fosfatidilinositol 3 kinaz/protein kinaz B yolağının (PI3K/Akt) inhibisyonu ile serebral İ/R hasarına karşı nöroprotektif etki gösterdiği gözlemlenmiştir (4).

2.5.2. Ratlarda doku dağılımı ve farmakokinetiği

Chin ve ark.'ın yaptığı bir çalışmada humanin ve analoglarının ratlarda intraperitoneal enjeksiyonu takiben farklı dokularda ki HN düzeyleri incelenmiştir (66). Bu çalışmada HN en yüksek plazmada saptanırken az miktarda da karaciğer dokusunda saptanmış, beyin ve kalpte hiç saptanamamıştır. Ratlarda HN'in peak plazma seviyesine 10. dakikada ulaştığı ve yarılanma ömrünün 4 saatten fazla olduğu bulunmuştur. Biyolojik yarılanma ömrünün ise kinetik yarılanma ömründen daha uzun olduğu kabul edilmiştir (66).

3. MATERYAL VE METOD

Bu çalışma, Bülent Ecevit Üniversitesi Hayvan Deneyleleri Yerel Etik Kurulu 10.10.2012 tarih ve 2012.08.02 sayılı onayı alınması sonrası Bülent Ecevit Üniversitesi Tıp Fakültesi Deney Hayvanları Üretim ve Araştırma Laboratuvar'ında yapılmıştır.

3.1. Deney Hayvanları

Çalışmaya ortalama 300-400 gr ağırlığında 32 adet Wistar-Albino cinsi rat dahil edildi. Çalışmaya dahil edilen tüm ratlar 12 saat gün ışığı alan ve havalandırma tertibatı bulunan odada (22-24°C, %70-75 nem) tutuldu. Ratların standart laboratuvar yemi ve su ile beslenmesi sağlandı. Deneyden 8 saat önce yemleri kesildi ve sadece su almalarına izin verildi. Denekler her grupta 8 rat olacak şekilde 4 gruba ayrıldı;

Kontrol grubu (Grup K, n=8),

İskemi+Reperfüzyon grubu (Grup İR, n=8),

Humanin+İskemi+Reperfüzyon grubu (Grup HİR, n=8),

Humanin+İskemi+Humanin+Reperfüzyon grubu (Grup HİHR, n=8).

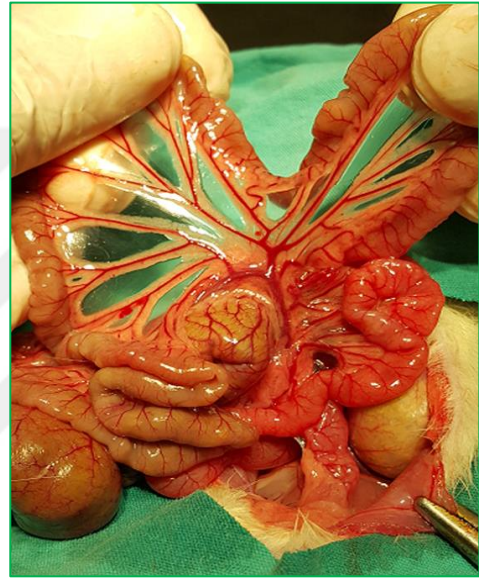
3.2. Cerrahi Prosedür

Tüm ratlara 100 mg/kg ketamin hidroklorür intramüsküler olarak verilerek anestezi sağlandı. Cerrahi işlemler aynı cerrah tarafınca tüm ratlara aynı şekilde uygulandı. Grup K'ya anestezi sağlanması sonrası laparotomi yapıldı (Resim 1). SMA izole edilerek ek cerrahi işlem yapılmadı. Deney başlangıcı sonrası 3. saatte ince bağırsak doku örneği alındı. İR grubundaki ratlarda anesteziyi takiben laparotomi sonrası ince bağırsaklar batın dışına alınıp, ince bağırsakların damarlanması görülerek SMA izole edilerek klemplenip 60 dakika iskemi gerçekleştirildi (Resim 2-3). İskemi bağırsak renginin solması ve pulsasyon kaybı ile doğrulandı (Resim 4). 2 saat reperfüzyon sağlandı ve deneyin başlangıcından sonraki 3. saatte ince bağırsak doku örnekleri alındı. HİR grubunda ratlara iskemiden 1 saat önce humanin 0,5 ml (2 mg/kg) intraperitoneal olarak verildikten sonra İR grubuyla benzer şekilde iskemi

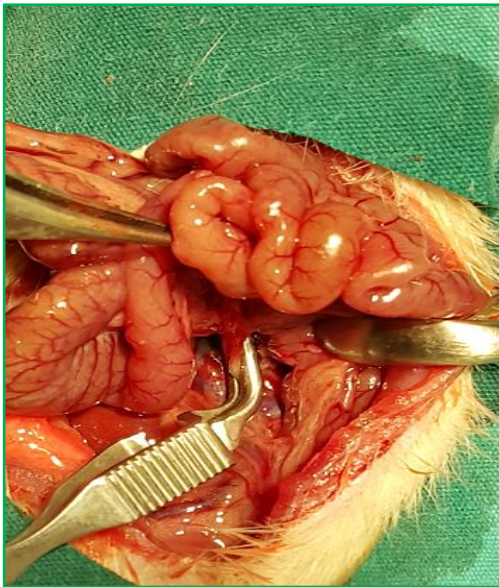
reperfüzyon modeli sağlanarak deneyin başlangıcını takiben 3. Saatte (2 saat reperfüzyon sonrası) ince bağırsak doku örnekleri alındı. HİHR grubunda ise ratlara iskemiden 1 saat önce 0,5 mL (2 mg/kg) humanin intraperitoneal uygulandı. Bu gruba reperfüzyondan 10 dakika önce de 0,5 mL (2 mg/kg) humanin intraperitoneal olacak şekilde verildi. Deneyin başlangıcından sonraki 3. saatte (2 saat reperfüzyon sonrası) ratların ince bağırsağından doku örnekleri alındı. Çalışmaya dahil edilen tüm ratlar örneklerin alınmasının ardından dekapite edildi.



Resim 1. Laparotomi.



Resim 2. İnce bağırsak damarlanması.



Resim 3. SMA'nın klemplenmesi.



Resim 4. İskemiye giden bağırsaklar.

3.3. Histopatolojik İnceleme

3.3.1. Mukozal iskemi tayini

Histopatolojik inceleme için, bağırsak örnekleri %10'luk tamponlu formalin solüsyonunda fikse edildi. Her rattan rezeke edilen bağırsak segmentlerinin tamamı makroskopik olarak örneklendi. Standart doku takibi işleminden geçirilen ve parafine gömülen örneklerin her birinden 5 mikrometre kalınlığında kesitler alınarak Hemotoksilen-Eozin (H&E) ile boyandı. Örnekler deney gruplarının dağılımını bilmeyen bir patolog tarafından Bülent Ecevit Üniversitesi Tıp Fakültesi Patoloji Anabilim Dalı Labaratuvar'ında ışık mikroskopunda değerlendirildi. Mukozal iskemi, Chiu ve ark. tarafından önerilen skalaya göre derecelendirildi (Tablo 1) (67).

Tablo 1. Chiu'nun Mukozal İskemi Skalası (67).

Grade	Bulgular
0	Normal mukozal villus
1	Subepitelyal Gruenhagen's boşluğunun genellikle villus tepesinde, kapiller konjesyon ile birlikte gelişmesi.
2	Epitelyal tabakanın lamina propriadan orta derecede ayrılmasıyla sub epitelyal boşluğun genişlemesi.
3	Birkaç villusun tepe hasarı ile birlikte villusun iki yanında masif epitelyal ayrılma olması.
4	Dilate kapillerler ve lamina proprianın açığa çıkmasıyla karakterize çıplak villuslar.
5	Lamina proprianın dağılıp parçalanması (hemoraji ve ülser).

3.3.2. Apoptozis tayini

Apoptotik cisimciklerin görüntülenmesinde pratik bir yöntem olarak, biyopsi örnekleri orta büyütmede (x10 büyütme) tarandı ve apoptotik hücrelerin en yoğun olduğu bölgeler bulundu. Daha sonra bu alanlar büyük büyütme altında değerlendirildi. Ardışık 10 kriptteki apoptotik hücreler sayıldı (68).

Apoptozisin tanımlanmasında kromatin kondensasyonu, komşu bağırsak epiteli hücrelerinden ayrılma ve membrana bağlı veziküller içeren apoptotik cisimler gibi standart morfolojik kriterler kullanıldı. İncelenen dokuda bir hücre çapı içerisinde birden fazla apoptotik cisim görüldüğünde, bir apoptotik hücre olarak sayıldı (69).

3.4. Biyokimyasal Analiz

3.4.1. SOD aktivite tayini

İnce bağırsak dokuları 1/10 oranında 20 mM potasyum fosfat (KPO₄) içinde (pH: 7.4) homojenize edildi. Homojenat +4°C'de 9000 rpm'de 20 dakika santrifüj edildi. Süpernatant, kloroform/etanol karışımı (3/5) ile 1/1 (v/v) oranında karıştırıldı. 13000 rpm'de +4 °C'de bir saat santrifüj edildi. Süpernatanda enzim aktivitesi ve protein tayini yapıldı (70). % 50 inhibisyonun 1Ü aktivite sağladığı düşünülerek enzim aktivitesi hesaplandı. SOD enzim aktivitesi protein miktarlarına bölünerek sonuçlar Ü/mg protein olarak verildi.

3.4.2. AOPP tayini

AOPP düzeyleri Witko-Sarsat ve arkadaşlarının tanımladığı spektrofotometrik yöntemle ölçülmüştür. Dokular 1/10 oranında 20 mM KPO₄ içinde (pH:7.4) homojenize edildikten sonra +4°C'de 9000 rpm'de 20 dakika santrifüj edildi. Dokular fosfat tampon solüsyonu (PBS) ile dilüe edildi. Dilüe numunelerin üzerine 10 µl potasyum iyodür (KI) ve 20 µl asetik asit eklenerek vortekslendi ve 340 nm absorbansta köre karşı spektrofotometrik ölçüm yapıldı. 0–100 µM Kloramin T standartları numune gibi çalışıldı. Sonuçlar standart eğriden hesaplanarak µmol /mg protein olarak verildi (71).

