

T.C.
BÜLENT ECEVİT ÜNİVERSİTESİ
TIP FAKÜLTESİ
FİZYOLOJİ ANABİLİM DALI

SIÇAN İNCE BARSAK İSKEMİ REPERFÜZYON MODELİNDE
AGMATİNİN ETKİLERİ

TIPTA UZMANLIK TEZİ

Dr. İnci TURAN

DANIŞMAN

Prof. Dr. Hale SAYAN ÖZAÇMAK

ZONGULDAK

2013

*Bu çalışma Bülent Ecevit Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri
Koordinasyon Birimi tarafından desteklenmiştir. (BAP No:2011-20-00-02)*

T.C.
BÜLENT ECEVİT ÜNİVERSİTESİ
TIP FAKÜLTESİ
FİZYOLOJİ ANABİLİM DALI

SIÇAN İNCE BARSAK İSKEMİ REPERFÜZYON MODELİNDE
AGMATİNİN ETKİLERİ

TIPTA UZMANLIK TEZİ

Dr. İnci TURAN

DANIŞMAN

Prof. Dr. Hale SAYAN ÖZAÇMAK

ZONGULDAK

2013

*Bu çalışma Bülent Ecevit Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri
Koordinasyon Birimi tarafından desteklenmiştir. (BAP No:2011-20-00-02)*

TEZ ONAY TUTANAĞI

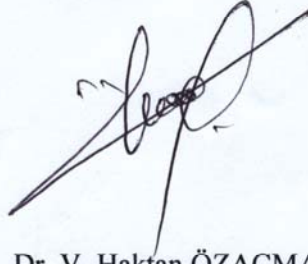
Tezin Teslim Edildiği Üniversite/Fakülte: Bülent Ecevit Üniversitesi Tıp Fakültesi

Tez Başlığı : Sıçan İnce Barsak İskemi Reperfüzyon Modelinde Agmatinin Etkileri

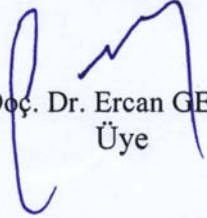
Tez Yazarı : Arş. Gör. Dr. İnci TURAN

Tez Savunma Tarihi: 19/07/2013

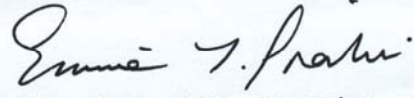
Tez Danışmanı : Prof. Dr. Hale SAYAN ÖZAÇMAK



Doç. Dr. V. Haktan ÖZAÇMAK
Jüri Başkanı



Yrd. Doç. Dr. Ercan GENCER
Üye



Prof. Dr. Emine YILMAZ SİPAHI
Üye

UYGUNDUR
23/10/2013

Prof. Dr. Mustafa AYDIN
Dekan



ÖNSÖZ

Bülent Ecevit Üniversitesi Tıp Fakültesi Fizyoloji Anabilim Dalı'nda sürdürdüğüm uzmanlık eğitimim süresince bilgi birikimini, tecrübe ve anlayışını esirgemeyen ve beni teşvik edip yönlendiren sayın hocalarıma, başta anabilim dalı başkanımız ve tez danışmanım Sayın Prof. Dr. Hale SAYAN ÖZAÇMAK'a, ayrıca eğitimim süresince destek ve katkılarını esirgemeyen, Sayın Doç. Dr. Veysel Haktan ÖZAÇMAK'a ve Sayın Yrd. Doç. Dr. Ercan GENCER'e en içten teşekkür ve saygılarımı sunarım.

Tez çalışmamın histopatolojik değerlendirmelerini yapan Sayın Doç. Dr. Figen BARUT'a, sitokin ölçümlerini yapan Sayın Doç. Dr. Mehmet ARASLI'ya, istatistiksel değerlendirmeleri yapan Sayın Yrd. Doç. Dr. Füzuran KÖKTÜRK'e ve tezimin deney aşamasındaki katkılarından dolayı Vet. Hekim Osman CENGİL'e,

Uzmanlık eğitimim boyunca aynı ortamı paylaştığım tüm asistan arkadaşlarıma ve dekanlık personeline,

Yaşamımın her anında sevgi ve desteklerini esirgemeyen anneme, babama ve kardeşlerime,

Hayatımın her anında sevgisiyle beni dimdik ayakta tutan eşime ve biricik oğluma sevgilerimi ve teşekkürlerimi sunarım...

Dr. İnci TURAN
ZONGULDAK, 2013

ÖZET

İnci Turan, Sıçan İnce Barsak İskemi Reperfüzyon Modelinde Agmatinin Etkileri, Bülent Ecevit Üniversitesi Tıp Fakültesi, Fizyoloji Tezi. Zonguldak, 2013.

İnce barsağın iskemi reperfüzyonunun (İ/R), barsakta mukozal ve yapısal bütünlüğü bozmasının yanı sıra barsak motilitesinde ve elektriksel aktivitesinde değişikliklere neden olduğu çeşitli çalışmalarda gösterilmiştir. Amacımız agmatinin intestinal İ/R hasarındaki etkilerini incelemektir. Çalışmamızda 32 adet yetişkin erkek Wistar-Albino sıçan rastgele 4 gruba ayrıldı. Bu gruplar 1) kontrol grubu; 2) İ/R grubu; 3) agmatin uygulanan kontrol grubu; 4) İ/R ve agmatin uygulanan gruptur. İnce barsaklarda iskemi superior mezenterik arterin (SMA) 30 dk. süreyle klempleneşi ile oluşturuldu. Sonrasında 3 saat süreyle dokular reperfüze edildi. Agmatin 10 mg/kg dozunda reperfüzyon öncesi intraperitoneal uygulandı. Deney sonunda terminal ileum dokuları alınarak izole organ banyosunda karbakol ve potasyum klorüre (KCl) olan kontraksiyon yanıtları değerlendirildi. Ayrıca dokuda malondialdehid (MDA), indirgenmiş glutatyon (GSH) ve miyeloperoksidaz (MPO) düzeyleri ölçüldü ve histopatolojik değişiklikler incelendi. İmmünohistokimyasal olarak indüklenabilir nitrik oksit sentaz (iNOS) yapımı ve plazmada proinflamatuvar sitokin (TNF α , IL-1 α , IFN- γ , MCP-1, GM-CSF ve IL-4) düzeyleri belirlendi. İ/R grubunda kontraksiyon yanıtlarının kontrol grubuna göre azaldığı görülmüştür. Agmatin uygulaması azalan kontraksiyon yanıtlarını önemli ölçüde düzeltmiştir. İ/R grubunda MDA ve MPO seviyelerinin arttığı, GSH seviyesinin azaldığı, histolojik hasarın çok şiddetli olduğu görülmüştür. Agmatin MDA ve MPO seviyelerini azaltıp, GSH seviyesini ve histolojik hasarı düzeltmede etkili olmuştur. İ/R grubunda artan iNOS, IL-1 α ve IFN- γ düzeyi agmatinle azalmıştır. Çalışmamızda agmatin intestinal İ/R hasarında kontraktıl yanıtları düzenleyerek, biyokimyasal parametreleri, histolojik hasarı ve sistemik inflamatuvar yanıtı iyileştirerek koruyucu etki göstermiştir. Bu etkinin oksidatif stresi, proinflamatuvar sitokin düzeylerini ve iNOS yapımını azaltma ile ortaya çıkardığı gözlenmiştir.

Anahtar Kelimeler: intestinal kontraktilite; intestinal iskemi reperfüzyon hasarı; agmatin

ABSTRACT

İnci Turan, The Effects of Agmatine on Intestinal Ischemia Reperfusion Model in Rats, Bulent Ecevit University School of Medicine, Thesis in Physiology. Zonguldak, 2013.

Various studies have documented that the intestinal ischemia-reperfusion (I/R) results in alterations of the electrical activity and motility as well as the damage of mucosal and the structural integrity in gut. The purpose of the present study is to investigate the possible effects of agmatine on injury induced by intestinal I/R. Total of 32 adult male Wistar-Albino rats were randomly divided into four groups: 1) Sham-operated control; 2) I/R control; 3) Agmatine-treated sham control; and 4) Agmatine-treated I/R group. Intestinal ischemia was generated by the occlusion of the superior mesenteric artery (SMA) by a clamp for 30 minutes followed by the period of reperfusion lasting 3 hours. Intraperitoneal administration of agmatine at a dose of 10 mg/kg was carried out just prior to the beginning of the reperfusion period. Immediately after the end of the reperfusion phase, the tissues of terminal ileum were carefully isolated and collected followed by the evaluation of contractile responses to both carbachol and potassium chloride (KCl) in isolated-organ bath. Malondialdehyde (MDA) and reduced glutathione (GSH) contents as well as myeloperoxidase (MPO) activity levels of the ileal tissues were measured in addition to the histopathological evaluation of the tissues. The expression of the tissue inducible form of nitric oxide synthase (iNOS) was determined immunohistochemically. Additionally, plasma levels of such proinflammatory cytokines as TNF, IL-1 α , IFN- γ , MCP-1, GM-CSF and IL-4 were measured by using the technique of flowcytometry. The contractile responses of the I/R group were significantly lower than those of the control group. The decreased contractile responses were improved remarkably by the treatment with agmatine. The content of MDA and the activity of MPO were both elevated significantly in tissues of the I/R group. Meaningful decrease in the GSH content and the advanced degree of the tissue damage were also evident in the same group. The treatment with agmatine appeared to be significantly effective in reducing the amounts of MDA content and MPO activity besides restoring the content of GSH. The treatment also attenuated the

histological injury. The I/R-induced increases in the expressions of iNOS, IL-1 α , and IFN- γ was brought back to the sham control levels by the treatment with agmatine. In conclusion, the present study have shown that the treatment with agmatin exerted protective effects on the I/R-induced intestinal injury via regulation of the contractile responses, improvement of the biochemical parameters, attenuation of the histological damage, and modulation of the systemic inflammatory response. The beneficial effects that we have observed were possibly the results of the reduction of oxidative stress, decrease of the proinflammatory cytokines, and lowered expression of iNOS.

Keywords: intestinal contractility; intestinal ischemia-reperfusion injury; agmatine.

İÇİNDEKİLER

Sayfa

ÖNSÖZ	iii
ÖZET.....	iv
ABSTRACT.....	v
İÇİNDEKİLER	vii
SİMGELER VE KISALTMALAR.....	x
TABLO DİZİNİ	xii
ŞEKİL DİZİNİ	xiii
GRAFİK DİZİNİ.....	xiv
RESİM DİZİNİ	xv
1.GİRİŞ VE AMAÇ	1
2. GENEL BİLGİLER	4
2.1. İskemi Reperfüzyon Hasarı.....	4
2.2. İntestinal İskemi Reperfüzyon Hasarı.....	6
2.2.1. İnce barsağın yapısı ve fonksiyonlarının sinirsel kontrolü	6
2.2.2. İnce barsak dolaşımının anatomi ve fizyolojisi.....	7
2.2.3. İntestinal iskemi reperfüzyonu	10
2.2.3.1. Serbest oksijen radikallerinin rolü	12
2.2.3.2. Lökositlerin rolü.....	19
2.2.3.3 .Komplemanın rolü	21
2.2.3.4. Endotelin rolü.....	22
2.2.3.5. Sitokinlerin rolü	23
2.2.3.6. Platelet aktivatör faktör (PAF)	25
2.2.3.7. Araşidonik asit (AA) metabolitleri	26
2.3. Barsakta İ/R Hasarından Korunma Stratejileri	26
2.3.1. Antioksidan tedavi	26
2.3.1.1. Endojen antioksidanlar.....	27
2.3.1.2. Eksojen antioksidanlar	29
2.3.2. İskemik ön koşullandırma.....	30
2.3.3. Antilökosit tedavi	31

2.3.4. Antikompleman tedavi	31
2.4. Agmatin.....	31
2.4.1. Agmatinin etkileri	34
3. GEREÇ VE YÖNTEM	37
3.1. Deney Hayvanları.....	37
3.2. Anestezi.....	37
3.3. Cerrahi Girişim.....	38
3.4. Deney Grupları.....	39
3.5. Kan ve Doku Örneklerinin Alınması	40
3.6. Değerlendirilen Parametreler	41
3.6.1. Barsak kasında kontraksiyon yanıtı	41
3.6.2. Biyokimyasal değerlendirmeler	42
3.6.2.1. MDA tayini	42
3.6.2.2. GSH tayini.....	42
3.6.2.3. MPO tayini	43
3.6.3. Histopatolojik ve immünohistokimyasal değerlendirmeler	43
3.6.3.1. Histopatolojik inceleme	43
3.6.3.2. İmmünohistokimyasal boyama	44
3.6.4. Plazmada sitokin tayini	44
3.6.5. İstatistiksel analiz	45
4. BULGULAR.....	46
4.1. Barsak Düz Kası Kontraksiyon Yanıtları.....	46
4.1.1. Karbakole verilen kontraksiyon yanıtları.....	53
4.1.2. KCl'e verilen kontraksiyon yanıtları.....	54
4.2. Biyokimyasal Sonuçlar	54
4.2.1. MDA sonuçları.....	55
4.2.2. GSH sonuçları	56
4.2.3. MPO sonuçları	57
4.3. Plazma Sitokin Sonuçları	58
4.4. Histopatolojik Değerlendirme Sonuçları	59
4.4.1. Histopatolojik görüntüler	60
4.4.2. iNOS yapımı ile ilgili immünohistokimyasal görüntüler.....	62

5. TARTIŞMA	64
6. KAYNAKLAR	70
Ek 1: Etik Kurul Onayı	83

SİMGELER VE KISALTMALAR

AA	Araşidonik Asit
ADC	Arjinin dekarboksilaz
ATP	Adenozin trifosfat
BHT	Butil hidroksi toluen
Ca	Kalsiyum
cNOS	Konstitütif nitrik oksit sentaz
Cu	Bakır
e⁻	Elektron
eNOS	Endotelyal nitrik oksit sentaz
ET	Endotelin
Fe	Demir
GMCSF	Granülosit-monosit koloni stimüle edici faktör
GSH	Redükte Glutatyon
GSHPx	Glutatyon Peroksidaz
GST	Glutatyon S transferaz
H₂O	Su
H₂O₂	Hidrojen peroksit
HOCL	Hipoklorik asit
ICAM	İntersellüler adezyon molekülü
IFN-γ	İnterferon gama
IL	İnterlökin
İ/R	İskemi Reperfüzyon
iNOS	İndüklenebilir Nitrik Oksit Sentaz
KAT	Katalaz
KCl	Potasyum klorür
LT	Lökotrien
MCP	Monosit kemoatraktan protein
MDA	Malondialdehid
MPO	Miyeloperoksidaz
Na	Sodyum

NAD⁺	Nikotin adenin dinükleotid
NMDA	N-metil D-Aspartat
nNOS	Nöronal Nitrik Oksit Sentaz
NO	Nitrik Oksit
O₂	Oksijen
O₂^{•-}	Süperoksit radikali
OH[•]	Hidroksil radikali
ONOO⁻	Peroksinitrit
PAF	Platelet aktivatör faktör
PAFR	Platelet aktivatör faktör reseptörü
PB	Potasyum fosfat tamponu
PECAM	Platelet-endotelyal hücre adezyon molekülü
PG	Prostaglandinler
PMNL	Polimorf nüveli lökositler
PSGL	P selektin glikoprotein
SMA	Superior Mezenterik Arter
SOD	Süperoksit Dismutaz
SOR	Serbest Oksijen Radikalleri
TBA	Tiyobarbütirik asit
TCA	Triklor asetik asit
TNF	Tümör nekrozis faktör
TXA₂	Tromboksan A ₂
XDH	Ksantin dehidrogenaz
XO	Ksantin oksidaz

TABLO DİZİNİ

<u>Tablo</u>	<u>Sayfa</u>
Tablo 1: Gruplarda izole barsak segmentinin Karbakol ve KCl'e verdiği kontraksiyon yanıtları.....	52
Tablo 2: Grupların MDA, GSH ve MPO değerleri.....	54
Tablo 3: Grupların sitokin değerlerinin karşılaştırmaları	58
Tablo 4: Gruplarda histopatolojik ve immünohistokimyasal değerlendirme sonuçları	59

ŞEKİL DİZİNİ

<u>Şekil</u>	<u>Sayfa</u>
Şekil 1: Hücre zedelenmesinde sitoplazmik kalsiyum artışının kaynakları ve sonuçları.....	5
Şekil 2: Superior mezenterik arter ve kanlandığı alanlar.....	8
Şekil 3: İnce barsak villus yapısı.....	9
Şekil 4: XO aracılı serbest radikal oluşum mekanizması.....	13
Şekil 5: Dokularda serbest oksijen radikallerinin direkt ve indirekt etkileri.....	14
Şekil 6: İ/R ile uyarılan lökosit migrasyonu.....	20
Şekil 7: Agmatinin Kimyasal yapısı.....	32
Şekil 8: Agmatin ve ilişkili moleküllerin metabolik yolları.....	33
Şekil 9: Agmatinerjik sinapsın şematize edilmesi.....	34

GRAFİK DİZİNİ

<u>Grafik</u>	<u>Sayfa</u>
Grafik 1. Grupların karbakole verdiği kontraksiyon yanıtları	53
Grafik 2. Grupların KCl'ye verdiği kontraksiyon yanıtları	54
Grafik 3. Grupların MDA değerleri	55
Grafik 4. Grupların GSH değerleri.....	56
Grafik 5. Grupların MPO değerleri.....	57

RESİM DİZİNİ

<u>Resim</u>	<u>Sayfa</u>
Resim 1: SMA'nın izole edilmesi.	38
Resim 2: SMA'nın klempe edilmesi ve barsak renginde soluklaşma.	39
Resim 3: İ/R hasarı sonrası barsakların görünümü.	39
Resim 4: Kontrol grubuna ait spontan kontraksiyonlar.	46
Resim 5: İ/R grubuna ait spontan kontraksiyonlar.	46
Resim 6: Kontrol+Agm grubuna ait spontan kontraksiyonlar.	47
Resim 7: İ/R+Agm grubuna ait spontan kontraksiyonlar.	47
Resim 8: Kontrol grubunun KCl'e verdiği kontraksiyon yanıtı.	48
Resim 9: Kontrol grubunun karbakole verdiği kontraksiyon yanıtı.	48
Resim 10: İ/R grubunun KCl'e verdiği kontraksiyon yanıtı.	49
Resim 11: İ/R grubunun karbakole verdiği kontraksiyon yanıtı.	49
Resim 12: Kontrol+Agm grubunun KCl'e verdiği kontraksiyon yanıtı.	50
Resim 13: Kontrol+Agm grubunun karbakole verdiği kontraksiyon yanıtı.	50
Resim 14: İ/R+Agm grubunun KCl'e verdiği kontraksiyon yanıtı.	51
Resim 15: İ/R+Agm grubunun karbakole verdiği kontraksiyon yanıtı.	51
Resim 16: Kontrol grubuna ait histopatolojik görüntü.	60
Resim 17: Kontrol+Agm grubuna ait histopatolojik görüntü.	60
Resim 18: İ/R grubuna ait histopatolojik görüntü.	61
Resim 19: İ/R+Agm grubuna ait histopatolojik görüntü.	61
Resim 20: Kontrol grubuna ait iNOS immün boyama görüntüsü.	62
Resim 21: Kontrol+Agm grubuna ait iNOS immün boyama görüntüsü.	62
Resim 22: İ/R grubuna ait iNOS immün boyama görüntüsü.	63
Resim 23: İ/R+Agm grubuna ait iNOS immün boyama görüntüsü.	63

1.GİRİŞ VE AMAÇ

Akut intestinal iskemi, abdominal aortik cerrahi, kardiovasküler cerrahi işlemlerde ve şiddetli şokta ortaya çıkan hayatı tehdit eden bir durumdur (1). İntestinal iskemi transplantasyon cerrahi sonrasında graft disfonksiyonundaki primer patofizyolojik olaydır.

İntestinal iskemi sırasında barsağın mukozal bariyer görevi bozulur, bakteriyel translokasyon gelişir ve bakterilerden salınan endotoksinler vücutta sistemik inflamatuvar yanıtı başlatır (2). İntestinal iskemide mortalite oranı yüksektir ve mortalitenin yüksek olmasının en önemli nedeninin bu sistemik inflamatuvar yanıt olduğu bildirilmektedir. İskemi ayrıca mukozal bariyerin yıkılmasının yanı sıra kapiller permeabilite artışına ve nekroza neden olmaktadır (3). İskeminin düzeltilmesi için dokuya yeniden kan akımı sağlanmalıdır. Fakat dokuya sağlanan reperfüzyon paradoksal olarak sadece iskemiyle oluşan hasardan daha büyük bir hasar yaratır ve bir dizi biyokimyasal reaksiyonu başlatır (4). Reperfüzyon serbest oksijen radikallerinin (SOR) oluşumu, lökosit infiltrasyonu (özellikle P selektin aracılı), proinflamatuvar sitokinler ve lökotrienlerin artışı ile ikinci bir hasar oluşumuna neden olur (5,6). SOR hücrede lipid peroksidasyonunu başlatır, bu da hücre membranında hasarlanmaya ve geçirgenliğin artışına neden olarak hücre ölümüne neden olur (7).

İntestinal iskemi barsakta mukoza hasarlanmasının yanı sıra bozulmuş intestinal motiliteyle karakterizedir. Barsak motilitesi ileusla sonuçlanabilecek boyutta azalır (8). Bu motilite değişikliklerine SOR, salınan inflamatuvar medyatörler, toplanan nötrofiller ve değişen nitrik oksit (NO) metabolizması gibi faktörler neden olur (9). Enterik sinir sisteminde N-metil D Aspartat (NMDA) glutamat reseptörlerinin yaygın olarak bulunduğu ve duyuşal ve motor refleşlerde rol aldığı bildirilmektedir. Ayrıca NMDA reseptörleri ile glutamaterjik ileti intestinal iskemi reperfüzyon (İ/R) sonrası ortaya çıkan motilite bozukluklarında rol alabilmektedir (10).

İntestinal İ/R esnasında NO sentez mekanizması da değişmektedir. Normal koşullarda NO serbest oksijen radikallerini temizlemesi, lökosit adezyonunu engellemesi ve vasküler permeabiliteyi koruması ile İ/R hasarında koruyucudur (11).

Ancak sitokin ve büyüme faktörlerine cevap olarak ortaya çıkan indüklenabilir nitrik oksit sentaz (iNOS) ile oluşan NO özellikle süperoksit radikali ile birleşerek peroksinitrit bileşiği aracılığı ile doku hasarına aracılık eder (12,13). Dokuda SOR'un artışı endotel kökenli NO yapımını azaltırken iNOS ile NO yapımına neden olur. Dokuda iNOS aracılı NO artışının inflamatuvar yanıt ile birlikte olduğu bildirilmektedir (12).

Agmatin arjinin dekarboksilazın (ADC) etkisiyle L-Arjininden sentezlenen polikasyonik bir amindir (14). Beyinde agmatinaz enzimi tarafından spermin ve spermidinin prekürsörü olan putresine hidrolize edilir. Bu nedenle agmatin memelilerde poliamin biyosentezinde bir medyatör olarak bilinmektedir (15). Agmatin nöronlarda sentezlenip depolanır ve salınır, ayrıca spesifik enzimatik yıkımı ve enerji bağımlı taşıyıcı ile inaktivasyonu bulunmasında dolayı beyinde bir nörotransmitter/nöromodulatör olarak kabul edilmektedir (14). ADC ve agmatinaz memelilerin beyinde ve mide, barsak ve aorta gibi diğer birçok organda tanımlanmıştır (15). Agmatin yüksek afiniteyle $\alpha 2$ adrenerjik ve imidazolin reseptörlerine bağlanır, özellikle NMDA reseptörleri olmak üzere voltaj kapılı katyon kanallarının blokajına neden olur (16). Agmatinin lokal, intratekal veya sistematik uygulanmasının eksitotoksinler tarafından oluşan nöronal hasarı, spinal kord ve beyin global/fokal iskemisinde iskemik hasarı azalttığı gösterilmiştir (17). Ayrıca agmatinin hipokampal ve serebellar hücre kültürlerinde NMDA ve glutamat toksisitesine karşı koruyucu olduğu gösterilmiştir (18,19). Agmatinin medulla spinalis (20) ve serebral iskemideki (21) nöroprotektif etkisinin iNOS inhibisyonu (14,21), apoptozisin önlenmesi (21), voltaj kapılı kalsiyum kanallarının kontrolü (22) ile ortaya çıktığı bildirilmektedir.

Bu tez çalışmasında barsak iskemi reperfüzyon modeli oluşturulan sıçanlarda agmatinin koruyucu etkilerinin olup olmadığını ve varsa koruyucu etki mekanizmalarını incelemeyi planladık. Literatürde agmatinin intestinal iskemi reperfüzyon hasarı üzerine etkilerini inceleyen herhangi bir çalışmaya rastlanmamıştır. İntestinal I/R hasarında agmatinin, gerek motilite değişikliklerinde gerekse mukozal hasarın oluşumunda rol oynayan oksidatif stres ve inflamatuvar yanıt üzerindeki etkilerinin incelenmesi planlanmıştır. Bu çalışmada; barsak segmentinin izole organ banyosunda agonistlere verdiği yanıtlar incelenerek motilite

değişiklikleri, lipid peroksidasyonunun göstergesi olarak malondialdehid (MDA), antioksidan savunma için redükte glutasyon (GSH), nötrofil birikiminin göstergesi olarak miyeloperoksidaz (MPO) aktivitesi, sistemik inflamasyonun göstergesi olarak plazma sitokin düzeyleri ve histopatolojik değerlendirme ile immünohistokimyasal olarak iNOS yapımı incelenmiştir.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. İskemi Reperfüzyon Hasarı

İskemi, kan ile birlikte dokuya ulaşması gereken substrat ve oksijenin bir şekilde engellenerek ulaşamaması veya kısıtlanması olarak tanımlanmaktadır (23). İskemi sonucunda dokunun oksijenden yoksun kalmasıyla hipoksik doku hasarı ortaya çıkar. Bu hasarın yok edilebilmesi için dokuya kan akımı tekrar sağlanmalıdır. Kan akımının tekrar sağlanmasına reperfüzyon denmektedir. Fakat iskemik dokunun reperfüzyonu dokuda paradoksal olarak sadece iskemi ile oluşan hasara göre çok daha ciddi bir hasara yol açar (4).

Hipoksiyle meydana gelen hücre hasarı, hücrenin temel bileşenlerinden bir veya daha fazlasında fonksiyonel ve biyokimyasal anormallikle sonuçlanır. İskemik hasarla hücrede en çok etkilenen organeller mitokondri, hücre membranı, hücre iskeleti ve hücre çekirdeğidir. Mitokondri hasarı genellikle hücrede nekroz veya apoptozisle sonuçlanır. Hasar sıklıkla mitokondri membranındaki yüksek iletkenli kanalların açılmasıyla oluşur. Bu kanalların açılması mitokondri membran potansiyelinin kaybı ve pH azalmasına neden olur. Daha sonra oksidatif fosforilasyon kaybolur, adenosin trifosfat (ATP) üretilmez ve hücre ölümü nekrozla sonuçlanır. Mitokondri, sitokrom-c gibi apoptotik yolakları aktive eden proteinler içerir. Mitokondri membranında permeabilite artışı bu proteinlerin hücre içine sızıp hücrenin apoptozisle ölümüne yol açar (24).

ATP düzeyinin normal sınırlardan %5-10 civarı azalması hücresel birçok sistemi etkiler. ATP'nin kaybıyla plazma membranında enerji bağımlı sodyum (Na) kanallarının aktivitesi azalır. Böylece hücre içinde Na birikimi, hücre dışına potasyum çıkışı olur. Net solüt yüke bağlı olarak hücrede su birikimi ile endoplazmik retikulumda dilatasyon olur. Hücre enerjisini korumak amacıyla kompensatuar olarak anaerobik glikolizisi arttırır. Bunun sonucu olarak hücre içi glikojen deposu hızla tükenir, laktik asit birikir, hücre içi pH ve hücresel enzimlerin çoğunun aktivitesi azalır. ATP'nin daha uzun süreli ve daha çok kaybedilmesiyle ribozomlar granüllü endoplazmik retikulumdan ayrılır ve polizomlardan monozomların oluşumu ile

protein sentezi azalır. Sonuç olarak membranların irreversibl hasara uğraması hücrede nekroza yol açar (24).

Normalde hücre içi serbest kalsiyum (Ca^{+2}) miktarı; hücre dışı, mitokondri ve endoplazmik retikulumda bulunan kalsiyuma göre ATP bağımlı Ca^{+2} taşıyıcılarla 10000 kat daha düşük tutulur. İskemi başlangıçta hücre içi depolardan Ca^{+2} salınmasına neden olarak, sonrasında plazma membranından Ca girişini artırarak sitozolik Ca^{+2} miktarında artışa neden olur (24).

Sitozolik Ca^{+2} miktarının artması hücrede potansiyel zararlı etkileri olan bir dizi enzimi aktifleştirir. Bu enzimler;

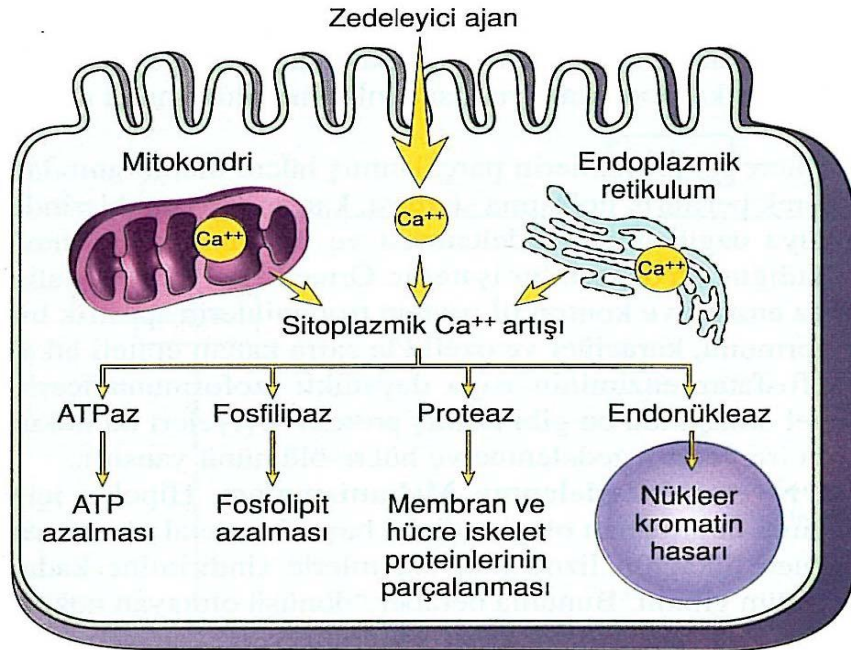
Fosfolipazlar: fosfolipidleri parçalayarak membran hasarına neden olur.

