

**T.C.  
CELAL BAYAR ÜNİVERSİTESİ  
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ  
HİSTOLOJİ EMBRİYOLOJİ ANABİLİM DALI  
YÜKSEK LİSANS TEZİ**

**GLOBAL BEYİN İSKEMİSİ İLE OLUŞAN METABOLİK BOZUKLUĞUN  
AKCİĞERDE YAPTIĞI HİSTOPATOLOJİK DEĞİŞİKLİKLERİN  
OKSİDATİF STRES VE APOPTOSİS İLE İLİŞKİSİ**

**HAYRUNNİSA YEŞİL**

**DANIŞMAN**

**Doç. Dr. M. İBRAHİM TUĞLU**

**Manisa 2008**

## TEŞEKKÜRLER

İlk iki yarıyıllı özel öğrenci olarak programını takip ettiğim Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı Yüksek Lisans eğitiminde bana kazandırdıkları formasyon ve ufuk için başta Prof. Dr. M. Kemal ÖZBİLGİN, Doç. Dr. Sevinç İNAN ve Doç. Dr. H. Seda VATANSEVER hocalarıma,

Tez konumun belirlenmesinde ve çalışmanın bu hale gelmesinde göstermiş olduğu özveri ve katkılar ötesinde gerek bölüm içi ve gerekse bölüm dışında karşılaştığım problemlerin çözümünde desteğini esirgemeyen danışman hocam Doç. Dr. İbrahim M. TUĞLU' ya,

Ve beni kendilerinden biri kabul edip; laboratuvarlarını her ihtiyaç duyduğumda açıp çalışma yapmama izin veren Manisa Devlet Hastanesi Patoloji Bölümü uzan doktorlarından; Dr. Safiye Vural, Dr. Ayla Yüçetürk, Dr. Olcay Ak Nalbant ile laboratuvar tekniklerinde deneyim kazanmama sebep olan laboratuvar sorumlusu Alparslan Çetin'e ve Ahmet Bağış'a,

Ayrıca her koşulda desteğini esirgemeyen değerli arkadaşım Hüsniye Fural'a,

Bu programın ve tezimin gerçekleşmesinde başından itibaren maddi ve manevi desteğini esirgemeyen aileme,

Katkılarından dolayı burada teşekkürlerimi sunmayı borç bilirim.

**Hayrunnisa YEŞİL**

## ÖNSÖZ

Beyin iskemisi, beyinde oluşturduğu değişikliklerin yanı sıra metabolik bozukluklara bağlı olarak beyin dışında meydana gelen patolojilerin de etkilediği ve böylece daha karışık hale gelen önemli bir klinik durumdur. Beyin iskemisini sadece beyinde oluşan bozukluklar ile değerlendirmek veya beyin dışında gelişen bozukluklara bağlı mekanizmaları dikkate almamak; tedavi ve oluşabilecek hasar açısından önemli bir hatadır. İki taraflı karotid arter oklüzyonu yöntemi ile gerçekleştirilen deneysel beyin iskemisinde meydana gelen solunumsal asidoza bağlı olarak değişen metabolik durum, reperfüzyon sonrası hasarın kritik belirleyicisi olmakta ve yapılan birçok çalışmada alınan sonuçların yorumlanmasına etki etmektedir. Klinik yansımaları da hastanın prognozu belirlemede büyük önem taşımaktadır. Tespitlerimize göre; önceki çalışmalarda bu konu ihmal edilmiş ve aydınlatılması gereken birçok soru bulunmaktadır. Bu neden ile çalışmamızda global iskemi sonrası gelişen metabolik duruma en önemli katkıyı veren akciğer dokusunda gelişen histopatolojik değişikliklerin incelenmesi amaçlandı.

**Doç. Dr. M. İbrahim TUĞLU**

**Arş. Gör. Hayrunnisa YEŞİL**

## ÖZET

Beyin iskemisi ve takip eden reperfüzyon sonrasında önemli doku hasarı gerçekleşir. Bu hasara bağlı sistemik etki sonucunda oluşan metabolik değişiklikler; birçok farklı organda yeni mekanizmalar ile ortaya çıkmaktadır. Bu organların önemli bir tanesi akciğer olup, hücrelerden salınan serbest oksijen radikalleri reperfüzyon sonrasında meydana gelen hasarda önemli rol oynarlar. Çalışmamızın amacı: İki taraflı karotid arter oklüzyonu yöntemi ile oluşturulan deneysel beyin iskemisinde, ortaya çıkan solunumsal asidoza bağlı olarak değişen metabolik durumun, reperfüzyon sonrası hasarın kritik belirleyicisi olmasına katkısının araştırılması ve oksidatif stres ile apoptoz birlikteliğinin incelenmesidir.