3.4.3. Protein tayini

Lowry metoduna göre süpernatanda protein tayinleri yapıldı (72). Dilüe edilen süpernatant üzerine 2 ml reaktif karışımı (0.5 mL %2'lik Na₂CO₃ içinde 0.1 N'lik NaOH, 0.5 mL %2'lik Na-K tartarat, 16.5 mL %1'lik CuSO₄) eklendi. Deney

tüpleri karıştırıldıktan sonra, 15 dakika bekletildi. Daha sonra deney tüplerine 200 µl Folin ciocalteu's fenol eklenerek iyice karıştırıldı ve 1 saat karanlıkta bekletildi. Kör tüpleride süpernatantlar gibi çalışıldı ancak numune yerine distile su konuldu. Tüpler 750 nm'de köre karşı okundu. Sonuçlar BSA ile hazırlanan standart eğri üzerinden hesaplanarak mg/mL olarak verildi.

3.5. İstatistiksel Analiz

İstatistiksel değerlendirme SPSS 19.0 (SPSS Inc., Chicago, IL, USA) programı kullanılarak yapıldı. Sayısal değişkenler için tanımlayıcı istatistikler ortalama \pm standart sapma olarak ifade edildi. Sayısal değişkenler bakımından grupların karşılaştırılmasında Kruskal-Wallis varyans analizi kullanıldı. Kruskal-Wallis varyans analizinde alt grupların ikişerli karşılaştırılması ise Dunn testi ile yapıldı ve $p < 0.05$ değeri anlamlı kabul edildi.

4. BULGULAR

Çalışma süresince deneklerden ölen olmadı. Gruplar arası ağırlık ve cinsiyet birbirine benzerdi. Çalışmamızda intestinal dokuda çalışılan histokimyasal parametrelerden AOPP ve SOD değerleri, doku hasarının histopatolojik skorları ve apoptotik sayım değerleri ortalama \pm standart sapma şeklinde verilmiştir.

4.1. Histopatolojik Bulgular

4.1.1. Kontrol grubu

Çalışmamızda kontrol grubundaki ratların ince bağırsakların histopatolojik incelenmesinde 6 denekte normal mukazal villus yapısı (Chiu 0) gözlenirken (Resim5), 2 örnekte villus tepesinde kapiller konjesyonla gelişmiş subepitelyal Gruenhagen alanını (Chiu 1) gözlendi (Resim 6). Ortalama Chiu skoru 0,25'ti.

4.1.2. İskemi-Reperfüzyon grubu

Çalışmamızda İR grubundaki ratların ince bağırsakların histopatolojik incelenmesinde 1 denekte masif epiteyal ayrılma (Chiu 3) gözlenirken (Resim 7), 2 örnekte dilate kapillerlerin eşlik ettiği hasarlı villuslar (Chiu 4) (Resim 8), 5 örnekte ise lamina proprianın dağılıp parçalanması, ülserasyon ve hemoroji (Chiu 5) gözlendi (Resim 9). Ortalama Chiu skoru 4,5'ti.

4.1.3. Humanin-İskemi-Reperfüzyon grubu

Çalışmamızda HİR grubundaki ratların ince bağırsakların histopatolojik incelenmesinde 1 denekte Chiu 1, 5 örnekte epiteyal tabakanın lamina propriadan ayrılmasıyla birlikte subepitelyal alanda genişleme (Chiu 2) (Resim 10), 1 örnekte Chiu 3 ve 1 örnekte ise Chiu 4 mukozal iskemi gözlendi. Ortalama Chiu skoru 2,25'ti.

4.1.4. Humanin-İskemi-Humanin-Reperfüzyon grubu

Çalışmamızda HİHR grubundaki ratların ince bağırsakların histopatolojik incelenmesinde ise mukozal iskemi skalasına göre 1 denekte Chiu 1, 5 denekte Chiu 2, 1 denekte Chiu 3,1 örnekte ise Chiu 4 mukozal iskemi gözlemlendi. Ortalama Chiu skoru 2,25'ti.

Grupların Chiu'nun Mukozal İskemi Skalasına göre yapılan histopatolojik incelemesinin analizinde K grubunda hiç hasar oluşmazken, İR grubunda ise mukozada hemoraji ve ülserasyon gözlemlendi ve karşılaştırma istatistiksel olarak anlamlı bulundu ($p<0,001$). HİR ve HİHR gruplarında mukozal hasar ortalama skoru İR grubuna göre belirgin düşük olsa da İR grubu ile karşılaştırmada istatistiksel olarak anlamlı fark gözlenmedi ($p=0,88$). Mukozal iskemi yönünden HİR ve HİHR kendi aralarında yapılan karşılaştırılmada da istatistiksel olarak anlamlı fark saptanmadı ($p=1,0$) (Tablo 2).

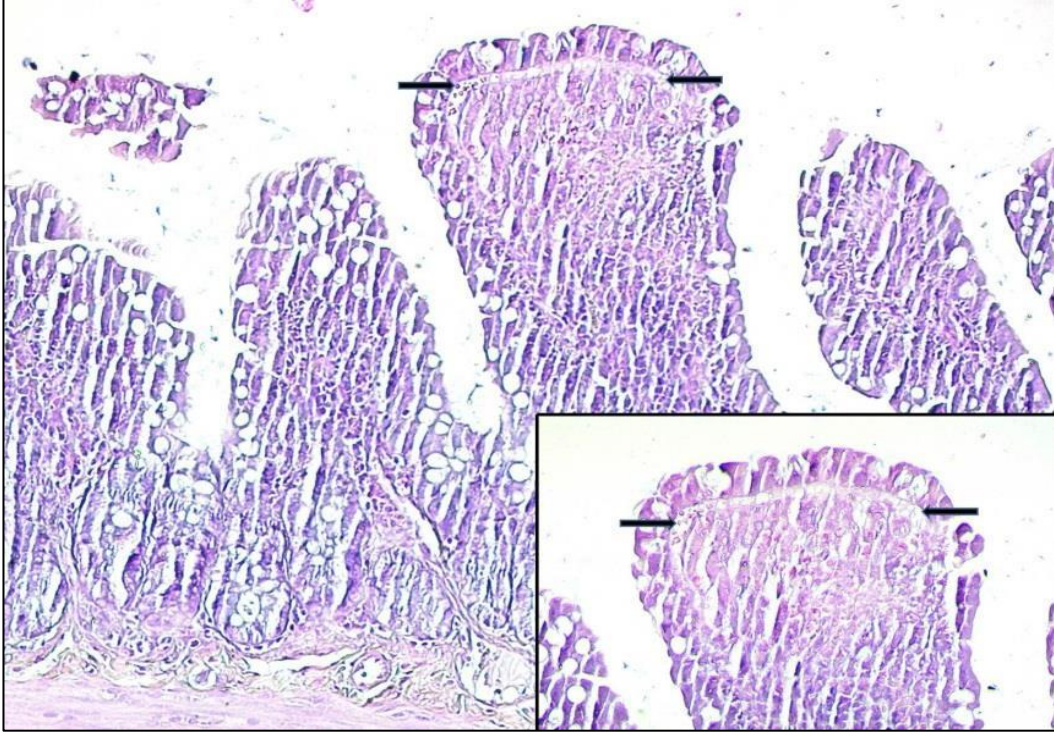
Tablo 2. Chiu'nun iskemi skalasına göre grupların karşılaştırılması.

	Grup K n=8	Grup İR n=8	Grup HİR n=8	Grup HİHR n=8	p
Chiu'nun İskemi Skoru	0,25 ± 0,463	4,5 ± 0,756	2,25 ± 0,886	2,25 ± 0,886	<0.001*

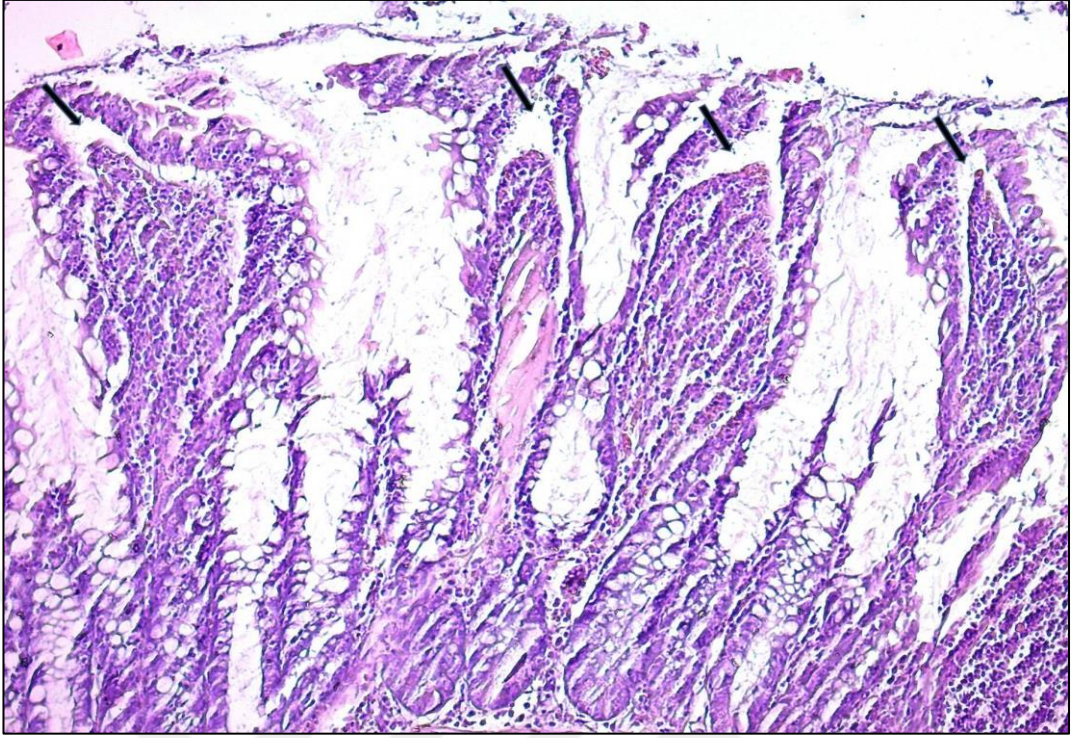
*: Grup K- Grup İR karşılaştırılması.