Proteazlar: hücre membranı ve hücre iskeletini hasara uğratar.

Endonükleazlar: DNA ve kromatinlerin parçalanmasına neden olur.

ATPazlar: ATP kaybına neden olur.

Sitozolik Ca^{+2} miktarı artışı ayrıca kaspazları direk aktive ederek ve mitokondri permeabilitesini arttırarak apoptozisi tetikler (24) (Şekil 1).



Şekil 1: Hücre zedelenmesinde sitoplazmik kalsiyum artışının kaynakları ve sonuçları (25).

İskemi sırasında meydana gelen birçok olay reperfüzyon sırasında oluşacak hasarlara zemin hazırlar. Parks ve Granger, iskemi-reperfüzyon modelinde, reperfüzyon esnasında oluşan doku hasarının iskemi esnasında oluşan hasardan daha büyük olduğunu bildirmişlerdir (26). Reperfüzyon döneminde dokuda nötrofil infiltrasyonu, kompleman sisteminin aktivasyonu, kalsiyum aracılı proteazların aktivasyonu, araşidonik asit metabolizması gibi pek çok sistem serbest radikal oluşumunu artırarak hasara neden olmaktadır. Sonuç olarak iskemi reperfüzyon hasarının fizyopatolojisinde birçok faktör rol almaktadır. Bunlardan en önemlileri;

- 1) Serbest oksijen radikalleri
- 2) Polimorf nüveli lökositler (PMNL)
- 3) Kompleman sistemi
- 4) Endotel hücreleridir (27).

2.2. İntestinal İskemi Reperfüzyon Hasarı

2.2.1. İnce barsağın yapısı ve fonksiyonlarının sinirsel kontrolü

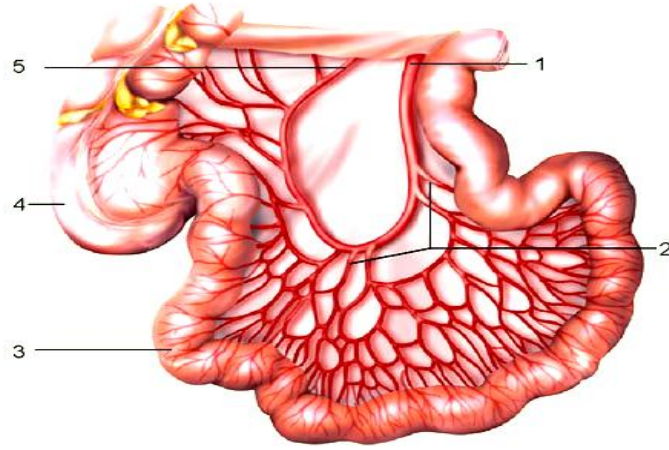
Gastrointestinal sistemin lümenal yüzeyi absorpsiyon işlevini yerine getirebilmek için yüzey alanını arttıracak şekilde kıvrımlı bir yapıya sahiptir. Lümen üst yüzeyindeki epitel tabakası mukus sekrete eden ekzokrin ve hormon sekrete eden endokrin hücreleri içermektedir. Epitel tabakasının hemen altında bağ dokudan oluşan ve içerisinde küçük kan damarları, sinir lifleri ve lenfatik damarlar bulunduran lamina propria tabakası bulunmaktadır. Bu tabakanın altında ince bir şekilde muskularis mukoza bulunmaktadır ve bu üç yapı (epitel-lamina propria-muskularis mukoza) intestinal mukozayı oluşturmaktadır. Mukoza altında içinde kan ve lenfatik damarlarla submukozal pleksus sinir ağını içeren submukozal tabaka vardır. Onun da altında muskularis eksterna tabakası bulunur. Burada daha ince olan longitudinal ve kalın olan sirküler kaslar olmak üzere iki kas tabakası mevcuttur. İki kas tabakası arasında ikinci bir sinir ağı olan myenterik pleksus yer alır. En dışta bağ dokudan oluşan seroza tabakası vardır (28).

Gastrointestinal kanalın düz kasları hemen hemen devamlı bir elektriksel aktivite içindedir. Gastrointestinal kontraksiyonların çoğu ritmik olarak ortaya çıkar.

İntestinal sistemin enterik sinir sistemi de denilen kendine ait sinir ağı mevcuttur. Bu ağ myenterik ve submukozal pleksuslardan oluşur. Myenterik pleksus temel olarak gastrointestinal hareketleri kontrol ederken, submukozal pleksus başlıca gastrointestinal sekresyonları ve lokal kan akımını kontrol eder (28). Ayrıca enterik nöronlardan birçok hormon ve nörotransmitter salgılanır ve bunlar motiliteyi etkiler. Myenterik pleksustaki yönleri geriye doğru olan kolinerjik nöronlar, P maddesi ve asetilkolin salgılayan nöronları aktive ederek düz kas kasılmasına yol açmaktadır. Yönleri ileriye doğru olan kolinerjik nöronlar ise NO, vazoaaktif intestinal peptid (VIP) ve adenozin trifosfat (ATP) salgılayan nöronları aktive ederek uyarının önünde gevşeme oluştururlar. Yine salgılanan motilin peptidi ince barsaklarda kontraksiyona neden olur. Ekstrinsik olarak sempatik ve parasempatik sistem de motiliteyi kontrol eder. Parasempatik kolinerjik etki genellikle barsak düz kas aktivitesini artırır ve sempatik noradrenerjik etki ise düz kas aktivitesini azaltır (28).

2.2.2. İnce barsak dolaşımının anatomi ve fizyolojisi

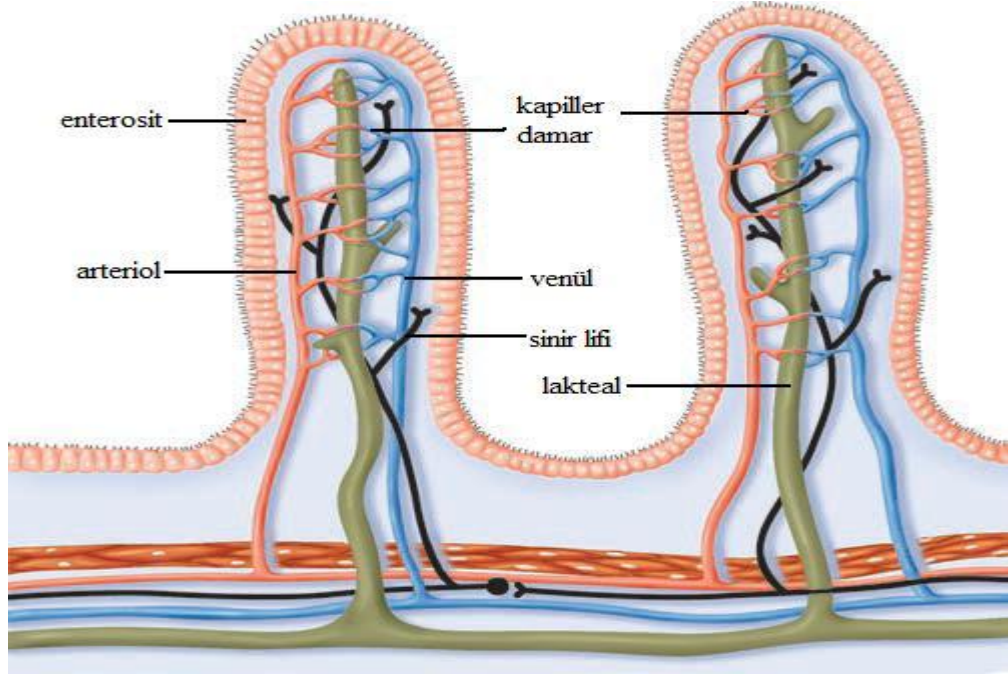
İnce barsak duodenum, jejunum ve ileum kısımlarından oluşmaktadır. İntestinal kan desteği esas olarak, abdominal aortun 3 majör dalı ile gerçekleşmektedir: Çölyak trunkus, superior mezenterik arter (SMA) ve inferior mezenterik arterdir. Bu üç damarın hepsi aortanın ön yüzünden çıkmaktadır. Duodenum başlıca çölyak trunkusun dalı olan pankreatikoduodenal arter tarafından beslenir. Jejunum ve ileum kanlanması SMA'nın çok sayıda olan dallarıyla sağlanır (şekil 2). Bu arterler pek çok dallara ayrılır ve mezenterde birbirleriyle bir ağ oluşturacak şekilde çok sayıda anastomoz yaparlar. Bu dallar daha sonra ince barsak boyunca marjinal arter olarak sonlanırlar. Marjinal arter barsak duvarına yakın ve paralel uzanan arter olarak tanımlanır (29). Marjinal arterden ayrılan serozal dallar (1A arteriolar damarlar) intestinal duvarda, submukozal vasküler pleksusu oluşturmak için muskularis eksternayı deler, submukozanın dış yüzeyi boyunca 2A arteriolar damarlar olarak uzanır. Ayrıca kapiller ağı oluşturan bir grup arteriel damar mukozal kript bezlerine kanı dağıtır, 3A arteriolar olarak adlandırılan bu damarlar villusların uçlarını besler ve bir örgü gibi subepitelyal kapiller pleksusu oluşturur. Genellikle her villusu bir veya iki ven drene eder ve büyük venüllerle birleşir (5).



Şekil 2: Superior mezenterik arter ve kanlandığı alanlar (30) 1)SMA 2)İleal arterler 3)ileum 4)çekum 5)İleokolik arter

Villuslarda damarların paralel yerleşmiş olması ve santral arterle kapiller ve venüllerin sadece 15-20 mikron uzaklıkta seyretmesi kan akımının zıt yönlü olmasını sağlar (Şekil 3). Villusta ters akım mekanizmasının birkaç etkisi vardır: Teorik olarak, kompleks bir şant olan bu mekanizma, arteriel oksijenin bir kısmının uç kapillerlere ulaşmadan önce villus bazalinde yakın venlere diffüze olmasına izin verir. Bu durum villus uçlarının iskemiyeye hassas olmasına neden olur. Ayrıca arteriyel hipotansiyon durumlarında kan akış hızı yavaşlatılır ve değiş tokuş yoluyla oksijen şantının artmasına neden olan transit zamanı uzar. Kan akımının engellendiği durumlarda bu olay zıt akım mekanizması ile barsakta iskemik hasarı arttıracığı anlamına gelir (5).

Barsaklar villus kript aksı boyunca İ/R hasarına karşı heterojenik duyarlılık gösterir. Barsak villus uçlarında bulunan hücreler bazaldaki hücrelere göre iskemik hasara daha duyarlıdır. Zıt akım mekanizmasının yanı sıra villus ucunda bulunan hücrelere barsak lümenindeki içeriğin mekanik kuvvet uygulamasının bu duyarlılıkta rol oynadığı bildirilmektedir (5,31). Ayrıca daha önce yapılmış çalışmalarda villus ucunda bulunan enterositlerin kriptlerdeki enterositlere göre santral arteriolden daha düşük basınçla kanlanması nedeniyle olduğu gösterilmiştir (32). Yapılan bir çalışmada da enterosit duyarlılığının hücrenin farklılaşma durumuna bağlı olduğu ileri sürülmüştür (33).



Şekil 3: İnce barsak villus yapısı (28).

Mezenterik dolaşım büyüklüğü ve kompleksliğiyle dikkat çekmektedir. Gastrointestinal sistem dinlenim sırasında kardiyak outputun %25'ini, yemek sonrasında ise %35'ten fazlasını alır ve bu değerlerle dinlenim sırasında en fazla kanlanan organlar arasındadır. Mezenterik kan akımının %70'i direk mukoza ve submukoza katmanlarına gider, kalanıysa müsküler ve serozal katmanlara dağılır (5). Barsak kan akımının otoregülasyonu, hipoperfüzyon esnasında gerekli oksijen ihtiyacının karşılanması ve mukozal devamlılığın korunması için gereklidir. Bir çok major faktörün etkileşimi kan akımının intestinal bölgeye uygun dağılımını sağlar. Bu faktörler ekstrensek ve intrinsek kontrol mekanizmalarından oluşmaktadır. İntrinsek kontrol mekanizmaları, metabolik ve myojenik yollar olmak üzere ikiye ayrılır. Ekstrensek kontrol mekanizmaları içinde; nöral ve humoral faktörler yer alır (34). İntestinal doku kanlanmasında ekstrensek mekanizmalar lokal kontrol mekanizmalarına göre daha zayıftır (35).

Metabolik teoriye göre; barsakta oksijen ihtiyacı ve barsağa oksijen sunumu arasında dengesizlik olduğunda lokal metabolitlerin konsantrasyonunun artışı vazodilatasyona ve dokuda hiperemiye yol açar. Metabolik mekanizma yeterli oksijen dağıtımını ve kan akımını korumaya çalışır (5).

Myojenik teoriye göre; perfüzyon basıncındaki akut bir azalma arteriolar basınç reseptörlerini uyarır ve arteriollerde duvar gerilimi düşürülerek kan akımının korunması sağlanır. Myojenik mekanizma barsak kapiller basıncını ve transkapiller sıvı değişimini sabit tutmaya yöneliktir (5).

İntestinal vasküler yatak, perfüzyon basıncında azalma olması durumunda vasküler rezistansı azaltır. Kan akımındaki bu otheregülasyon geniş bir basınç aralığında etkilidir. Dahası perfüzyon basıncı düştükçe kan barsağın çeşitli katmanları arasında yeniden dağıtılır ve metabolik olarak en aktif olan yüzeyel mukozaya yönlendirilir (35).

İntestinal kan akımının nöral kontrolüne baktığımızda, esas olarak otonom sinir sisteminin adrenerjik liflerinin kontrolü altındadır. Çölyak gangliondaki postganglionik adrenerjik lifler uyarıldığında mezenterik arter ve arteriyollerde vazokonstriksiyon oluşur (36). Vagal, kolinerjik, histaminerjik ve sempatik sistem gibi birçok değişik tipte nöral stimülasyon barsağı etkileyebiliyor olsa da, splanknik dolaşım üzerinde baskın ve muhtemelen tek etkili nöral sistem adrenerjik liflerdir (34).

İntestinal kan akımının düzenlenmesinde iki hormon sistemi önemlidir. İlk olarak ekstrasellüler volümün azalması, renin-anjiyotensin mekanizmasını uyarır. Bunun sonucu açığa çıkan anjiyotensin II, direkt olarak mezenterik vazokonstriksiyona neden olur. İkinci sistem; azalan kan volümü ve hiperozmolarite, nörohipofizi uyararak antidiüretik hormon salgılamasına neden olur. Antidiüretik hormon, mezenterik arterlerde vazokonstriksiyon; mezenterik venlerde ise dilatasyona yol açar (37).

İntrinsik mekanizmalar; ekstrinsik mekanizmalar, nöral ve humoral faktörler ile barsakta kan dolaşımının uygun paylaşılması için etkileşim içindedir (38).

2.2.3. İntestinal iskemi reperfüzyonu

İntestinal iskemi genellikle tromboz veya emboli ile meydana gelen arteriyel oklüzyon sonucu oluşurken, kalp yetmezliği, sepsis, alfa adrenerjik veya dijital ilaç kullanımı ile oluşan düşük mezenter akımın olduğu nonoklüziv durumlarda oluşur (39). Ancak mezenterik arterler arasındaki kollaterallerin miktarı ve komşu dolaşım

çok fazla olduğundan dokulara kan akımı kompanse edilebilir (39). Bu yüzden tanıyı kesinleştirmek zordur. Zor tanı konması ve iskemik dokuların hızlı kötüleşen doğası nedeniyle akut intestinal iskemi %60-80 mortalite oranlarına sahip vasküler acil bir durumdur (40).

İç organlar içinde barsak muhtemelen İ/R hasarına karşı en duyarlı organdır. Reperfüzyon sonrasında mukoza daha fazla hasarlanır (32). İntestinal iskemi barsakta mukoza hasarlanmasının yanı sıra bozulmuş intestinal motiliteyle karakterizedir. Barsak motilitesi ileusla sonuçlanabilecek boyutta azalır (8). Bu motilite değişikliklerine SOR, salınan inflamatuvar medyatörler, toplanan nötrofiller ve değişen NO metabolizması gibi faktörler neden olur. Genellikle; SOR üretimi İ/R hasarında ilk oluşan olaylardan biridir ve direk hücre hasarının yanı sıra nötrofillerde kemotaksise neden olduğu bilinmektedir (9). İntestinal İ/R, barsak duvarında özellikle kas tabakasında inflamatuvar yanıtı tetikler. Bu inflamatuvar yanıtla beraber nötrofillerin toplanması ve ekstrasvazasyonu kas lifleri arasındaki sinsisyumların bozulmasına neden olur. Dolayısıyla barsak düz kasının kasılma fonksiyonu etkilenir ve bozulur (41). İskemik koşullarda ATP gibi enerji kaynaklarının tükenmesi de kas liflerinde meydana gelen azalmış kontraktiliteye katkıda bulunur (9). NO güçlü bir düz kas gevşeticisidir. Enterik nöronlardan salınan yapısal ve nöronal NO, gastrointestinal sistemde motilitede etkili major inhibitör düzenleyicidir. Ancak inflamasyonun tetiklendiği iskemik durumlarda iNOS aracılığıyla üretilen aşırı miktardaki NO barsakta gelişen ileusa sebep olan esas medyatördür (42). Deneysel birçok çalışmada iskemik barsakta iNOS inhibitörlerinin kullanılmasıyla barsak motilitesinin düzeldiği bildirilmiştir (42-44). İskemi ile tetiklenen inflamatuvar yanıt, platelet aktivatör faktör (PAF) ve sitokinler gibi birçok proinflamatuvar medyatörün ve onların ürünlerinin artmasına sebep olur. Bu medyatörler nöromotor fonksiyonu bozarak barsak motilitesini değiştirirler (45).

Splanknik arterlerin oklüzyon ve reperfüzyonu vücutta dolaşım şokuna neden olur. Bu şok özellikle vasküler permeabilite artış, PMNL aktivasyon ve adezyonu, proinflamatuvar medyatörlerin salınımı, serbest nitrojen ve oksijen radikallerinin oluşumu yoluyla meydana gelir (39). Splanknik İ/R ile oluşan hasar, özellikle mukoza ve submukozal alanlarda endotel harabiyetine neden olan yoğun bir inflamasyonla karakterizedir (39).

İnce barsağın iskemi ve reperfüzyonu, mukozal bariyerin bozulması, bakteriyel translokasyon ve inflamatuvar yanıt tetikler ve beraberinde uzak organlarda da görülen sıvı-elektrolit ve asit-baz dengesi bozukluklarına neden olur. Bakteriyel translokasyon canlı bakterilerin barsak mukozasından mezenterik lenf nodu ve diğer organ ve dokulara geçişidir (39). Normalde vücudu barsak lümenindeki zararlı ortama karşı koruyan intestinal bariyerin fonksiyonunun bozulması, gastrointestinal İ/R hasarının önemli bir sonucudur. Bu nedenle bozulmuş barsak motilitesi ve emilimine ek olarak, intestinal permeabilite artışı ve portal ve sistemik dolaşıma bakteriyel translokasyonun artışı barsağın İ/R hasarı ile ilişkilidir. Sitokin kaskadının aktivasyonu ile birlikte intestinal bakteriyel translokasyonun sistemik inflamatuvar yanıt sendromuna katkıda bulunduğu düşünülmektedir (46).

İntestinal İ/R hasarı patofizyolojisinde önemli olan, yukarıda özet olarak bahsedilen faktörler aşağıda daha ayrıntılı tartışılmıştır:

2.2.3.1. Serbest oksijen radikallerinin rolü

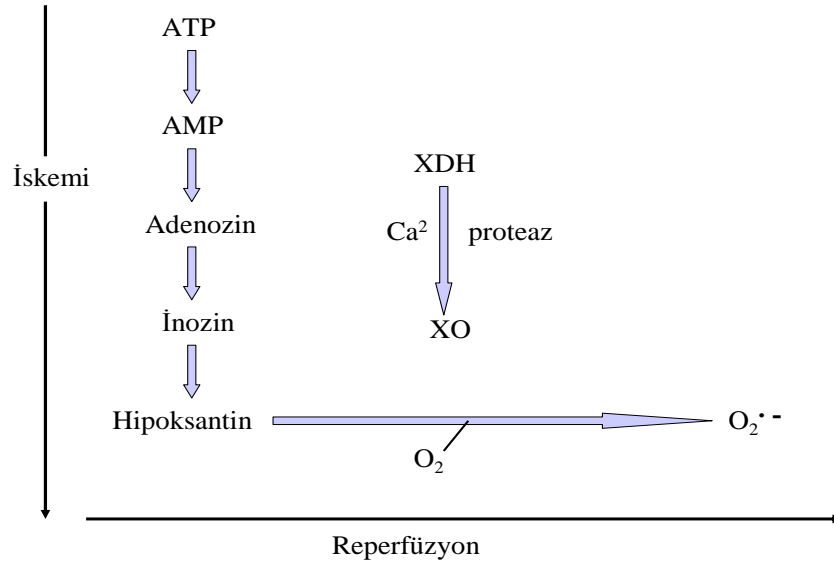
İskemik dokuya reperfüzyonla beraber oksijenin (O_2) gelmesi SOR'nin kaynağını oluşturur. Normal koşullar altında oluşan serbest radikaller endojen antioksidan sistemler tarafından yok edilirler. Fakat reperfüzyon sırasında aşırı miktarda SOR oluşumu, daha sonradan zararlı etkiler yaratacak olan oksidatif stres adı verilen bir süreci açığa çıkarmış olur (47).

Serbest radikaller dış yörüngesinde çiftleşmemiş tek bir elektron bulunduran kimyasallar sınıfıdır. Serbest radikallerin İ/R sürecindeki kaynakları; mitokondrilerin elektron transport zincirleri, ksantin oksidaz (XO) metabolizması, endotel hücreleri, prostaglandinler ve aktive olan nötrofillerdir (39).

İskemik periyod boyunca ATP hipoksantine katabolize olur. Normal fizyolojik koşullarda hipoksantin, ksantin dehidrogenaz (XDH) enzimi tarafından ksantin ve ürik aside dönüştürülür. Normalde bu reaksiyonda elektron alıcısı olarak nikotin adenin dinükleotid (NAD^+) kullanılır. İskemi sırasında dokuda hipoksantin birikir. İskemi boyunca hücre içinde Ca birikimi XDH'ın XO'a dönüşümüne neden olur ve bu olay iskeminin süresi uzadıkça artar. İskemide hipoksantin ürik aside dönüşümü XO tarafından gerçekleştirilir ve burada elektron alıcısı olarak moleküler

oksijen kullanılır (şekil 4). Reperfüzyon sırasında ortama gelen moleküler oksijenin XO tarafından kullanılarak pürin metabolitleriyle reaksiyona girmesi, İ/R hasarında dokuya göre değişen derecelerde sorumlu tutulan serbest radikallerin en önemli kaynağını oluşturmaktadır (39,46). İntestinal XO aktivitesi barsakta serbest radikal oluşumunun en önemli kaynaklarından biridir ve esas olarak mukozada villus tabanından ucuna kadar artan oranda yer almaktadır. Mukozanın iskemiye en hassas yer olmasının sebeplerinden biri de buradaki XO aktivitesidir (48).

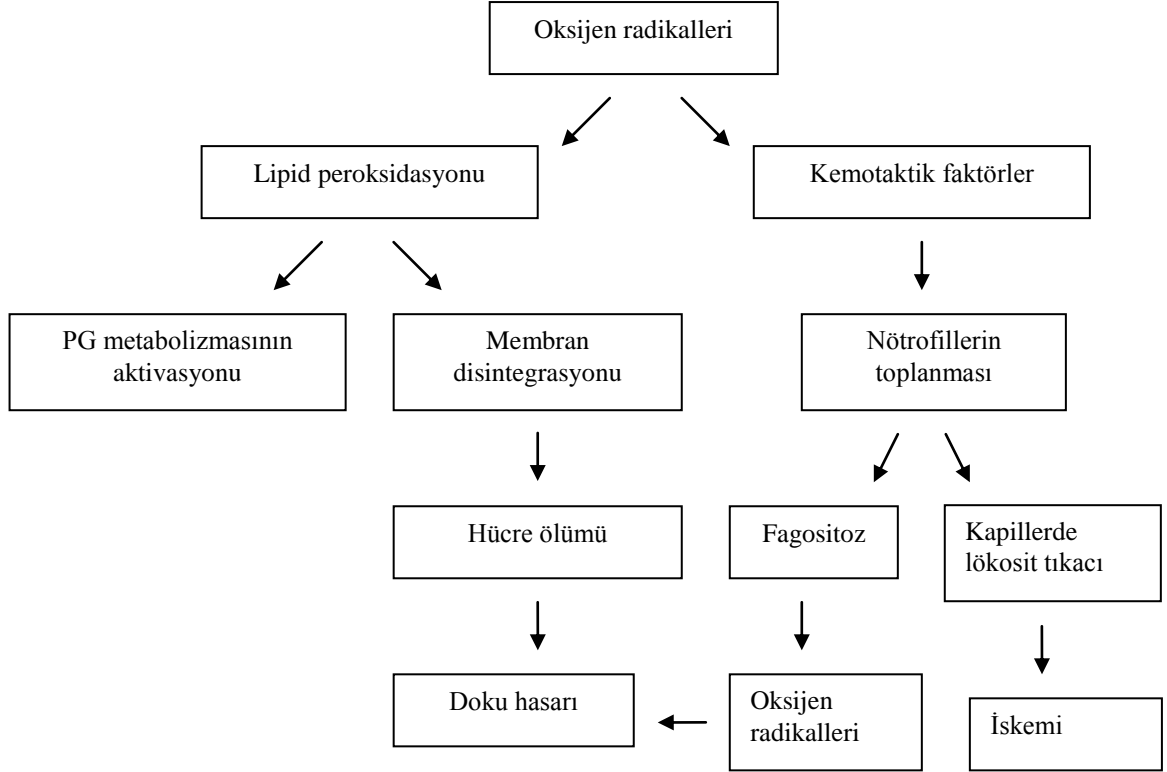
İntestinal İ/R boyunca üretilen aşırı miktarlarda SOR, endojen antioksidanlar tarafından yok edilemez ve hücre membranlarıyla reaksiyona girip barsakta lipid peroksidasyonunu başlatır. Aynı zamanda birçok kemotaktik medyatörün salınmasına neden olarak granülositlerin kapiller endotellerine gelmesini sağlar. Granülositlerden de birçok proteaz salgılanıp endotel harabiyetine neden olmaktadır (39).



Şekil 4: XO aracılı serbest radikal oluşum mekanizması (32,48)

Serbest radikaller aşırı reaktif ve kararsız bir yapıya sahiptirler. Bu yüzden proteinler, lipidler, karbonhidratlar ve özellikle hücre membranı ve nükleik asit gibi organik ve inorganik kimyasal yapılarla reaksiyona girerek hücrede zedelenme oluştururlar (39). Özellikle hücre membranlarında poliansatüre yağ asitleri bol miktarda vardır ve serbest radikallere çok duyarlıdır. Oksijen radikalleri,

poliansatüre yağ asitleri ile doğrudan reaksiyona girerek hücre membranlarında lipid peroksidasyonuna yol açar. Dolaylı olarak radikaller etkilenmiş dokuda nötrofil birikimine neden olup ciddi mukozal lezyona yol açan inflamatuvar süreci başlatırlar (Şekil 5)(49).

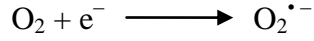


Şekil 5: Dokularda serbest oksijen radikallerinin direkt ve indirekt etkileri (49)

Reaktif oksijen türlerinin en başta gelenleri süperoksit anyon radikali, hidrojen peroksit, singlet oksijen ve hidroksil radikalleridir. Serbest oksijen radikalleri normal koşullar altında antioksidan sistem tarafından yok edilirler (49,50).

2.2.3.1.1. Süperoksit radikali ($O_2^{\bullet -}$)

Moleküler oksijene bir elektron (e^-) eklenmesi süperoksit radikali oluşumuyla sonuçlanır (43). Bu olay enzimatik olarak nikotinamid adenin dinükleotid (NADPH) oksidaz ve XO aracılığıyla oluşurken, nonenzimatik olarakta mitokondriyal elektron transport zincirinde redoks tepkimelerine giren semiubikinon gibi bileşenler aracılı olur (44).



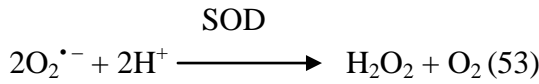
Reperfüzyonun sağlanmasıyla dokuya gelen kanla beraber dokuda nötrofil birikimi gerçekleşir. Nötrofillerde, eizinofillerde ve monositik fagositer hücrelerde bulunan NADPH oksidaz, oksijeni ve NADPH'ı süperoksit radikaline dönüştüren reaksiyonu katalizler (51).



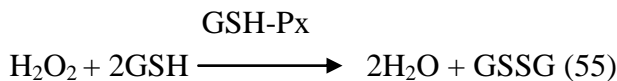
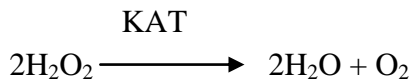
Süperoksit nispeten benign bir radikaldir. Demir-sülfür proteinlerini kolaylıkla inaktive etmesine rağmen çoğu biyolojik molekülle reaksiyona girmez. Bununla birlikte demir-sülfür içeren proteinlerinden ayrılan demirler aracılığıyla oluşan hidroksil radikali gibi sekonder ürünler ve buna ek olarak peroksinitrit süperoksit toksisitesine major katkıda bulunan bileşiklerdir (52).

2.2.3.1.2. Hidrojen peroksit (H₂O₂)

Süperoksit radikali süperoksit dismutaz (SOD) aracılığıyla dismutasyonla yok edilir. Bu reaksiyonla H₂O₂ meydana gelir. H₂O₂ molekülü eşlenmemiş elektron içermez ve bu yüzden radikal türevi değildir (53).



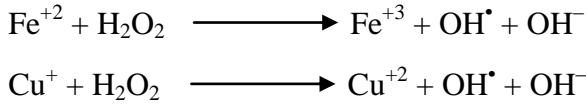
Oluşan H₂O₂, katalaz (kat), peroksiredoksin ya da glutatyon peroksidazla (GSH-Px) suya (H₂O) katalize edilir (54).