Çalışmamızda erişkin erkek Wistar sıçanlar ( $250 \pm 50$  gr) her grupta 5 hayvan ve 4 grup olacak şekilde kullanıldı. 10 dakikalık ön tanımlama (ÖT) iskemisini takiben 48 saat sonra 20 dakika süreyle global iske mi (Gİ) uygulandı. İskemik reperfüzyon (İR) etkisi için Gİ sonrası 48 saatlik süre beklendi. İske mi uygulaması öncesi ketamin + ksilazin anestezisi altında, femoral arter yolu ile hem hipovolemi oluşturmak hem de kan gazı analizi yapmak üzere 10 ml kan alındı. Kontrol amaçlı taklit grubunda (SH) ligasyon sonrasında iske mi yapılmadı. Sıçanların tamamı 96 saatlik toplam süre sonrasında incelenmek üzere öldürüldü. Tüm gruplar için deneklerin optik kiezma sınırından kesitleri alınarak beyinleri hippocampus düzeyinde histokimyasal (H-E), immünohistokimyasal (GFAP, S100 $\beta$ , iNOS, eNOS, TUNEL) ve morfometrik analizler ile değerlendirilen hayvanların akciğerleri hilus düzeyinde alınan kesitlerde benzer yöntemler (H-E, MT, iNOS, eNOS, TUNEL) ile incelendi.

Beyinde iske mi sonrasında gruplar arasında görülen anlamlı histopatolojik değişikliklerin gliosize (GFAP, S100 $\beta$ ) ile gelişen oksidatif strese (iNOS, eNOS) ve ilişkili apoptoze (TUNEL) neden olduğu saptandı. Akciğer histopatolojik hasarı, histolojik parametreler ile morfometrik olarak belirlendi. SH ile ÖT grupları arasında minimal değişiklikler bulundu. Ancak bu gruplar, global iske mi ve iske mi reperfüzyon gruplarından hasar açısından anlamlı olarak farklı idi. Buna karşılık Gİ ve İR sonrası anlamlı bir akciğerde uzak organ etkisi şeklinde gelişen hasarın varlığı görüldü. Hasarın H-E incelemesinde değişen derecelerde interstisyel ödem, vasküler konjesyon, intraalveoler kanama, kan damarları etrafında ödem, nötrofil infiltrasyonu ve alveol yapısında bozulma şeklinde saptandı. Ayrıca Masson Trikrom boyamasında bağ dokuda inflamatuvar hücreler

rastlandı. Akciğerde oluşan hasarın beyinde gerçekleşen hasara benzer şekilde oksidatif strese bağlı oluşan serbest radikaller (iNOS, eNOS) ile ilişkili olduğu ve TUNEL yöntemi ile belirlenen apoptozun indüklenmesine ve hücre ölümünün aktifleşmesine neden olduğu bulundu.

Sonuçlarımız beyinde gelişen iskemi ve reperfüzyon hasarında akciğerde uzak organ etkisi şeklinde oluşan histopatolojik değişikliklerin hücrel infiltrasyona bağlı serbest oksijen radikallerinden kaynaklandığını ve bir mekanizma olarak apoptozu indükleyerek hücre ölümüne neden olduğunu göstermektedir.

**Anahtar kelimeler:** Beyin, İskemi, Reperfüzyon, Akciğer, NOS, Apoptoz

## SUMMARY

The important tissue damage occurs after brain ischemia and following reperfusion. The metabolic alterations due to systemic effect from this damage can be exposed at the different organ with new mechanisms. The one of the main important organ is lung and free oxygen radicals from the cells of this organ play important role in this damage. The aim of this study was the investigation of the effects of respiratory acidosis as a critical determinant from metabolic alterations due to bilateral carotid artery occlusion which is a model for the brain ischemia on the damage after reperfusion and examination of their relation with oxidative stress coupling with apoptosis.

4 groups and 5 Male Wistar rat ( $250 \pm 50$  gr) in each group were used in this study. After 48 hours, following 10 minutes ischemia for preconditioning group (PC), 20 minutes ischemia was used for the global ischemia (GI). Rats were waited for 48 hours after GI for the ischemic reperfusion (IR) effect. 10 ml blood for the gas analyses and hypovolemia were taken from femoral artery under the ketamine+xylazine anesthesia. Rats in all groups were sacrificed at the end of 96 hours which was total time for whole experiment. Their brain sections at the optic chiasma level were investigated for histochemical (H&E), immunohistochemical (GFAP, S100 $\beta$ , iNOS, eNOS, TUNEL) and morphometric analyses. The lung of the ischemic brain was processed for the similar analyses (H-E, MT, iNOS, eNOS, TUNEL).

There were significant changes with ischemic brain which showed gliosis (GFAP, S100 $\beta$ ) with oxidative stress and free radicals (iNOS, eNOS) related to apoptosis (TUNEL). The histopathologic damage of the lung was evaluated by morphometry with histological parameters. There were minimal alterations between sham and preconditioning groups. However, these groups were significantly different from global ischemia and ischemic reperfusion groups for the damage. Interstitial edema, vascular congestion, intraalveolar hemorrhage, neutrophil infiltration and alveolar destruction were found with H-E examination. There were also inflammatory cells in connective tissue by Masson Trichrome staining. The damage in the lung as a distant organ was similar to ischemic reperfusion damage of the brain which related to the free radicals from oxidative stress (iNOS, eNOS). Increase of the free radical caused the induction of the apoptosis (TUNEL) and the activation of the cell death.