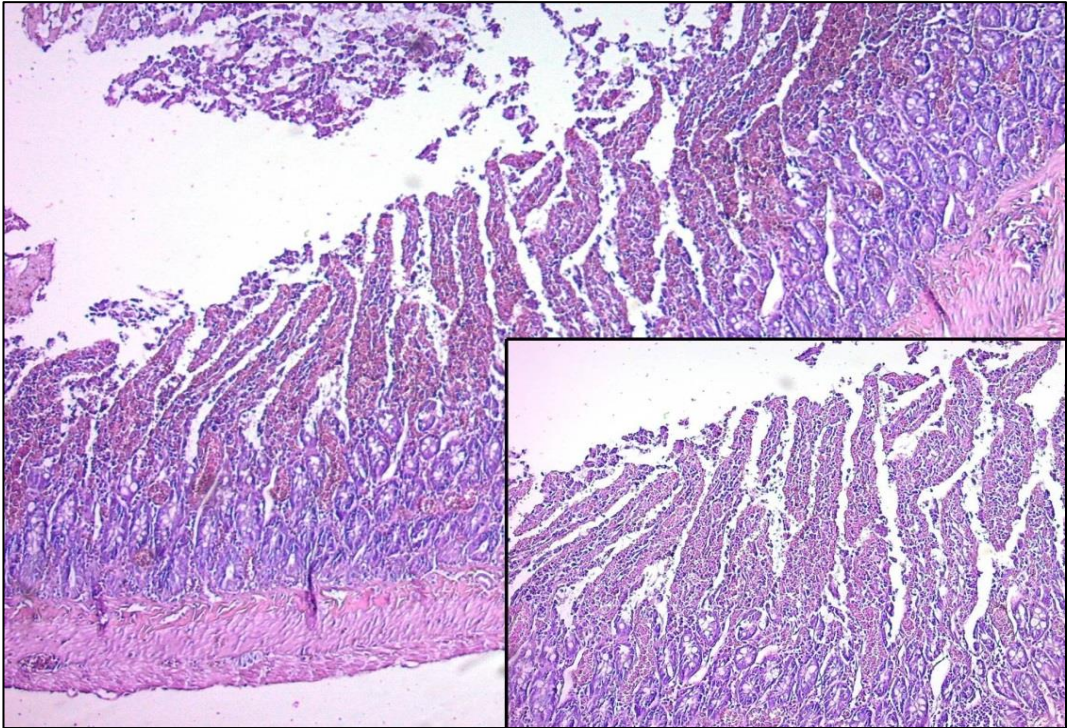
Resim 5. K grubunda normal ince bağırsağın tam kat görünümü (Chiu 0) (H&E, x100).



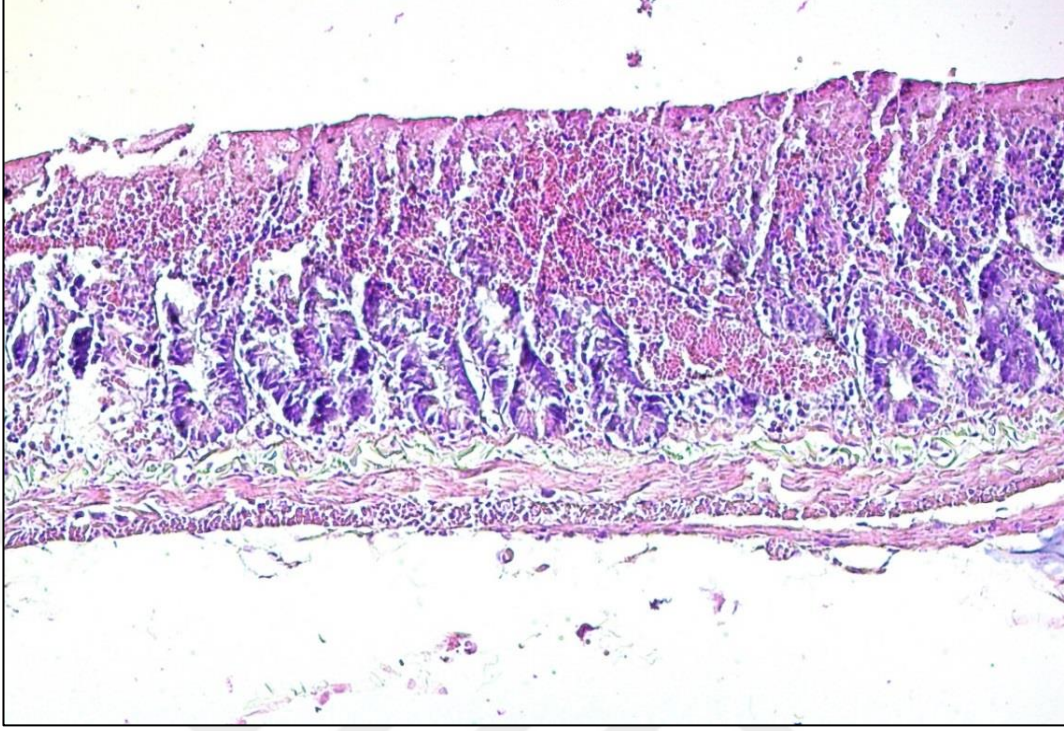
Resim 6. K grubunda kapiller konjesyon ile birlikte villusun tepe kısmında subepitelyal Gruenhagen boşluğu (oklar) (Chiu 1) (H&E, x200).



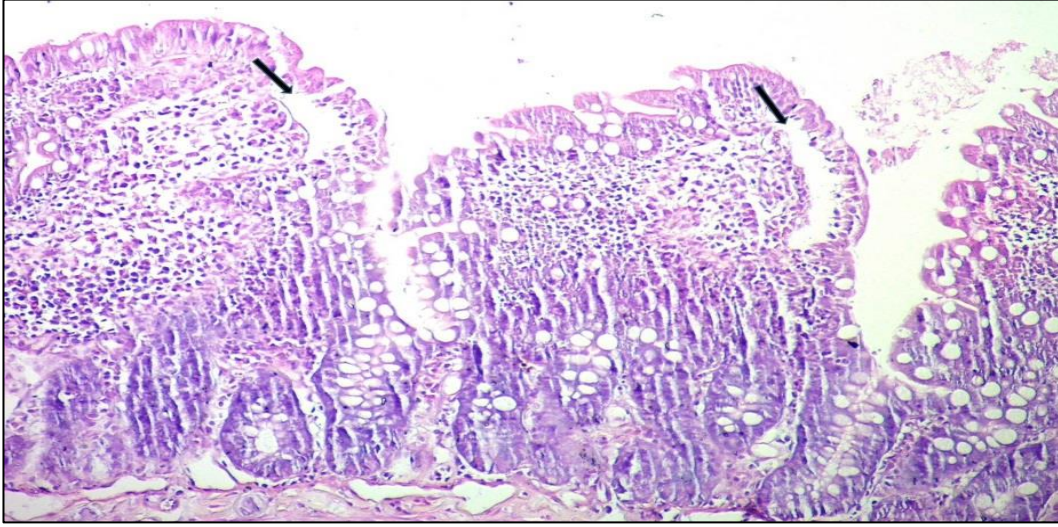
Resim 7. İR grubunda villusların her iki yanına da uzanacak şekilde epitelin lamina propriadan ayrılması (oklar) (Chiu 3) (H&E, x200).



Resim 8. İR grubunda döşeyici epitelin dökülmesi ile karakterize çıplak villuslar (Chiu 4) (H&E, x200).



Resim 9. İR grubunda villusların ve döşeyici epitelin tamamen kaybı ile birlikte lamina propriada yaygın hemoraji (Chiu 5) (H&E, x200).



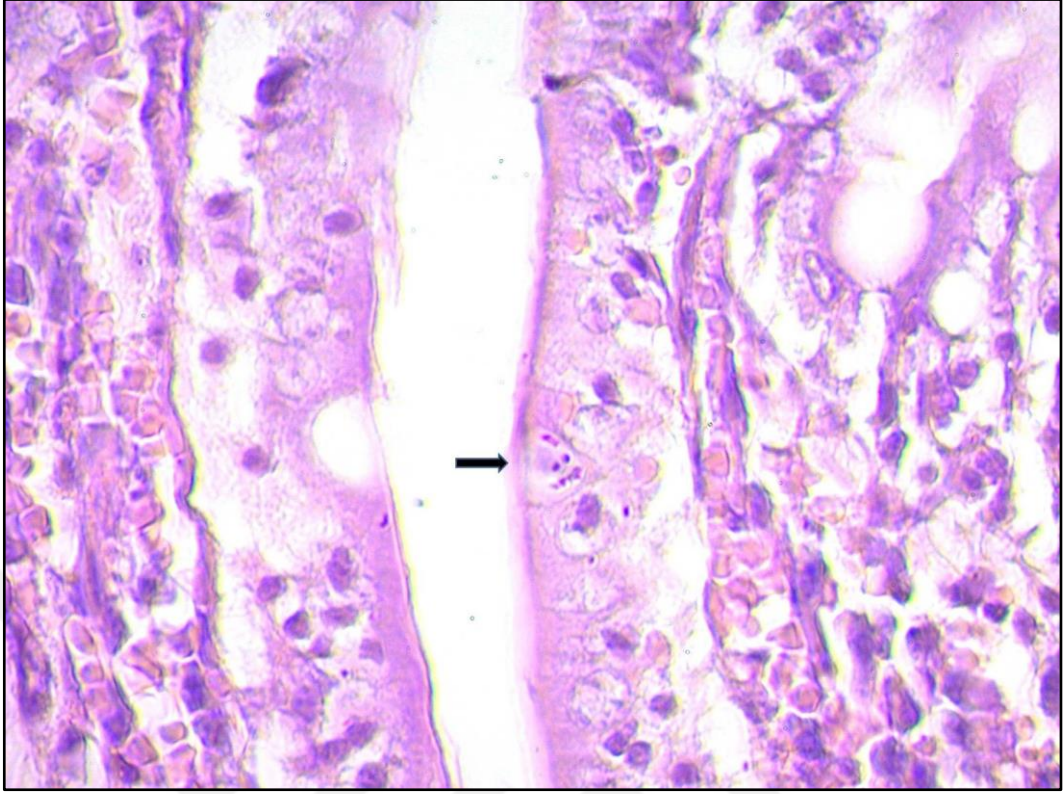
Resim 10. HİR ve HİHR grubunda daha belirgin subepitelyal boşluk (oklar) (Chiu 2) (H&E, x200).