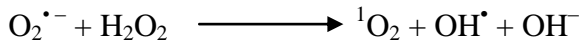
H₂O₂ serbest radikal olmamasına rağmen serbest radikal biyokimyasında önemli bir rol oynar. Çünkü H₂O₂, geçiş metal iyonlarının varlığında kolayca parçalanarak en reaktif ve en toksik oksijen radikali olan hidroksil radikalini (OH•) oluşturmaktadır. H₂O₂; lipid solubl olup membranlardan kolayca geçebildiği için ve OH• üretmek suretiyle canlı sistemlerde önemli hasarlara sebep olduğundan H₂O₂ birikiminin kontrolü hücreler için biyolojik olarak önemlidir (56,57).

2.2.3.1.3. Hidroksil radikali

OH• son derece reaktif ve aköz solüsyonlarda yarıömrü 1 nanosaniyeden daha kısadır. Bu nedenle üretildiğinde üretim yerinin yakınındaki moleküllerle reaksiyona girer. OH• çeşitli mekanizmalarla üretilmektedir. İyonize radyasyon H₂O'nun ayrışmasına neden olarak OH• ve hidrojen atomu oluşturur. Ayrıca alkilhidroperoksidazların fotolitik ayrışmasıyla oluşur. En büyük kısmı ise demir (Fe), bakır (Cu) gibi geçiş metallerinin H₂O₂ ile reaksiyonu sonucunda oluşur (53,58). Bu reaksiyon aşağıda formülize edilen Fenton reaksiyonu olarak bilinmektedir.



Süperoksit radikali ve hidrojen peroksitin etkileşimiyle de Haber-Weiss reaksiyonu olarak bilinen reaksiyonla OH• oluşur (59).



2.2.3.1.4. Singlet oksijen (¹O₂)

Singlet oksijen gerçek bir radikal olmamasına rağmen mikrosaniyeler kadar kısa bir yarı ömüre sahip reaktif oksijen türüdür. Fenton benzeri bir reaksiyonla oluşur. Alternatif olarak süperoksit ve hidroksil radikalinin reaksiyona girmesiyle meydana gelir (60).

2.2.3.1.5. Nitrik oksit (NO)

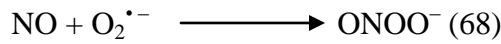
NO birçok organda özel düzenleyici fonksiyonlara sahip olan, oldukça reaktif bir serbest radikaldir (61). NO, nitrik oksit sentaz (NOS) denilen enzim ailesi tarafından, bir aminoasit olan L-arginin'in terminal guanidin grubunun NO'e çevrilmesiyle üretilir. Bu oluşum esnasında moleküler oksijen ile, kofaktör olarak, NADPH, flavin adenin dinükleotid, flavin mononükleotid ve tetrahidrobiopterine ihtiyaç vardır. NO sentezlendikten sonra hızla hemoglobin, metilen mavisi ve süperoksit anyonu tarafından nötralize edilir veya saniyeler içinde nitrat veya nitritlere dönüştürülür (62). NO hidrofobik ortamlarda sudan 70 kez daha fazla çözünebilir haldedir ve hücre membranlarından kolayca difüze olur. Yarı ömrünün kısa olması nedeniyle primer olarak lokal etki gösterir (63).

NOS ailesi üç izoformdan oluşmaktadır. Bunlar nöronal NOS (nNOS), endotelial NOS (eNOS), ve iNOS'tur. Bu üç izoform sentez edildikleri ve buldukları yere göre ve ayrıca Ca^{+2} bağımlılığına göre farklılıklar gösterirler: NOS-I yada nNOS özellikle nöronlarda bulunur. NOS-II yada iNOS başta sitokinle indüklenmiş makrofajlar olmak üzere, nötrofiller, trombositler, vasküler düz kas hücreleri ve damar dışı birçok hücreden de izole edilmiştir. NOS-III ya da eNOS ise endotel hücrelerinde bulunmaktadır (63). nNOS ve eNOS Ca^{+2} 'a bağımlı olarak çalışırlar ve bu yüzden konstitutif NOS (cNOS) olarak adlandırılırlar (62).

Gastrointestinal sistemde NO nonadrenerjik nonkolinerjik major inhibitör nörotransmitter olarak gösterilmiştir. NO myenterik pleksustan nNOS'un aktivasyonu ile salınır. Sinirlerden salınan NO intestinal düz kas hücrelerinde gevşemeye neden olur. İntestinal sfinkterlerin kas tonusunun ayarlanmasını sağlar. Ayrıca peristaltik refleksin regülasyonunda önemlidir (64). Asetilkolin ya da bradikinin gibi reseptör aracılı agonistler ve mekanik stres, endotel hücrelerinde inositol trifosfat (IP_3) aracılığı ile hücre içi depolardan geçici olarak Ca^{+2} salınmasına neden olur. Artan Ca^{+2} , Ca^{+2} -kalmodülin kompleksini oluşturarak eNOS aktivasyonuna neden olur. eNOS aracılığıyla NO üretimi geçicidir ve hücre içi Ca^{+2} seviyesiyle paraleldir. eNOS nanomolar seviyelerde NO üretimine neden olur ve hücre içi Ca^{+2} seviyesi azaldığında üretim de azalır. Üretilen NO damar tonusunun düzenlenmesinde rol alarak sitoprotektif etkiler gösterir (63). cNOS aracılığıyla

üretilen NO intestinal sistemde mukoza bütünlüğünün korunmasında rol alır ve antiinflamatuvar etkiler gösterir (65). NO'nin nötrofillerdeki adezyon moleküllerini ve vasküler endoteldeki P-selektin yapımını inhibe ettiği gösterilmiştir (66). eNOS ve nNOS'un aksine iNOS hücre içi Ca değişikliklerine daha az duyarlıdır (63). iNOS aracılı NO sentezi birçok fizyolojik ve patolojik süreçle ilgilidir. İntestinal sistemin çeşitli inflamatuvar hastalıklarında iNOS varlığı gösterilmiştir ve aşırı NO üretildiği bilinmektedir (67). iNOS tarafından NO üretimi transkripsiyonel seviyede düzenlenir, başlıca sitokinler ve endotoksin gibi mikrobiyal ürünlerle uyarılır. iNOS ile NO üretimi mikromolar seviyelerde olur. Bu düzeydeki NO mitokondri membran porlarından geçişi ve kaspazları aktive ederek hücrede apoptozis ve nekroza yol açar. NO'nin genel sitotoksik etkilerinden bu yüksek NO değerleri sorumludur (63). NO'nin kendisi aynen H₂O₂'te olduğu gibi tek başına serbest oksijen radikalleri gibi toksik değildir. Fakat reaktif oksijen türleriyle etkileşime girip onların zararlı etkilerini arttırarak sitotoksik etki gösterir. NO ve O₂^{•-} in birleşiminden oluşan peroksinitrit (ONOO⁻) mitokondri içindeki enzimlerin parçalanmasına ve lipid peroksidasyonuna neden olur. Ayrıca DNA'da oksidatif hasara neden olur ve DNA tamir enzimlerini inhibe eder (65).

Peroksinitrit oluşumu:



İntestinal İ/R'da sitotoksik etkilerden sorumlu NO'nin iNOS yoluyla üretilen çok miktardaki NO olduğu bildirilmektedir. Bu yüzden iNOS enziminin spesifik inhibisyonunun yararlı etkileri olduğu bildirilmiştir (32). iNOS geninden yoksun farelerde yapılan bir çalışmada, farelerin intestinal İ/R hasarında mukozal bariyer bozulmasına ve bakteriyel translokasyona karşı dirençli olduğu gösterilmiştir. Bu çalışma iNOS'un reperfüzyon hasarındaki en önemli medyatörlerden biri olduğunu desteklemektedir (69). Ayrıca intestinal İ/R hasarı sonrası indüklenen iNOS'un mukozal apoptozise yol açtığı gösterilmiştir (70). Reperfüzyon süreci boyunca iNOS yoluyla üretilen NO, proteinlerin tirozin kalıntılarına nitrozilleyerek intestinal İ/R de meydana gelen akciğer hasarında da sorumlu tutulmaktadır (71). İntestinal İ/R

sırasında meydana gelen ileusun sebebinin de iNOS ile üretilen NO olduğu ileri sürülmektedir (42).

2.2.3.2. Lökositlerin rolü

Nötrofil olarak bilinen PMNL dolaşımında bulunan lökositlerin %50-60 kadarını oluşturur. Konağı mikrobiyal patojenlerden koruyan doğal immün yanıtın önemli bileşenidirler. Ayrıca ölü veya hasarlı hücrelerin zararlı etkilerini de azaltırlar. PMNL'in barsaktaki primer görevi lümen mikroplarını öldürüp, endotel ve mukozadan olabilecek translokasyonları önlemektir (72). İ/R hasarı lökosit aktivasyonu, kemotaksis, lökosit endotel hücre adezyonu ve transmigrasyonla karakterizedir (73). Aktif nötrofiller intestinal İ/R'dan sonra lokal ve sistemik organ hasarının oluşmasındaki primer medyatörlerden biridir (74).

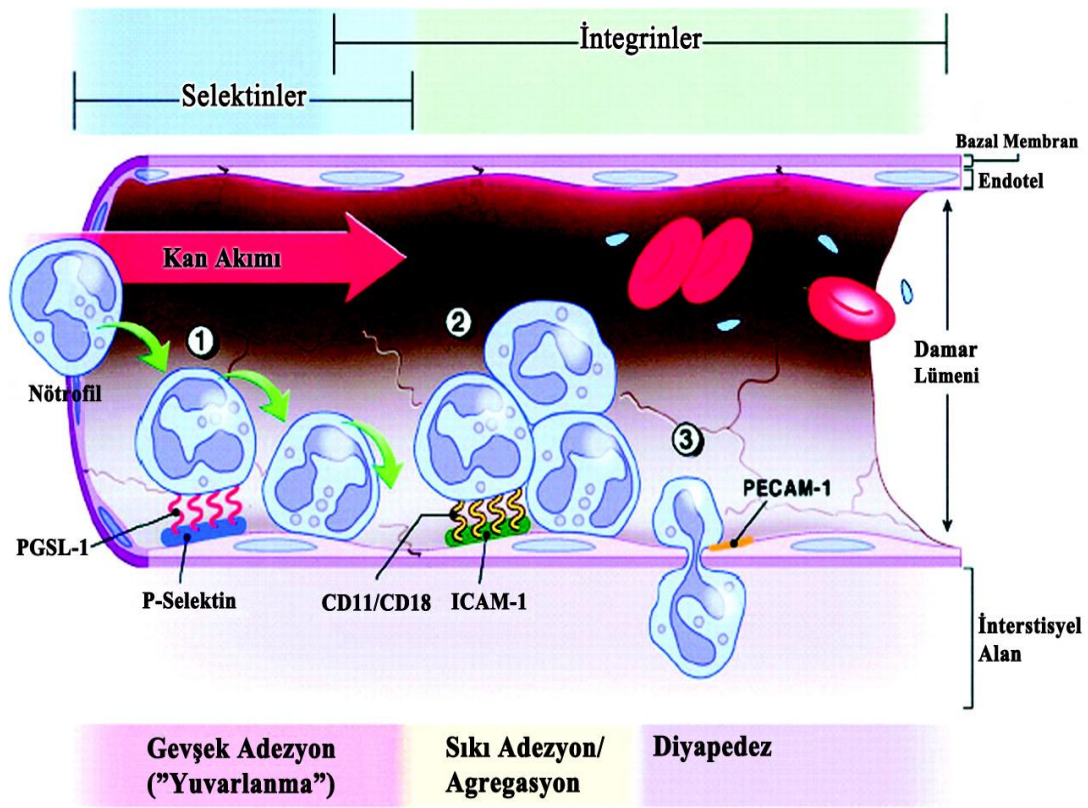
PMNL'lerin aktivasyon ve migrasyonları endotel hücrelerinde ve lökositlerde bulunan adhezyon molekülleri aracılığıyla olur (27). Lökosit endotel hücre etkileşimini sağlayan başlıca 3 adezyon molekül ailesi vardır. Bunlar:

a)Selektinler (P-selektin, L-selektin, E-selektin): Lökosit ve endotelin ilk etkileşimini sağlayan glikoprotein yapıda bir ailedir. L-selektin özellikle nötrofil ve lenfosit başta olmak üzere lökositlerin yüzeyinde yapısal olarak bulunur ve aktive endotelde lökositin yuvarlanma hareketine katılır. P-selektin endotel hücresindeki weibel-palade cisimciklerinde yada trombositlerin α granüllerinde bulunur. Trombin, histamin, H_2O_2 ve kompleman gibi humoral faktörlerle çok hızlı bir şekilde yapımı artar ve hücre yüzeyine gönderilir. Yani İ/R hasarı P-selektin yapımını artırır. P-selektin lökosit yuvarlanmasındaki (lökosit rolling) major medyatördür. Lökosit göçünün ilk basamağı endotelde bulunan P-selektin ile lökositteki P-selektin glikoprotein-1 (PSGL-1)'in etkileşime girmesidir. E-selektin endotel hücrelerinin yüzeyinde bulunur ve sitokinler tarafından daha yavaş bir şekilde yapımı artar. E-selektin düzeyi 4-6 saate kadar önemli bir değişiklik göstermez, bu yüzden reperfüzyon hasarının geç fazında önemli bir protein haline gelir.

b) β 2 integrinler: lökositler üzerinde bulunan CD11a/CD18, CD11b/CD18 ve CD11c/CD18 olmak üzere üç üyesi vardır. MAC-1 olarak bilinen CD11b/CD18

nötrofiller ve damar endoteli arasındaki yapışmayı (adezyonu) sağlayan major glikoproteindir.

c)İmmünglobulin ailesi: Endotel yüzeyinde bulunan intersellüler adezyon molekülü-1 (ICAM-1), lökositte bulunan MAC-1'e bağlanarak endotel ve nötrofil arasındaki sıkı adezyonu sağlar. Sıkı adezyon lökosit göçünün ikinci basamağıdır. Platelet-endotelyal hücre adezyon molekülü (PECAM-1) ise trombosit, lökosit ve endotel yüzeyinde bulunur ve lökosit transmigrasyonunun gerçekleşmesini sağlar. Transmigrasyon ise lökosit göçünün son basamağıdır (75) (şekil 6).



Şekil 6: İ/R ile uyarılan lökosit migrasyonu (73).

Nötrofillerin, $O_2^{\bullet -}$ ve H_2O_2 ürettiği ve H_2O_2 ve klorür iyonlarından hipoklorik asid (HOCL) oluşumunu katalizleyen MPO salgıladığı bilinmektedir (76). PMNL'ler, NADPH oksidaz sistemi ve MPO enzimi aracılığıyla SOR üretirler. Normal şartlarda NADPH oksidaz enzimi inaktif haldedir. PMNL uyarıldığında enzim hızla aktifleşir. Elektron vericisi olarak NADPH kullanır ve ortama bol miktarda $O_2^{\bullet -}$ radikali salınır. Artmış O_2 tüketiminin olduğu bu duruma "solunum

patlaması” adı verilir. Bu durum, organizma tarafından istemli olarak SOR oluşturulan tek durumdur. Sonuçta açığa çıkan $O_2^{\bullet-}$ radikali, antimikrobiyal ajanların öldürülme sürecinin bir parçasıdır (77). $O_2^{\bullet-}$ radikali spontan dismutasyonla H_2O_2 'ye dönüşür. Degranülasyonla birlikte nötrofil granüllerinde bulunan MPO enzimi, ortamda Cl^- iyonu varlığında, H_2O_2 'i HOCL'ye dönüştürür. HOCL, oldukça kuvvetli bir oksidandır (78). İnce barsağa nötrofil migrasyonu MPO aktivitesi ölçülerek indirek olarak değerlendirilebilir (79).

Reperfüze barsağa masif bir PMNL akışı olur, mikrovasküler permeabilitede artış görülür ve mukozal bariyerin fonksiyonu bozulur (80). Mikrovasküler yapının hasarlanmasına aktif nötrofillerden salınan kollajenaz, jelatinaz, elastaz gibi enzimler neden olmaktadır. Ayrıca spesifik granüllerinde bulunan ve salınan laktoferrin fenton reaksiyonuna Fe^{+2} sağlamaktadır (81). Reperfüzyon döneminin en ağır mikrovasküler patolojisi olan kan akışının yeniden durması fenomenine (No reflow phenomen) aktive olmuş nötrofillerin yol açtığı gösterilmiştir (82). Reperfüzyonda granülosit aktivasyonunu ve infiltrasyonunu sağlayan birçok madde vardır. Bunlar endotoksin ve N-formillenmiş peptid gibi barsak lümeninden mukozal interstisyuma geçmeye çalışan bakteriyel ürünler, lökotrienler, C5a gibi aktif kompleman komponentleri, lipid hidroperoksitler ve süperoksit bağımlı kemoatraktanlardır (83). Reperfüzyonla aktifleşen nötrofiller sistemik dolaşıma tekrar geçebilirler. Aktif nötrofillerin İ/R ile oluşan uzak organ hasarından sorumlu olduğu bildirilmektedir. Aslında lökosit adezyonunun engellenmesiyle uzak organ hasarının olmaması çoklu organ yetmezliği sendromunda nötrofil aktivasyonunun merkezi bir rol aldığı güçlü bir şekilde destekler (76).

2.2.3.3. Komplemanın rolü

Kompleman sistemi doğal immün yanıtın ve inflamasyonun önemli bir bileşeni olarak tanımlanmaktadır. Kompleman sistemi kanda ve hücre yüzeylerinde yer alan yaklaşık 35-40 kadar protein ve glikoproteinden oluşmaktadır. Plazma proteinlerinin çoğunluğu karaciğerde üretilmesine rağmen kompleman proteinlerinin asıl üretimi monosit/makrofaj gibi hücrelerde gerçekleşmektedir. Bu sentezden dolayı

kompleman proteinleri dokularda ve diğer vücut sıvılarında önemli konsantrasyonlara ulaşmaktadır. Kompleman sisteminin asıl görevi patojenleri tanıyıp opsonizasyon yaparak konağı mikrobiyal enfeksiyonlara karşı korumaktır (84). Kompleman proteinleri normalde inaktif halde prekürsör zimojenler şeklinde bulunmaktadır. Komplemanın aktivasyonu ile inflamasyona neden olan biyolojik olarak aktif küçük proteinler salınır. Bunlar anafilotoksinlerdir (C3a, C4a ve C5a) (84,85). Anafilotoksinler diğer inflamatuvar hücrelerin aktivasyonundan ve bölgeye toplanmasından sorumludur. Ayrıca vazoaktif aminler ve lizozomal enzimlerin hücrelerden serbestlenmesine, vasküler permeabilitede artışa ve düz kas kontraksiyonuna neden olurlar. C5a nötrofillerin agregasyonunu, kemotaksisini, sitotoksik aktivitesini ve nötrofillerden proteaz ve SOR salınımını indükler. Aynı zamanda C5a eozinofil, bazofil, monosit, makrofaj ve mikrogliyal için güçlü bir kemotaktik faktördür. Komplemanın sistemik aktivasyonundan sonra C5a E-selektin, ICAM-1 ve VCAM-1 gibi vasküler adezyon moleküllerinin yapımının artışına neden olur. Kompleman aktivasyonunda diğer bir olay C5b'nin C6, C7, C8 ve C9 ile etkileşime girerek C5b-9 olarak bilinen membran atak kompleksinin oluşmasıdır. Bu kompleks membran fosfolipazlarını aktive ederek membranda porların açılmasına neden olur (86). Bahsedilen tüm bu olaylar İ/R hasarında komplemanın neden olduğu etkilerdir. İntestinal İ/R hasarı oluşturulmuş hayvanların kompleman inhibitörleriyle tedavi edildiğinde histolojik olarak mukozal hasarda ve vasküler permeabilitede azalma, hayatta kalma oranında artış saptanmıştır (86).

2.2.3.4. Endotelin rolü

Endotel hücreleri kan akımını, permeabiliteyi ve hücre trafiği gibi birçok özelliği düzenleyen dinamik ve multifonksiyonel bir yapıya sahiptir. Endotel hücreleri bu fonksiyonların düzenlenmesindeki kritik rollerinin bir sonucu olarak İ/R hasarının patofizyolojisinde çok önemli bir yere sahiptirler. İ/R hasarının endotel hücrelerinde birçok değişikliğe neden olduğu bilinmektedir. Bu değişiklikler; membran depolarizasyonu, membran akışkanlığının artması, iyon dağılımındaki dengesizlikler, hücrelerde şişme, hücre iskelet bozuklukları ve inflamatuvar hücrelerin aktivasyonudur (87).

Endotelde NO ve prostasiklin gibi vazodilatasyon yapan maddeler ile endotelin (ET) ve tromboksan A2 (TxA₂) gibi vazokonstriktör maddeler salınır. İ/R sonrasında vasküler bölgede endotel kaynaklı NO ve endotel bağımlı gevşeme azalır. Ayrıca ET aracılığıyla gerçekleşen vazokonstriksiyonun NO tarafından modüle edildiğini gösteren birçok çalışma mevcuttur (88-90). NO arteriyel dolaşımında ET'in vazokonstriktör etkisini tersine çevirme eğilimindedir. Venlerde ise bunun tersi söz konusudur. İ/R hasarında ET/NO oranı endotelin lehine bozulur. Sonuçta arteriyel vazokonstriksiyon, venlerde vazodilatasyon olur (27).

Endotel hücrelerinde oksidatif stres sonucu kompleman sistemi aktive olur ve lökosit adezyon moleküllerinin üretimi artar. SOR etkisi ile endotel hücreleri hasara yanıt olarak interlökin-1 (İL-1), PAF, prostaglandinler (PG I₂, PG E₂), granülosit-monosit koloni stimüle edici faktör (GM-CSF), büyüme faktörleri, ET, NO ve TxA₂ salgırlar. Aktive olan endotel hücreleri ek olarak kendi bazal membranlarını sindiren kollajenazlar salgıllama yeteneğindedir (27).

2.2.3.5. Sitokinlerin rolü

Sitokinler; doğal ve kazanılmış bağışıklıkta rol oynayan hücrelerin büyüme, farklılaşma ve immün yanıtta fonksiyonlarını düzenleyen protein ailesidir. Kökenlerine göre mononükleer fagositlerden salgılananlara 'monokin', lenfositlerden salgılananlara 'lenfokin' ve lökositlerden salgılananlara 'interlökin' adı verilir. Lökositlerin kemotaksisine neden olan sitokinler ise 'kemokin' olarak adlandırılır (91). Sitokinlerin etkileri hedef hücrelerdeki kendilerine özgül membran reseptörlerine bağlanmaları ile başlar. Bu etki lokal ve sistemik olabilir. Sitokinler etkilerine göre; pro-inflamatuar ve anti-inflamatuar sitokinler olmak üzere iki gruba ayrılırlar. Pro-inflamatuar sitokinler (İL-1, İL-6, TNF- α), diğer sitokinlerin salınımını artırır ve akut faz yanıtını uyarırlar. Anti-inflamatuar sitokinler (İL-4, İL-10, İL-13) ise, pro-inflamatuar sitokinlerin salınımını inhibe ederler (92).

Tümör nekrozis faktör (TNF) ve İL-1 esas olarak aktive olmuş makrofajlardan ve aynı zamanda mast hücreleri ve endotel hücrelerinden de sentezlenebilir. Sekresyonları mikrobiyal ürünler, bakteriyel endotoksinler, immün kompleksler ve T lenfosit ürünleriyle uyarılır. İL-1 ve TNF; endotelde endotelial

aktivasyonu uyarır. TNF ve IL-1 endotelde adezyon moleküllerinde artışa, lökosit toplanmasına, sitokin ve eikazonoidlerin artmasına sebep olmaktadır (24).

Son zamanlarda ince barsak TNF ve IL-1 için önemli bir kaynak olarak gösterilmiştir. İntestinal mukoza lamina propriasında yerleşik makrofajlar büyük miktarlarda TNF ve IL-1 içerir ve ince barsak TNF ve IL-1 üretimi için büyük bir potansiyele sahiptir. Ayrıca çeşitli çalışmalarda enterosit ve Paneth hücrelerinin de TNF ve IL-1 üretme yeteneğine sahip olduğu gösterilmiştir (93).

TNF- α , IL-1 β ve IL-6, İ/R aracılı inflamatuvar süreçlerde anahtar rol oynayan pro-inflamatuvar sitokinlerdir. TNF- α ve IL-1 β 'nin inflamasyonun erken döneminde ortaya çıktığı benzer ortak sinyal molekülleri üzerinden etki gösterdiği bilinmektedir (94). IL-1 doku fibroblastlarını aktive ederek, ekstrasellüler matriks üretiminde artışa sebep olur. TNF- α nötrofil aktivasyonuna, endotel trombojenitesine ve endotelial lökosit adezyon moleküllerinin salınmasına neden olarak nötrofil aracılı endotel hasarına katkıda bulunur (24). Dahası TNF- α ve IL-1 β apoptozu tetikler. IL-6 ise B hücrelerinin matürasyonunun sağlanmasından ve nötrofillerin oksidatif patlaması ve serbest radikallerin salınmasından sorumludur (94).

TNF ve IL-1'in sistemik dolaşıma geçmesi sistemik akut faz reaksiyonlarını tetikler. Ateş, letarji, karaciğerden akut faz proteinlerinin sentezinde artış, nötrofillerin dolaşıma geçmesi ve adrenokortikotropik hormonların salınmasına neden olur (24).

Yapılan çalışmalar intestinal İ/R hasarında TNF ve IL-1 β 'nin doku ve plazma seviyelerinin önemli ölçüde arttığını göstermiştir. TNF ve IL-1 inhibitörü kullanarak intestinal hasar azaltılabilmiş ve hayvanların yaşam süreleri uzatılabilmektedir (93).

IL-4; B ve T lenfosit gibi hücrelerin büyüme ve farklılaşmasını sağlayan, aktive olmuş T lenfosit ve makrofajlar tarafından üretilen önemli düzenleyici bir sitokindir. B lenfositlerden antikor üretimini artırır ve T lenfositlerin T helper 2 (Th2) hücrelerine farklılaşmasını sağlayan en önemli faktördür. Çoğu araştırmacı tarafından antiinflamatuvar etkili bir sitokin olduğu bildirilse de proinflamatuvar etkili olduğunu gösteren araştırmacılar da mevcuttur. İnfalamasyonda endotel üzerinde VCAM-1 yapımında önemli bir rol oynar. VCAM-1'in yapımını etkilemesiyle T

lenfosit, monosit, bazofil ve eozinofillerin direk infalamasyon alanına göç etmesine neden olur (95).

İnflamatuar süreçlerde rol oynayan interferon-gama (IFN- γ) fizyolojik olarak T hepler 1, sitotoksik T hücreleri ve aktif naturel killer hücreleri tarafından üretilir. IL-2, IFN- γ sentezini arttırabilir. IFN- γ monosit ve makrofajlarda TNF-alfa sekresyonunu ve reaktif oksijen türlerinin salınımını arttırır. Ayrıca lipopolisakkaritler tarafından uyarılan IL-1 β sentezini arttırır. İntestinal İ/R boyunca IFN- γ ve IFN- γ mRNA'sının arttığı ve hasara katkıda bulunduğu gösterilmiştir (96).

2.2.3.6. Platelet aktivatör faktör (PAF)

PAF normal fizyolojik koşullar altında çok az salınımı olan doğal bir fosfolipiddir. Ancak akut inflamasyon veya İ/R sonucu oluşan oksidatif stres durumlarında üretilir ve endotel hücrelerinin dış yüzeyinde bulunur. Çok çeşitli hücre tipinde ve dokuda uygun uyarılarla PAF sentezlendiği gösterilmiştir. Genellikle membran fosfolipidlerinden fosfolipaz A₂ aracılığıyla sentezlenir (97). Özellikle inflamatuvar reaksiyonun gelişimine katılan monosit/makrofaj, PMNL, eozinofil, bazofil ve trombositlerde üretilmektedir. Buna ek olarak insan endotel hücrelerinin trombin, anjiotensin II, vazopresin, lökotrien C₄-D₄, histamin, bradikinin, elastaz, katepsin G, hidrojen peroksit, plazmin, IL-8, IL-1 α ve TNF- α ile stimülasyonu PAF ürettiği gösterilmiştir (98). Salındıktan sonra çeşitli biyolojik aktivitelere sahip PAF reseptörünün (PAFR) aktivasyonu sonuçlanır. PAFR, G proteinine bağlıdır. PAF reseptörüne bağlanır ve guanozin difosfat-guanozin trifosfat dönüşümünü sağlayan G proteinini aktive eder. Bu olay fosfolipaz C ve fosfolipaz A₂'nin aktivasyonu ile sonuçlanır. Bu aktivasyon protein kinaz C'nin aktivasyonunu sağlayan diaçilgliserol oluşumuna, hücre içi depolardan Ca serbestlenmesini sağlayan IP₃'ün salınmasına neden olur (98). Aktive olmuş PAF barsak reperfüzyonu boyunca PECAM-1 ekspresyonuna ve IL-6 sentezine neden olup, antiinflamatuvar etkili olan IL-10 sekresyonunu inhibe ederek intestinal İ/R hasarında rol alır. Reseptörle etkileşim nötrofil aktivasyon ve kemotaksisine, vasküler permeabilitede ve trombosit aktivasyonunda değişikliklere yol açar ve bu durum İ/R hasarının klinik bulgularına katkıda bulunur (97,98).