Our results showed that the histopathological alterations of the lung after the damage of the ischemic reperfusion in the brain were originated from the infiltration of the

cells producing free oxygen radicals and inducing apoptosis as a mechanism which cause cell death

**Key word:** Brain, Ischemia, Reperfusion, Lung, NOS, Apoptosis

## SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ

<b>NO</b>	: Nitrik oksit
<b>NOS</b>	: Nitrik oksit sentetaz
<b>nNOS (NOS- 1)</b>	: Nöronal Nitrik Oksit
<b>iNOS (NOS- 2)</b>	: İndüklenebilir Nitrik Oksit
<b>eNOS (NOS- 3)</b>	: Endotelial Nitrik Oksit
<b>cNOS</b>	: Yapısal Nitrik Oksit
<b>ATP</b>	: Adenozin Trifosfat
<b>DNA</b>	: Deoksiribonukleik asit
<b>H<sub>2</sub>O<sub>2</sub></b>	: Hidrojen peroksit
<b>OH</b>	: Hidroksil
<b>TNF</b>	: Tümör nekroz faktörü
<b>TNF-<math>\alpha</math></b>	: Tümör nekroz alfa
<b>TUNEL</b>	: Terminal deoksinukleotidil transferaz [Tdt]-mediated dUTP-biotin nick-end-labeling
<b>FITC</b>	: Floresan izotiyosiyanat
<b>İR</b>	: İskemik reperfüzyon
<b>O<sub>2</sub></b>	: Oksijen
<b>CO<sub>2</sub></b>	: Karbondioksit
<b>O<sub>2</sub><sup>-</sup></b>	: Süperoksit anyon
<b>PAF</b>	: Plaketalet aktive edici faktör
<b>LTB<sub>4</sub></b>	: Lökotrien B <sub>4</sub>
<b>ATP</b>	: Adenin trifosfat
<b>KD</b>	: Ksantin dehidrojenaz
<b>KO</b>	: Ksantin oksidaz
<b>NADPH</b>	: Nikotinamid adenin dinükleotid fosfat
<b>ELAM</b>	: Endotel lökosit adezyon molekülü
<b>cAMP</b>	: Siklik adenozin mono fosfat
<b>ET-1</b>	: Endotelin-1
<b>EDRF</b>	: Endotel kökenli gevşeme faktörü
<b>P<sub>53</sub></b>	: Tümör baskılayıcı gen
<b>SOR</b>	: Serbest oksijen radikalleri



<b>ONOO<sup>-</sup></b>	: Peroksinitrit
<b>BH<sub>4</sub></b>	: Tetrahidobiopterin
<b>L-LMMA</b>	: Monomethyl-L-Arjinin
<b>L-ADMA</b>	: Asymmetric dimethyl-L-Arjinin
<b>L-NNA</b>	: Nitro
<b>L-NAME</b>	: Nitro-L-Arjinin methyl ester
<b>IL-4</b>	: İnterlökin-4
<b>IL-8</b>	: İnterlökin-8
<b>EGF</b>	: Epidermal büyüme faktörü
<b>PDGF</b>	: Trombosit kökenli büyüme faktörü
<b>HbNO</b>	: Nitrozohemoglobin
<b>metHb</b>	: Methemoglobin
<b>Bcl-2</b>	: B-cell leukemia/Lymphoma-2 protein ailesi
<b>TTC</b>	: Triphenyltetrazolium chloride
<b>PBS</b>	: Fosfat tampon solüsyon
<b>DAB</b>	: Diaminobenzidin tetrahidroklorit
<b>Gİ</b>	: Global iskemi
<b>SH</b>	: Sham
<b>ÖT</b>	: Ön tanıtım
<b>BKAO</b>	: Bilateral karotid arter oklüzyonu
<b>ARDS</b>	: Adult Respiratuar Distres Sendromu
<b>SOD</b>	: Süperoksid dismutaz
<b>MPO</b>	: Myeloperoksidaz
<b>SD</b>	: Standart deviasyon
<b>ER</b>	: Endoplazmik retikulum

## İÇİNDEKİLER

	Sayfa
TEŞEKKÜRLER	I
ÖNSÖZ	II
ÖZET	III
İNGİLİZCE ÖZET	IV
SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ	V
1. GİRİŞ	1
1.1. Akciğer Anatomisi	3
1.2. Akciğer Histolojisi	3
1.3. İskemi Reperfüzyon	7
1.4. İskemi Reperfüzyon Sonrası Uzak Organ Hasarı ve Akciğer	10
1.5. Nitrik Oksit	12
1.6. Apoptoz	16
1.7. Amaç	21
2. GEREÇ VE YÖNTEM	37
3. BULGULAR	45
4. TARTIŞMA	57
5. YORUM	66
6. KAYNAKLAR	67