4.2. Apoptozis Tayini

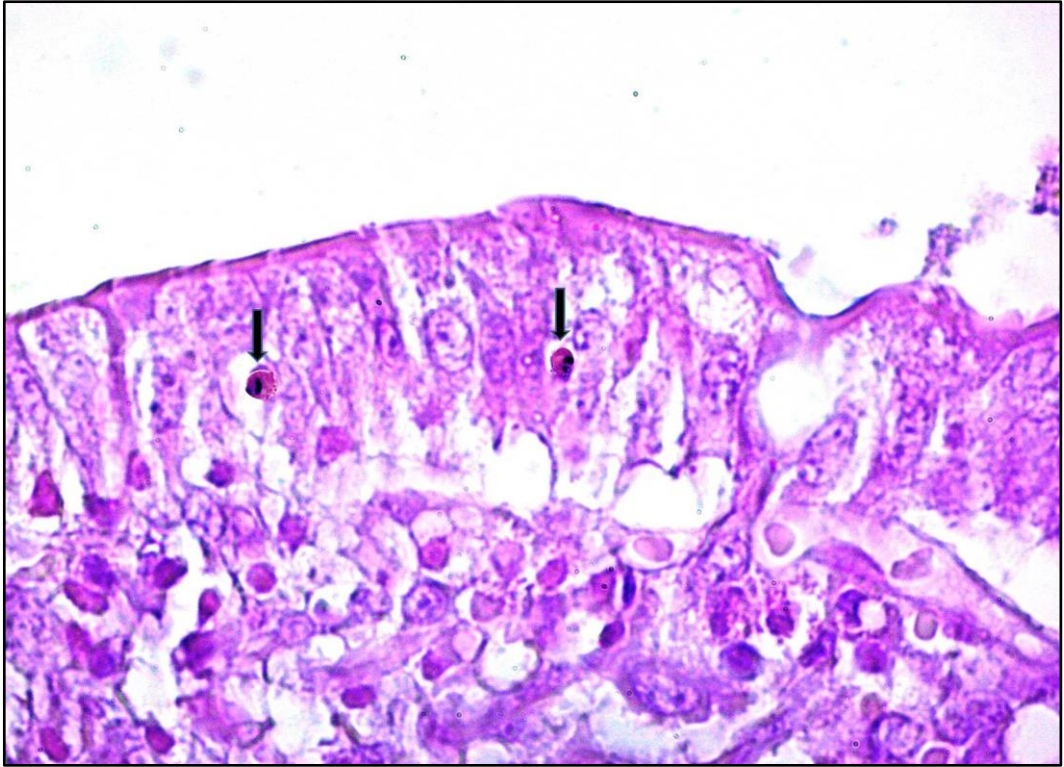
Grupların apoptotik hücre sayımına göre yapılan istatistiksel analizinde, K grubunda ardışık 10 kripte izlenen apoptotik hücre sayısı 5 (4-7), İR grubunda 16 (14-17), HİR grubunda 10 (7-11) ve HİHR grubunda ise 9 (8-11) olarak bulundu. İstatistiksel olarak gruplar arasında anlamlı fark bulundu ($p<0,001$). Grupların ikili karşılaştırılmasında K grubu ile İR grubu arasındaki fark istatistiksel olarak anlamlı bulundu ($p<0,001$) (Tablo 3). K grubu ile HİR grubu arasındaki fark anlamlı bulundu ($p<0,05$). HİHR ile İR grubu arasında ki farkta istatistiksel olarak anlamlı bulundu ($p<0,05$). Diğer ikili karşılaştırmalarda ise istatistiksel olarak fark tespit edilmedi.

Tablo 3. Apoptotik hücre sayımına göre istatistiksel analiz sonuçları

	Grup K n=8	Grup İR n=8	Grup HİR n=8	Grup HİHR n=8	p
Apoptotik hücre sayısı	5,25 ± 1,035	15,88 ± 1,126	9,63 ± 1,302	9,38 ± 1,188	< 0,001



Resim 11. Kontrol grubunda apoptotik hücre (ok) (H&E, x400).



Resim 12. HİR grubunda apoptotik hücreler (ok) (H&E, x400).

4.3. Biyokimyasal Parametreler

4.3.1. SOD aktivite tayini

Grupların ince bağırsak SOD aktivitesi bakımından karşılaştırılmasında, kontrol grubunda SOD aktivitesi $17,06 \pm 3,90$ U/mg protein bulunurken, İR grubunda $21,98 \pm 9,98$ U/mg protein, HİR grubunda $17,00 \pm 4,43$ U/mg protein, HİHR grubunda ise $16,24 \pm 3,49$ U/mg protein olarak bulundu. İstatiksel olarak gruplar arasında anlamlı fark saptanmadı ($p=0,620$) (Tablo 4).

Tablo 4. Doku SOD aktivite tayinine göre istatistiksel analiz sonuçları

	Grup K n=8	Grup İR n=8	Grup HİR n=8	Grup HİHR n=8	p
SOD aktivitesi U/mg protein	$17,06 \pm 3,90$	$21,98 \pm 9,98$	$17,00 \pm 4,43$	$16,24 \pm 3,49$	0.620

4.3.2. Aşırı okside olmuş protein ürünleri

Grupların ince bağırsak AOPP düzeyleri açısından karşılaştırılmasında, kontrol grubunda AOPP düzeyi $83,32 \pm 30,94$ $\mu\text{mol} / \text{mg}$ protein olarak ölçülürken, İR grubunda $108,26 \pm 92,88$ $\mu\text{mol}/\text{mg}$ protein, HİR grubunda $83,24 \pm 8,90$ $\mu\text{mol}/\text{mg}$ protein, HİHR grubunda $73,50 \pm 19,20$ $\mu\text{mol}/\text{mg}$ protein olarak ölçüldü. Gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı fark bulunamadı ($p= 0.690$) (Tablo 5).

Tablo 5. Doku AOPP düzeylerine göre istatistiksel analiz sonuçları

	Grup K n=8	Grup İR n=8	Grup HİR n=8	Grup HİHR n=8	p
AOPP düzeyi ($\mu\text{mol} / \text{mg}$ protein)	$83,32 \pm 30,94$	$108,26 \pm 92,88$	$83,24 \pm 8,90$	$73,50 \pm 19,20$	0.690

5. TARTIŞMA

İntestinal İ/R hasarı, mezenter arter embolisi, ciddi travmalar, major vasküler ve abdominal cerrahiler sırasında veya sonrasında görülebilmektedir. AMİ erken tanı konulup hızlıca mezenterik kan akımının düzeltilmesini gerektiren hayatı tehdit eden ve %60-80 mortalite ile birliktelik gösteren, vasküler bir acildir (73).

AMİ bağırsak nekrozu ile sonlanan bir takım patofizyolojik değişikliklerle seyretmektedir. Tıbbi tedaviler ve tanısal işlemlerdeki gelişmelere rağmen silik bulgular nedeni ile tanıdaki güçlüğüne bağlı tedavideki gecikme ve eşlik eden yandaş hastalıklar yüzünden mortalite oranlarında belirgin bir düzelme yoktur (73,74). AMİ insidansı yaşla birlikte artmakta ve her iki cinste eşit oranda gözlenmektedir (75). AMİ'nin; arteriyel trombüse bağlı AMİ, arteriyel emboliye bağlı AMİ, venöz tromboza bağlı AMİ ve non-okluziv mezenterik iskemi (NOMİ) olmak üzere 4 farklı etyolojik formu tanımlanmıştır. Vakaların %50' sinde etyolojiden SMA embolisi sorumluyken, % 25 olguda arteriyel tromboza, %20 olguda NOMİ'ya ve %10'dan az olguda venöz tromboza bağlı AMİ gelişmektedir (74,76). Daha ender olarak gözlenen durumlar (%2) ise; lupus eritomatozis, takayasu arterit ya da tromboanjitis obliterans gibi vaskülitlere bağlı SMA diseksiyonu, anevrizma embolizasyonu, volvulus veya invajinasyona bağlı strangülasyon, dıştan basıya bağlı intestinal obstrüksiyonlardır (74).

İskemi, dokuya hemostazisin sürüdürülmesi için gerekli kan akımının sağlanamamasıdır. İskemik dönemde hücre içi enerji depoları boşalır ve toksik metabolitler dokudan uzaklaştırılmaz. Reperfüzyon ile bu durumun düzelmesi beklenirse de reperfüzyon ile dokuda sadece iskeminin yaptığı hasardan daha ciddi bir hasar meydana gelmektedir (21). Parks ve Granger tarafınca yapılan bir çalışmada 3 saat iskemi sonrası 1 saat reperfüzyon ile oluşan mukozal hasarın tek başına 4 saat iskemi ile ortaya çıkan hasardan daha şiddetli olduğu saptanmıştır (21). Mezenterik kan akımı değişikliklerinden kaynaklanan doku hasarı genellikle reperfüzyon ilişkili hücre hasarından kaynaklanır (35,77). Kısa süren mezenterik iskemi atakları mikrovasküler geçirgenlikte artışa yol açarken; uzamış iskemi sonrası, PMNL'ler ve SOR'a bağlı hasar sonucunda bağırsak mukozal bariyeri bozulmaktadır. Doku hasarında SOR'un rolü antioksidanlar, KO inhibitörleri ve

serbest radikal süpürücülerin varlığında doku hasarının azaltılması ile gözlenir (73). Reperfüzyon sonrası doku hasarında PMNL'den salınan sitotoksik maddeler ile doku hasarı oluşturulmaktadır. Reperfüzyon hasarı ile oksidatif strese maruz kalan endotel hücresi bir takım pro-inflamatuar sitokinler salgılayarak PMNL'ye bağlı doku hasarına aracılık eder (36,40,73). Ayrıca reperfüzyon sırasında aktive olan fosfolipaz A2 iskemik dokuda lizofosfolipidlerin, prostoglandin ve lökotrienlerin oluşumunu artırır (29,78).

İntestinal İ/R hasarı ince bağırsakların emilim fonksiyonlarında bozulma, artmış bakteriyel translokasyon ve uzak organ hasarı ile birlikte. Bağırsağın emilim fonksiyonunun İ/R hasarı ile değiştiği yapılan birçok çalışma ile gösterilmiştir (79-80). Sileri ve ark. ratlarda yaptıkları 7 gün aralıkla 45 dakika SMA klemplenmesi ile oluşturulan İ/R hasarının, intestinal emilim fonksiyonunda akut ve kronik değişikliklere neden olduğunu göstermişlerdir (81). İ/R hasarında gözlenen artmış intestinal permeabilite, bakteriyel aşırı üreme ve konak bağışıklığındaki değişiklikler bakteriyel translokasyonun nedenleridir (82,83). İntestinal İ/R hasarı ile oluşan SOR ve inflammatuar sitokinler sadece lokal etki göstermeyip ÇOY ile sonuçlanabilen SIRS'a da neden olabilirler (1).

İntestinal iskeminin nadiren önlenabilir olması nedeni ile araştırmaların çoğunda iskeminin erken tespitini sağlamaya yarayan teknikler ve postiskemik dönemdeki hasarı azaltmayı hedefleyen yeni yaklaşımlara yoğunlaşmıştır. Reperfüzyon hasarından başlıca SOR ve PMNL infiltrasyonunun sorumlu olabileceği ileri sürülmüştür. Bu nedenle reperfüzyon hasarını engellemeye yönelik çalışmalar oksidatif hasarı ve nötrofil aktivasyonu üzerine yoğunlaşmıştır (84,85). Bu çalışmaların neticesinde nekroz ve apoptozis aracılı hücre ölümlerinin İ/R hasarının şiddetini artırdığı ve ölmekte olan hücrelerin klerensinin yetersiz olması nedeni ile doku hasarının arttığı görülmüştür. Bu nedenle hücre ölüm yolları ile yenilenme süreçleri üzerinde durulmuştur (86).