2.2.3.7. Araşidonik asit (AA) metabolitleri

Reperfüzyonda hücre içi Ca miktarının artmasıyla fosfolipaz A₂ enziminin aktivitesi aşırı artar. Bu enzim membran fosfolipidlerinden AA salınmasına neden olur. AA'ten de siklooksijenaz enzimiyle PG, tromboksan ve prostasiklin (PGI₂) sentezlenir. Lipooksijenaz enzimiyle de lökotrienler (LT) meydana gelir. Bu maddeler vazokonstrüksiyona, vazodilatasyona, vasküler permeabilitede artışa neden olup, trombosit agregasyonunu ve PMNL kemotaksisini uyarırlar (39). PGI₂ trombosit agregasyonunu önleyen güçlü bir vazodilatatördür. İ/R hasarı ile birlikte endotelial hücrelerden salınan PGI₂ düzeyi azalır ve neticede hasarlanan dokularda artan ödem sonucu mikrodolaşım giderek bozulur. TXA₂ ise prostosiklinin aksine trombosit agregasyonunu arttıran ve vazospazmın başlamasına neden olan bir endotelial faktördür. Endojen araşidonik asitten trombositler tarafından sentezlenir. Fiziyojik şartlarda PGI₂ sentezi ile paralel olarak sentezlenir ancak reperfüzyon ile birlikte her ikisinin salınımındaki düzensizliklere eklenen nötrofil infiltrasyonu mikrosirkülasyonu bozar ve PLA₂ aktivasyonu TXA₂ düzeyinin giderek artmasına katkıda bulunur. LTB₄ araşidonik asitten lipooksijenaz yolu ile salınan ve İ/R sırasında endotelial disfonksiyonda önemli rolü olan bir metabolittir. LTB₄ nötrofil yüzeyindeki spesifik reseptörlere bağlanarak CD18 gibi adhezyon moleküllerinin aktivasyonuna yol açarak serbest radikal ve proteazların artışına katkıda bulunur. Ayrıca nötrofillerin kemotaktik aktivitesinde artışa neden olur (99).

2.3. Barsakta İ/R Hasarından Korunma Stratejileri

2.3.1. Antioksidan tedavi

Normal şartlar altında O₂ molekülü mitokondride suya dönüştürülmek için sitokrom sistemi tarafından tetravalan bir indirgenmeye uğrar. Ancak O₂'nin %1-2 si bu yoldan kaçır ve tek değerlikli bir indirgenmeyle SOR'u oluşturur. Normal şartlar altında bu radikaller SOD ve GSH gibi endojen antioksidan sistemler tarafından nötralize edilir, böylece hücrelere zararlı etki gösteremezler. Bununla birlikte

hücrede, oksidan üretimi antioksidan savunma sisteminin kapasitesini aştığında yada antioksidan sistemin etkinliği azaldığında 'oksidatif stres' oluşur. İnsan vücudunda çok sayıda doğal antioksidan vardır fakat bunların hepsi İ/R ile oluşan oksidanlara karşı korunmada yeterli olmamaktadır (100). Bu yüzden birçok antioksidan farmakolojik ajan deneysel olarak denenmiştir ama hala klinik olarak kullanılabilir ajan sayısı çok sınırlıdır. Endojen olanlar ve eksojen olanlar olarak ikiye ayrılır.

2.3.1.1. Endojen antioksidanlar

Enzim Olan Endojen Antioksidanlar:

SOD: En etkili intrasellüler antioksidan enzimlerden biridir. Süperoksit radikalinin oksijen ve daha az reaktif olan hidrojen peroksite dismutasyonunu sağlar. İnsanda 3 izoformu bulunmaktadır. Bunlar sitozolik bakır-çinko (Cu-Zn) SOD, mitokondriyal Mn-SOD ve ekstrasellüler SOD'dır. SOD 'pin-pon' tipi bir mekanizmayla enzimin aktif bölgesinde bulunan geçiş metallerinin oksidasyon ve redüksiyonunu sağlayarak oldukça yüksek reaksiyon hızlarıyla $O_2^{\bullet-}$ i yok eder (53). Riaz ve ark. yaptığı çalışmada intestinal İ/R uygulanan ratlarda SOD kullanımının nötrofil yuvarlanması ve adezyonunu azaltarak oksidatif stresi azalttığını göstermişlerdir(101).

Katalaz: Hücre içinde peroksizomlarda bulunmaktadır. Enzim çok etkili bir şekilde H_2O_2 'i su ve moleküler oksijene dönüştürür. Katalaz tüm enzimler içinde en yüksek dönüşüm hızına sahip enzimdir. Her bir dakikada bir molekül katalaz yaklaşık 6 milyon H_2O_2 molekülünü su ve oksijene dönüştürebilir (53).

Glutasyon peroksidaz: Bu enzimin birçok çeşidi vardır. Major formları; sitozolik GSH-Px, glutasyon S transferaz (GST), fosfolipid hidroperoksit glutasyon peroksidazdır. GSH-Px lar, H_2O_2 ve lipid peroksitleri indirgenmiş glutasyonu okside forma çevirerek katalize ederler (78).

GST peroksidasyon reaksiyonlarını GSH'ı kullanarak katalize eder ancak substrat olarak H_2O_2 kullanmaz. GST yalnızca lipid peroksitleri katalize eder. Aktif bölgesinde selenyum bulunmaz. Başlıca sitoplazmada yerleşiktir, küçük miktarlarda ise mitokondri ve endoplazmik retikulum membranlarında bulunur (78).



Mitokondriyal sitokrom oksidaz: Mitokondriyal sitokrom oksidaz solunum zincirinin son enzimidir ve süperoksidi detoksifiye eder. Bu reaksiyon fizyolojik şartlarda sürekli meydana gelen normal bir reaksiyondur, bu yolla yakıt maddelerinin oksidasyonu tamamlanır ve bol miktarda enerji üretimi (ATP) sağlanır. Ancak çoğu zaman süperoksit üretimi mitokondriyal sitokrom oksidaz enziminin kapasitesini aşar ve bu durumda diğer antioksidan enzimler devreye girerek süperoksidin zararlı etkilerine engel olurlar (102).

Enzim Olmayan Endojen Antioksidanlar:

Melatonin: Epifiz bezinde en iyi bilinen kimyasal medyatördür. Çok yavaş ve sınırlı olmak üzere özel durumlarda retina, kemik iliği, genitoüriner sistem gibi başka organlardanda salındığı bilinmektedir. Melatonin direk olarak toksik oksijen ve nitrojen reaktanlarını ortamdan temizler, antioksidan enzimleri stimüle eder. Elektron transport zincirinin etkinliğini artırır, böylece elektron sızıntısını ve serbest radikal oluşumunu önlemiş olur, ayrıca ATP sentezini destekler. Melatonin bu etkiler sayesinde mitokondri bütünlüğünü korur, hücrenin yaşamasını ve fonksiyonlarını korumasını sağlar. Melatonin bazı mekanizmalarla lipid peroksidasyonuna karşıda koruyucudur (103). Birçok araştırmacı melatoninin intestinal İ/R daki etkisini incelemiş ve koruyucu etkilerinin olduğunu göstermişlerdir. Üstündağ ve ark. intestinal İ/R uyguladıkları ratlarda melatoninin SOD ve GSH-Px'ı artırarak oksidatif stresi azalttığını göstermişlerdir (104). Özaçmak ve ark. (105) benzer şekilde intestinal İ/R'da melatoninin MDA seviyesini düşürüp, GSH düzeylerini arttırdığını, barsak kontraktilesini düzenlediğini ve İ/R ile oluşan doku hasarını azaltmada etkili olduğunu bulmuşlardır.

Seruloplazmin: Seruloplazmin ferroksidaz aktivitesi ile ferröz demirin, ferrik demire oksidasyonunu katalizleyerek demirin transport proteini olan transferin ve depo proteini olan ferritine yüklenmesini kolaylaştırır. Aynı zamanda fenton reaksiyonunu da önleyerek antioksidan aktivite gösterir. Seruloplazmin, süperoksid

ve diğ er reaktif oksijen türlerini uzaklaştırabilme yeteneğ i ile de bir plazma antioksidanı olarak kabul edilmektedir (106).

Glutasyon: Glutasyon sitoplazma, nükleus ve mitokondride oldukça yüksek miktarda bulunur ve bu kompartmanlarda major solubl antioksidandır. İndirgenmiş formuna GSH, okside formuna ise GSSG (glutasyon disülfid) denmektedir (53). Glutasyonun oksidatif strese karşı koruyucu rolü çeşitli mekanizmalarla olmaktadır:

i) GSH, GSH-Px ve GST gibi oksidatif stresi detoksifiye eden enzimlerin kofaktörü olarak görev yapar.

ii) GSH plazma membranından aminoasit taşınmasına katılır.

iii) GSH direk olarak OH[•] ve singlet oksijeni ortamd an temizler, hidrojen peroksit ve lipid peroksitleri GSH-Px ile detoksifiye eder.

iv) GSH en önemli antioksidanlardan olan vitamin C ve E'nin aktif formlarına dönüşümünü sağlar, GSH vitamin E'nin tokoferol radikalini direk olarak indirger, indirek olarak semidehidroaskorbatın askorbata dönüşümünde indirgeyici rol oynar (53).

Diğ erleri: Transferin, laktoferrin, miyoglobin, hemoglobin, ferritin, bilirubin, sistein, metiyonin, ürat, laktoferrin ve albüminin de antioksidan etkisi bulunmaktadır.

2.3.1.2. Eksojen antioksidanlar

Vitamin C: Bir karbonhidrat türevi olan askorbik asit suda eriyen bir vitamindir ve zincir kıran bir antioksidandır. C vitamini, E vitamininden daha yavaş olarak lipit peroksil radikallerini ortadan kaldırabilir. Askorbik asit özellikle O₂⁻ ve OH⁻ radikali ile reaksiyona girer. Askorbat hem antioksidan hem de preoksidan işlevi olan bir yapı olarak bilinir. Sonuçta; antioksidan işlev, askorbattan radikale elektron veya hidrojen taşınması ile gerçekleşir. Diğ er taraftan özellikle H₂O₂ ve Fe⁺² varlığında redoks reaksiyonlarına katılan askorbat, mikrozomal lipit peroksidasyonunda preoksidan rol oynayabilir (107).

Vitamin E: E vitamini tokoferol yapısında olup doğal olarak alfa, beta, gama, delta gibi çeşitli formlarda bulunmaktadır. Bunlar içerisinde α-tokoferol en geniş doğal dağılıma ve en yüksek antioksidan aktiviteye sahiptir. E vitamini zincir

kırıcı bir antioksidan olarak bilinir. Doymamış yağ asitleri, çift bağlara sahip oldukları için oksijen ile hızlı bir şekilde reaksiyona girerek mitokondri, mikrozoim ve hücre içi zarların yapısını ve metabolizmasını bozan peroksit ve hidroperoksitleri doyurarak peroksit radikallerinin oksidan etkisini azaltır. Böylece peroksit oluşumu önlenmiş olur. Yapısındaki fenolik hidroksi grubuna sahip aromatik halka kimyasal olarak aktif kısmını oluşturur ve antioksidan özelliği buradan kaynaklanır. Lipid peroksil radikalini parçalayarak lipid peroksidasyon zincir reaksiyonlarını sonlandırır. Otoksidasyonun başlatıcısı olan peroksit ve hidroperoksit radikallerini inhibe eder (108).

Karotenoidler: Vitamin A'nın ön maddesi olan β -karotenin serbest oksijeni nötralize ettiği, O_2^{\bullet} radikalini temizlediği, OH, alkoksil ve peroksil radikalleriyle direk olarak etkileşerek antioksidan görev yaptığı ve lipid peroksidasyonunu önlediği saptanmıştır. β -karoten serbest oksijen uzaklaştırıcı olarak bilinen en güçlü karotenoiddir (109).

Selenyum: Toprakta, suda, sebzelerde, deniz ürünlerinde, ette, karaciğer ve mayada bulunan bir mineraldir. GPx gibi birçok antioksidan enzimin aktif bölgesinde yer almaktadır. Düşük dozlarda, antioksidan, antikarsinojenik ve immünmodülatör olarak rol oynayarak yararlı etkiler gösterir (110).

2.3.2. İskemik ön koşullandırma

İskemik ön koşullandırma, dokuları uzamış iskeminin zararlı etkilerinden korumak için, 'kısa süreli periodlarla iskemiye maruz bırakmak' olarak tanımlanabilir. İskemik ön koşullandırma ikiye ayrılır: Erken veya klasik iskemik ön koşullandırma, geçici iskemiden hemen sonra başlayıp sonraki 2-3 saat devam eder. Geç iskemik ön koşullandırma, geçici iskemiden 12-24 saat sonra başlar ve yaklaşık 3-4 gün sürer. Erken faz birkaç dakika içinde olur ve hücre fonksiyonlarını düzenleyici etki gösterir. Geç faz için pekçok stres yanıt proteininin aktivasyonu ve çeşitli proteinlerin de novo sentezi gerekir (73).

2.3.3. Antilökosit tedavi

Lökosit aracılı İ/R hasarını azaltmaya yönelik deneysel modeller üç gruba ayrılır: 1. Lökosit aktivasyonunun inhibisyonu; 2. Adezyon moleküllerinin salınımının inhibisyonu; 3. Lökosit-endotel adezyonunun inhibisyonu. İlk grup deneysel modellerde lökosit aktivasyonuna neden olan mediatörlerin (ör: histamin, TNF- α) inhibisyonu hedeflenmiştir. İkinci grupta adezyon moleküllerinin salınımını engellemek amacıyla antiinflamatuvar ilaçlar, glukokortikoidler, altın tuzu ve D-penisilamin denenmiştir. Üçüncü grupta ise adezyon molekülleri ve reseptörlerine karşı monoklonal antikorlar kullanılmıştır. Özellikle son gruptaki ajanlar, deneysel modellerdeki başarılı sonuçlara rağmen; klinikte, olası immünolojik reaksiyonlar nedeniyle, kısıtlı kullanım alanı bulmuşlardır (32).

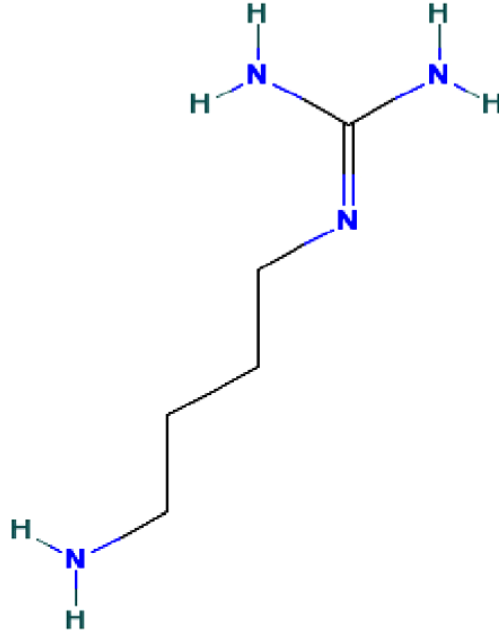
2.3.4. Antikompleman tedavi

İ/R sonrası doku hasarı, kompleman inhibisyonu ve kompleman tüketimi yoluyla önemli şekilde azatılmıştır ve kompleman eksikliği olan hayvanlarda yapılan çalışmalarda İ/R sonrası doku hasarının daha az olduğu görülmüştür. Deneysel myokardiyal İ/R modellerinde C3 dönüştürücü enzim inhibitörleri, C5a reseptör antagonistleri, C5 monoklonal antikorları, çözünebilir C1 reseptör antagonistleri ve C1 esteraz inhibitörleri kullanılmış; kompleman inhibisyonunun infarkt boyutunu azalttığı gösterilmiştir (46).

2.4. Agmatin

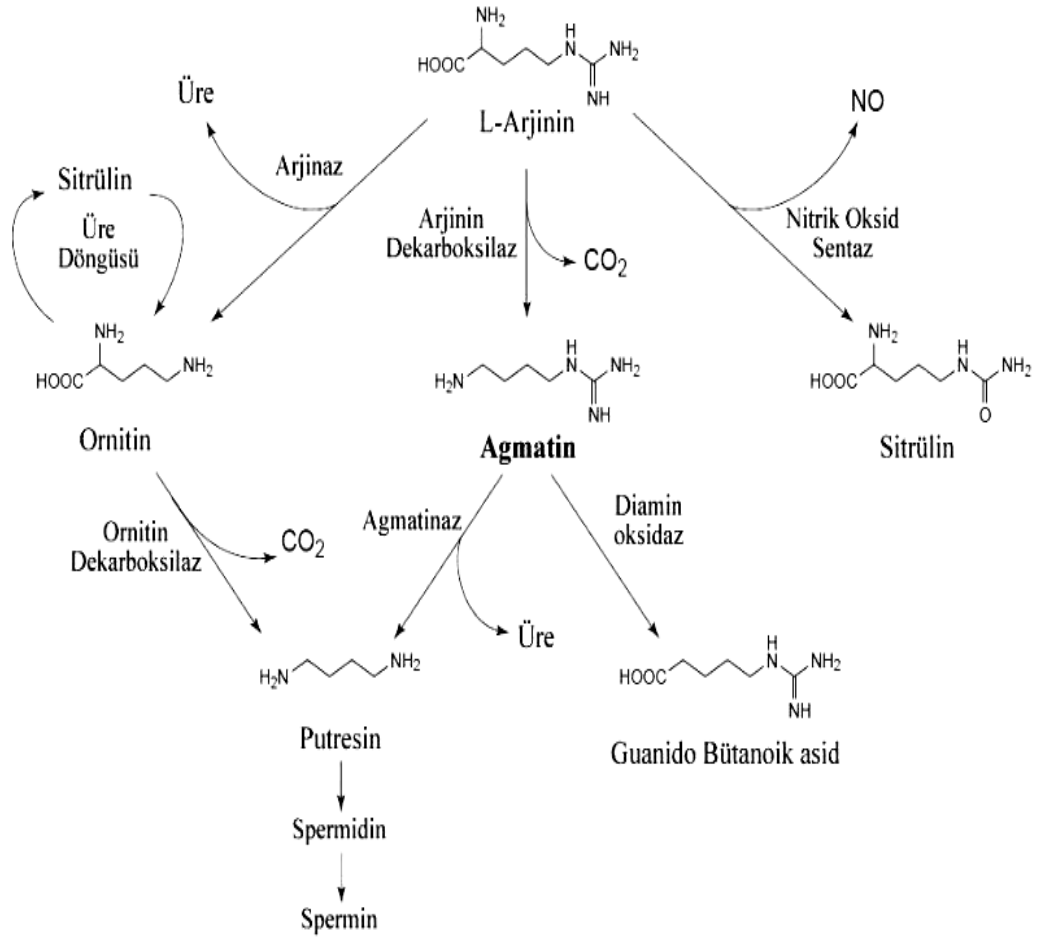
Agmatin ADC enziminin etkisiyle L-Arjininden sentezlenen polikatyonik bir amindir (14,111) (Şekil 7). Beyinde agmatinaz enzimi tarafından spermin ve spermidinin prekürsörü olan putresine hidrolize edilir. Bu nedenle agmatin memelilerde poliamin biyosentezinde bir medyatör olarak bilinmektedir (15). Periferik dokularda ise diamino oksidaz enzimiyle guanido butanoik aside dönüştürülerek parçalanmaktadır (112). Agmatin bakteri, bitki ve vertebrasızlarda üretilir ve doğada oldukça korunmuş bir halde bulunur. 1990'ların ortalarına kadar agmatin, ADC ve

agmatinaz'ın memelilerde sentezlenmediği düşünülüyordu. Ancak 1994 yılında imidazolin reseptörleri için endojen ligand araştırmalarında beyin dokusunda spektroskopik analizlerde bulunan molekül agmatin olarak tespit edildi (113). ADC ve agmatinaz memelilerin beyinde ve mide, barsak ve aorta gibi diğer birçok organda tanımlanmıştır (15).



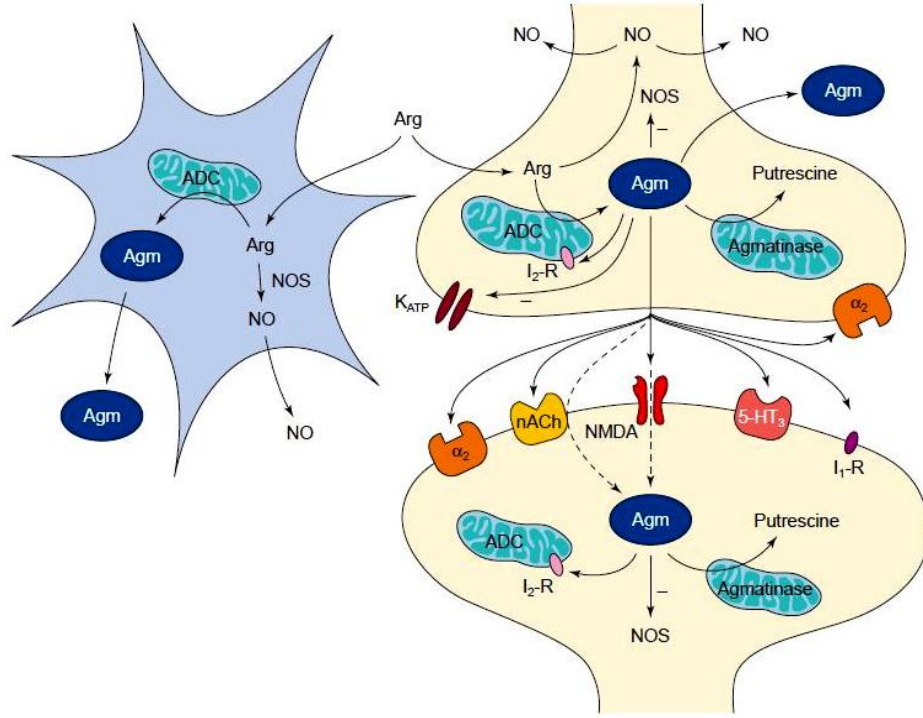
Şekil 7: Agmatinin Kimyasal yapısı (15).

Agmatin'in ADC ile biyosentezi nöronların içine spesifik amino asid taşıyıcılar tarafından alınan L-arjinin'in varlığına bağlıdır. Dokularda L-arjinin başka iki önemli enzimin de substratıdır. Bunlardan arjinaz L-arjinini ornitine dönüştürür ve ornitin üre siklusuna katılır. Diğer enzim NOS ile L-arjinin, NO ve sitriline dönüştürülür ve bu olayın in vitro olarak agmatinle kompetitif inhibisyona uğradığı gösterilmiştir (113) (Şekil 8).



Şekil 8: Agmatin ve ilişkili moleküllerin metabolik yolları (113).

Agmatinin beyindeki konsantrasyonu diğer klasik nörotransmitterlerle karşılaştırıldığında agmatinin de bir nörotransmitter olabileceği düşünülmüştür (15). Agmatin de diğer nörotransmitterler gibi Ca bağımlı depolarizasyonla sinaptozomlardan salınır (15,113). Beyin ve spinal korda sentezlenip, nöron sinaptik veziküllerinde heterojen bir dağılımla depo edilir. Nörona geri alınım (reuptake) ile inaktive edilir, spesifik enzimi agmatinaz ile parçalanır (15) (Şekil 9).



Şekil 9: Agmatinerjik sinapsın şematize edilmesi (113)

2.4.1. Agmatinin etkileri

Agmatin yüksek afiniteyle α_2 adrenerjik ve imidazolin reseptörlerine bağlanır, özellikle NMDA olmak üzere voltaj kapılı katyon kanallarının blokajına neden olur (16). Agmatinin merkezi sinir sisteminde nöronal hasarı önleyebilen veya onarabilen nöroprotektif bir element olduğu konusunda fikir birliği vardır. Birçok çalışmada eksojen agmatin uygulamasının in vivo ve in vitro nörotoksik ve iskemik beyin hasarı modellerinde nöroprotektif etkiler gösterdiği bildirilmektedir (15). Yang ve Reis'in (114) yaptığı çalışmada sıçan hipokampal nöron kültürlerinde agmatin'in selektif NMDA blokajı yaptığı ve bu blokajın molekülün özellikle guanido grubu aracılığıyla ve konsantrasyon - voltaj bağımlı olduğu gösterilmiştir. Zhu ve ark. (18) nöronlar ve P12 hücre kültürleri üzerinde yaptıkları bir çalışmada agmatinin glutamat NMDA reseptörleriyle oluşan ekzitotoksisiteyi inhibe ettiğini göstermişlerdir. Daha sonra hipokampal nöron kültürlerinde glutamat ve NMDA ile oluşan hücre hasarına karşı agmatinin koruyucu etkisini birkez daha kanıtlamışlardır (19). Ayrıca Weng ve ark. (115) hipokampal nöron kültürlerinde agmatinin L tipi voltaj kapılı Ca kanallarını da bloke ettiğini bulmuşlardır. Agmatinin L tipi voltaj kapılı Ca

kanallarını bloke ederek miyositlerde intrasellüler Ca artışını inhibe ettiği gösterilmiştir (116).

Agmatinin kompetitif olarak NOS inhibisyonu, özellikle iNOS inhibisyonu yaparak koruyucu etkiler gösterdiğine ait çalışmalar bulunmaktadır (117). Astrosit ve makrofaj hücre kültürlerinde yapılan bir çalışmada agmatinin iNOS aktivasyonunu azaltarak NO miktarında azalma meydana getirdiği, bu sayede nöroprotektif ve antiinflamatuvar özelliklerinin olduğundan bahsedilmiştir (111). Mun ve ark. (21) yaptıkları çalışmada, geçici global serebral iskemi oluşturulan ratlarda agmatinin nöroprotektif etkili olduğunu ve bunuda iskemide koruyucu rolü olan eNOS yapımını arttırıp, toksik etkileri olan iNOS ve matriks metalloproteinaz-9 da azalma meydana getirerek yaptığını göstermişlerdir.

Agmatin antinosiseptif etkiye de sahiptir. Hayvan modellerinde eksojen sistemik agmatin uygulamasının morfinin analjezik etkisini arttırdığı gösterilmiştir (118). Yeşilyurt ve ark. (119) agmatinin bu etkisini $\alpha 2$ adrenerjik reseptörler yoluyla yaptığını çalışmalarında göstermişlerdir. Morfin yoksunluk sendromuna toleransı azalttığını gösteren çalışmalar da vardır (120).

Agmatinin anksiyolitik ve antidepresif etkilerinin olduğu birçok çalışma tarafından belirtilmiştir. Bu etkiler eksojen agmatin uygulamasının, imidazolin, 5HT_{1A/1B} ve 5HT₂ reseptörleri, NMDA, $\alpha 2$ adrenerjik reseptör, potasyum kanalları, L-arjinin-NO yolu ve opioid sistemle etkileşimiyle gerçekleşmektedir. Ayrıca antikonvülzan etkileri de bilinmektedir (121).

Agmatinin nikotik asetilkolin (Ach) reseptörlerini etkileyerek kromafin hücrelerden katekolamin salınımını bloke ettiği gösterilmiştir (122). İn vivo olarak kan basıncını düşürdüğünü gösteren çok sayıda çalışma mevcuttur (123). Hong ve ark. (124) kronik oküler hipertansif ratlarda, agmatinin göz içi basıncını azalttığını da göstermişlerdir.

Agmatinin hücre proliferasyonunu inhibe ettiği birçok deneysel çalışmada gösterilmiştir. Bunu da hücre içi poliamin oluşumunu sağlayan ornitin dekarboksilazın (ODC) aktivasyonunu azaltıp poliamin miktarını düşürerek ve poliamin alımını azaltarak yaptığı gösterilmiştir (121). Metabolik olarak pankreas langerhans hücrelerinden insülin salınımını arttırıp (125), dokulara glukoz alımını arttırdığı kanıtlanmıştır (126). Glavin ve ark. (127) yaptıkları çalışmada sistemik

agmatin uygulamasının mide dokusunda asit ve pepsin sekresyonunu arttırıp, mukus kalınlığını azalttığını bulmuşlardır.

Eksojen Uygulanan Agmatinin Potansiyel Klinik Etkileri (121):

- *) Kanser tedavisinde adjuvan ilaç
- *) İskemik yada travmatik beyin yada spinal kord hasarının tedavisi
- *) Nöropatik ağrı ve postoperatif ağrı tedavisi
- *) Opiad bağımlılığı tedavisi
- *) Antikonvulzan ajan olarak kullanım
- *) Antidepresan ve anksiyolitik ajan olarak kullanım
- *) Parkinson ve Alzheimer hastalıklarının tedavisi
- *) Damarsal hiperplazilerin tedavisi
- *) Hipertansiyon tedavisi
- *) Sepsis tedavisinde yararlı etkiler
- *) Karaciğer hastalıklarında bozulmuş üre yapımının tedavisi
- *) Dekompanse siroz tedavisi
- *) Antiemetik olarak
- *) Glokom tedavisi
- *) Retinal hücre bozukluklarının tedavisi
- *) Diyabetes mellitus tedavisinde adjuvan ilaç

3. GEREÇ VE YÖNTEM

Çalışmamız Bülent Ecevit Üniversitesi Tıp Fakültesi Fizyoloji Anabilim dalında Eylül 2011-Eylül 2012 tarihleri arasında gerçekleştirildi. Çalışma öncesinde Bülent Ecevit Üniversitesi Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulunun 09/03/2011 tarihli oturumunda onay alındı (Ek-1). Çalışmamız Bülent Ecevit Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinasyon Birimi tarafından 2011-20-00-02 nolu proje olarak desteklenmiştir.

3.1. Deney Hayvanları

Çalışmamızda Bülent Ecevit Üniversitesi Tıp Fakültesi Deney Hayvanları Laboratuvarı'ndan temin edilen ağırlıkları 250-300 gr. arasında değişen 32 adet yetişkin erkek Wistar-Albino cinsi sıçan kullanılmıştır. Deney hayvanları rastgele ve eşit olacak şekilde (n=8) 4 gruba ayrıldı. Sıçanlar, deney öncesi tel kafeslerde, 12 saat aydınlık 12 saat karanlık sirkadiyen ritimde ve sıcaklığı 20-25°C olacak şekilde %50-60 nem ortamında odada tutuldular. Sıçanlar, standart sıçan yemiyle serbest olarak beslendi ve suluktan serbestçe su içmeleri sağlandı. Tüm sıçanların bakımları, Tıbbi Araştırmalar Ulusal Derneği tarafından biçimlendirilen '*Deney Hayvanlarının Bakım Prensipleri*' ne ve Laboratuvar Hayvanı Kaynakları Enstitüsü tarafından düzenlenen '*Laboratuvar Hayvanlarının Bakım ve Kullanımı için Kılavuz*' una uygun olarak yapılmıştır.

3.2. Anestezi

Tüm hayvanlar deneyden 12 saat önce yemekten yoksun bırakıldılar, ancak serbestçe su içmelerine izin verildi. Anestezi intraperitoneal yoldan 90 mg/kg dozunda sodyum tiyopental ile sağlanmıştır. Cerrahi girişim, enjeksiyonlar, kan ve dokuların alınması anestezi altında yapıldı. Anestezi süresince denekler, solunum desteğine ihtiyaç duymadan, oda havasında izlendiler. Deney sırasında gelişebilecek hipotermiyi önlemek amacıyla, cerrahi girişim ısıtıcı lamba altında yapıldı.