## RESİMLER DİZİNİ

	Sayfa	
<b>Resim 1.1</b>	Karotid arter oklüzyonuna bağlı beyin iskemisi	25
<b>Resim 1.2</b>	İskemi reperfüzyon hasarı	25
<b>Resim 1.3</b>	Akciğerin anatomisi ve histolojisi	26
<b>Resim 1.4</b>	Akciğerin histolojisi	27
<b>Resim 1.5</b>	Akciğerin kan hava bariyeri	29
<b>Resim 1.6</b>	Akciğerin histopatolojik mekanizmaları	30
<b>Resim 1.7</b>	İR sonrası gelişen akciğer hasarı oluşumunda yer alan faktörler	31
<b>Resim 1.8</b>	İR sonrası gelişen mikrodolaşım bozukluğu	32
<b>Resim 1.9.</b>	İR hasarında endotel hücreleri için ksantin yolağı ve nötrofil aktivasyonunun ürettiği moleküller ve etkileri	33
<b>Resim 1.10</b>	İskemi sonrası fagositer hücre aktivasyonu ile reperfüzyon ile ilişkili hücre ölümü	34
<b>Resim 1.11</b>	Akciğerin histopatolojisi	35
<b>Resim 2.1</b>	Beyin İR sonrası akciğer dokusu üzerine göç eden makrofaj ve nötrofil gösterimi ile hasarın HE boyamasına göre en az, orta ve en çok boyamaları için örnekleme .	40
<b>Resim 2.2</b>	Beyin İR sonrası akciğer dokusunda yapılan immunohisto-kimyasal morfometride kullanılan en az, orta ve en çok boyamaları için örnekleme.	40
<b>Resim 3.1</b>	İR sonrası alınan beyin örneklerinde TTC boyaması ile iskemik alanların görüntüsü.	48
<b>Resim 3.2</b>	İskemik hasar bölgesinde H-E histokimyası ve GFAP, S100 $\beta$ , iNOS, eNOS ve TUNEL immunohistokimya boyamaları	49
<b>Resim 3.3</b>	SH, ÖT, Gİ ve İR sonrası alınan akciğer örneklerinde yapılan HE boyaması	50
<b>Resim 3.4.</b>	SH, ÖT, Gİ ve İR sonrası alınan akciğer örneklerinde yapılan HE boyaması	51
<b>Resim 3.5</b>	SH, ÖT, Gİ ve İR sonrası alınan akciğer örneklerinde yapılan MT boyaması	52

<b>Resim 3.6</b>	SH, ÖT, Gİ ve İR sonrası alınan akciğer örneklerinde yapılan iNOS immünoaktivitesi	<b>53</b>
<b>Resim 3.7</b>	SH, ÖT, Gİ ve İR sonrası alınan akciğer örneklerinde yapılan eNOS immünoaktivitesi	<b>54</b>
<b>Resim 3.8</b>	SH, ÖT, Gİ ve İR sonrası alınan akciğer örneklerinde yapılan TUNEL boyaması	<b>55</b>

### **TABLolar DİZİNİ**

		Sayfa
<b>Tablo 1.1</b>	NOS tipleri	<b>36</b>
<b>Tablo 1.2</b>	Apopitoz ile nekroz farkları ve genler ile ilişkisi	<b>36</b>
<b>Tablo 2.1</b>	Parafin doku takibi	<b>41</b>
<b>Tablo 2.2</b>	Hematoksilen - eozin boyaması	<b>42</b>
<b>Tablo 2.3</b>	İndirek immunohistokiyaya boyaması	<b>43</b>
<b>Tablo 2.4</b>	TUNEL boyaması	<b>44</b>
<b>Tablo 3.1</b>	SH, ÖT, Gİ ve İR sonrası kan gazı analiz sonuçları	<b>48</b>

### **GRAFİKLER DİZİNİ**

		Sayfa
<b>Grafik 3.2</b>	SH, ÖT, Gİ ve İR sonrası alınan beyin örneklerinde yapılan histomorfometrik analiz.	<b>49</b>
<b>Grafik 3.3</b>	Beyin iskemisi yapılan deneklerde histokimyasal ve immünohistokimyasal boyamaların morfometrik analizi	<b>56</b>

## 1. GİRİŞ

Beyinde oluşan iskemik hasarın tedavisi zor ve maliyeti oldukça yüksektir. Bu durum dünyada önemli ölüm nedenlerinden biridir. Bu nedenle bu tür hastalıklardan korunmak ve tedavisini geliştirmek hekimler açısından çok kıymetlidir. İskemi reperfüzyon (İR) sonrası gelişen metabolik şartların hem beyin hem de uzak organlarda yaptığı hasar tam olarak bilinmemektedir. Moleküler düzeyde çalışmalar ekstremitelerde gibi diğer organ İR hasarında hem metabolizmanın değiştiğini hem de özellikle akciğerler olmak üzere uzak organ hasarının oluştuğunu göstermektedir. Bu iskemiler; emboli, akut aterosklerotik tromboz, travmatik veya iyatrojenik arteriyel hasar ve rekonstrüktif arteriyel cerrahi sırasındaki arteriyel klempaj nedeniyle sıkça ortaya çıkabilen klinik bir durumdur. İskemik ekstremitenin reperfüzyonu, multipli organ disfonksiyonuna kadar gidebilen sistemik komplikasyonlara neden olabilmektedir (Awerbuck D ve ark, 1994). Beyin İR için farklı fizyopatolojik mekanizmalar rol oynadığından, çeşitli tedavi alternatifleri geliştirilmeye çalışılmaktadır. Bu nedenle bu çalışmada global beyin iskemisi sonrası gelişen metabolik duruma en önemli katkıyı veren akciğer dokusunda gelişen histopatolojik değişikliklerin incelenmesi amaçlandı.