İntestinal İ/R hasarına karşı koruyucu stratejiler; reperfüzyon hasarını azaltmak amacı ile hayvan deney modellerinde başarı ile kullanılmıştır. İskemik ön koşullama (İÖK), antioksidanlar, NO takviyesi, antikompleman tedavi, antilökosit tedavi, perflorokarbonlar, enteral beslenme, glutamin desteği ve glisin desteği; İ/R hasarına karşı koruyucu stratejilerdir (87).

İntestinal İ/R hasarında ön koşullama ilk defa 1996'da Hotter ve ark. tarafından tanımlanmıştır (88). Bu prosedürde uzun iskemik hasar öncesi deneklerin SMA'sı klemplenerek 5-20 dk iskemi ardından 5-15 dk reperfüzyon dönemleri sağlanır. İskemik ön koşullama ortaya çıkış zamanları ve kullandıkları mekanizma farklılıkları nedeniyle erken ve geç ön koşullama olarak ikiye ayrılır. Erken İÖK iskemiden hemen sonra başlar ve spesifik hücre fonksiyonlarını düzenleme etkisi vardır. Geç İÖK ise iskemiden 12-24 saat sonra başlar ve bir takım stres proteinlerinin sentezlenmesini gerektirir (89-90). Ferencz ve ark. ince bağırsak otoplastasyonu yaptıkları köpek modelinde SOD ve glutasyon gibi proteinlerin sentezinin geç İÖK'nin sağladığı korumada aracı olduğunu göstermiştir (91). Davis ve ark.'ın yaptıkları bir başka çalışmada ise İÖK ile iskemik bağırsaktaki p-selektin ekspresyonunun tamamen engellendiğini söylenmiştir. (92).

Antioksidanlar vücudumuzda bulunan oksidatif hasara karşı koymaya çalışan ancak intestinal İR hasarına karşı koymada yetersiz kalan doğal savunma mekanizmalarını oluştururlar. Klinik araştırmalarla antioksidanların İ/R'na bağlı doku hasarının azaltılmasına yardımcı olduğu gösterilmiştir. Allopürinol, anti-trombin 3, bilirubin, melatonin, nitrogliserin, glutamin ve SOD çalışılan ajanlar arasındadır. Kojima ve arkadaşlarının ratlarda yapmış olduğu çalışmada; iskemi öncesi 2 saat boyunca intraduodenal glutasyon, rebamipide ve dimetilsülfoksit infüzyonu yapılmış ve 60 dk. iskemi sonrası 60 dk reperfüzyon sağlanmıştır. Deney sonucunda İ/R hasarında meydana gelen apoptozis artışında azalma meydana gelmiştir, ancak tamamen engellenememiştir (93). Spalidis ve ark. tarafınca yapılan bir çalışmada tavşanlarda oluşturulan İ/R modelinde allopürinolün etkisi araştırılmıştır (94).

Kedi ve köpekler üzerinde yapılan deneysel çalışmalarla NO desteği ile intestinal İ/R hasarında hafifleme gösterilmiştir (95). Cihan ve ark. tarafınca yapılan bir çalışmada İ/R uygulanmış ratlarda intraperitoneal nitrogliserin uygulamasının anastomoz üzerine etkisi çalışılmış ve nitrogliserinin fibroblast proliferasyonunu ve anastomoz gücünü arttırabileceği söylenmiştir (96).

Kompleman eksikliği veya kompleman inhibisyonu olan deney hayvanlarında İ/R hasarı belirgin şekilde azdır (97). Tuboly ve ark. 2016 yılında yapmış oldukları ratlarda deneysel İ/R hasarında C5a inhibitörü olan AcPepA isimli peptidi kullanmışlar ve AcPepA'nın ağır yaralanan villüs oranını azalttığını, inflamatuvar hücrelerin indüksiyonunu zayıflattığını söylemişlerdir (98).

Antilökosit terapide 3 yöntem vardır. Bu yöntemler; lökosit aktivasyonunun inhibisyonu, lökosit adhezyonunu sağlayan molkeüllerin sentezinin inhibisyonu ve lökosit-endotel adhezyonunun engellenmesidir. Doku hasarında meydana gelen lökosit aktivasyonu, LT-B4, PAF ve TNF α gibi inflamatuvar mediyatörlerce desteklenmektedir (36). LT-B4 antagonistleri, PAF antagonistleri ve TNF α antagonistleri ile yapılan çalışmalar intestinal İ/R hasarında lökosit aktivasyonunun sınırlandırıldığını göstermektedir (87).

Plazmadan 20-25 kat fazla O₂ çözünürlüğü olan perflorokarbonlar düşük O₂ bağlayıcı sabitleri nedeni ile doku oksijenizasyonunu sağlamakta oldukça iyidirler. Perflorokarbonların intestinal İ/R'deki koruyucu etkileri yapılmış çalışmalarla gösterilmiştir (99-101). Ntinas ve ark. tavşanlarda yaptıkları çalışmalarında perflorokarbonların İ/R hasarında histopatolojik olarak anlamlı bir iyileşme sağladığını bildirmişlerdir (101).

Enteral beslenmenin mukozal bütünlüğü koruyucu etkisi vardır (102). Sıçanlarda yapılan bir çalışmaya göre enteral beslenmenin uzak organ hasarı ve mortaliteyi düşürdüğü gözlenmiştir (103). Fukatsu ve ark. yaptıkları çalışma ile total parenteral beslenmenin ICAM-1 ve p-selektin ekspresyonunu artırdığını göstermişlerdir (104). Ayrıca enteral beslenme eksikliği lamina propriada ICAM-1'in endotelial ekspresyonunu inhibe eden IL-4 ve IL-10 düzeylerini değiştirmektedir (105).

Nonesansiyel bir aminoasit olan glutamin ciddi yaralanma durumunda esansiyel bir besin ögesi olarak karşımıza çıkmaktadır. Fizyolojik şartlarda plazma ve iskelet kas dokusunda yoğun olarak bulunan glutamin seviyeleri yaralanma veya cerrahi gibi süreçlerde belirgin olarak düşmektedir. Glutaminin İ/R hasarında bağırsak permeabilitesini ve bakteriyel translokasyonu azalttığı değişik çalışmalarda gösterilmiştir (106,107). Li ve ark.'ın yakın zamanda yaptıkları bir çalışmada yüksek glukoz ve hipoksi-reoksijeinizasyona bağlı apoptozisin glutamin desteği ile azaltıldığı bildirilmiştir (108).

Glisin de glutamin gibi esansiyel olmayan bir aminoasittir. Glisinin İ/R hasarında koruyucu etkileri antiinflamatuvar, immunomodülatör ve doğrudan sitoprotektif özelliklerinden kaynaklanır (109-110). Schafer ve ark.'ın yürüttüğü bir çalışmada ratlarda ince bağırsak transplantasyonu öncesi donöre ve reperfüzyon öncesi alıcıya 1mg/kg dozdan verilen glisinin transplante edilen greft hasarının azaldığı gösterilmiştir (111).

Planlanmış hücre ölümü olarak bilinen apoptozisin, İ/R hasarında hücre ölümünden sorumlu bir yol olduğu ve anti-apoptotik tedavilerin İ/R hasarına karşı etkin bir tedavi yaklaşımı olabileceği çeşitli çalışmalarda gösterilmiştir (3,112).

İlk defa 2001 yılında Hashimoto ve ark. (54) tarafınca tanımlanan HN'in sitoprotektif, anti-inflamatuar ve anti-oksidatif özellikleri vardır (63). HNG ise HN'in sentetik bir analogu olup, sitoprotektif etkisi HN'den 1000 kat daha fazladır (113). Chin ve ark. yaptıkları çalışma sonucunda HN ve analoglarının peak plasma seviyesine 10 dk.da ulaştığını, kinetik yarılanma ömrü 4 saatten uzun olduğunu söylemişlerdir. Bu çalışmaya göre günlük veya gün aşırı 4 µg/kg ile 4mg/kg arasında verilen terapötik dozların önemli klinik etkiler oluşturabileceği gösterilmiştir (66).

Çalışmamızda, daha önce yapılan çalışmalarda kalpte ve beyinde anti-oksidatif, anti-apoptotik ve anti-inflamatuar mekanizmalar ile koruyucu etkinliği gösterilen HN'in intestinal İ/R hasarında olan etkileri incelenmiştir. Literatür incelendiğinde intestinal İ/R hasarında HN'in etkisi ile ilgili yayınlanmış bir çalışma bulunmamaktadır. Xu ve ark.'ın 2006 ve 2008'de yayınlanan iki farklı çalışmalarında HNG'nin in-vivo olarak sıçanlarda serebral İ/R hasarına nöroprotektif etkileri araştırılmıştır. Çalışma sonucunda; HN'nin ERK aktivasyonunun ve PI3K/Akt yolunun inhibisyonu ile serebral İR hasarına karşı nöroprotektif etki gösterdiği gözlemlenmiştir (4,58). Muzumdar ve ark.'ın yaptığı çalışmada 2 mg/kg dozunda HN'nin in-vivoda sıçan deneysel İ/R modelinde miyokardial infarkt alanını azaltmıştır. HNG tedavisi kalp dokusunda pAMPK ve p-eNOS ekspresyonunu anlamlı olarak arttırmış ve Bax ve Bcl-2 düzeylerini azaltmıştır. HNG, in-vitro ortamda miyokardiyositlerin yaşam sürelerini arttırmış ve apoptozisi azaltmıştır (5).

Literatür incelendiğinde farklı deneysel intestinal İ/R modelleri vardır. Çalışmamızda Liu ve ark. ile Tas ve ark. nın çalışmalarında kullandığı SMA klemplenecek 60 dk. iskemi ve 120 dk. reperfüzyon olacak şekilde intestinal İ/R hasarı sağlanmıştır (114-115). HNG farmakokinetiğine uygun olacak şekilde HİR grubuna iskemiden 1 saat önce 2 mg/kg, HİHR grubuna ise iskemiden 1 saat önce 2mg/kg ve reperfüzyondan 10 dk. önce 2mg/kg olacak şekilde intraperitoneal yolla verilmiştir.

Alınan doku örneklerinin Chiu'nun Mukozal İskemi Sınıflaması'na göre histopatolojik incelenmesi sonucu HİR ve HİHR gruplarında İ/R grubuna göre mukozal hasar belirgin olarak az görülmesine rağmen istatistiksel olarak anlamlı bulunmamıştır

($p=0,55$). Ancak İ/R grubunda çoğunlukla ($n=5$) Chiu skorunda 5 puan alınırken, HİR ve HİHR gruplarında çoğunlukla ($n=5$) 2 puan alınmış olup HN'nin istatistiksel fark olmasa da mukozal iskemiye azalttığı söylenebilir.