3.3. Cerrahi Girişim

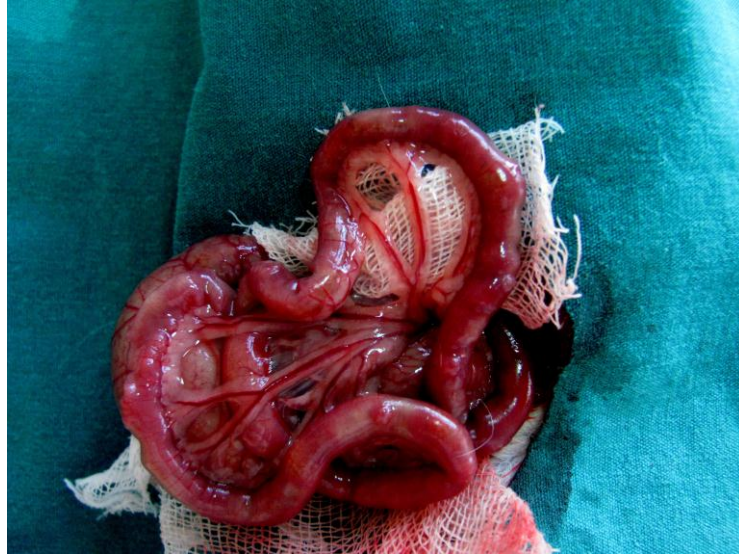
Anestezi uygulanan hayvanlar karın cildi traş edildikten sonra povidon iyot ile temizlendi ve örtüldü. Sırtüstü yatar pozisyonda yaklaşık 3 cm'lik orta hat kesisi ile batına girildi. Barsaklar ıslak steril gazlı bez yardımıyla batın dışına alındı. Deneklerde intestinal iskemiyi gerçekleştirmek için SMA bulundu. Arter dikkatlice disseke edilip etraf dokulardan soyutlandı ve atravmatik mikrovasküler klemp kullanılarak iskemi oluşturuldu (Resim 1). İntestinal iskemi, arter pulsasyonunun kaybolması ve barsak renginde soluklaşma gözlenmesiyle doğrulandı (Resim 2). Isı ve sıvı kaybını en aza indirmek için barsaklar batın içine yerleştirilerek laparotomi kesisi 4/0 atravmatik ipek suturele kapatıldı. 30 dk. süren iskemi döneminin sonunda sutureler alınarak batına girildi ve SMA'daki klemp kaldırılarak reperfüzyon süreci başlatıldı. Reperfüzyonun gerçekleştiği, solukluğun kaybolarak barsakların daha pembe bir renk alması ve arter pulsasyonunun tekrar görülmesi ile doğrulandı (Resim 3). Barsaklar tekrar batın içine yerleştirildi ve insizyon tekrar kapatıldı. Reperfüzyon dönemi için 180 dk. süreyle beklendi. Ardından doku ve kan örnekleri alınarak sıçanlar feda edildi.



Resim 1: SMA'nın izole edilmesi.



Resim 2: SMA'nın klempe edilmesi ve barsak renginde soluklaşma.



Resim 3: İ/R hasarı sonrası barsakların görünümü.

3.4. Deney Grupları

Deney hayvanları her grupta 8 sıçan olacak şekilde rastgele 4 gruba bölündü.

Grup I (kontrol grubu): Bu gruptaki sıçanlara laparotomi yapıldı. SMA bulunarak izole edildi. İskemi ve reperfüzyon girişimleri yapılmadan sadece cerrahi stres uygulanarak batın kapatıldı. Hayvanlar feda edilmeden önce diğer tüm

deneklerle eşit olarak, iskemi ve reperfüzyon süreçlerinin toplamı olan 210 dk. süreyle beklendi. Ardından kan ve barsak doku örnekleri alınan sıçanlar feda edildi.

Grup II (iskemi+ reperfüzyon grubu, I/R): Bu gruptaki sıçanlara laparotomi yapıp SMA'ya klemp uygulandı. Klemp 30 dk. süreyle bekletilerek iskemi uygulandı. Ardından SMA'deki klemp kaldırılarak ve batin kapatılarak 180 dk. süreyle reperfüzyon sağlandı. Reperfüzyon sonrası kan ve barsak doku örnekleri alınan sıçanlar feda edildi.

Grup III (kontrol+agmatin grubu, kontrol+agm): Bu gruptaki sıçanlara laparotomi yapıldı. SMA bulundu. İskemi ve reperfüzyon girişimleri yapılmadan 30 dakikalık süre bitiminde intraperitoneal yoldan 10 mg/kg dozunda agmatin (Sigma Chemical Co.,St. Louis, MO, USA) uygulandı. Sıçanlar 180 dakika sonrasında ise kan ve barsak doku örnekleri alınarak feda edildi.

Grup IV (iskemi reperfüzyon+agmatin grubu, I/R+agm): Bu gruptaki sıçanlara laparotomi yapıldı. SMA bulunup klempe edildi. 30 dakikalık iskeminin ardından klemp kaldırıldı ve reperfüzyon başlatıldı. Reperfüzyon başlangıcında 10 mg/kg dozunda agmatin intraperitoneal yoldan uygulandı. 180 dakikalık reperfüzyon sürecinin ardından kan ve barsak doku örnekleri alınarak sıçanlar feda edildi.

3.5. Kan ve Doku Örneklerinin Alınması

Tüm gruplarda yapılan işlemler ve reperfüzyon süresi bittikten sonra hayvanlar feda edilmeden önce intrakardiyak 5 ml. kan alındı. Elde edilen kanlar 4000 devirde 5 dk santrifüj edilerek plazmaları ayrıldı. Ayrılan plazmalar ependorf tüplere konarak, flowsitometre yöntemiyle inflamatuvar sitokinlerin bakılacağı güne kadar -80 °C de saklandı.

İntestinal doku örneği için ileoçekal bileşkenin 10 cm. proksimalinden 1cm'lik barsak segmenti alındı. Fekal doku içeriği % 0,9'luk NaCl solüsyonu ile temizlendi. Hemen ardından barsak motilitesini değerlendirmek için kas kontraksiyon çalışmasının yapılacağı izole organ banyosu sistemine yerleştirildi. Ayrıca histopatolojik çalışmalar için yine aynı bölgeden alınan barsak örnekleri hemen %10'luk formaldehit içine konularak Bülent Ecevit Üniversitesi Tıp Fakültesi Patoloji Anabilimdalı'na gönderildi. Aynı bölgeden alınan biyokimyasal ölçümlerin

yapılacağı barsak örnekleri ise çalışmanın yapılacağı güne kadar iki eşit parçaya ayrılarak alüminyum folyolara sarılarak -80 °C de saklandı.

3.6. Değerlendirilen Parametreler

3.6.1. Barsak kasında kontraksiyon yanıtı

Fekal doku içeriğinden temizlenen barsak segmenti içinde Krebs solüsyonu bulunan petri tabağına alındı. Etrafındaki yağ ve bağ dokuları dikkatlice temizlendikten sonra Krebs solüsyonu ([mM]: NaCl, 118,5; KCl, 4,8; MgSO₄. 7H₂O, 1,2; CaCl₂, 1,9; KH₂PO₄, 1,2; NaHCO₃, 25; glikoz, 10,1) içeren 5 ml'lik çift cidarlı cam organ banyolarında, bir ucu izometrik kuvvet-yer değiştirme kuvvet ölçerine (FDA-10A, Commat İletişim Co., Ankara, Turkey) bağlı olacak diğeri ise organ askısına sabitlenecek şekilde dikey olarak asıldı. Krebs solüsyonu deney boyunca sürekli olarak %95 O₂ ve %5 CO₂ karışımı ile gazlandırıldı ve termostatik kontrollü bir su sirkülatörü aracılığıyla 37°C sabit sıcaklıkta tutuldu. İzole organ banyoları içine eklenerek uygulanan test maddelerine yanıt olarak düz kas dokusunda oluşan izometrik gerim değişiklikleri, bilgisayar aracılı bir fizyolojik veri toplama ve kaydetme sistemi (MP30 BiopacSystems Inc., Santa Barbara, CA, USA) aracılığıyla kaydedildi. İzole organ banyolarına yerleştirildikten sonra, tüm dokular, 2 g dinlenme gerimi altında, 15 dakikada bir taze çözelti ile yıkanarak, 60 dakika süresince dengelenmeye bırakıldı. Dengeye giren barsak kaslarında spontan kasılma yanıtları kayıt altına alındı. Ardından kasılma yanıtı oluşturan test maddeleri ortama eklendi. Kullanılan test maddelerinin konsantrasyonları organ banyosundaki son konsantrasyon olacak şekilde hesaplandı. Test maddeleri olarak karbakol ve potasyum klorür (KCl) kullanıldı. KCl 30 mM konsantrasyonunda, karbakol ise 10⁻⁷ M ve 10⁻² M arasında değişen konsantrasyonlarda uygulandı. Barsak düz kasının bulunduğu izole organ banyosuna ilk olarak KCl eklendi ve kasılma yanıtı oluşturuldu. Ardından doku 5 dakika arayla 3 kez yıkandı. Dinlenim gerimine dönen barsağa bu defa 10⁻⁷, 10⁻⁶, 10⁻⁵, 10⁻⁴, 10⁻³, 10⁻² M konsantrasyonlarında karbakol kümülatif olarak artan oranda uygulandı. Barsak düz kasında meydana gelen kasılma yanıtının şiddeti ve frekansı kayıt altına alındı. Tüm deney sonunda asılan barsak

dokuları tartılarak yaş doku ağırlıkları (g) ölçüldü ve elde edilen cevaplar (g) yaş doku ağırlığıyla oranlanarak hesaplamalar yapıldı.

3.6.2. Biyokimyasal değerlendirmeler

3.6.2.1. MDA tayini

Lipid peroksidasyonunun göstergesi olan MDA seviyesi Casini ve arkadaşlarının metodu esas alınarak çalışıldı (128). -80 derecede saklanan ileum örneklerinin buz içinde çözünmesi beklendi. Ardından dokular tartıldı. Tartılan dokunun 1 gramına 9 ml olacak şekilde soğuk %10'luk triklorasetik asit (TCA, Sigma Chemical Co., St. Louis, MO, USA) eklendi ve mekanik homojenizatörde homojenizasyon sağlandı. Homojenat 18-20 °C'de 3000g'de 15 dakika santrifüj edildi. Elde edilen 1,5 ml süpernatant mikrosantrifüj tüplerinde 18-20 °C'de 3000g'de 8 dakika santrifüj edildi. Ortaya çıkan 750 µl süpernatant üzerine %1'lik butilhidroksi toluenden (BHT, Sigma Chemical Co., St. Louis, MO, USA) 10 µl eklendi. Üzerine 750 µl %0,67'lik tiyobarbitürik asit (TBA, Sigma Chemical Co., St. Louis, MO, USA) eklendi. Karışım 15 dakika kaynatıldı. Elde edilen örnekler 535 nm'de spektrofotometrik olarak okundu.

3.6.2.2. GSH tayini

Major endojen antioksidan olan GSH seviyeleri Aykac ve arkadaşlarının metoduna göre çalışıldı (129). -80 derecede saklanan ileum örneklerinin buz içinde çözünmesi beklendi. Ardından dokular tartıldı. Tartılan dokunun 1 gramına 9 ml olacak şekilde soğuk %10'luk TCA eklendi ve mekanik homojenizatörde homojenizasyon sağlandı. Homojenat 18-20 °C'de 3000g'de 15 dakika santrifüj edildi. Elde edilen 1,5 ml süpernatant mikrosantrifüj tüplerinde 18-20 °C'de 3000g'de 8 dakika santrifüj edildi. Ortaya çıkan 250 µl örnek süpernatantına 1 ml 0,3M Na₂HPO₄ (Sigma Chemical Co., St. Louis, MO, USA) eklendi. Üzerine 125 µl ditiobisnitrobenzoat (Sigma Chemical Co., St. Louis, MO, USA) eklendi. Örnekler vorteksleme sonrası 412 nm'de spektrofotometrede okundu.

3.6.2.3. MPO tayini

Doku nötrofil birikiminin göstergesi olan MPO seviyeleri Bradley metoduna göre çalışıldı (130). -80 derecede saklanan ileum örneklerinin buz içinde çözünmesi beklendi. Ardından dokular tartıldı. Doku ağırlığının 20 katı olacak şekilde 50 mM'lık potasyum fosfat tamponu (PB) eklendi ve 0-2 °C'de mekanik homojenizatörle homojenize edildi. Homojenat 40,000g'de 4 °C'de 15 dakika santrifüj edildi. Süpernatantlar dökülüp alt kısımda kalan pellet üzerine 10 kat olacak oranda 5g/L heksadesiltrimetilamonyumbromid (Sigma Chemical Co.,St. Louis, MO, USA) içeren 50mM PB eklendi ve tekrar homojenize edildi. Örnekler üç kere dondurulup çözüldü ve her dondurma arasında sonikatörle (Bandelin Sonopuls HD2070, Bandelin Electronic GmbH and CO.KG,Berlin,Germany) sonikasyon yapıldı. Ardından örnekler 40,000g'de 10 dakika santrifüj edildi. Elde edilen süpernatandan 100 µl alınıp üzerine 2,9 ml reaksiyon karışımı eklenerek hemen 460 nm'de absorbans değişimi 5 dakika boyunca ölçüldü.

Hazırlanan reaksiyon karışımı 50 mM lık PB içinde 0,167 mg/ml O-dianisidine (Sigma Chemical Co.,St. Louis, MO, USA) ve 20 mM H₂O₂ içermektedir.

3.6.3. Histopatolojik ve immünohistokimyasal değerlendirmeler

3.6.3.1. Histopatolojik inceleme

Segmental incebarsak rezeksiyon materyalleri %10 luk nötral formalin solüsyonunda fikse edildi ve takip işleminden sonra parafin bloklara gömüldü. Spesmenlerin her biri için ayrı hazırlanan parafin bloklardan mikrotom cihazı ile 4-5 µm kalınlığında seri kesitler elde edildi. Kesitler deparafinize edilerek morfolojik inceleme için hematoksilin ve eosin (H&E) ile boyandı. İntestinal dokulardan hazırlanan H&E kesitler, Hierholzer ve ark. (41) tarafından tanımlanan derecelendirme metodu (grade 0-4) temel alınarak ışık mikroskopisi ile semikantitatif olarak grupları bilmeksizin tarafsız patolog tarafından değerlendirildi.

Grade 0, spesifik bir patolojik değişiklik gözlenmedi: Villus, kripleri, lamina propriayı ve muskularis eksternayı içeren normal barsak duvar yapısı mevcuttur.

Grade 1, hafif mukozal hasar saptandı: Sadece villus epitelinde dökülme olup, diğer yapılar normal izlendi.

Grade 2, orta derecede hasarın oluştuğu gözlendi.

Grade 3, çoğu villuslarda kayıp ve submukoza-muskularis tabakasında sınırlandırılmış şiddetli hasar ile beraberinde granulomatöz inflamasyon bulgusu izlenmektedir.

Grade 4, şiddetli hasar ve nekroz mevcut olup, intestinal duvarın tüm katlarını tutan inflamasyon ve nekroz gözlenmektedir.

3.6.3.2. İmmünohistokimyasal boyama

Spesmenlerden hazırlanan parafin bloklardan polilizinli lamlara mikrotom cihazı ile 4-5 µm kalınlığında kesitler alındı. Kesitler deparafinize edilerek ve sitrat (pH:7.0) ile mikrodalgada ısıtma yöntemi ile ön aşama uygulanarak, iNOS rabbit poliklonal primer antikor (RB-9242-R7, Thermo Scientific/LabVision, 7 ml kullanıma hazır) ile immünohistokimyasal boyama yapıldı. İmmünohistokimyasal reaksiyon sonuçları grupları bilmeksizin tarafsız patolog tarafından semikantitatif olarak boyanma yoğunluğuna göre 0 dan 3 e doğru ilerleyen skorlama yöntemi ile değerlendirildi (0: yok, 1: hafif, 2: orta, 3: güçlü).

3.6.4. Plazmada sitokin tayini

Her denekten elde edilen plazma örneğinde IL-1 α , monosit kemoatraktan protein (MCP-1), TNF- α , IFN- γ , GM-CSF ve IL-4 sitokin düzeylerinin ölçümü, flöresan boncuk immünoassay yöntemi ve FlowCytomix Multiple Analyte Detection Rat Cytokine 6plex kit (eBioscience Bender MedSystems GmbH, Vienna, Austria) kullanılarak gerçekleştirildi. Ölçümler kitin kullanma kılavuzu esas alınarak yapıldı. Kısaca; plazma numuneleri ve seri dilüe standartları flöresan boncuklarla süspansiyon haline getirildi ve ardından yukarıda bahsi geçen her sitokine spesifik

monoklonal antikorlar, yine sitokine spesifik biotinle kaplı monoklonal antikorlarla birlikte kaplandı. Örneğin 25 µl plazma örneğine, 25 µl boncuk karışımı ve 50 µl biotin konjugatı eklendi. Oda sıcaklığında karanlık bir yerde 2 saatlik inkübasyonun ardından, 1 ml tampon karışıma eklendi. Boncuklar santrifüj yoluyla iki kez yıkandı ve 50 µl Streptavidin-PE solüsyonu ile inkübe edildi. Aynı koşullar altında 1 saatlik inkübasyonun ardından santrifüj yoluyla iki kez yıkandı. Daha sonra tüm deney gruplarındaki her örneğin sitokin düzeyi flow sitometre (Epics XL-MCL, Beckman Coulter, FL, USA) kullanılarak ölçüldü. İleri ve yana saçılım voltajları ayarlandı, boncuk farklılaşmasını göstermek için 675nm (flöresan 4) dedektör kullanıldı, boncuk ölçümü için 575nm (flöresan 2) dedektör kullanıldı. Her analiz için 3000 boncuk toplandı. Tüm sitokinler için en düşük limit (sensitivite) 0,3 pg/ml ve 8,5 pg/ml arasında bir değerdedi. Her sitokin için 3-20000 pg/ml arasında değişen standart eğri aralığı belirlendi. Her analitin değeri FlowCytomix Pro 2.1 programı (eBioscience Bender MedSystems GmbH, Vienna, Austria) kullanılarak ilgili standartlardan hesaplandı.

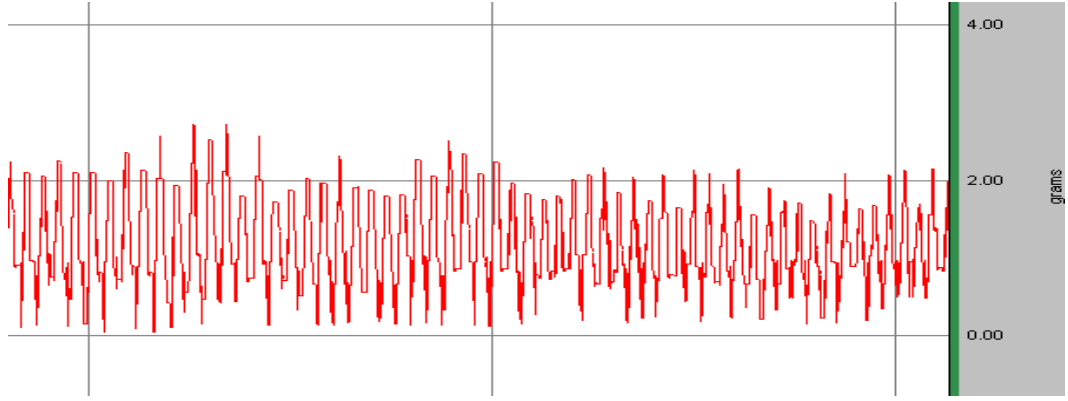
3.6.5. İstatistiksel analiz

İstatistiksel değerlendirme SPSS 18.0 programı kullanılarak yapıldı. Veriler için tanımlayıcı istatistikler ortanca (min-max) olarak ifade edildi. Gruplar arasında fark olup olmadığı parametrik test varsayımları sağlanmadığı için Kruskal-Wallis varyans analizi ile değerlendirildi. Kruskal-Wallis varyans analizinde alt grupların ikişerli karşılaştırılması ise Bonferroni düzeltilmeli Mann-Whitney U testi ile yapıldı. Sonuçlar % 95 güven aralığında değerlendirildi ve $p < 0.05$ değeri anlamlı kabul edildi.

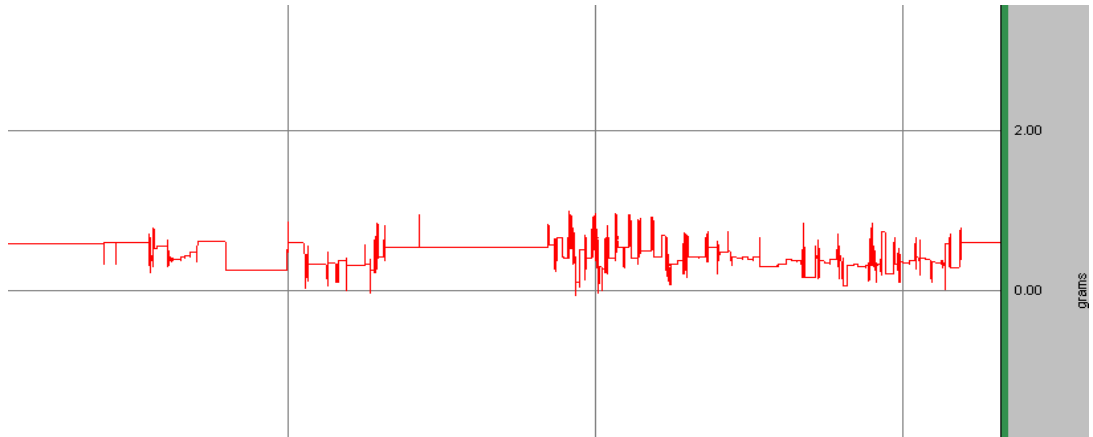
4. BULGULAR

4.1. Barsak Düz Kası Kontraksiyon Yanıtları

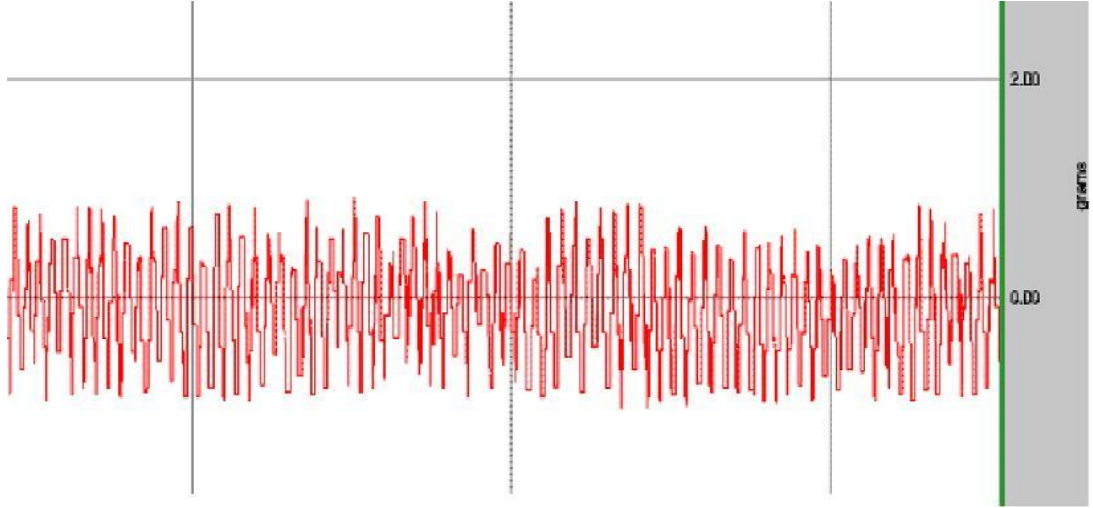
Gruplara ait Biopac MP30 veri sistemiyle elde edilen kontraksiyon yanıtlarının görüntüleri resim 4-15'tedir.



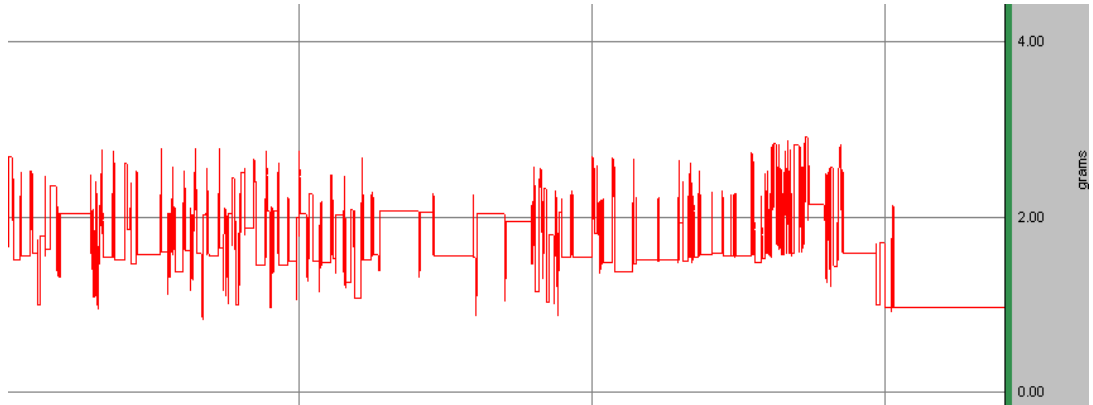
Resim 4: Kontrol grubuna ait spontan kontraksiyonlar



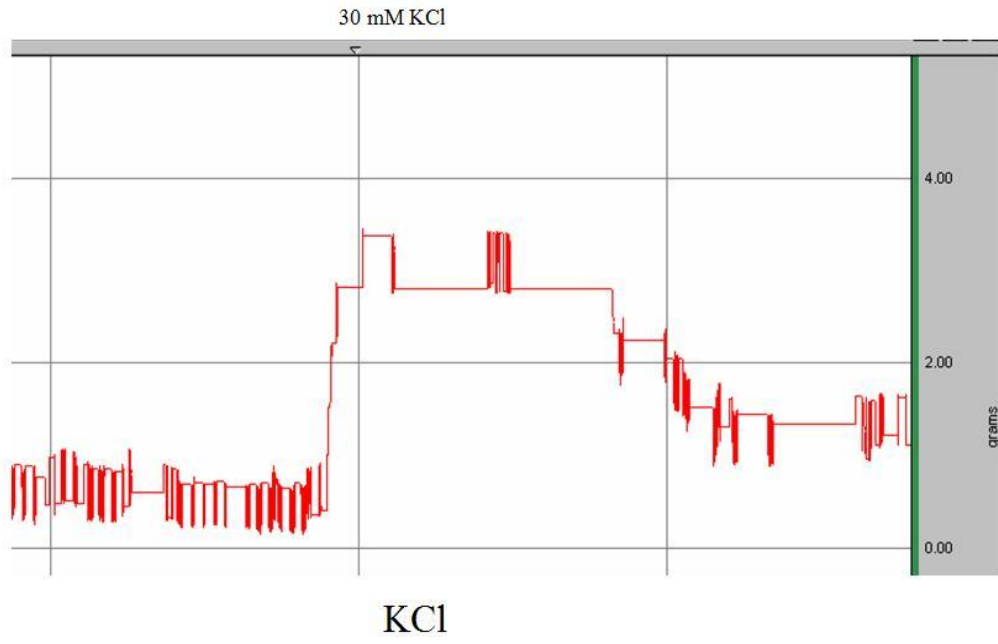
Resim 5: İ/R grubuna ait spontan kontraksiyonlar



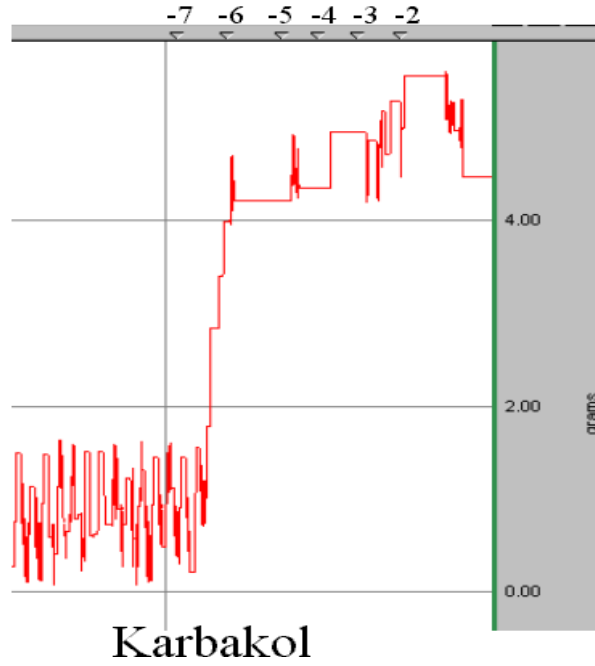
Resim 6: Kontrol+Agm grubuna ait spontan kontraksiyonlar



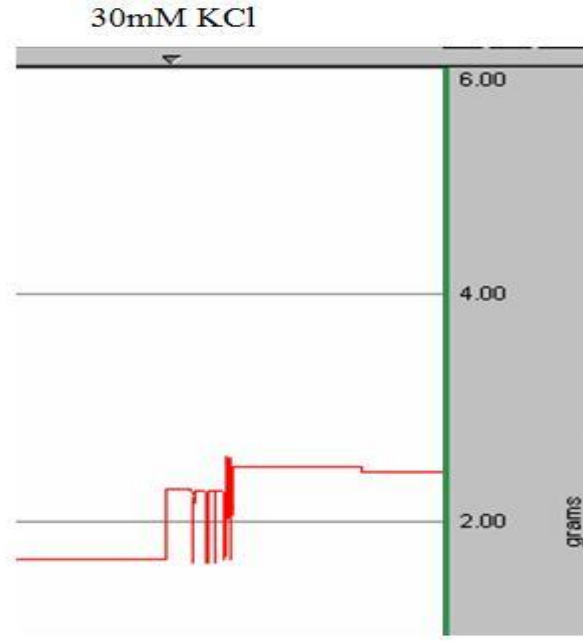
Resim 7: İ/R+Agm grubuna ait spontan kontraksiyonlar