Deney hayvanlarında internal karotid arterin iki taraflı oklüzyonu ile örneği (Resim 1.1) oluşturulan iskemik serebrovasküler hastalıklar ölümle sonuçlanabilen önemli nörolojik sorunlardır. Nöronal yapılar bu tür iskemiye değişik tepkiler vermektedir. İskemi şiddeti ile orantılı olarak bu tepkiler birçok faktörler aracılığı ile yönlendirilmektedir. Özellikle beynin kısa süreli ve orta şiddette bir iskemi ile tanışmasından sonra gelen uzun süreli iskemiye nöronların direnç kazandıkları ve tolerans mekanizmaları geliştirdikleri düşünülmektedir. Kan akımının azalması ile başlayan ve iskemi sonrası ortaya çıkan birçok faktör bu mekanizmada yer almakta ve bunlar sadece beyinde değil birçok organda oluşmaktadır. Hipoksi, hipertermik stres ve toksik ajanlar ile karşılaşma da sublethal düzeyde bu tür faktörleri tetikleyebilmekte ve iskemik hasarı arttırmaktadır. Deney hayvanlarında saptanan bu etkilerin geçici iskemik atak geçiren hastalarda da görülmesi bu mekanizmanın önemini vurgulamaktadır. (Kitagawa K ve ark, 1991, Sugawara T ve ark, 2004, Giffard RG ve ark, 2004, Saito A ve ark, 2005, Harukuni I ve Bhardwaj A, 2006).

Miyokard infarktüsü, felç, periferik vasküler hastalık, ekstremitelerde iskemisi, organ transplantasyonu ve hipovolemik şok gibi pek çok önemli klinik tablonun temelinde, dokuya gelen kan akımının kesildiği bir durum olarak tanımlanan iskemi yer

almaktadır. Bu durumda hücre fonksiyonu için temel bir yakıt olan oksijenin olmaması; anaerobik metabolizmaya, asidoza ve sonuçta normal enzim kinetiklerinin değişmesine yol açmaktadır (Rhodes RS ve DePalma RG, 1980). Ancak, iskemik dokuya kan akımının yeniden sağlanması dokunun beslenmesi ve oksijenasyonu için yararlı olmakla birlikte asidotik kanın dolaşıma dönmesi bir seri sistemik problemlere de neden olmaktadır. Reperfüzyon hasarı olarak tanımlanan bu durum doku için ek tehdit oluşturan olaylar zincirini tetiklemekte, lokal ve uzak organ hasarına yol açmaktadır (Grace PA, 1994). Sonuçta İR hasarı olarak tanımlanan bu fenomenin ortaya çıkışında rol alan araşidonik asit ürünleri, nötrofillerin endotele adezyonunu indüklemekte ve nötrofilleri daha fazla oksijen radikali ve proteolitik enzim üretimi için aktive edebilmektedirler (Welbourn ve ark, 1991). Ayrıca, proinflamatuvar bir sitokin olan TNF- $\alpha$  (Tümör nekroz faktör-alfa) nötrofil aktivasyonu ve adezyonuna katkıda bulunmakta, adezyon reseptörlerinde upregulation oluşturarak doku sekestrasyonuna, nötrofil degranülasyonuna ve toksik oksijen ürünlerinin ortaya çıkmasına neden olmaktadır (Windsor AC ve ark, 1993). İR'un uzak organlara etkisi sonucunda ortaya çıkan nonkardiyojenik pulmoner ödemin, akciğerlerde proteinlere karşı anormal permeabilite artışına sekonder olduğu ileri sürülmekte (Anner H ve ark, 1987, Schmeling ve ark, 1989) ve bu hasarın nötrofiller aracılığı ile oluştuğu (Klausner JM ve ark, 1988, Klausner JM ve ark, 1989) ve TNF- $\alpha$  bu hasarın oluşmasında önemli bir modülatör olduğu (Okusawa S ve ark, 1988, Sorkine P ve ark, 1995) bildirilmektedir (Resim 1.2). Ayrıca, monositlerden TNF- $\alpha$  üretimini, nötrofil aktivasyonunu ve endotel hücrelerine nötrofil adezyonunu inhibe ederek lökosit aktivasyonunu da baskılamaktadır (Kainoh M ve ark, 1990, Mana Riva C ve ark, 1990, Eisenhut T ve ark, 1993).

İR sonrası gelişen bu mekanizmalar sonuç olarak oksidatif stres yaratmakta ve ortamda gelişen serbest radikaller toksik etki sonucu hücre ölümüne neden olmaktadır. Bu akciğerde sekonder olarak oluşabilecek ve hasarı arttırıcı bir etkiye neden olabilir (Noel AA ve ark, 1996).