Humaninin bilinen bir etkisi olan anti-apoptozisin değerlendirilmesinde Remotti ve ark. tarafınca belirtilen apoptotik hücre sayımı kullanıldı (68). İstatistiksel olarak gruplar arasında anlamlı fark saptandı ($p<0,001$). Grupların ikili karşılaştırılmasında özellikle HIHR grubunda ani-apoptotik etki yüksek bulunmuştur. HİR grubu ile HIHR gruplarının apoptotik hücre sayımları birbirine çok yakın olmasına rağmen HİR/İR ve HİR/HİHR arasındaki karşılaştırmalarda farkın istatistiksel olarak anlamsız olması denek sayısının yetersiz olmasına bağlı olabilir.

Oksidatif stresin belirteci olarak çeşitli çalışmalarda SOD düzeyleri çalışılmıştır. Zhao ve ark. 18 günlük rat embriyolarının primer kortikal nöronlarından elde edilen kültürlerde yaptıkları çalışmalarında HN'in İ/R hasarında SOD aktivitesini artırdığını gösterdiler (116). Benzer şekilde Klein ve ark.'ın sıçan kardiyak myoblast hücre kültürlerinde yaptıkları çalışmada da HN, İ/R'da SOD aktivitesini arttırmıştır (117). Bizim çalışmamızda gruplar arasında doku SOD düzeyleri bakımından yapılan istatistiksel analizde anlamlı fark bulunmadı ($p= 0.690$).

Çalışmamızda oksidatif stresin bir diğer belirteci olarak AOPP kullanıldı. Protein karbonil derivelerinin kullanımı, daha erken oluşmaları ve daha stabil olmaları nedeniyle oksidatif stresi belirlemede MDA gibi lipid peroksidasyon ürünlerine göre daha avantajlıdır (34). İR grubundaki deneklerin doku AOPP ortalama değerleri Grup K'ya göre yüksek bulunurken, HİR ve HİHR grubundaki deneklerin doku AOPP değerleri Grup K ile benzer olup İR grubundan düşüktür. Bu durum oksidatif stresin azaldığını gösterebilir. AOPP düzeyleri açısından yapılan istatistiksel analizde anlamlı fark bulunmadı ($p=0,690$).

Çalışmamızda HNG intestinal İ/R hasarında mukozal iskemiye önlemede kısmen etkili olsa da fark istatistiksel olarak anlamlı değildi. HNG'in anti-apoptotik etkisi literatürle uyumlu olarak çalışmamızda da görülmüş ve HNG verilen grupla İR grubu arasında istatistiksel fark bulunmuştur. AOPP değerlerinin HNG verilen gruplarda kontrol grubuna yakın olması; beyin ve kalpte oluşturulan deneysel İ/R modellerinde gözlenen HNG'nin anti-oksidatif etkinliğine benzerdir.

6. SONUÇ

Çalışmamızda daha önce farklı dokularda sitoprotektif etkisi kanıtlanan HNG'in intestinal İ/R hasarına olan etkileri araştırılmıştır. Literatürde HNG'in intestinal İ/R hasarına etkisi ile ilgili yayınlanmış bir çalışma gözlenmemiştir.

Ratlarda intestinal İ/R modelinde yaptığımız çalışmada iskemi öncesi ve hem iskemi hem de reperfüzyon öncesi uygulanan HNG'in ince bağırsak üzerine etkileri biyokimyasal ve histopatolojik olarak değerlendirilmiştir.

Histopatolojik inceleme sonrası HNG'nin mukozal hasarı azalttığı gözlense de, fark istatistiksel olarak anlamlı değildi.

HNG uygulanan gruplarda apoptotik hücre sayısı azalmış olup, anti-apoptotik etki literatürle uyumlu olarak bulunmuştur.

Oksidatif stresin bir belirteci olan AOPP düzeyleri de istatistiksel olarak anlamlı olmasa da İ/R grubuna göre HNG verilen gruplarda düşük bulunmuştur.

SOD düzeyleri açısından gruplar arasında anlamlı fark tespit edilmemiştir.

HNG'nin intestinal İ/R'da koruyucu etkilerinin daha geniş örneklem gruplarında, daha farklı sürelerde çalışılması uygun olacaktır.

7. KAYNAKLAR

1. Yasuhara H. Acute mesenteric ischemia: the challenge of gastroenterology. *Surg Today* 35(3):185–195, 2005.
2. Granger DN, Richardson PD, Kvietys PR, Mortillaro NA. Intestinal blood flow. *Gastroenterology* 78(4): 837-863, 1980.
3. Wu B, Iwakiri R, Tsunada S, Utsumi H, Kojima M, Fujise T, Ootani A, Fujimoto K. iNOS enhances rat intestinal apoptosis after ischemia-reperfusion. *Free Radic Biol Med* 33(5):649-658, 2002.
4. Xu X, Chua CC, Gao J, Chua KW, Wang H, Hamdy RC, Chua BH. Neuroprotective effect of humanin on cerebral ischemia/reperfusion injury is mediated by a PI3K/Akt pathway. *Brain Res* 28:1227:12-8, 2008.
5. Muzumdar RH, Huffman DM, Calvert JW, Jha S, Weinberg Y, Cui L, Nemkal A, Atzmon G, Klein L, Gundewar S, Ji SY, Lavu M, Predmore BL, Lefer DJ. Acute humanin therapy attenuates myocardial ischemia and reperfusion injury in mice. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 30(10):1940-1948, 2010.
6. Zacharias DG, Kim SG, Massat AE, Bachar AR, Oh YK, Herrmann J, Rodriguez-Porcel M, Cohen P, Lerman LO, Lerman A. Humanin, a cytoprotective peptide, is expressed in carotid atherosclerotic plaques in humans. *PLoS One* 7(2):e31065, 2012.
7. Pansky B, Gest TR. Lippincott Açıklamalı İnsan Anatomisi Atlası: Thorax, Abdomen ve Pelvis (Çev.Ed: Elhan A.) Cilt 2, s.120-128, Güneş Tıp Kitabevleri, Ankara, 2015.
8. Sancak B, Cumhuriyet M. Fonksiyonel Anatomi, Baş-Boyun ve İç Organlar. METU Press, Ankara, 2015.
9. Gray H. The arteries of the trunk. Ed: Lewis WH, Gray's Anatomy of the Human Body. 30th edition, pp. 827-30, Lea and Febiger, Philadelphia, USA, 1984.
10. Gartner LP, Hiatt JL. Color Textbook of Histology. W.B. Saunders Company, Philadelphia, 2006.

11. Tekelioğlu M. Genel Tıp Histolojisi. Beta Basım Yayım Dağıtım, İstanbul, 1993.
12. Zimmerman BJ, Granger DN. Reperfusion injury. *Surg Clin North Am* 72(1):65-83, 1992.
13. Granger DN, Korthuis RJ. Physiologic mechanisms of postischemic tissue injury. *Annu Rev Physiol* 57: 311-332, 1995.
14. Wilhelm J. Metabolic aspects of membrane lipid peroxidation. *Acta Univ Carol Med Monogr* 137:1-53, 1990.
15. Granger DN, Hollwarth ME, Parks DA. Ischemia-reperfusion injury: Role of oxygen-derived free radicals. *Acta Physiol Scand Suppl* 548:47-63, 1986.
16. Yamamoto S, Tanabe M, Wakabayashi G, Shimazu M, Matsumoto K, Kitajima M. The role of tumor necrosis factor-alpha and interleukin-1 beta in ischemia-reperfusion injury of the rat small intestine. *J Surg Res* 99(1):134-141, 2001.
17. Cerqueira NF, Hussni CA, Yoshida WB. Pathophysiology of mesenteric ischemia/reperfusion: a review. *Acta Cir Bras* 20(4):336-43, 2005.
18. Orrenius S, Burkitt MJ, Kass GE, Dypbukt JM, Nicotera P. Calcium ions and oxidative cell injury. *Ann Neurol* 32 Suppl:S33-42, 1992.
19. Younes M, Schoenberg MH, Jung H, Fredholm BB, Haglund U, Schildberg FW. Oxidative tissue damage following regional intestinal ischemia and reperfusion in the cat. *Res Exp Med(Berl)* 184(4):259-64, 1984.
20. Davies MG, Juynh TTT, Hagen PO. Endothelial physiology. In *Ischemia-Reperfusion Injury*. Ed: Grace PA, Mathie RT. pp. 157-159, Blackwell Science, London, 1999.
21. Parks DA, Granger DN. Contributions of ischemia and reperfusion to mucosal lesion formation. *Am J Physiol*, 250(6 Pt 1):G749-53, 1986.
22. Homer-Vanniasinkam S, Crinnion JN, Gough MJ. Post-ischæmic organ dysfunction: a review. *Eur J Vasc Endovasc Surg* 14(3): 195-203, 1997.
23. Harman D. Aging: a theory based on free radical and radiation chemistry. *J Gerontol* 11(3):298-300, 1996.

24. Beckman KB, Ames BN. The free radical theory of aging matures. *Physiol Rev* 78(2):547-581,1998.
25. Diplock A. Healthy lifestyles nutrition and physical activity: Antioxidant nutrients. ILSI Europe concise monograph series, Belgium 1998; 59.
26. Kowaltowski AJ, Vercesi AE. Mitochondrial damage induced by conditions of oxidative stress. *Free Radic Biol Med* 26(3-4):463-471, 1999.
27. Reiter RJ. Oxidative processes and antioxidative defense mechanisms in the aging brain. *FASEB J* 9(7):526-533, 1995.
28. Reiter RJ, Acuna-Castroviejo D, Tan DX, Burkhardt S. Free radical mediated molecular damage. Mechanisms for the protective actions of melatonin in the central nervous system. *Ann N Y Acad Sci* 939: 200-215, 2001.
29. Akkuş İ. Serbest Radikaller ve Fizyopatolojik Etkileri. 1. Baskı, , s.1-60, Mimoza Yayınları, Konya, 1995.
30. Michalik L, Wahli W. Involvement of PPAR nuclear receptors in tissue injury and wound repair. *J Clin Invest* 116(3):598-606, 2006.
31. Witko-Sarsat V, Friedlander M, Capeillère-Blandin C, Nguyen-Khoa T, Nguyen AT, Zingraff J, Jungers P, Descamps-Latscha B. Advanced oxidation protein products as a novel marker of oxidative stress in uremia. *Kidney Int* 49(5):1304-1313, 1996.
32. Cakatay U, Telci A, Kayali R, Tekeli F, Akçay T, Sivas A. Relation of aging with oxidative protein damage parameters in the rat skeletal muscle. *Clin Biochem* 36(1):51-5, 2003.
33. Winterbourn CC, Kettle AJ. Biomarkers of myeloperoxidase-derived hypochlorous acid. *Free Radic Biol Med* 29(5):403-409, 2000.
34. Dalle-Donne I, Rossi R, Giustarini D, Milzani A, Colombo R. Protein carbonyl groups as biomarkers of oxidative stress. *Clin Chim Acta* 329(1-2):23-38, 2003.
35. Schoenberg MH, Berger HG. Reperfusion injury after intestinal ischemia. *Crit Care Med.* 21(9):1376-86, 1993.