Resim 8: Kontrol grubunun KCl'e verdiği kontraksiyon yanıtı

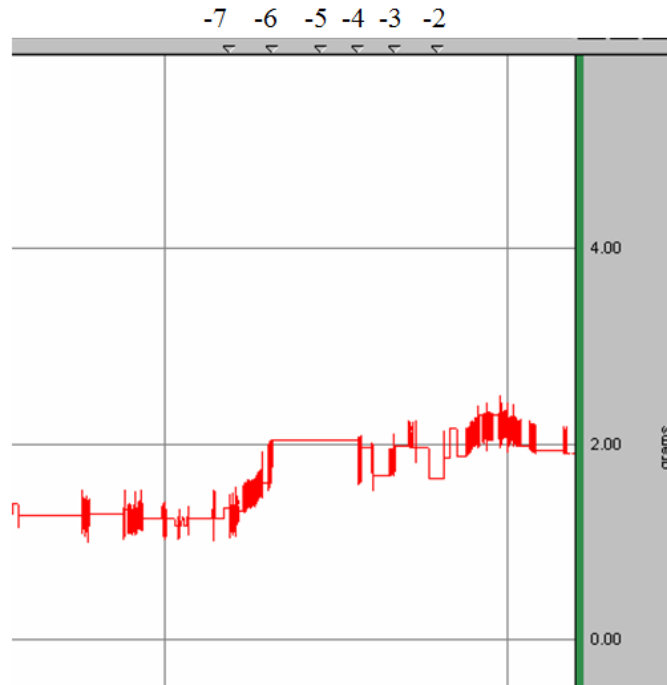


Resim 9: Kontrol grubunun karbakole verdiği kontraksiyon yanıtı



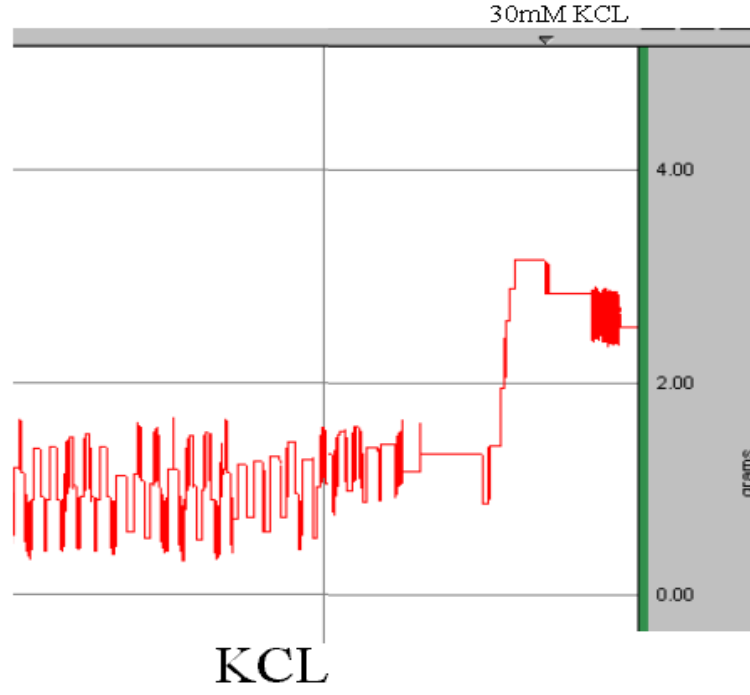
KCl

Resim 10: İ/R grubunun KCl'e verdiği kontraksiyon yanıtı

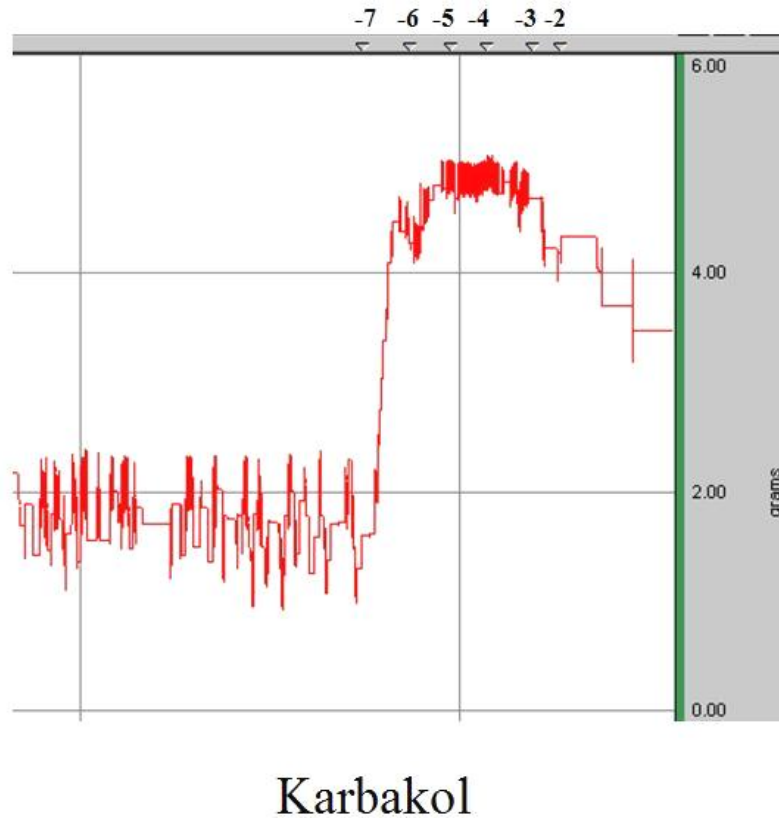


Karbakol

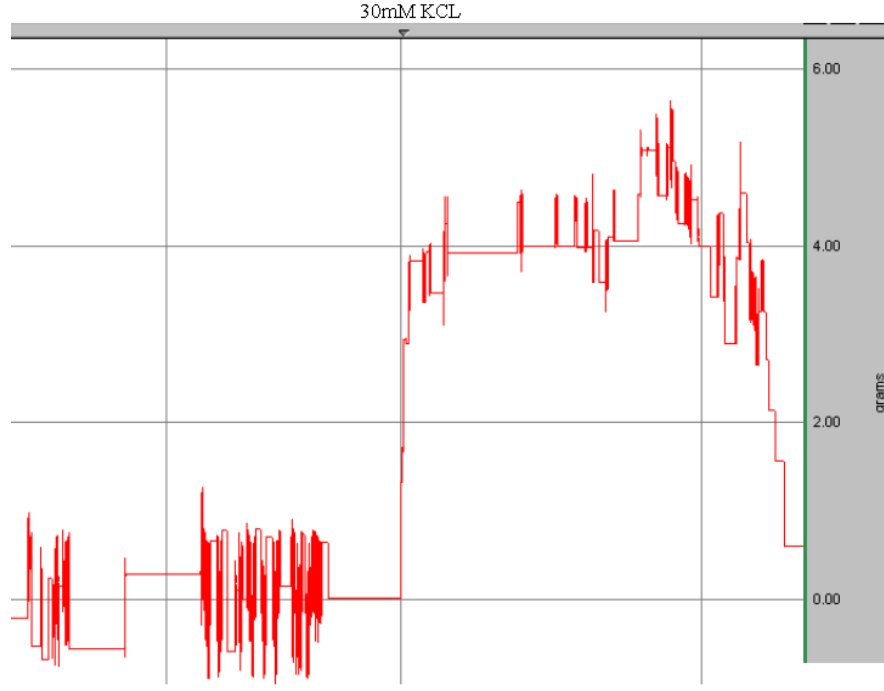
Resim 11: İ/R grubunun karbakole verdiği kontraksiyon yanıtı



Resim 12: Kontrol+Agm grubunun KCl'e verdiği kontraksiyon yanıtı

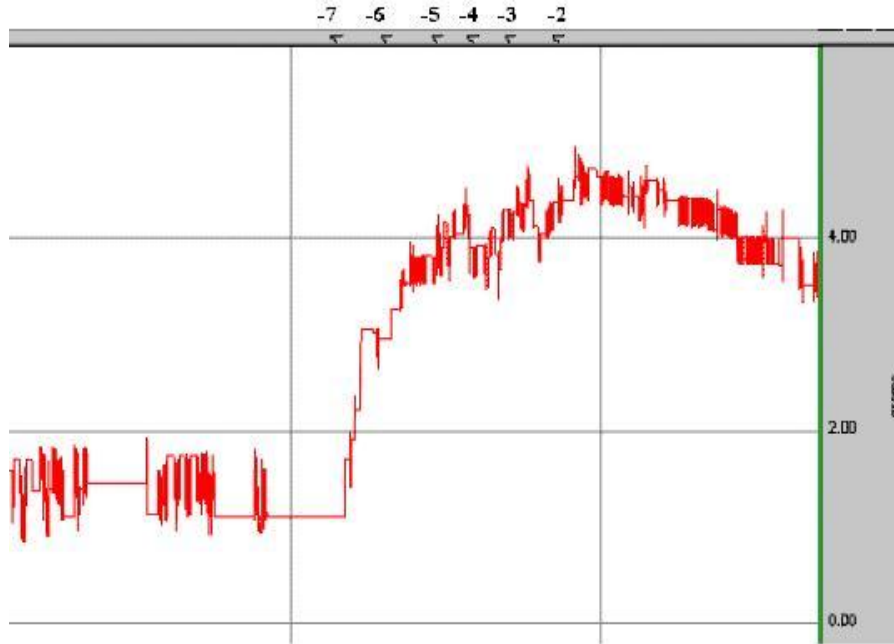


Resim 13: Kontrol+Agm grubunun karbakole verdiği kontraksiyon yanıtı



KCL

Resim 14: İ/R+Agm grubunun KCl'e verdiği kontraksiyon yanıtı



Karbakol

Resim 15: İ/R+Agm grubunun karbakole verdiği kontraksiyon yanıtı

Gruplardan alınan terminal ileum dokularının izole organ banyosu sisteminde karbakol ve KCl'e verdiği kontraksiyon yanıtlarının gruplara göre karşılaştırmaları tablo 1'de verilmiştir. İstatistiksel değerlendirmeler sonucunda gruplar arasında 10^{-7} M dozunda karbakole verilen kontraksiyon yanıtı dışında anlamlı farklılık gözlenmiştir.

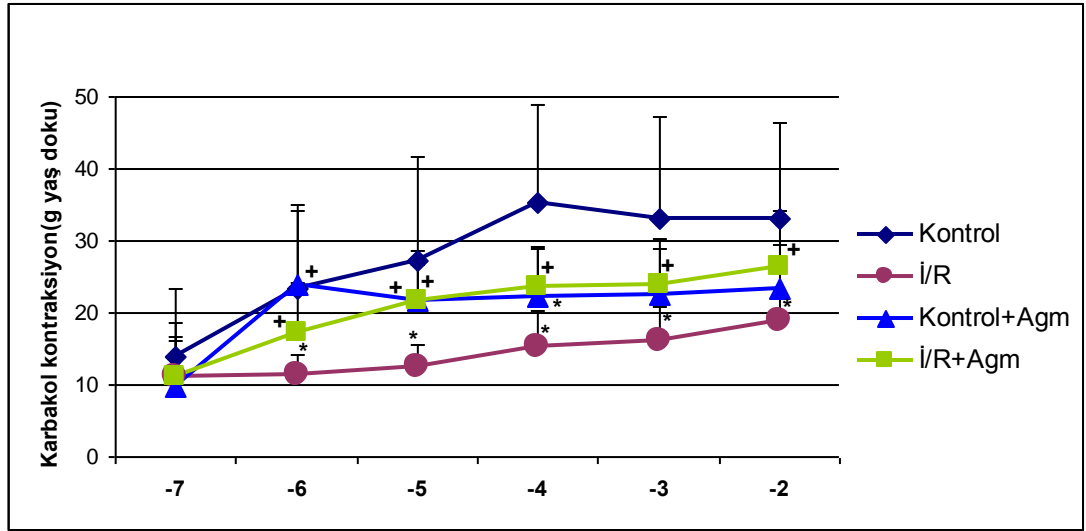
Tablo 1: Gruplarda izole barsak segmentinin Karbakol ve KCl'e verdiği kontraksiyon yanıtları

Karbakol Dozu	Kontrol	İ/R	Kontrol +Agm	İ/R+Agm	p
10^{-7} M	13,86±9,47	11,03±5,58	9,66±6,46	11,11±7,48	>0,05
10^{-6} M	23,33±10,89	11,28 ^a ±2,98	23,98 ^b ±10,96	17,18 ^b ±6,9	0,011
10^{-5} M	27,16±14,56	12,58 ^a ±2,98	21,78 ^b ±6,88	21,79 ^b ±4,98	0,012
10^{-4} M	35,17±13,39	15,36 ^a ±4,85	22,32 ^a ±6,62	23,59 ^b ±5,73	0,017
10^{-3} M	33,04±14,9	16,03 ^a ±4,99	22,50±6,49	23,92 ^b ±6,34	0,030
10^{-2} M	33,07±13,33	18,91 ^a ±3,57	23,32±6,08	26,52 ^b ±7,74	0,046
KCl	17,27±10,82	8,87 ^a ±2,68	14,21 ^b ±4,92	19,37 ^b ±8,88	0,027

^a kontrol grubuna göre; ^b İ/R grubuna göre anlamlı farklılığı ifade etmektedir.

4.1.1. Karbakole verilen kontraksiyon yanıtları

10^{-7} M dozunda karbakol uygulandığında gruplar arasında kontraksiyon yanıtlarında anlamlı farklılık gözlenmemiştir. 10^{-6} - 10^{-2} M dozlarında karbakole cevap İ/R grubunda kontrol grubuna göre anlamlı şekilde azalmıştır (Tablo 1). İ/R+Agm grubunda ise 10^{-6} - 10^{-2} dozlarında karbakole olan kontraksiyon yanıtlarında İ/R grubuna göre anlamlı olarak düzelmeye gözlenmiştir (Grafik 1).

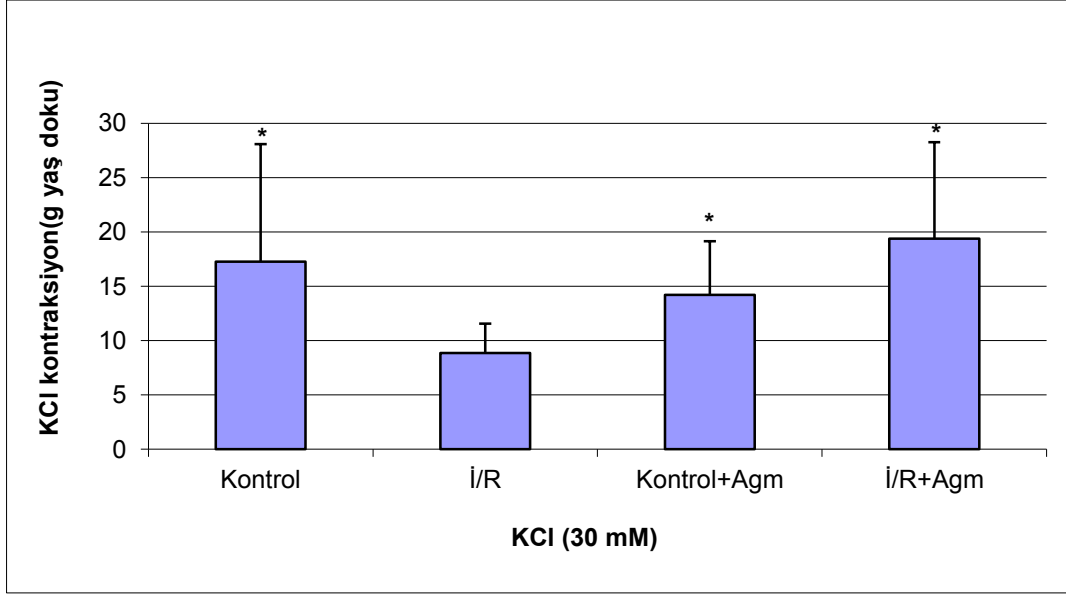


*kontrol grubuna göre; + İ/R grubuna göre anlamlı farklılığı göstermektedir.

Grafik 1. Grupların karbakole verdiği kontraksiyon yanıtları

4.1.2. KCl'ye verilen kontraksiyon yanıtları

İzole barsak segmentlerinin KCl'e verdiği yanıtlar incelendiğinde İ/R grubunda elde edilen değerlerin kontrol, kontrol+Agm ve İ/R+Agm gruplarına göre istatistiksel olarak anlamlı şekilde azaldığı tespit edilmiştir (Tablo 1). Diğer gruplar arasında anlamlı farklılık saptanmamıştır (Grafik 2).



* İ/R grubuna göre anlamlı farklılığı göstermektedir

Grafik 2. Grupların KCl'ye verdiği kontraksiyon yanıtları

4.2. Biyokimyasal Sonuçlar

Deney gruplarının MDA, GSH ve MPO değerleri Tablo 2'de verilmiştir. Gruplar arasında MDA, GSH ve MPO değerleri açısından istatistiksel olarak anlamlı farklılık gözlenmiştir ($p < 0,05$).

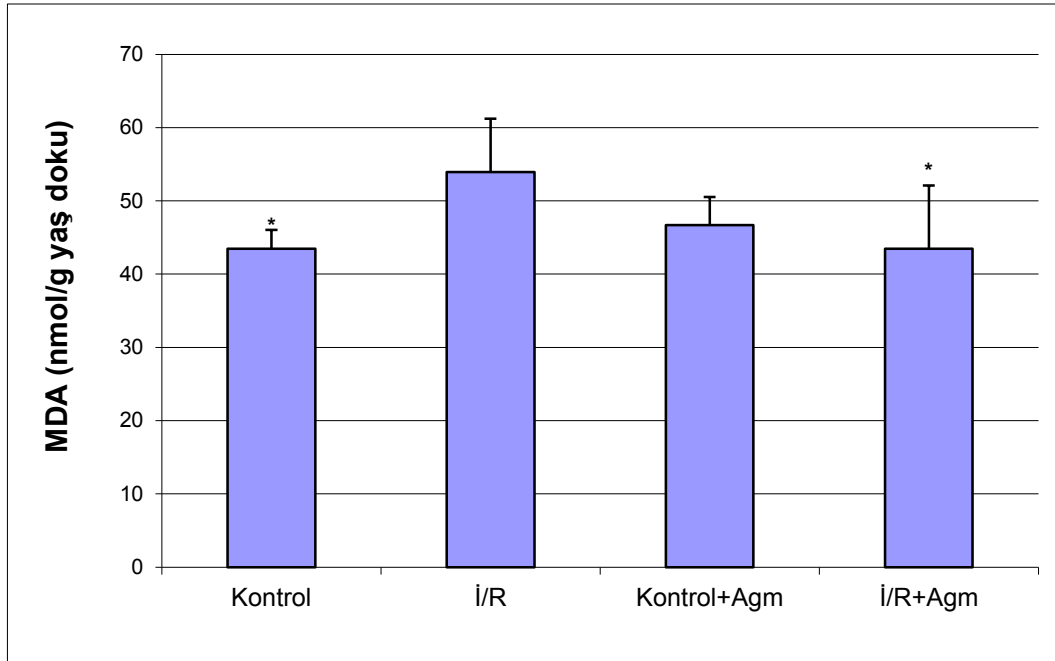
Tablo 2: Grupların MDA, GSH ve MPO değerleri

	Kontrol	İ/R	Kontrol +Agm	İ/R+Agm	p
MDA	43,45 ^a ±2,58	53,91±7,31	46,68±3,84	43,44 ^a ±8,67	0,014
GSH	11,71 ^{a,b} ±1,83	6,68±0,99	11,41 ^{a,b} ±1,17	8,11 ^a ±1,12	<0,001
MPO	0,13 ^a ±0,06	0,41±0,15	0,08 ^a ±0,07	0,19 ^{a,c} ±0,09	0,001

^a İ/R grubuna göre; ^b İ/R+Agm grubuna göre; ^c Kontrol+Agm grubuna göre anlamlı farklılığı göstermektedir.

4.2.1. MDA sonuçları

İ/R grubunda MDA değeri kontrol ve İ/R+Agm grubuna göre anlamlı şekilde yüksek bulunurken, diğer gruplar arasında herhangi bir fark saptanmamıştır (Grafik 3). Kontrol+Agm grubunda MDA düzeyi İ/R grubuna göre düşük bulunmuş ancak bu fark istatistiksel olarak anlamlı değildir.

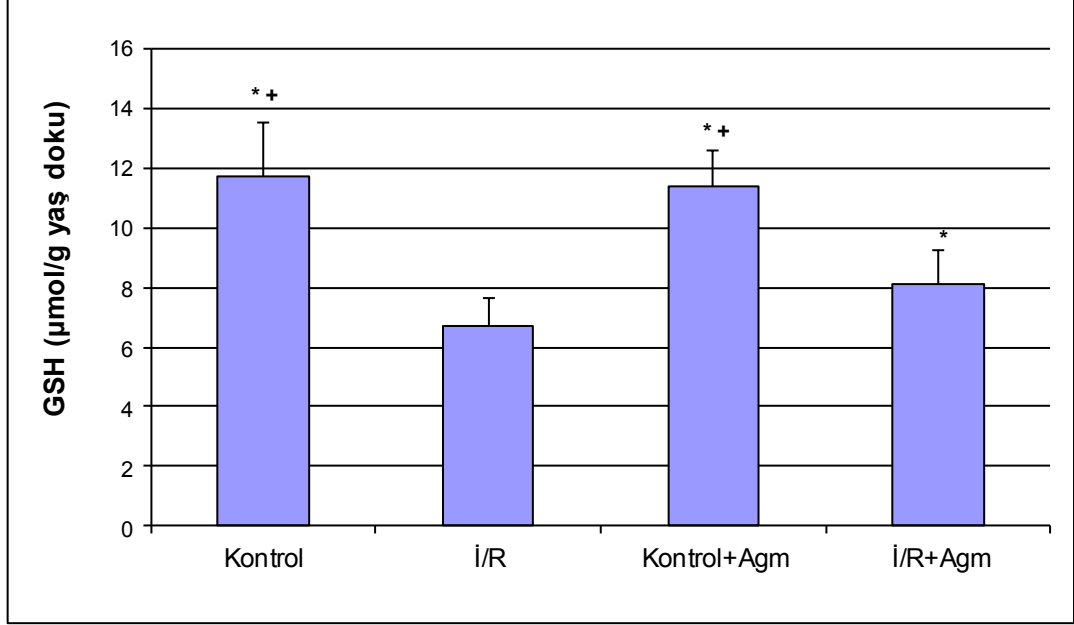


* İ/R grubuna göre anlamlı farklılığı göstermektedir.

Grafik 3. Grupların MDA değerleri

4.2.2. GSH sonuçları

İ/R grubunda GSH değerleri kontrol, kontrol+Agm ve İ/R+Agm gruplarına göre istatistiksel olarak anlamlı şekilde düşük tespit edilmiştir. İ/R+Agm grubunda GSH düzeyleri kontrol ve kontrol+Agm gruplarına göre düşük bulunmuştur (Grafik 4).

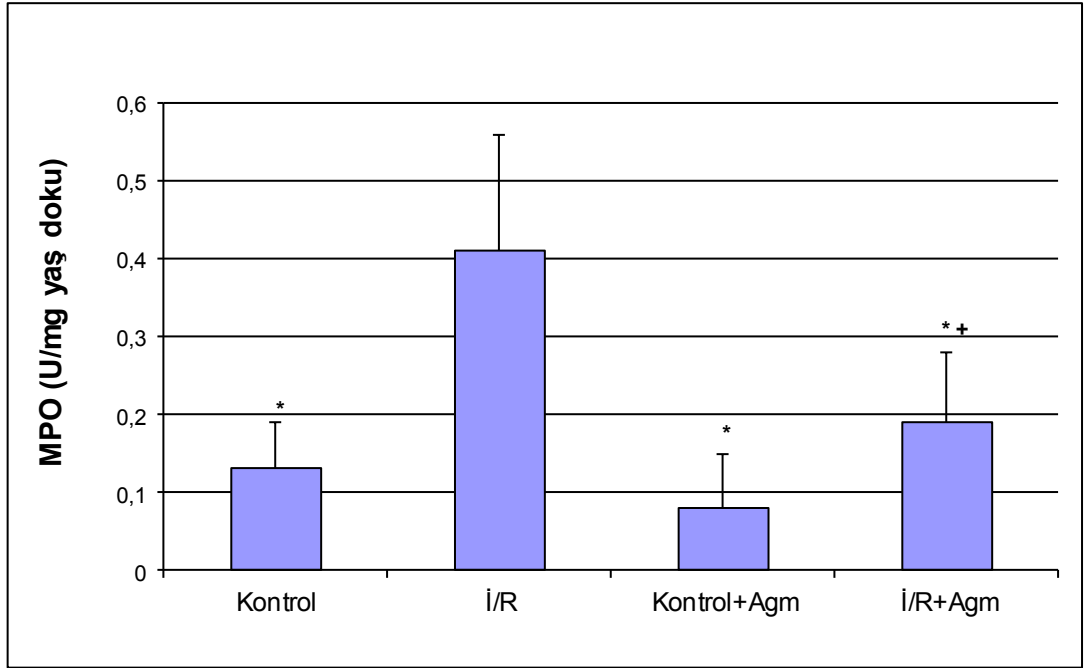


* İ/R grubuna göre; + İ/R+Agm grubuna göre anlamlı farklılığı göstermektedir.

Grafik 4. Grupların GSH değerleri

4.2.3. MPO sonuçları

İ/R grubunun MPO değerleri diğer üç gruba göre istatistiksel olarak anlamlı derecede yüksek tespit edilmiştir. Kontrol grubunun MPO değerleri ile kontrol+Agm ve İ/R+Agm grubu MPO değerleri arasında farklılık saptanmamıştır. İ/R+Agm grubunda ise MPO düzeyi kontrol+Agm grubuna göre yüksek bulunmuştur (Grafik 5).



* İ/R grubuna göre; + Kontrol+Agm grubuna göre anlamlı farklılığı göstermektedir.

Grafik 5. Grupların MPO değerleri

4.3. Plazma Sitokin Sonuçları

Grupların sitokin değerlerinin ortalama ve standart sapmaları Tablo 3'te verilmiştir. Gruplar arasında GM-CSF değerleri hariç istatistiksel anlamlı farklılık saptanmıştır.

Tablo 3: Grupların sitokin değerlerinin karşılaştırmaları

	Kontrol	İ/R	Kontrol +Agm	İ/R+Agm	p
IL-1α	28,08 \pm 4,68	118,83 ^a \pm 92,47	45,34 ^{a,b} \pm 5,51	74,96 ^{a,b,c} \pm 40,47	<0,001
MCP-1	444,05 \pm 77,48	2839,29 ^a \pm 1372,5	607,77 ^b \pm 172,82	2174,23 ^{a,c} \pm 1007,3	<0,001
TNF-α	3,61 \pm 1,80	13,26 ^a \pm 5,05	5,48 ^b \pm 1,48	9,31 ^a \pm 5,06	0,002
IFN-γ	35,63 \pm 4,52	63,17 ^a \pm 14,61	64,13 ^a \pm 3,48	46,66 ^{a,b} \pm 11,87	0,001
GM-CSF	22,19 \pm 5,48	25,70 \pm 7,53	21,51 \pm 1,95	23,07 \pm 4	0,365
IL-4	27,60 \pm 9,25	42,57 ^a \pm 7,52	38,78 ^a \pm 9,94	44,47 ^a \pm 15,03	0,006

^a kontrol grubuna göre; ^b İ/R grubuna göre; ^c kontrol+Agm grubuna göre farklılığı göstermektedir.

IL-1 α değerleri açısından gruplar karşılaştırıldığında bütün gruplar arasında anlamlı farklılık gözlenmiştir. İ/R grubunda değerler diğer üç gruba göre anlamlı şekilde yüksektir. İ/R+Agm grubunda ise İ/R grubuna göre anlamlı düşme tespit edilmiştir.

MCP-1 değerleri İ/R ve İ/R+Agm gruplarında diğer gruplara göre anlamlı şekilde yüksek tespit edilirken, İ/R ve İ/R+Agm grubu arasında fark saptanamamıştır.

TNF- α değerleri İ/R grubunda kontrol ve kontrol+agm grubuna göre anlamlı şekilde yüksek tespit edilmiştir. İ/R+Agm grubunda ise sayısal bir düşüklük olmasına rağmen bu fark İ/R grubuna göre istatistiksel anlamlı fark bulunmamıştır.

IFN- γ değerleri tüm gruplarda kontrol grubuna göre yüksek tespit edilmiştir. İ/R+Agm grubunda İ/R grubuna göre istatistiksel anlamlı düşme tespit edilmiştir.

GM-CSF açısından gruplar arasında istatistiksel hiçbir fark gözlenmemiştir.

IL-4 değerleri kontrol grubunda diğer gruplara göre anlamlı derecede düşük bulunmuşken, diğer gruplar arasında istatistiksel anlamlı bir farklılık bulunmamıştır.

4.4. Histopatolojik Değerlendirme Sonuçları

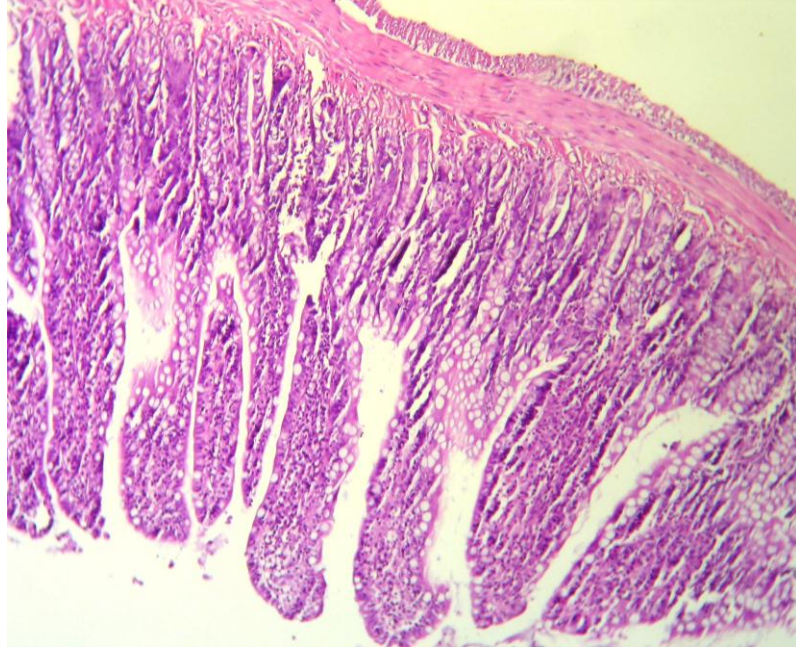
Kontrol ve Kontrol+Agm grubunda normal morfolojik görünümde, spesifik patolojik özellik sergilemeyen ince barsak dokusu izlendi (Resim 16,17). Bunun yanı sıra Kontrol+Agm grubunun bir kısmında hafif bir mukozal hasar tespit edildi. İ/R grubunda ise derece 3 daha fazla olmak üzere bazı dokularda derece 4 ün de izlendiği tüm duvar katını tutan şiddetli hasar gözlemlendi (Resim 18). İ/R+Agm grubunda hafif ve orta derece mukozal hasar izlendi (Resim 19). iNOS yapımının İ/R grubunda diğer gruplara göre belirgin artış olduğu saptanmıştır (Resim 22) ancak bu yapım İ/R+Agm grubunda azalmış olarak gözlemlendi (Resim 23). Gruplara ait histopatolojik değerlendirme sonuçları ile immünohistokimyasal iNOS yapımının değerlendirmesi tablo 4'te gösterilmektedir.