## 1.1. Akciğer Anatomisi

Topografik- anatomik tanımlama ile solunum yolları üst solunum yolları; burun kanalı, nasal kavite, paranasal sinüsler, oral kavite, orofarinks, epiglottis ve kord vokallerden oluşurken, alt solunum yolları; trakea, bronşlar, terminal ve respiratuar bronşöller, alveol kanal ve alveol keselerinden oluşur. Alt solunum yollarından trakea, bronş ve terminal bronşöller solunum borusunun iletici bölümünü respiratuar bronşöle, alveol kanal ve keseleri solunum bölümünü oluşturur. Akciğerler trakeadan itibaren bronş, bronşöle ve kan damarları ile beraber dikotomik çatallanarak veya ikiye bölünerek alveollere kadar 23–24 çatallanma ve alveollerde yaklaşık 300 milyon alveol yaparlar. Amaç solunum alanını arttırmaktır (Resim 1.3).

Akciğerlere total olarak bakıldığında sağ akciğer daha büyük, sol akciğer daha küçüktür. Trakea submukozaında hiyalin tip kıkırdak bulunur. Bunun görevi lümeni açık tutmak ve trakeaya destek sağlamaktır. Kıkırdak trakea'nın yemek borusu yüzeyinde ve bronşöllerde yoktur. Bronşlar hilusta 7–8, periferde 10–14 çatallanma ile terminal bronşöle varırlar. İletici bölümü oluşturan terminal bronşöller; 2–3 çatallanma sonra respiratuar bronşöle yaparlar. Asinüs, terminal bronşöle distalinde kalan akciğer ünitesine denir. Akciğerlerin en küçük fonksiyonel ünitesi olarak kabul edilir. Akciğerlerde 20–30 bin asinüs vardır. Respiratuar bronşöller, distallerinde alveol kanal ve keseler bulunan yapılardır. Akciğerin solunum bölümünü oluştururlar. Yapılarında kıkırdak ve bez yoktur. Kas hücresi ve bağ dokusu liflerinden yana zengindir. Her bir respiratuar bronşöleden 3–8 alveol kanalı çıkabilir. Her bir asinüste ise 800 kadar alveol kanalı ve akciğerlerde de 300 milyon alveol tahmin edilir. Yeni doğanda bu sayı 20–25 milyondur. Erişkin hale 8–10 yaşlarında erişilir. Primer lobül, respiratuar bronşöle distalinde kalan bölümdür. Her bir asinüste 6–8 adet primer bronşöle bulunur (Grey's anatomi, 1995)

## 1.2. Akciğer Histolojisi

Akciğerlerde solunum yolları hava iletimi ve temizlenmesini, alveoller ise gaz değişimini sağlayacak yapılardan oluşur. İletici bölüm elemanları enine kesitlerde içten dışa doğru üç tabakadan oluşurlar. Bu sıralama mukoza, submukoza, kıkırdak ve adventisya şeklindedir. Mukoza'nın yapısı, üst solunum yollarından burun, ağız boşluğu, dil, farinks yüzeyi ve epiglottisin bir bölümünde çok katlı nonkeratinize epitel

ile örtülüyken nasal kavite, paranasal sinüsler, nasofarinks, epiglottisin bir bölümü trakea ve bronşiolle kadar devam eden bronş mukozası tek katlı- çok sıralı epitel ile örtülüdür. Bronşiol yüzeyleri ise tek katlı- tek sıralı kübik epitel ile döşeliyken alveoller ise tek katlı yassı epitel ile döşelidir (Junqueira L ve Carneiro J, 2006).

Bronş ağacı olarak bilinen trakeada hilumdan akciğerlere giren iki adet birincil bronşa ayrılır. Her iki hilumdan arterler akciğere girerken, venler ve lenf damarları organı terk eder. Akciğere giren ve çıkan bu yapılar sıkı bağ dokusuyla sarılıdır ve pulmoner kök denen birimi oluştururlar. Birincil bronşlar, akciğere girdikten sonra aşağı ve dışa doğru inerek sağ akciğerde üç, sol akciğerde iki lobe bronşa ayrılırlar. Bu lobe bronşlar defalarca dallanarak daha küçük bronşları oluştururlar. Bunların sonlandırıcı dallarına bronşiyol denir. Her bronşiyol bir akciğer lopçuğuna girer ve burada da dallanarak beş ila yedi adet sonlandırıcı bronşiyol oluşturur. Akciğer lopçukları, tepesi hiluma dönük bir piramit şeklindedir. Birincil bronş genellikle trakeayla aynı histolojik görüntüyü gösterir. Bronşlardan bronşiolle ani bir yapısal geçiş gözlenmez. Her birincil bronş ikiye ayrılarak 9-12 defa iki uç çatallanır ve böylece her dal çapı yaklaşık 5mm oluncaya kadar incilir. Bronş mukozası kıkırdak ve kasların düzenlenişi dışında, yapısal olarak trakea mukozasına benzer ancak kıkırdaklar trakeaya oranla daha düzensizdir. Büyük bronşlarda kıkırdak halkaları lümeni tam sarar. Bronş çapı azaldıkça kıkırdak halkalarının yerini hiyalin kıkırdak plakları alır. Epitelin altında, bronşun lamina propriasında birbirini çaprazlayan spiral düz kas demetleri yer alır. Solunum bölgesine yaklaştıkça iletici bölümün duvarındaki düz kas demetleri daha da belirginleşir (Junqueira L ve Carneiro J, 2006). Lamina propria elastik liflerden ve lenfositlerden zengindir ve boşaltım kanalları bronş lümenine açılan çok sayıda seröz ve müköz bezler içerir (Resim 1.4A, a-f).