36. Kumar V, Abbas A, Aster J. Robbins Temel Patoloji (Çev.Ed:Tuzlalı S.) s. 31-53, Nobel Tıp Kitabevi, İstanbul, 2013.
37. Woodfin A, Voisin MB, Nourshargh S. PECAM-1: a multi-functional molecule in inflammation and vascular biology. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 27:2514-2523, 2007.
38. Eltzschig HK, Collard CD. Vascular ischaemia and reperfusion injury. *Br Med Bull* 70:71-86, 2004.
39. Schoenberg MH, Beger HG. Reperfusion injury after intestinal ischemia. *Crit Care Med* 21(9):1376-1386, 1993.
40. Weight SC, Bell PR, Nicholson ML. Renal ischaemia--reperfusion injury. *Br J Surg* 83(2):162-170, 1996.
41. Thrane AS, Skehan JD, Thrane PS. A novel interpretation of immune redundancy and duality in reperfusion injury with important implications for intervention in ischaemic disease. *Med Hypotheses* 68:1363-1370, 2007.
42. Suzuki M, Asako H, Kubes P, Jennings S, Grisham MB, Granger DN. Neutrophil-derived oxidants promote leukocyte adherence in postcapillary venules. *Microvasc Res* 42: 125-138, 1991.
43. Zhang W, Smith C, Shapiro A, Monette R, Hutchison J, Stanimirovic D. Increased expression of bioactive chemokines in human cerebromicrovascular endothelial cells and astrocytes subjected to simulated ischemia in vitro. *J Neuroimmunol* 101(2):148-60, 1999.
44. Bombeli T, Mueller M, Haeberli A. Anticoagulant properties of the vascular endothelium. *Thromb Haemost* 77:408-423, 1997.
45. García-Villalón AL, Amezquita YM, Monge L, Fernández N, Salcedo A, Diéguez G. Endothelin-1 potentiation of coronary artery contraction after ischemia-reperfusion. *Vascul Pharmacol* 48:109-114, 2008.
46. Phillips L, Toledo AH, Lopez-Neblina F, Anaya-Prado R, Toledo- Pereyra LH. Nitric oxide mechanism of protection in ischemia and reperfusion injury. *J Invest Surg* 22:46-55, 2009.

47. Sener G, Sakarcan A, Yegen BC. Role of garlic in the prevention of ischemia-reperfusion injury. *Mol Nutr Food Res* 51:1345-1352, 2007.
48. Karihtala P, Soini Y. Reactive oxygen species and antioxidant mechanisms in human tissues and their relation to malignancies. *APMIS* 115:81-103, 2007.
49. Cherubini A, Ruggiero C, Morand C, Lattanzio F, Dell'aquila G, Zuliani G, Di Iorio A, Andres-Lacueva C. Dietary antioxidants as potential pharmacological agents for ischemic stroke. *Curr Med Chem* 15(12):1236-1248, 2008.
50. Mickle DA, Weisel RD. Future directions of vitamin E and its analogues in minimizing myocardial ischemia-reperfusion injury. *Can J Cardiol* 9(1):89-93, 1993.
51. Virág L, Szabó C. The therapeutic potential of poly(ADP-ribose) polymerase inhibitors. *Pharmacol Rev* 54(3):375-429, 2002.
52. Valko M, Leibfritz D, Moncol J, Cronin MT, Mazur M, Telser J. Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease. *Int J Biochem Cell Biol* 39(1):44-84, 2007.
53. Şehirli AO. Renal İskemi/Reperfüzyon Hasarında Melatonin'in Koruyucu Etkisi. Yüksek Lisans Tezi. T.C. Marmara Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Enstitüsü, İstanbul, 2001.
54. Hashimoto Y, Niikura T, Tajima H, Yasukawa T, Sudo H, Ito Y, Kita Y, Kawasumi M, Kouyama K, Doyu M, Sobue G, Koide T, Tsuji S, Lang J, Kurokawa K, Nishimoto I. A rescue factor abolishing neuronal cell death by a wide spectrum of familial Alzheimer's disease genes and Aβ. *Proc Natl Acad Sci* 98:6336–6341, 2001.
55. Niikura T, Chiba T, Aiso S, Matsuoka M, Nishimoto I. Humanin: after the discovery. *Mol Neurobiol* 30:327–340, 2004.
56. Guo B, Zhai D, Cabezas E, Welsh K, Nouraini S, Satterthwait AC, Reed JC. Humanin peptide suppresses apoptosis by interfering with Bax activation. *Nature* 423:456–461, 2003.

57. Singh BK, Mascarenhas DD. Bioactive peptides control receptor for advanced glycated end product-induced elevation of kidney insulin receptor substrate 2 and reduce albuminuria in diabetic mice. *Am J Nephrol* 28:890–899, 2008.
58. Xu X, Chua CC, Gao J, Hamdy RC, Chua BH. Humanin is a novel neuroprotective agent against stroke. *Stroke* 37: 2613–2619, 2006.
59. Lue Y, Swerdloff R, Liu Q, Mehta H, Hikim AS, Lee KW, Jia Y, Hwang D, Cobb LJ, Cohen P, Wang C. Opposing roles of insulin-like growth factor binding protein 3 and humanin in the regulation of testicular germ cell apoptosis. *Endocrinology* 151:350–357, 2010.
60. Hashimoto Y, Kurita M, Aiso S, Nishimoto I, Matsuoka M. Humanin inhibits neuronal cell death by interacting with a cytokine receptor complex or complexes involving CNTF receptor alpha/WSX-1/gp130. *Mol Biol Cell* 20:2864–2873, 2009.
61. Hashimoto Y, Suzuki H, Aiso S, Niikura T, Nishimoto I, Matsuoka M. Involvement of tyrosine kinases and STAT3 in humanin-mediated neuroprotection. *Life Sci* 77(24): 3092, 2005.
62. Luciano F, Zhai D, Zhu X, Bailly-Maitre B, Ricci JE, Satterthwait AC, Reed JC. Cytoprotective peptide humanin binds and inhibits proapoptotic Bcl-2/Bax family protein BimEL. *J Biol Chem* 280(16):15825-35, 2005.
63. Muzumdar RH, Huffman DM, Atzmon G, Buettner C, Cobb LJ, Fishman S, Budagov T, Cui L, Einstein FH, Poduval A, Hwang D, Barzilai N, Cohen P. Humanin: a novel central regulator of peripheral insulin action. *PloS one* 4:e6334, 2009.
64. Mamiya T, Ukai M. [Gly(14)]-Humanin improved the learning and memory impairment induced by scopolamine in vivo. *Br J Pharmacol* 134:1597–1599, 2001.
65. Hashimoto Y, Niikura T, Ito Y, Sudo H, Hata M, Arakawa E, Abe Y, Kita Y, Nishimoto I. Detailed characterization of neuroprotection by a rescue factor humanin against various Alzheimer's disease-relevant insults. *J Neurosci* 21(23): 9235-45, 2001.

66. Chin YP, Keni J, Wan J, Mehta H, Anene F, Jia Y, Lue YH, Swerdloff R, Cobb LJ, Wang C, Cohen P. Pharmacokinetics and tissue distribution of humanin and its analogues in male rodents. *Endocrinology* 154(10):3739-44, 2013.
67. Chiu CJ, McArdle AH, Brown R, Scott HJ, Gurd FN. Intestinal mucosal lesion in low-flow states. I. A morphological, hemodynamic, and metabolic reappraisal. *Arch Surg* 101(4):478-83, 1970.
68. Remotti H, Subramanian S, Martinez M, Kato T, Magid MS. Small-bowel allograft biopsies in the management of small-intestinal and multivisceral transplant recipients: histopathologic review and clinical correlations. *Arch Pathol Lab Med* 136(7):761-71, 2012.
69. Coles HS, Burne JF, Raff MC. Large-scale normal cell death in the developing rat kidney and its reduction by epidermal growth factor. *Development* 118(3):777-84, 1993.
70. Sun Y, Oberley LW, Li Y. A simple method for clinical assay of superoxide dismutase. *Clin Chem* 34(3):497-500, 1988.
71. Witko-Sarsat V, Friedlander M, Capeillère-Blandin C, Nguyen-Khoa T, Nguyen AT, Zingraff J, Jungers P, Descamps-Latscha B. Advanced oxidation protein products as a novel marker of oxidative stress in uremia. *Kidney Int* 49(5):1304-13, 1996.
72. Lowry OH, Rosebrough NJ, Farr AL, Randall RJ. Protein measurement with the folin phenol reagent. *J Biol Biochem* 193(1):145-157, 1951.
73. Oldenburg WA, Lau LL, Rodenberg TJ, Edmonds HJ, Burger CD. Acute mesenteric ischemia: a clinical review. *Arch Intern Med* 164(10):1054-62, 2004.
74. Debus ES, Müller-Hülsbeck S, Kölbl T, Larena-Avellaneda A. Intestinal ischemia. *Int J Colorectal Dis* 26(9):1087-97, 2011.
75. Acosta S. Epidemiology of mesenteric vascular disease: clinical implications. *Semin Vasc Surg* 23(1):4-8, 2010.
76. Bassiouny HS. Nonocclusive mesenteric ischemia. *Surg Clin North Am* 77(2): 319-326, 1997.