Tablo 4: Gruplarda histopatolojik ve immünohistokimyasal değerlendirme sonuçları

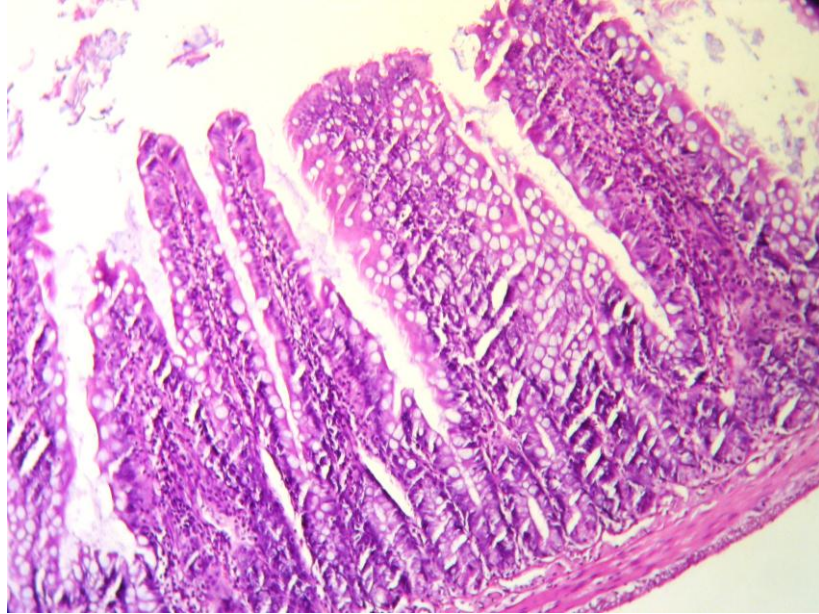
Gruplar	H&E kesitlerde histopatolojik değerlendirme	İmmünohistokimyasal iNOS Skorlama
Kontrol	0±0	0.5±0.01
İ/R	3.25 ^a ±0.01	3 ^a ±0
Kontrol+Agm	0.5 ^b ±0.01	0.75 ^b ±0.01
İ/R+Agm	1.25 ^b ±0.01	1.25 ^b ±0.01

^a kontrol grubuna göre; ^b İ/R grubuna göre istatistiksel anlamlı farklılığı göstermektedir (p<0.05).

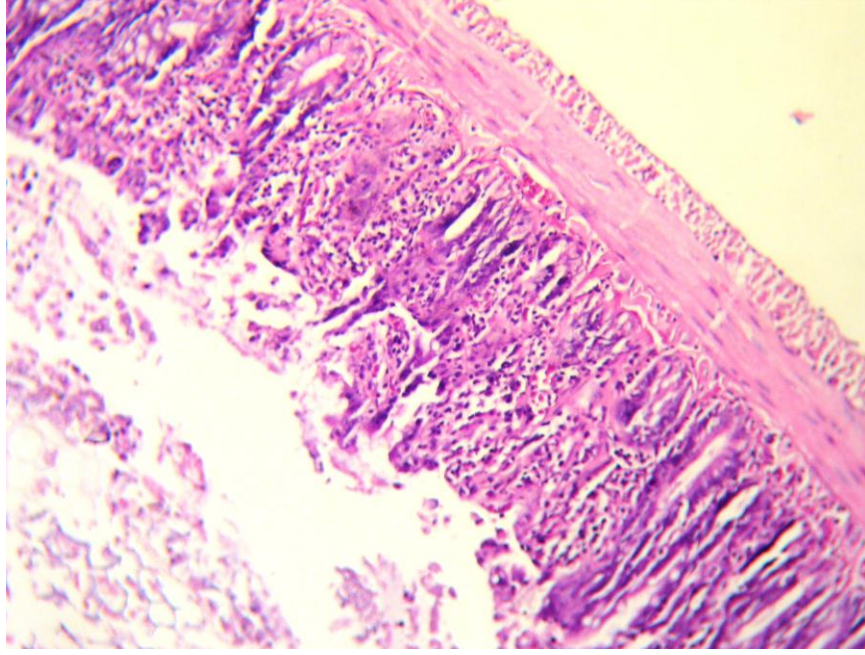
4.4.1. Histopatolojik görüntüler



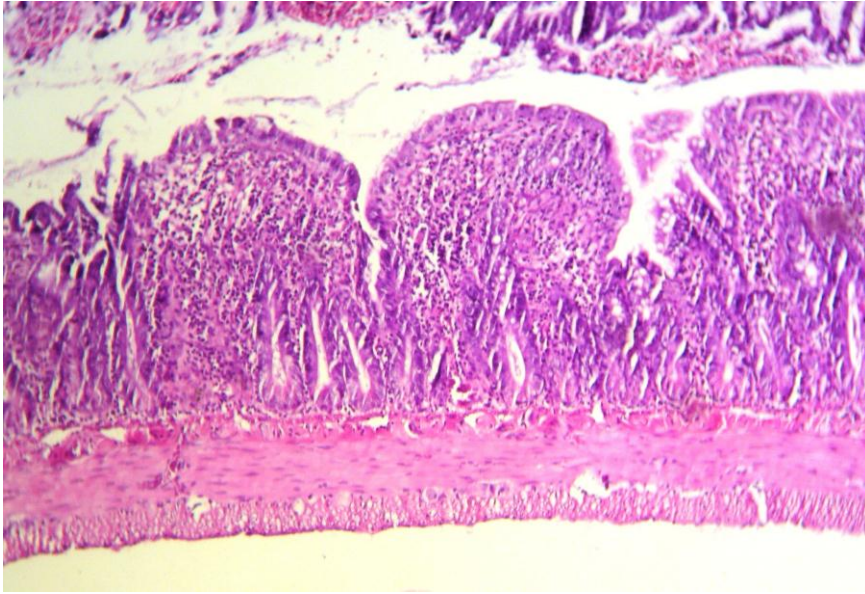
Resim 16: Kontrol grubuna ait histopatolojik görüntü



Resim 17: Kontrol+Agm grubuna ait histopatolojik görüntü

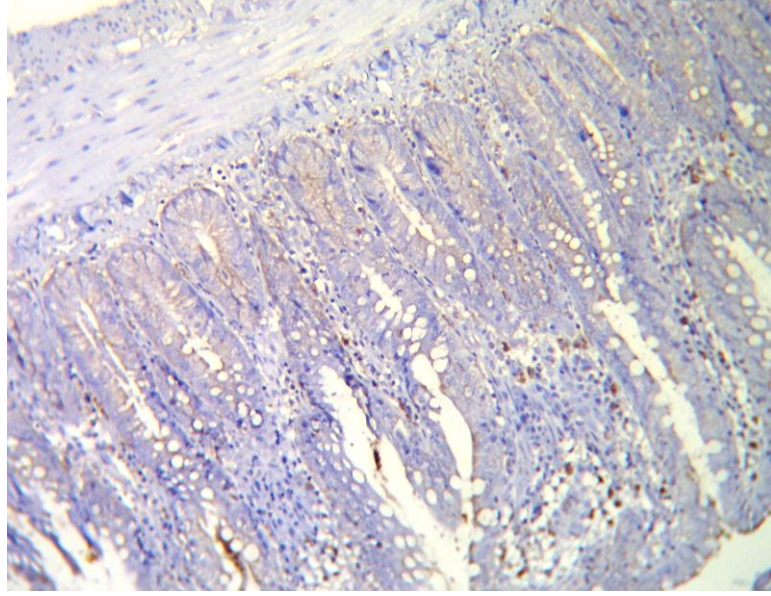


Resim 18: İ/R grubuna ait histopatolojik görüntü

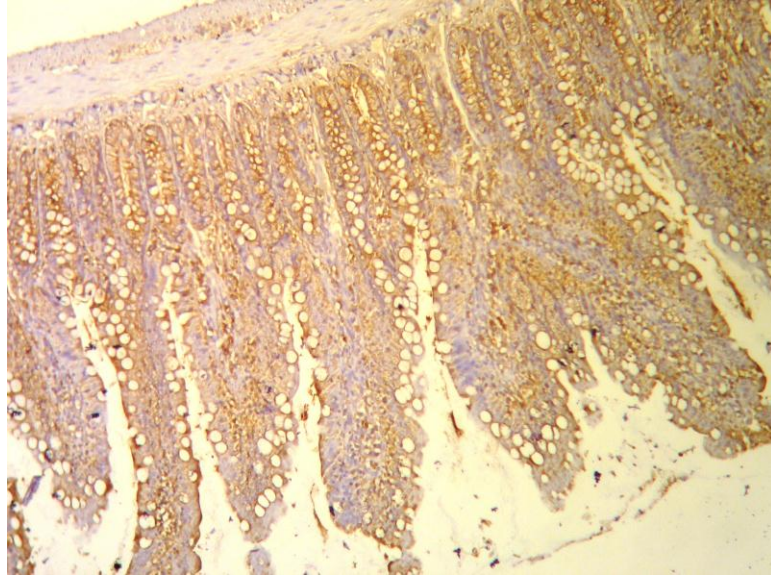


Resim 19: İ/R+Aqm grubuna ait histopatolojik görüntü

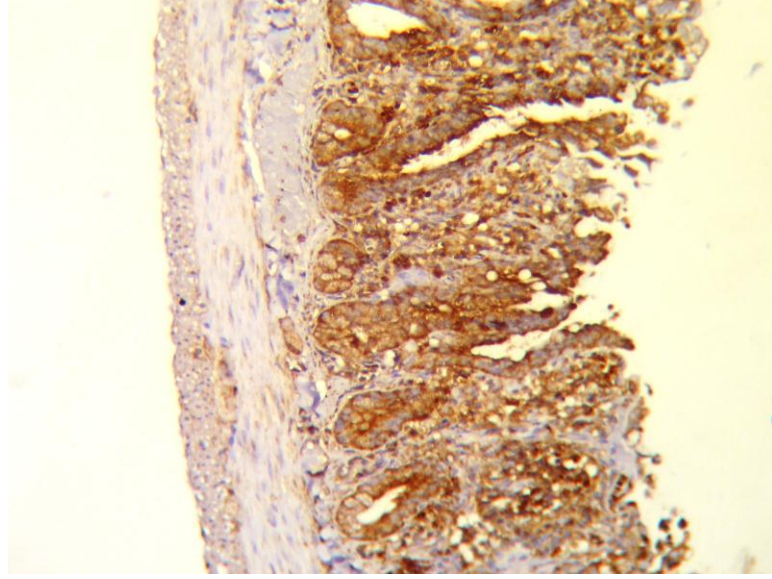
4.4.2. iNOS yapımı ile ilgili immünohistokimyasal görüntüler



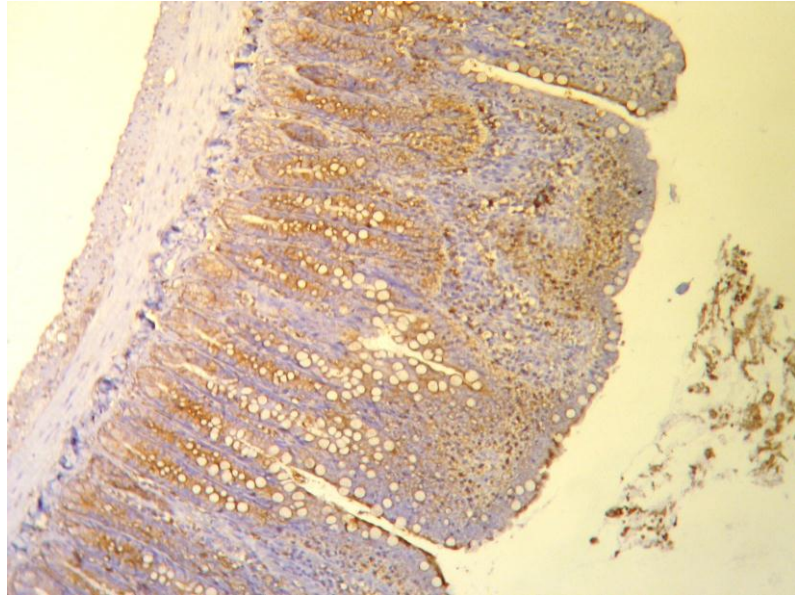
Resim 20: Kontrol grubuna ait iNOS immün boyama görüntüsü



Resim 21: Kontrol+Agm grubuna ait iNOS immün boyama görüntüsü



Resim 22: İ/R grubuna ait iNOS immün boyama görüntüsü



Resim 23: İ/R+Agm grubuna ait iNOS immün boyama görüntüsü

5. TARTIŞMA

Çalışmamızda intestinal iskemi reperfüzyon hasarı oluşturulan sıçanlarda reperfüzyon öncesi 10 mg/kg dozunda intraperitoneal agmatin uygulanmasının barsak hasarı üzerindeki etkileri incelenmiştir. Sonuçlarımız agmatinin KCl ve karbakole karşı iskemi ile bozulan ileal kontraktileti düzelttiği, MDA ve MPO düzeylerini düşürdüğü, GSH düzeyini koruduğu, histolojik boyutta doku harabiyetini önlediği, immünohistokimyasal olarak iNOS yapımını azalttığı ve plazma proinflamatuvar sitokin seviyelerinde kısmi azalmalar yarattığını gösterdi.

İntestinal İ/R hasarı oklüziv ve nonoklüziv nedenlerle oluşabilen ayrıca travma ve cerrahi hastalarında yüksek morbidite ve mortaliteye neden olan önemli bir durumdur. İntestinal İ/R geliştiğinde barsak emilim fonksiyonunda ve motilitesinde değişiklikler gözlenir (32). Barsakta azalmış kontraktil aktiviteyle beraber mikrovasküler permeabilite artar ve mukozal bariyer bozulur. Barsak İ/R hasarı sırasında özellikle reperfüzyon sürecinde ortama oksijenin gelmesiyle mukozada yoğun olarak SOR oluşumu meydana gelir. SOR'un üretimindeki en önemli faktörün esas olarak XO aracılığıyla olduğu düşünülmektedir. Bu aşamada iNOS'un aktive olması ile yüksek miktarlarda NO yapımı ortamda bulunan $O_2^{\bullet -}$ ile etkileşerek peroksinitrit yapımına neden olur. Tüm bu radikaller organizmada SOR'un en önemli etkisi olan lipid peroksidasyonunu başlatır. İnflamatuvar sürecin başlamasıyla da nötrofillerin infiltrasyonu gerçekleşir. Proinflamatuvar sitokinlerin salınması ve lökotrienlerin artmasıyla hasar şiddetlenir. Özellikle mukozal bariyerin bozulmasıyla gelişen bakteriyel translokasyon ve sitokinlerin etkisiyle sistemik inflamatuvar yanıt gelişir. Uzak organ hasarından bu inflamatuvar yanıt sorumlu tutulmaktadır (32,39).

Bugüne kadar farklı birçok yöntem kullanılarak İ/R hasarına karşı organların korunmasını amaçlayan pek çok deneysel çalışma planlanmış ve yapılmıştır. Deneysel ortamda başarılı gibi görünen çalışmaların çok azı klinikte uygulama şansı bulmuştur. Bunda İ/R hasarının tek bir basamak veya medyatörün bloke edilmesi ile önlenemeyecek kadar karmaşık olmasının rolü büyüktür. Barsak İ/R hasarını araştırmamızın nedeni bu denli yüksek mortaliteye sahip bir olayın mekanizmalarının hala tam olarak aydınlatılamamış ve hasarlanmayı azaltacak kesin ajanların hala bulunamamış olmasıdır.

Agmatin ADC etkisiyle L-Arjininden sentezlenen polikasyonik bir amindir (14,111). Agmatinin İ/R hasarına karşı koruyucu etkisi deneysel olarak beyin (131), spinal kord (20), böbrek (132), mide (133) ve retina (134) gibi birçok organda gösterilmiştir. Literatürde agmatinin intestinal İ/R hasarı üzerine etkilerini inceleyen bir çalışmaya rastlanmamıştır. Çalışmamız bu yönüyle agmatinin iskemik barsakta etkilerini inceleyen ilk çalışmadır.

İ/R hasarı ileumun kasılma yanıtlarında ve elektriksel aktivitesinde bozulmaya neden olur (8). Bu motilite değişiklikleri bakterilerin çoğalması ve bakteriyel translokasyonla sonuçlanır. Oluşan motilite değişikliklerine SOR, salınan inflamatuvar medyatörler, toplanan nötrofiller ve değişen NO metabolizması gibi faktörler neden olur (9). Özellikle NO potent bir düz kas gevşeticisidir. Enterik nöronlardan salınan yapısal NO gastrointestinal motilitenin major inhibitör düzenleyicisidir (42).

Enterik sinir sisteminde NMDA glutamat reseptörleri yaygın olarak bulunur ve duysal ve motor reflekslerde rol aldığı bildirilmektedir. Ayrıca son zamanlarda NMDA reseptörleri ile glutamaterjik iletinin intestinal iskemi reperfüzyon sonrası ortaya çıkan motilite bozukluklarında rol aldığı bildirilmektedir (10). NMDA reseptör blokajının iskemi ile bozulan intestinal transit süresini normale çevirdiği çeşitli çalışmalarda gösterilmiştir (6,135).

Çalışmamızda iskemi ile ortaya çıkan motilite değişikliklerini in vitro olarak gözlemleyebileceğimiz izole organ banyosunda, ileum örneklerinin karbakol ve KCl agonistlerine verdiği kontraksiyon yanıtlarını inceledik. İ/R sonucunda ileumun KCl ve 10^{-6} - 10^{-2} M karbakole olan yanıtlarının azaldığı tespit edildi. Agmatin uygulaması sonrasında iskemide bozulan kontraktilite yanıtlarının düzeldiği gözlemlendi. Agmatinle oluşan bu düzelmede, agmatinle iNOS yapımının, oksidatif stresin ve nötrofil birikiminin azalmasının etkili olduğu gözlemlendi.

İskemik durumlarda iNOS aracılığıyla aşırı ve uzun süreli NO salınımı barsakta meydana gelen ileusta anahtar rol oynamaktadır (42). Hassoun ve arkadaşları tarafından yapılan çalışmada şiddetli iskemi sonrası ileus gerçekleşen ratlarda iNOS mRNA ve proteininde artış saptanmış, selektif iNOS inhibitörü kullandıklarında barsak transit süresinde fonksiyonel iyileşme bulmuşlardır (42). Başka çalışmalarda da selektif

iNOS inhibitörlerinin lipopolisakkaritlerin zararlı etkilerini azalttığı gösterilmiştir (43,44).

Çalışmamızda immünohistokimyasal olarak barsak dokusunda iNOS yapımının agmatin uygulanan grupta iskemik gruba göre anlamlı şekilde azaldığını tespit ettik. Bu tespit iNOS düzeyini değerlendiren diğer çalışmalarla desteklenmektedir. Agmatinin iNOS inhibisyonu yaptığı bir çok çalışma tarafından gösterilmiştir (14,21,111,117,131,136). Mun ve ark.'nın (21) yakın zamanda yaptığı çalışmada, geçici global serebral iskemide oluşturulan ratlarda agmatinin nöroprotektif etkili olduğunu ve bunu da iskemide koruyucu rolü olan eNOS yapımını artırıp, toksik etkileri olan iNOS ve matriks metalloproteinaz-9'da azalma meydana getirerek yaptığını göstermişlerdir. Astrosit ve makrofaj hücre kültürlerinde yapılan bir çalışmada agmatinin iNOS aktivasyonunu azaltarak NO miktarında azalma meydana getirdiği, bu sayede nöroprotektif ve antiinflamatuvar özelliklerinin olduğundan bahsedilmiştir (111). Ahn ve ark. (136) hücre mikrogial kültürlerde LPS ile oluşan sitotoksiteyi agmatinin iNOS inhibisyonu yaparak azalttığını göstermişlerdir. Wang ve ark. (131) geçici serebral iskemide oluşturdukları ratlarda reperfüzyon öncesi agmatin uygulamasının, apoptozisi önleyerek ve iNOS inhibisyonu yaparak beyin enfarktını, gliozisi ve ödemi engellediğini, motor ve derin duyu bozukluklarında düzelme sağladığını bulmuşlardır. Ayrıca agmatinin NMDA blokajı yaparak nöroprotektif etkiler göstermesi literatürde çok sayıda çalışma tarafından desteklenmiştir (18,19,114). Bizim bulduğumuz sonuçlarda da agmatinin İ/R hasarı sonrası azalan barsak düz kas kontraksiyon yanıtlarını düzeltebilmesinin yaptığı iNOS inhibisyonu ve NMDA blokajı sayesinde olabileceği düşünülebilir. Ayrıca intestinal iskemide motilite bozukluklarından sorumlu lipid peroksidasyonunun, nötrofil birikiminin ve mukozal hasarın çalışmamızda agmatinle azaltılması kontraktıl yanıtlarda belirgin düzelmeye sonuçlanmıştır.

Çalışmamızda agmatinin mukozal ve barsak duvarı hasarını önemli ölçüde azalttığı gözlemlendi. Çalışmamıza benzer şekilde Al Masri ve ark. (133) gastrik İ/R öncesi 100 mg/kg agmatin uyguladıkları çalışmada, histopatolojik olarak agmatinin midede hemoraji ve ülseri azalttığı ve mide epitelini koruyucu etkisinin olduğunu göstermişlerdir. Sugiura ve ark.'nın (132) yaptıkları çalışmada, böbrek İ/R sonrası akut

böbrek yetmezliği gelişen ratlarda 300 µM/kg agmatin uygulayarak, histolojik olarak tübüler hasarın ve medullar konjesyonun azaldığını bulmuşlardır.

Lipid peroksidasyonunun son ürünü MDA'dır. Dokuda MDA düzeyi ölçülerek lipid peroksidasyonunun derecesi hakkında fikir edinilebilir. Bu çalışmada İ/R ile intestinal dokuda lipid peroksidasyonunun arttığı tespit edildi. Agmatin uygulaması ile lipid peroksidasyon seviyelerinde belirgin azalma olduğu saptandı. Bizim bulgularımızı destekler şekilde Dastan ve ark. (134) yaptıkları çalışmada retinal İ/R hasarında 50 mg/kg intraperitoneal agmatin uygulamasıyla MDA düzeylerini düşürerek lipid peroksidasyonunu azalttığını göstermişlerdir. Aynı zamanda NO düzeylerinde ve retinal kalınlıkta azalma tespit edip agmatinin retinal İ/R hasarında nöroprotektif etkisini kanıtlamışlardır. Bhutada ve ark. (137) yaptıkları çalışmada streptozotosin ile diyabet oluşturulmuş ratların 30 gün boyunca 5-10 mg/kg ip. agmatin tedavisi uygulayarak, agmatinin kognitif fonksiyonlarda düzelme sağladığını, kan glukozunu düzenlediğini ve MDA düzeyinde azalma, GSH düzeylerinde artma meydana getirdiğini göstermişlerdir. Bizim çalışmamızda agmatin uygulaması ile azalan MDA seviyesinin özellikle iNOS yapımının inhibisyonu ile peroksinitrit oluşumunun ve dokuya olan nötrofil göçünün azaltılmasından kaynaklanabileceğini düşünmekteyiz.

İ/R hasarında SOR'un üretimi lökosit aktivasyonuna ve dokuya lökosit infiltrasyonuna neden olur. İnce barsağa nötrofil migrasyonu MPO aktivitesi ölçülerek indirek olarak değerlendirilebilir (79). Çalışmamızda iskemik grupta artan MPO düzeyi agmatin uygulamasıyla kontrol düzeylerine indirilebilmiştir.

GSH hücrede sitoplazma, nükleus ve mitokondride oldukça yüksek miktarda bulunur ve bu kompartmanlarda major solubl antioksidandır. GSH direk olarak OH[•] radikalini ve singlet oksijeni ortamdan temizler, hidrojen peroksit ve lipid peroksitleri GSH-Px ile detoksifiye eder (53). İ/R periyodu boyunca hücre içi redükte glutatyonun tükendiği ve bunun SOR'ne bağlı oksidatif stresin bir göstergesi olarak kullanılabileceği bilinmektedir. Sonuçlarımız barsakta İ/R ile meydana gelen GSH kaybının, agmatin uygulamasıyla korunduğunu gösterdi. Bu bize agmatinin indirekt antioksidan etkinliğinin olabileceğini gösterdi. Agmatinin bu etkisi iNOS yapımını inhibe ederek dokudaki lipid peroksidasyonunu engellemesi ve GSH kullanımını azaltmasının bir sonucu olabileceğini gösteriyor.

Çalışmamızda iNOS yapımı azalması ile birlikte proinflamatuvar sitokin yapımının agmatin ile azaldığı gözlemlendi. Agmatin iskemi ile artan IL-1 α düzeylerini düşürmede etkili olurken, TNF- α 'da istatistiksel anlamlı bir fark saptanamamıştır. TNF ve IL-1 ince barsakta iskemi ve reperfüzyon süresince üretilir (93). Bu proinflamatuvar sitokinler diğer sitokinlerin salınımını artırır ve akut faz yanıtını uyarırlar. TNF ve IL-1' in her ikisi de endotelde adezyon moleküllerinin artışına, lökosit toplanmasına, sitokin ve eikazonoidlerin artmasına sebep olmaktadır (24). Bu da iskemik barsakta hasarlanmayı arttırmaktadır. Yamamoto ve ark.'nın (93) yaptıkları çalışmada İ/R uygulanan ratlarda TNF ve IL-1 inhibitörlerinin kullanılmasıyla intestinal hasarın azaldığını ve hayvanların yaşam sürelerinin uzadığını göstermişlerdir. Ahn ve ark. (136) yaptıkları çalışmada agmatinin mikrogliyalarda LPS ile indüklenen sitotoksik hasarı azalttığını, nitrit ve iNOS ekspresyonu ile beraber TNF- α ve IL-1 β düzeylerinde düşme gözlemlenmiştir. Hong ve ark. (138) retinal gangliyon hücre kültüründe yaptıkları çalışmada 100 μ M agmatin uygulayarak TNF ile indüklenen hücre ölümünde azalma meydana getirdiğini bulmuşlardır.

T hepler-1 hücrelerinden IFN- γ üretimi İ/R hasarı patogeneğinde önemli bir yer tutmaktadır. Deneysel İ/R hasarı modellerinde artmış serum ve doku IFN- γ değerleri gösterilmiştir (139). Yaptığımız çalışmada IFN- γ düzeyleri iskemik grupta kontrol grubuna göre yüksek bulundu, ilginç olarak kontrol+Agm grubunda değerler iskemik gruptaki kadar yükselmişti. Ancak agmatin uygulamasının IFN- γ değerini iskemik gruba göre anlamlı şekilde düşürdüğü bulundu.

MCP-1 inflamatuvar medyatör moleküldür ve yapımındaki artış İ/R hasarı sonrası inflamatuvar hücrelerin bölgeye toplanmasından sorumludur. Özellikle MCP-1'in reseptörü CCR2 ile etkileşmesinin deneysel kalp, böbrek ve serebral İ/R hasarı modellerinde merkezi rol oynadığı gösterilmiştir (140). Bu yüzden MCP-1 üretiminin azalması monositlerin toplanmasını ve etkilerini azaltacak, dolayısıyla postiskemik inflamatuvar cevapta azalma meydana gelecektir (133). Mide İ/R hasarı sonrası mide dokusunda MCP-1 düzeyinin arttığı ve bunun agmatin tedavisiyle azaltıldığı Al Masri ve ark. (133) tarafından gösterilmiştir. Bizim çalışmamızda MCP-1 düzeyleri İ/R grubunda kontrol gruplarına göre belirgin şekilde artmıştır. Agmatin tedavisiyle MCP-1 düzeyinde düşme görülmesine rağmen bu düşüş istatistiksel olarak anlamlı bulunmamıştır.

IL-4; B ve T lenfosit gibi hücrelerin büyüme ve farklılaşmasını sağlayan, aktive T lenfosit ve makrofajlar tarafından üretilen önemli düzenleyici bir sitokindir. B lenfositlerden antikor üretimini artırır ve T lenfositlerin T helper 2 (Th2) hücrelerine farklılaşmasını sağlayan en potent faktördür. Çoğu araştırmacı tarafından antiinflamatuvar etkili bir sitokin olduğu bilirse de proinflamatuvar etkili olduğunu gösteren araştırmacılar da mevcuttur. İnfalamsyonda endotel üzerinde VCAM-1 indüksiyonunda önemli bir rol oynar. VCAM-1'i etkilemesiyle T lenfosit, monosit, bazofil ve eizinofillerin direk inflamasyon alanına göç etmesine neden olabilir (95). Çalışmamızda İ/R IL-4 düzeyini arttırmış, ancak agmatin tedavisi bu düzeyi düşürememiştir. Çalışmamızda IL-4'ün İ/R sürecinde artmış bulunması proinflamatuvar özelliğini desteklemektedir. IL-4'ün bu keşfedilmemiş karmaşık yanı ancak yapılacak yeni deneysel çalışmalarla açıklığa kavuşabilir.

GMCSF hematopoietik sitokin ailesinin bir üyesidir. Ana fonksiyonu kemik iliği hücrelerinin çoğalmasını stimüle etmek, kan hücrelerinin apoptozisini inhibe etmek ve periferik kanda hücre sayısını arttırmaktır. Son zamanlarda nöroprotektif etkilerinin olduğu birçok çalışmada gösterilmiştir (141). Çalışmamızda plazma GMCSF düzeyleri değerlendirildiğinde gruplar arasında anlamlı fark saptanmadı. Çalışmamıza göre agmatinin GMCSF üzerinde herhangi bir etkisi bulunmamaktadır.