Bronşiyoller çapı 5mm ya da daha az olan lopçuk içindeki hava yollarıdır. Başlangıçta bronşiyol epiteli tek katlı prizmatik ve kinosilyalıdır. Büyük bronşiyollerde epitel yalancı çok katlı prizmatik kinosilyalı epitelle çevrilidir. Bu epitel hücreleri arasında müköz hücreler vardır. Daha dar çaplı bronşiyollere gidildikçe epitelin boyu alçalır, aynı zamanda klara hücrelerini de içerir (Resim 1.4A, g-i). Klara hücrelerinin titre tüyleri yoktur, tepe sitoplazmasında salgı granülleri bulunur ve bronşiyol yüzeyini oksitleyici artıklardan ve inflamasyondan koruyan proteinleri salgıladıkları bilinmektedir. Mukozalarında kıkırdak ya da bez içermezler. Alveollerin açıldığı bölümde bronşiyol epiteli yassı alveol epiteli hücreleri olan tip 1 alveol hücreleri ile



devam eder. Bronşiyoller boyunca distale doğru alveol sayısı büyük ölçüde artar ve alveoller arası mesafe önemli ölçüde azalır. Alveoller arasında bronşiyol epiteli titrektüylü kübik epitelidir. Ancak daha distalde titrektüylü tüyler bulunmayabilir. Solunum bronşiyolü epitelinin altında düz kas ve elastik bağ dokusu vardır. Bronşiyolün lamina propriası büyük ölçüde düz kas ve elastik liflerden oluşur. Bronşların ve bronşiyollerin kasları vagus sinirlerinin ve sempatik sinir sisteminin kontrolü altındadır (Junqueira L ve Carneiro J, 2006). Vagus uyarılması bu yapıların çapını daraltırken, sempatik uyarı ters yönde etki oluşturur (Resim 1.4B, a-e).

Solunum bronşiyolleri boyunca alveol sayısı giderek artar ve duvarda alveolden başka bir yapı bulunmaz hale geldiğinde tüp artık alveol kanalı adını alır. Hem alveol kanalları hem de alveoller çok ince yassı alveol hücreleriyle döşelidir. Lamina propria da alveollerin kenarları boyunca düz kas hücrelerinden oluşur. Alveol kanalları alveol keseleri ile bağlantılı olan atriyumlara açılır. Her atriyumdan iki ya da daha fazla alveol kesesi çıkar. Elastik lifler soluk alma sırasında alveollerin genişleyebilmesini ve soluk verme sırasında büzülmesini sağlar. Retiküler liflerin sağladığı destekle ince kan kapillerleri ile alveol bölmelerinin aşırı gerilmesi önlenir. Alveoller solunum bronşiyolleri, alveol kanalları ve alveol keselerinde bulunan kese şeklinde çıkıntılardır. Akciğerlerin süngerimsi yapısını oluştururlar. Alveollerde hava ile kan arasında  $O_2$  ve  $CO_2$  değişimi gerçekleşir (Junqueira L ve Carneiro J, 2006). Genelde her duvar, iki komşu alveol arasında yer alır ve bu nedenle alveoller arası bölmede arasında kılcal kan damarları, fibroblastlar, elastik ve retiküler lifler ile makrofajlar bulunan iki ince bağ dokusu matriksi interstisyumu oluşturur (Resim 1.4B, f-i).

Alveollerdeki hava ile kılcal kan damarlarındaki kan üç bileşenden oluşan bir kan-hava engeli ile birbirinden ayrılır (Resim 1.5). Bu bileşenler; alveol yüzey epiteli ve alveol hücrelerinin sitoplazması; birbirine çok yakın konumdaki alveol ve endotel hücrelerinin kaynaşmış bazal laminası ve endotel hücrelerinin sitoplazmasıdır. Alveol içindeki havadan gelen oksijen, bu tabakaları geçerek kılcal kan damarları içindeki kana ulaşır.  $CO_2$  yayılımı ise ters yönde gerçekleşir.  $CO_2$ 'in  $H_2CO_3$ 'den ayrılması eritrositlerde bulunan karbonik anhidraz enzimi ile katalizlenir (Junqueira L ve Carneiro J, 2006).