77. Zimmerman BJ, Grisham MB, Granger DN. Role of oxidants in ischemia/reperfusion-induced granulocyte infiltration. *Am J Physiol* 258:G185-190, 1990.
78. Koike K, Moore EE, Moore FA, Read RA, Carl VS, Banerjee A. Gut ischemia/reperfusion produces lung injury independent of endotoxin. *Crit Care Med* 22(9):1438- 1444, 1994.
79. Kuenzler KA, Pearson PY, Schwartz MZ. Interleukin-11 enhances intestinal absorptive function after ischemia-reperfusion injury. *J Pediatr Surg* 37(3):457–459, 2002.
80. Rajeevprasad R, Alavi K, Schwartz MZ. Glucagonlike peptide-2 analogue enhances intestinal mucosal mass and absorptive function after ischemia-reperfusion injury. *J Pediatr Surg* 35(11):1537– 1539, 2000.
81. Sileri P, Morini S, Schena S, Rastellini C, Abcarian H, Benedetti E, Cicalese L. Intestinal ischemia/reperfusion injury produces chronic abnormalities of absorptive function. *Transplant Proc* 34(3); 984, 2002.
82. Xia G, Martin AE, Michalsky MP, Besner GE. Heparin-binding EGF-like growth factor preserves crypt cell proliferation and decreases bacterial translocation after intestinal ischemia/reperfusion injury. *J Pediatr Surg* 37(7):1081, 2002.
83. Berg RD. Bacterial translocation from the gastrointestinal tract. *Adv Exp Med Biol* 473:11–30, 1999.
84. Riaz AA, Wan MX, Schäfer T, Dawson P, Menger MD, Jeppsson B, Thorlacius H. Allopurinol and superoxide dismutase protect against leucocyte-endothelium interactions in a novel model of colonic ischaemia-reperfusion. *Br J Surg* 89(12): 1572–1580, 2002.
85. Shen ZY, Zhang J, Song HL, Zheng WP. Bone-marrow mesenchymal stem cells reduce rat intestinal ischemia-reperfusion injury, ZO-1 downregulation and tight junction disruption via a TNF-alpha-regulated mechanism. *World J Gastroenterol* 19: 3583–3595, 2013.

86. Wu R, Dong W, Wang Z, Jacob A, Cui T, Wang P. Enhancing apoptotic cell clearance mitigates bacterial translocation and promotes tissue repair after gut ischemia-reperfusion injury. *Int J Mol Med* 30(3):593-8, 2012.
87. Mallick IH, Yang W, Winslet MC, Seifalian AM. Ischemia-reperfusion injury of the intestine and protective strategies against injury. *Dig Dis Sci* 49(9):1359-77, 2004.
88. Hotter G, Closa D, Prados M, Fernández-Cruz L, Prats N, Gelpí E, Roselló-Catafau J. Intestinal preconditioning is mediated by a transient increase in nitric oxide. *Biochem Biophys Res Commun* 222(1):27-32, 1996.
89. Cohen MV, Baines CP, Downey JM. Ischemic preconditioning: from adenosine receptor to KATP channel. *Annu Rev Physiol* 62:79-109, 2000.
90. Yellon DM, Dana A. The preconditioning phenomenon: A tool for the scientist or a clinical reality? *Circ Res* 87(7):543-50, 2000.
91. Ferencz A, Szántó Z, Kalmár-Nagy K, Horváth OP, Róth E. Mitigation of oxidative injury by classic and delayed ischemic preconditioning prior to small bowel autotransplantation. *Transplant Proc* 36(2): 286-8, 2004.
92. 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* 277(6 Pt 2): H2476-81, 1999.
93. Kojima M, Iwakiri R, Wu B, Fujise T, Watanabe K, Lin T, Amemori S, Sakata H, Shimoda R, Oguzu T, Ootani A, Tsunada S, Fujimoto K. Effects of antioxidative agents on apoptosis induced by ischaemia-reperfusion in rat intestinal mucosa. *Aliment Pharmacol Ther* 18 Suppl 1;139-45, 2003.
94. Sapalidis K, Papavramidis TS, Gialamas E, Deligiannidis N, Tzioufa V, Papavramidis S. The role of allopurinol's timing in the ischemia reperfusion injury of small intestine. *J Emerg Trauma Shock* 6(3):203-8, 2013.
95. Kawata K, Takeyoshi I, Iwanami K, Sunose Y, Aiba M, Ohwada S, Matsumoto K, Morishita Y. A spontaneous nitric oxide donor ameliorates small bowel ischemia-reperfusion injury in dogs. *Dig Dis Sci* 46(8):1748-56, 2001.

96. Cihan AO, Bicakci U, Tander B, Rizalar R, Kandemir B, Ariturk E, Bernay F. Effects of intraperitoneal nitroglycerin on the strength and healing attitude of anastomosis of rat intestines with ischemia-reperfusion injury. *Afr J Paediatr Surg* 8(2):206-10, 2011.
97. Collard CD, Gelman S. Pathophysiology, clinical manifestations, and prevention of ischemia-reperfusion injury. *Anesthesiology* 94(6): 1133–1138, 2001.
98. Tuboly E, Futakuchi M, Varga G, Érces D, Tókécs T, Mészáros A, Kaszaki J, Suzui M, Imai M, Okada A, Okada N, Boros M, Okada H. C5a inhibitor protects against ischemia/reperfusion injury in rat small intestine. *Microbiol Immunol* 60(1): 35-46, 2016.
99. Oldham KT, Guice KS, Gore D, Gourley WK, Lobe TE. Treatment of intestinal ischemia with oxygenated intraluminal perfluorocarbons. *Am J Surg* 153(3): 291-294, 1987.
100. O'Donnell KA, Caty MG, Zheng S, Rossman JE, Azizkhan RG. Oxygenated intraluminal perfluorocarbon protects intestinal mucosa from ischemia/reperfusion injury. *J Pediatr Surg* 32(2):361-365, 1997.
101. Ntinis A, Iliadis S, Alvanou Achparaki A, Vrochides D, Pitoulias G, Papageorgiou G, Spyridis C, Papadimitriou D, Karamanos D, Gerasimidis T. The protective effect of oxygenated perfluorocarbons (PFCs) on intestinal ischemia reperfusion injury (I/R) in rabbits. *Vasc Endovascular Surg* 44(2):81-88, 2010.
102. Grossie VB, Weisbrodt NW, Moore FA, Moody F. Ischemia/reperfusion-induced disruption of rat small intestine transit is reversed by total enteral nutrition. *Nutrition* 17(11-12):939-43, 2001.
103. Fukatsu K, Zarzaur BL, Johnson CD, Lundberg AH, Wilcox HG, Kudsk KA. Enteral nutrition prevents remote organ injury and death after a gut ischemic insult. *Ann Surg* 233(5):660-8, 2001.

104. Fukatsu K, Lundberg AH, Hanna MK, Wu Y, Wilcox HG, Granger DN, Gaber AO, Kudsk KA. Increased expression of intestinal P-selectin and pulmonary E-selectin during intravenous total parenteral nutrition. *Arch Surg* 135(10):1177-82, 2000.
105. Wu Y, Kudsk KA, DeWitt RC, Tolley EA, Li J. Route and type of nutrition influence IgA-mediating intestinal cytokines. *Ann Surg* 229(5):662–667, 1999.
106. Shu X, Zhang J, Wang Q, Xu Z, Yu T. Glutamine decreases intestinal mucosal injury in a rat model of intestinal ischemia-reperfusion by downregulating HMGB1 and inflammatory cytokine expression. *Exp Ther Med* 12(3):1367-1372, 2016.
107. Li YS, Li JS, Jiang JW, Liu FN, Li N, Qin WS, Zhu H. Glycylglutamine-enriched long-term total parenteral nutrition attenuates bacterial translocation following small bowel transplantation in the pig. *J Surg Res* 82(1):106–111, 1999.
108. Li K, Cui YC, Zhang H, Liu XP, Zhang D, Wu AL, Li JJ, Tang Y. Glutamine Reduces the Apoptosis of H9C2 Cells Treated with High-Glucose and Reperfusion through an Oxidation-Related Mechanism. *PLoS One* 10(7):e0132402, 2015.
109. Lee MA, McCauley RD, Kong SE, Hall JC. Pretreatment with glycine reduces the severity of warm intestinal ischemic reperfusion injury in the rat. *Ann Plast Surg*. 46(3):320-326, 2001.
110. Lee MA, McCauley RD, Kong SE, Hall JC. Influence of glycine on intestinal ischemia-reperfusion injury. *JPEN J Parenter Enteral Nutr* 26(2):130-135, 2002.
111. Schaefer N, Tahara K, Schuchtrup S, Websky MV, Overhaus M, Schmidt J, Wirz S, Abu-Elmagd KM, Kalff JC, Hirner A, Türler A. Perioperative glycine treatment attenuates ischemia/reperfusion injury and ameliorates smooth muscle dysfunction in intestinal transplantation. *Transplantation* 85(9):1300-1310, 2008.

112. Zhang F, Tong L, Qiao H, Dong X, Qiao G, Jiang H, Sun X. Taurine attenuates multiple organ injury induced by intestinal ischemia reperfusion in rats. *J Surg Res.* 149(1):101-119, 2008.
113. Hashimoto Y1, Ito Y, Niikura T, Shao Z, Hata M, Oyama F, Nishimoto I. Mechanisms of neuroprotection by a novel rescue factor humanin from Swedish mutant amyloid precursor protein. *Biochem Biophys Res Commun* 283(2):460-8, 2001.
114. Liu C, Liu Y, Shen Z, Miao L, Zhang K, Wang F, Li Y. Sevoflurane Preconditioning Reduces Intestinal Ischemia-Reperfusion Injury: Role of Protein Kinase C and Mitochondrial ATP-Sensitive Potassium Channel. *PLoS One* 10(10):e0141426, 2015.
115. Tas U, Ayan M, Sogut E, Kuloglu T, Uysal M, Tanriverdi HI, Senel U, Ozyurt B, Sarsilmaz M. Protective effects of thymoquinone and melatonin on intestinal ischemia-reperfusion injury. *Saudi J Gastroenterol* 21(5): 284-289, 2015.
116. Zhao ST, Huang XT, Zhang C, Ke Y. Humanin protects cortical neurons from ischemia and reperfusion injury by the increased activity of superoxide dismutase. *Neurochem Res* 37(1):153-160, 2012.
117. Klein LE, Cui L, Gong Z, Su K, Muzumdar R. A humanin analog decreases oxidative stress and preserves mitochondrial integrity in cardiac myoblasts. *Biochem Biophys Res Commun* 440(2):197-203, 2013.

8. EKLER

Ek 1: Etik Kurul Onayı



20

T.C.
BÜLENT ECEVİT ÜNİVERSİTESİ
Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu



TOPLANTI TARİHİ : 10/10/2012

TOPLANTI NO : 2012/08

- 2- B.E.Ü. Tıp Fakültesi Genel Cerrahi Anabilim Dalı öğretim üyesi Prof Dr. Mustafa CÖMERT'in 2012-11-07/03 Protokol no'lu "Ratlarda İntestinal İskemi Reperfüzyon Hasarı Modelinde Humaninin Olası Anti-Apoptotik ve Anti- İnflammatuar Etkilerinin Araştırılması" konulu başvurusunun Etik Kurul ilkelerine uygun olduğuna,

Oy birliği ile karar verildi.

ASLI GİBİDİR

Prof. Dr. Z. Nur BANOĞLU
Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu Başkanı