Sonuç olarak bu çalışma deneysel olarak intestinal İ/R hasarı oluşturulmuş sıçanlarda agmatinin koruyucu etkilerinin olduğunu gösteren ilk çalışmadır. Çalışmamızda agmatinin iNOS inhibisyonu yaparak, lipid peroksidasyonunu ve nötrofil infiltrasyonunu azaltarak barsakta fonksiyonel ve yapısal iyileşme sağladığı gözlemlendi. Aynı zamanda agmatinin barsak düz kasında iskemiyle azalan KCl ve karbakol kontraksiyon yanıtlarını düzelttiği görüldü. Agmatinle ortaya çıkan yapısal ve fonksiyonel iyileşme mekanizmasında lipid peroksidasyonunu azaltması, GSH seviyelerini koruması, nötrofil birikimini önlemesi ve proinflamatuvar sitokin seviyelerinde kısmi azalmalar yaratarak sistemik infalamatuvar yanıtı azaltması yer almaktadır. Ancak agmatinin bu etkileri hangi mekanizmaları ve sinyal yollarını kullanarak gerçekleştirdiğini anlamak için deneysel birçok çalışmaya ihtiyaç vardır. Agmatin bu çalışmada gösterdiği koruyucu etkilerle ciddi mortalite nedeni olan mezenterik iskemiye potansiyel ilaç olabilecek bir adaydır.

6. KAYNAKLAR

1. Petrat F, Swoboda S, de Groot H, Schmitz K. Quantification of ischemia-reperfusion injury to the small intestine using a macroscopic score. *J Invest Surg* 23(4):208-17, 2010.
2. Borjesson A, Norlin A, Wang X, Andersson R ve Folkesson HG. TNF- α stimulates alveolarliquid clearance during intestinal ischemia reperfusion in rats. *Am J Physiol* 278:3-12, 2000.
3. Arumugam TV, Arnold N, Proctor LM, Newman M, Reid RC, Hansford KA, Fairlie DP, Shiels IA, Taylor SM. Comparative protection against rat intestinal reperfusion injury by a new inhibitor of sPLA2, COX-1 and COX-2 selective inhibitors, and an LTC4 receptor antagonist. *Br J Pharmacol* 140: 71–80, 2003.
4. Zimmerman BJ, Granger DN. Reperfusion injury. *Surg Clin North Am* 72: 65-83, 1992.
5. Vollmar B, Menger MD. Intestinal ischemia/reperfusion: microcirculatory pathology and functional consequences. *Langenbecks Arch Surg* 396(1):13-29, 2011.
6. Cámara-Lemarroy CR, Guzmán-de la Garza FJ, Alarcón-Galván G, Cordero-Pérez P, Fernández-Garza NE The effects of NMDA receptor antagonists over intestinal ischemia/reperfusion injury in rats. *Eur J Pharmacol* Oct 25;621(1-3):78-85, 2009.
7. Girotti AW. Lipid hydroperoxide generation, turnover, and effector action inbiological systems. *J Lipid Res* 39:1529-1542, 2000.
8. Ballabeni V, Barocelli E, Bertoni S, Impicciatore M. Alterations of intestinal motor responsiveness in a model of mild mesenteric ischemia/reperfusion in rats. *Life Sci* 71(17):2025-35, 2002.
9. Ozacmak VH, Sayan H, Igdem AA, Cetin A, Ozacmak ID. Attenuation of contractile dysfunction by atorvastatin after intestinal ischemia reperfusion injury in rats. *Eur J Pharmacol* 562(1-2):138-47, 2007.
10. Giaroni C, Zanetti E, Giuliani D, Oldrini R, Marchet S, Moro E, Borroni P, Trinchera M, Crema F, Lecchini S, Frigo G. Protein kinase c modulates NMDA receptors in the myenteric plexus of the guinea pig ileum during in vitro ischemia and reperfusion. *Neurogastroenterol Motil* 23(2):e91-103, 2011.

11. Takizawa Y, Kishimoto H, Kitazato T, Tomita M, Hayashi M. Effects of nitric oxide on mucosal barrier dysfunction during early phase of intestinal ischemia/reperfusion. *Eur J Pharm Sci* 42(3):246-52, 2011.
12. Kesik V, Guven A, Vurucu S, Tunc T, Uysal B, Gundogdu G, Oztas E, Korkmaz A. Melatonin and 1400 W ameliorate both intestinal and remote organ injury following mesenteric ischemia/reperfusion. *J Surg Res* 157(1):e97-e105, 2009.
13. Katada K, Bihari A, Badhwar A, Yoshida N, Yoshikawa T, Potter RF, Cepinskas G. Hindlimb ischemia/reperfusion-induced remote injury to the small intestine: role of inducible nitric-oxide synthase-derived nitric oxide. *J Pharmacol Exp Ther* 329(3):919-27, 2009.
14. Zarifkar A, Choopani S, Ghasemi R, Naghdi N, Maghsoudi AH, Maghsoudi N, Rastegar K, Moosavi M. Agmatine prevents LPS-induced spatial memory impairment and hippocampal apoptosis. *Eur J Pharmacol* 634(1-3):84-88, 2010.
15. Uzbay TI. The pharmacological importance of agmatine in the brain. *Neurosci Biobehav Rev* 36(1):502-19, 2012.
16. Halaris, A., Piletz J. Agmatine: metabolic pathway and spectrum of activity in brain. *CNS Drugs* 21:885–900, 2007.
17. Regunathan S. Agmatine: biological role and therapeutic potentials in morphine analgesia and dependence. *AAPS J* 8(3):E479-84, 2006.
18. Zhu MY, Piletz JE, Halaris A, Regunathan S. Effect of agmatine against cell death induced by NMDA and glutamate in neurons and PC12 cells. *Cell Mol Neurobiol* 23(4-5): 865–72, 2003.
19. Wang WP, Iyo AH, Miguel-Hidalgo J, Regunathan S, Zhu MY. Agmatine protects against cell damage induced by NMDA and glutamate in cultured hippocampal neurons. *Brain Res* 1084(1): 210–6, 2006.
20. Gilad GM, Gilad VH. Accelerated functional recovery and neuroprotection by agmatine after spinal cord ischemia in rats. *Neurosci Lett* 296 (2-3): 97–100, 2000.

21. Mun CH, Lee WT, Park KA, Lee JE Regulation of endothelial nitric oxide synthase by agmatine after transient global cerebral ischemia in rat brain. *Anat Cell Biol* 43(3):230-40, 2010.
22. Wang ZM, Sun GQ, Wang ZA, He RR. Effects of agmatine on neuronal discharges in rat hippocampal CA1 area. *Sheng Li Xue Bao* 55 (6): 717–21, 2003.
23. Özkaya FC, Koçdor H. Ischemia Reperfusion and Cancer Metastasis: Biochemical Aspects. *Deü Tıp Dergisi* 22(2): 89-9, 2008.
24. Kumar V, Abbas AK, Fausto N, Mitchell R. *Robbins Basic Pathology*. 8th edition. pp. 13-19, 48-50, 2007.
25. Kumar V, Cotran R, Robbins SL. *Basic Pathology*. 6th edition. pp. 6-10, 30-36, 2000.
26. Parks DA, Granger DN. Contributions of ischemia and reperfusion to mucosal lesion formation. *Am J Physiol* 250: 749-753, 1986.
27. Şener G, Yeğen B. İskemi Reperfüzyon Hasarı. *Klinik Gelişim Dergisi* 22: 5-13, 2009.
28. Widmaier EP, Raff H, Strang KT. *Vander's Human Physiology: the mechanisms of body function*. 11th edition. pp. 535, 2008.
29. Geboes K, Geboes KP, Maleux G. Vascular anatomy of the gastrointestinal tract. *Best Pract Res Clin Gastroenterol* 15(1):1-14, 2001.
30. <http://www.chirurgenmanual.charite.de>
31. Guan Y, Worrell RT, Pritts TA, Montrose MH. Intestinal ischemia-reperfusion injury: reversible and irreversible damage imaged in vivo. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 297:187–196, 2009.
32. 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.
33. Hinnebusch BF, Ma Q, Henderson JW, Siddique A, Archer SY, Hodin RA. Enterocyte response to ischemia is dependent on differentiation state. *J Gastrointest Surg* 6(3):403–409, 2002.

34. Oldenburg WA, Lau LL, Rodenberg TJ, Edmonds HJ, Burger CD. Acute Mesenteric Ischemia. *Arch Intern Med* 164: 1054-1062, 2004.
35. Haglund U, Bergqvist D. Intestinal ischemia: The basics. *Langenbecks Arch Surg* 384:233-238, 1999.
36. Paterno F, Longo WE. The Etiology and Pathogenesis of Vascular Disorders of the Intestine. *Radiol Clin N Am* 46: 877-85, 2008.
37. Rosenblum JD, Boyle CM, Schwartz LB. The mesenteric circulation, anatomy and physiology. *Surg Clin N Am* 77: 289-306, 1997.
38. Hansen MB, Dresner LS, Wait RB. Profile of neurohumoral agents on mesenteric and intestinal blood flow in health and disease. *Physiol Res* 47:307–327, 1998.
39. Cerqueira NF, Hussni CA, Yoshida WB. Patophysiology of mesenteric ischemia/reperfusion injury: a review. *Acta Cir Bras* 20(4): 336-343, 2005.
40. Debus ES, Müller-Hülsbeck S, Kölbl T, Larena-Avellaneda A. Intestinal ischemia. *Int J Colorectal Dis* 26(9):1087-97, 2011.
41. Hierholzer C, Kalff JC, Audolfsson G, Billiar TR, Tweardy DJ, Bauer AJ. Molecular and functional contractile sequelae of rat intestinal ischemia/reperfusion injury. *Transplantation* 68, 1244–54, 1999.
42. Hassoun HT, Weisbrodt NW, Mercer DW, Kozar RA, Moody FG, Moore FA. Inducible nitric oxide synthase mediates gut ischemia/reperfusion-induced ileus only after severe insults. *J Surg Res* 15;97(2):150-4, 2001.
43. Kaminski KA, Bonda TA, Korecki J, Musial WJ. Oxidative stress and neutrophil activation—the two keystones of ischemia / reperfusion injury: *Int J Cardiol* 86 (1): 41–59, 2002.
44. Dröge W. Free Radicals in the Physiological Control of Cell Function: *Physiol Rev* 82: 47–95, 2001.
45. Takahashi A, Tomomasa T, Kaneko H, Watanabe T, Tabata M, Morikawa H, Tsuchida Y, Kuwano H. Intestinal motility in an in vivo rat model of intestinal ischemia-reperfusion with special reference to the effects of nitric oxide on the motility changes. *J Pediatr Gastroenterol Nutr* 33(3):283-8, 2001.

46. Collard CD, Gelman S. Pathophysiology, Clinical Manifestations, and Prevention of Ischemia-Reperfusion Injury: *Anesthesiology* 94(6):1133-8, 2001.
47. Yoshida WB. Radicais livres na síndrome da isquemia e reperfusão. *Cir Vasc Angiol* 12:82-95, 1996.
48. Granger DN, Hollwarth ME, Parks DA: Ischemia-reperfusion injury: Role of oxygen-derived free radicals. *Acta Physiol Scand Suppl* 548:47-63, 1986.
49. Schoenberg MH, Beger HG. Reperfusion injury after intestinal ischemia. *Crit Care Med* 21: 1376-1386, 1993.
50. Slavikova H, Lojek A, Hamar J, Duskova M, Kubala L, Vondracek J, Ciz M. Total antioxidant capacity of serum increased in early but not late period after intestinal ischemia in rats. *Free Rad Biol Med* 25: 9-18, 1998.
51. Babior BM, Lambeth JD, Nauseef W. The neutrophil NADPH oxidase. *Arch Biochem Biophys* 397(2):342-4, 2002.
52. Winterbourn CC and Kettle AJ. Radical-radical reactions of superoxide: a potential route to toxicity. *Biochem Biophys Res Commun* 305: 729-736, 2003.
53. Valko M, Rhodes CJ, Moncol J, Izakovic M, Mazur M. Free radicals, metals and antioxidants in oxidative stress-induced cancer: *Chemico-Biological Interactions* 160:1-40, 2006.
54. Fukai T, Ushio-Fukai M. Superoxide Dismutases: Role in Redox Signaling, Vascular Function, and Diseases: *Antioxid Redox Signal* 15(6):1583-1606, 2011.
55. Buettner GR. Superoxide Dismutase in Redox Biology: The roles of superoxide and hydrogen peroxide. *Anticancer Agents Med Chem* 11(4): 341-346, 2011.
56. Akkuş İ. Serbest radikaller ve fizyopatolojik etkileri. 1. Basım, s.1-84, Konya Mimoza Yayınları, 1995.
57. Mccord JM. The evolution of free radicals and oxidative stres. *Am J Med* 108: 652-659, 2000.
58. Valko M, Leibfritz D, Moncol J, Cronin MT, Mazur M, Telser J. Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology* 39: 44-84, 2007.

59. Kehrer JP. The Haber–Weiss reaction and mechanisms of toxicity. *Toxicology* 149(1):43-50, 2000.
60. Freinbichler W, Colivicchi MA, Stefanini C, Bianchi L, Ballini C, Misini B, Weinberger P, Linert W, Varešlija D, Tipton KF, Della Corte L. Highly reactive oxygen species: detection, formation, and possible functions. *Cell Mol Life Sci* 68(12):2067-79, 2011.
61. Arıtaş Y, Bedirli A. Role of nitric oxide in gastrointestinal system. *T Klin J Med Sci* 18:145-149, 1998.
62. Aladağ MA, Türköz Y, Özerol İH. Nitric oxide and its neurophysiopathological effects. *T Klin Tıp Bilimleri* 20:107-111, 2000.
63. Jin RC, Loscalzo J. Vascular nitric oxide: formation and function. *Journal of Blood Medicine* 1:147–162, 2010.
64. Takahashi T. Pathophysiological significance of neuronal nitric oxide synthase in the gastrointestinal tract. *J Gastroenterol* 38:421–430, 2003.
65. Cho CH. Current roles of nitric oxide in gastrointestinal disorders. *Journal of Physiology - Paris* 95: 253–256, 2001.
66. Davenpeck KL, Gauthier TW, Lefer AM. Inhibition of endothelial derived nitric oxide promotes P-selectin expression and actions in the rat microcirculation. *Gastroenterology* 107: 1050–1058, 1994.
67. Keklikoğlu N, Koray M, Kocaeli H, Akıncı S. iNOS Expression in Oral and Gastrointestinal Tract Mucosa. *Dig Dis Sci* 53:1437–42, 2008.
68. Pacher P, Beckman JS, Liaudet L. Nitric Oxide and Peroxynitrite in Health and Disease. *Physiol Rev* 87(1): 315–424, 2007.
69. Suzuki Y, Deitch EA, Mishima S, Lu Q, Xu D. Inducible nitric oxide synthase gene knockout mice have increased resistance to gut injury and bacterial translocation after an intestinal ischemiareperfusion injury. *Crit Care Med* 28(11):3692–6, 2000.
70. 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):649–58, 2002.

71. Virlos IT, Inglott FS, Williamson RC, Mathie RT: Differential expression of pulmonary nitric oxide synthase isoforms after intestinal ischemia-reperfusion. *Hepatology* 50(49):31–36, 2003.
72. Fournier BM, Parkos CA. The role of neutrophils during intestinal inflammation. *Mucosal Immunol* 5(4):354-66, 2012.
73. Eltzschig HK, Collard CD. Vascular ischaemia and reperfusion injury. *British Medical Bulletin* 70: 71–86, 2004.
74. Kalia N, Brown NJ, Wood RF, Hopkinson K, Fairburn B, Pockley AG. Effects of intestinal ischemia reperfusion injury on rat peripheral blood neutrophil activation. *Dig Dis Sci* 48(9):1677-84, 2003.
75. Lefter AM, Lefter DJ. The role of nitric oxide and cell adhesion molecules on the microcirculation in ischaemia-reperfusion. *Cardiovascular Research* 32:743-751, 1996.
76. Carden DL, Granger DN. Pathophysiology of ischaemia-reperfusion injury. *J Pathol* 190: 255-266, 2000.
77. Kehrer JP. Free radicals as mediators of tissue injury and disease. *Crit Rev Toxicol* 23: 21-48, 1993.
78. Nakazawa H, Genka C, Fujishima M. Pathological aspects of active oxygens/free radicals. *Japan J Physiol* 46: 15-32, 1996.
79. Naito Y, Takagi T, Uchiyama K, Handa O, Tomatsuri N, Imamoto E, Kokura S, Ichikawa H, Yoshida N, Yoshikawa T. Suppression of intestinal ischemia-reperfusion injury by a specific peroxisome proliferator-activated receptor-gamma ligand, pioglitazone, in rats. *Redox Rep* 7(5):294–99, 2002.
80. Simpson R, Alon R, Kobzik L, Valeri CR, Shepro D, Hechtman HB. Neutrophil and Nonneutrophil Mediated Injury in Intestinal Ischemia-Reperfusion. *Ann Surg* 218(4): 444–54, 1993.
81. Kurose I, Granger DN. Evidence implicating xanthine oxidase and neutrophils in reperfusion-induced microvascular dysfunction. *Ann N Y Acad Sci* 723:158-79, 1994.
82. Anaya-Prado R, Toledo-Pereyra LH, Lentsch AB et al. Ischemia/Reperfusion Injury. *The Journal Of Surgical Research* 105(2): 248-58, 2002.

83. Granger DN. Role of xanthine oxidase and granulocytes in ischemia-reperfusion injury. *Am J Physiol* 255:H1269-75, 1988.
84. Diepenhorst GM, van Gulik TM, Hack CE. Complement-Mediated Ischemia-Reperfusion Injury: Lessons Learned From Animal and Clinical Studies. *Ann Surg* 249(6):889-99, 2009.
85. Carroll MV, Sim RB. Complement in health and disease. *Advanced Drug Delivery Reviews* 63:965–975, 2011.
86. Arumugam TV, Magnus T, Woodruff TM, Proctor LM, Shiels IA, Taylor SM. Complement mediators in ischemia–reperfusion injury. *Clin Chim Acta* 374(1-2):33-45, 2006.
87. Seal JB, Gewertz BL. Vascular Dysfunction in Ischemia-Reperfusion Injury. *Ann Vasc Surg* 19(4):572-84, 2005.
88. García-Villalón AL, Amezcua YM, Monge L, Fernández N, Climent B, Sánchez A, Diéguez G. Effect of ischemia duration and nitric oxide on coronary vasoconstriction after ischemia-reperfusion. *Eur J Pharmacol* 509(2-3):165-70, 2005.
89. Berti F, Rossoni G, Della Bella D, Villa LM, Buschi A, Trento F, Berti M, Tondo C. Nitric oxide and prostacyclin influence coronary vasomotor tone in perfused rabbit heart and modulate endothelin-1 activity. *J Cardiovasc Pharmacol* 22: 321–26, 1993.
90. Pernow J, Modin A. Endothelial regulation of coronary vascular tone in vitro: contribution of endothelin receptor subtypes and nitric oxide. *Eur J Pharmacol* 243:281–86, 1993.
91. Santen S, Wang Y, Menger MD, Jeppsson B, Thorlacius H. Mast cell dependent secretion of CXC chemokines regulates ischemia-reperfusion induced leukocyte recruitment in the colon. *Int J Colorectal Dis* 23: 527-34, 2008.
92. Giannoudis PV. Current concepts of the inflammatory response after major trauma: an update. *Injury* 34: 397-404, 2003.
93. Yamamoto S, Tanabe M, Wakabayashi G, Shimazu M, Matsumoto K, Kitajima M. The role of tumor necrosis factor-alpha and interleukin-1beta in ischemia-reperfusion injury of the rat small intestine. *J Surg Res* 99(1):134-41, 2001.

94. Güneş TU, Badak Mİ, Kurtoğlu T, Karul A, Özkısacık EA, Dişçigil B. Rat alt ekstremitte iske-mi-reperfüzyon modelinde iskemik önkoşullama ve ardkoşullamanın erken dönem etkileri. Adnan menderes üniversitesi tıp fakültesi dergisi 12(3):21-7, 2011.
95. Beiras-Fernandez A, Thein E, Chappell D, Schropp A, Hammer C. Polyclonal antithymocyte globulins reduce the expression of IL-4 in a non-human primate model of ischemia-reperfusion injury. *Transpl Immunol* 13(1):9-13, 2004.
96. Braun F, Hosseini M, Wieland E, Sattler B, Müller AR, Fändrich F, Kremer B, Ringe B. Kinetics and localization of interleukin-2, interleukin-6, heat shock protein 70, and interferon gamma during intestinal-rerfusion injury. *Transplant Proc* 36(2):267-9, 2004.
97. Penna C, Bassino E, Alloatti G. Platelet activating factor: the good and the bad in the ischemic/reperfused heart. *Exp Biol Med (Maywood)* 236(4):390-401, 2011.
98. Montrucchio G, Alloatti G, Camussi G. Role of Platelet-Activating Factor in Cardiovascular Pathophysiology. *Physiol Rev* 80(4):1669-99, 2000.
99. Grace PA: Ischemia- reperfusion injury *Br J Surg* 81:637-647, 1994.
100. Sasaki M, Joh T. Oxidative Stress and Ischemia-Reperfusion Injury in Gastrointestinal Tract and Antioxidant, Protective Agents. *J Clin Biochem Nutr* 40:1–12, 2007.
101. Riaz AA, Wan MX, Schafer 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):1572–80, 2002.
102. Halliwell B, Murcia MA, Chirico S, Auroma OI. Free Radicals and Antioxidants in Food abd In Vivo: What They Do And How They Work. *Critical Rew Food Sci And Nutrit* 35: 7-20, 1995.
103. Eşrefoğlu M. Cell Injury and Death: Oxidative Stress and Antioxidant Defense System: Review. *Turkiye Klinikleri J Med Sci* 29(6):1660-76, 2009.
104. Ustundag B, Kazez A, Demirbag M, Canatan H, Halifeoglu I, Ozercan IH: Protective effect of melatonin on antioxidative system in experimental ischemia-reperfusion of rat small intestine. *Cell Physiol Biochem* 10(4):229–36, 2000.

105. Ozacmak VH, Sayan H, Arslan SO, Altaner S, Aktas RG. Protective effect of melatonin on contractile activity and oxidative injury induced by ischemia and reperfusion of rat ileum. *Life Sci* 76(14):1575-88, 2005.
106. Floris G, Medda R, Padiglia A, Musci G. The physiopathological significance of ceruloplasmin. A possible therapeutic approach. *Biochem Pharmacol* 60(12):1735-41, 2000.
107. Şimşek F. Free Radicals, Antioxidants and Lipid Peroxidation. *T Klin J Pediatri* 8: 42-7, 1999.
108. Faulder CG, Pamela AH. Vitamin E in biological systems. *Antiox Ther Preven Med* 3: 234, 1990.
109. Silalahi J. Anticancer and health protective properties of citrus fruit components. *Asia Pac J Clin Nutr* 11(1):79-84, 2002.
110. Pham-Huy LA, He H, Pham-Huy C. Free Radicals, Antioxidants in Disease and Health. *Int J Biomed Sci* 4(2):89-96, 2008.
111. Regunathan S, Piletz JE. Regulation of inducible nitric oxide synthase and agmatine synthesis in macrophages and astrocytes. *Ann N Y Acad Sci* 1009:20-9, 2003.
112. Holt A, Baker GB. Metabolism of agmatine (clonidine-displacing substance) by diamine oxidase and the possible implications for studies of imidazoline receptors. *Prog Brain Res* 106:187-97, 1995.
113. Reis DJ, Regunathan S. Is agmatine a novel neurotransmitter in brain? *Trends Pharmacol Sci* 21(5):187-93, 2000.
114. Yang XC, Reis DJ. Agmatine selectively blocks the NMDA subclass of glutamate receptor channels in rat hippocampal neurons. *JPET* 288:544-9, 1999.
115. Weng XC, Gai XD, Zheng JQ, Li J. Agmatine blocked voltage-gated calcium channel in cultured rat hippocampal neurons. *Acta Pharmacol Sin* 24:746-50, 2003.
116. Li Q, Yin JX, He RR. Effect of agmatine on L-type calcium current in rat ventricular myocytes. *Acta Pharmacol Sin* 23:219-24, 2002.

117. Galea E, Regunathan S, Eliopoulos V, Feinstein DL, Reis DJ. Inhibition of mammalian nitric oxide synthases by agmatine, an endogenous polyamine formed by decarboxylation of arginine. *Biochem J* 316 (Pt 1):247-9, 1996.
118. Bhalla S, Rapolaviciute V, Gulati A. Determination of α 2 adrenoceptor and imidazoline receptor involvement in augmentation of morphine and oxycodone analgesia by agmatine and BMS182874. *Eur J Pharmacol* 651:109–121, 2011.
119. Yesilyurt Ö, Uzbay IT. Agmatine potentiates the analgesic effect of morphine by an α 2-adrenoceptor-mediated mechanism in mice. *Neuropsychopharmacology* 25:98–103, 2001.
120. Aricioglu F, Means A, Regunathan S. (2004). Effect of agmatine on the development of morphine dependence in rats: potential role of cAMP system. *Eur J Pharmacol* 504:191–7, 2004.
121. Molderings GJ, Haenisch B. Agmatine (decarboxylated L-arginine): physiological role and therapeutic potential. *Pharmacol Ther* 133(3):351-65, 2012.
122. Santos WC, Hernández-Guijo JM, Ruiz-Nuño A, Olivares R, Jurkiewicz A, Gandía L, García AG. Blockade by agmatine of catecholamine release from chromaffin cells is unrelated to imidazoline receptors. *Eur J Pharmacol* 417(1-2):99-109, 2001.
123. Raasch W, Schäfer U, Chun J, Dominiak P. Biological significance of agmatine, an endogenous ligand at imidazoline binding sites. *Br J Pharmacol* 133(6):755-80, 2001.
124. Hong S, Kim CY, Lee WS, Shim J, Yeom HY, Seong GJ. Ocular hypotensive effects of topically administered agmatine in a chronic ocular hypertensive rat model. *Exp Eye Res* 90:97–103, 2010.
125. Berdeu D, Puech R, Loubatières-Mariani MM, Bertrand G. Agmatine is not a good candidate as endogenous ligand for imidazoline sites of pancreatic B cells and vascular bed. *Eur J Pharmacol* 308: 301–4, 1996.
126. Su CH, Liu IM, Chung HH, Cheng JT. Activation of I2-imidazoline receptors by agmatine improved insulin sensitivity through two mechanisms in type-2 diabetic rats. *Neurosci Lett* 457:125–8, 2009.

127. Glavin GB, Carlisle MA, Smyth DD. Agmatine, an endogenous imidazoline receptor agonist, increases gastric secretion and worsens experimental gastric mucosal injury in rats. *J Pharmacol Exp Ther* 274:741–4, 1995.
128. Casini A, Ferrali M, Pampella A, Maellaro E, Combati M. Lipid peroxidation and cellular damage in extrahepatic tissues of bromobenzene in toxicated mice. *Am J Pathol* 123:520–31, 1989.
129. Aykac G, Uysal M, Yalan AS, Kocak Toker N, Sivas A, Oz H. The effects of chronic ethanol injection on hepatic lipid peroxide, glutathione, glutathione peroxidase and glutathione transferase in rats. *Toxicology* 36:71–6, 1985.
130. Bradley PP, Priebat DA, Christensen RD, Rothstein G. Measurement of cutaneous inflammation: estimation of neutrophil content with an enzyme marker. *J Invest Dermatol* 78:206–9, 1982.
131. Wang CC, Chio CC, Chang CH, Kuo JR, Chang CP. Beneficial effect of agmatine on brain apoptosis, astrogliosis, and edema after rat transient cerebral ischemia. *BMC Pharmacol* 10:11, 2010.
132. Sugiura T, Tsutsui H, Takaoka M, Kobuchi S, Hayashi K, Fujii T, Matsumura Y. Protective effect of agmatine on ischemia/reperfusion-induced renal injury in rats. *J Cardiovasc Pharmacol* 51(3):223-30, 2008.
133. Al Masri AA, El Eter E. Agmatine induces gastric protection against ischemic injury by reducing vascular permeability in rats. *World J Gastroenterol* 18(18):2188-96, 2012.
134. Dastan A, Kocer I, Erdogan F, Ates O, Kiziltunc A. Agmatine as retinal protection from ischemia-reperfusion injury in guinea pigs. *Jpn J Ophthalmol* 53(3):219-24, 2009.
135. Calcina F, Barocelli E, Bertoni S, Furukawa O, Kaunitz J, Impicciatore M, Sternini C. Effect of N-methyl-d-aspartate receptor blockade on neuronal plasticity and gastrointestinal transit delay induced by ischemia/reperfusion in rats. *Neuroscience* 134(1):39-49, 2005.
136. Ahn SK, Hong S, Park YM, Choi JY, Lee WT, Park KA, Lee JE. Protective effects of agmatine on lipopolysaccharide-injured microglia and inducible nitric oxide synthase activity. *Life Sci* 91(25-26):1345-50, 2012.

137. Bhutada P, Mundhada Y, Humane V, Rahigude A, Deshmukh P, Latad S, Jain K. Agmatine, an endogenous ligand of imidazoline receptor protects against memory impairment and biochemical alterations in streptozotocin-induced diabetic rats. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry* 37(1):96-105, 2012.
138. Hong S, Kim CY, Lee JE, Seong GJ. Agmatine protects cultured retinal ganglion cells from tumor necrosis factor-alpha-induced apoptosis. *Life Sci* 84(1-2):28-32, 2009.
139. Huang Y, Rabb H, Womer KL. Ischemia-reperfusion and immediate T cell responses. *Cell Immunol* 248(1):4-11, 2007.
140. Frangogiannis NG. Chemokines in ischemia and reperfusion. *Thromb Haemost* 97:738-47, 2007.
141. Kong T, Choi JK, Park H, Choi BH, Snyder BJ, Bukhari S, Kim NK, Huang X, Park SR, Park HC, Ha Y. Reduction in programmed cell death and improvement in functional outcome of transient focal cerebral ischemia after administration of granulocyte-macrophage colony-stimulating factor in rats. Laboratory investigation. *J Neurosurg* 111(1):155-63, 2009.

Ek 1: Etik Kurul Onayı



T.C.
Zonguldak Karaelmas Üniversitesi
Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu

TOPLANTI TARİHİ : 09/03/2011
TOPLANTI NO : 2011/01

- 1- Tıp Fakültesi Fizyoloji Anabilim Dalı Başkanlığı'nın, 2011-01-09/03 Protokol nolu "Sıçan İnce Barsak İskemi Reperfüzyon Modelinde Agmatinin Etkileri" konulu çalışmasının ZKÜ Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurul ilkelerine uygun olduğuna,

Oy birliği ile karar verildi.

ASLI GİBİDİR

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