Yassı alveol hücreleri olarak da isimlendirilen tip1 hücreler, alveol yüzeyini döşeyen ileri derecede incelmış hücrelerdir. Bütün tip 1 epitel hücrelerinde desmozomların yanı sıra, doku sıvısının alveol hava boşluğuna sızmasını önleyen zona

okludensler bulunur. Bu hücrelerin başlıca görevi gazların geçişine uygun kalınlığı en az olan engeli oluşturmaktır. Tip 2 hücreler, tip 1 alveol hücrelerin arasına serpilmış olarak bulunurlar ve tip 1 epitel hücreleriyle aralarında desmozomlar ve zona okludensler vardır. Tip 2 alveol hücreleri yuvarlak yapıdadır. Genellikle alveollerin birleştikleri ve birbiriyle açılar oluşturdukları noktalarda iki ya da üç hücreden oluşan gruplar halinde bulunurlar. Tip 1 alveol hücreleriyle aynı kökenden meydana gelir. Elektron Mikroskop ile Tip 2 alveol hücrelerinin lameller cisimciklere sahip olduğu görülür. Bu lamelli cisimcikler alveol yüzeyine yayılarak hücre dışı bir alveol örtüsü meydana getiren ve yüzey gerilimini düşüren pulmoner sürfaktanı oluşturur. Sürfaktan tabakası başlıca dipalmitoyil fosfatidilkolin ve fosfatidilgliserolden oluşan tek moleküllü ince bir fosfolipid tabakasıyla kaplı, sulu proteinimsi bir hipofazdan oluşur. Pulmoner sürfaktan, alveol hücrelerinin yüzey geriliminin azaltılmasına yardımcı olur. Yüzey geriliminin azaltılmasının anlamı; alveollerin havayla dolması için daha az soluk alma gücü harcanması ve böylece solunumun kolaylaştırılmasıdır. Toz hücreleri de denilen akciğer makrofajları alveoller arası bölmenin iç tarafında bulunur ve çoğu kez alveol yüzeyinde görülür. Büyük damarlar çevresinde bağ dokusunda ya da plevrada çok sayıda bulunan karbon ve toz yüklü makrofajlar muhtemelen hiçbir zaman epiteli aşmamış hücrelerdir (Resim 1.6).

Akciğerlerin yapısına katılan hücrelerin nitelikleri saptanmış olmasına karşın, bazı araştırmacılar hem solunum yollarında, hem de alveol duvarında bazı farklı hücre türü belirtirler (Ericson LE ve ark, 1972). Bazı araştırmacılara göre alveol duvarındakiler morfolojileri yönünden ganglion hücrelerine benzerler. Bir grup araştırmacı akciğerde solunum yolları ve alveol epiteli arasındaki bazı hücrelerin sinir telleri ile ilişki kuran nöroepitelyal hücreler olduğunu savunmuşlardır. Diğer bir grup araştırmacı ise örtü epiteli arasındaki bazı hücrelerin arjirofil ve floresan granüller içerdiğini saptamışlardır. Bu granüllü hücrelerin nörosekresyon yaptığını söyleyenlerin yanı sıra bunların endokrin salgı yaptığını savunanlarda vardır (Tateishi, 1973).

Akciğerlerdeki dolaşım, hem besleyici hem de işlevsel damarları kapsar. İşlevsel dolaşımı pulmoner arterler ve venler oluşturur. Pulmoner arterler, akciğer dolaşımında düşük basınçla karşılaşan ince duvarlı damarlardır. Bu arterler, pulmoner venlerden daha fazla düz kas hücresi ve elastik lif içerirler. Kapiller ağından çıkan venüller parankimde hava yollarının uzağında tek başlarına izlenirler. Lenf damarları bronşları ve pulmoner kan damarlarını izler. Akciğerlerin sinir ağını hem sempatik hem de

parasempatik götürücü lifler oluşturur. Sinirlerin çoğu geniş hava yollarının etrafındaki bağ dokusu içinde bulunur (Junqueira L ve Carneiro J, 2006).

### **1.3. İskemi Reperfüzyon (İR)**

İR hasarı, cerrahi hastalarda sık karşılaşılan kompleks bir fenomendir (Grace PA, 1994). İskemi organa gelen kan akımının yetersizliği ve dokunun bozulmuş perfüzyonu olup, dokuların ihtiyacı olan oksijen ve metabolik substratların karşılanamadığı patolojik bir olaydır (Cotran RS ve ark, 1994, Sun WJ, 1997). Reperfüzyon ise iskemik dokunun oksijenlenmiş kan ile perfüze edilmesiyle enerji desteğinin sağlanması ve hücrel hemostazın yeniden düzenlenmesidir (Resim 1.7). Yeterli akımın sağlanması sonrasında organ veya dokularda kapiller kan akımının olmaması durumu ise “no-reflow fenomeni” olarak adlandırılmaktadır (Sun WJ, 1997).

İR hasarının patofizyolojisinin incelendiği iskelet kası çalışmasında oluşan kimyasal olayların sırasıyla disfonksiyon ve ödem ile hücrenin ölümüne yol açtığı gösterilmiştir. Oksijen yokluğunda anaerobik metabolizma çalışmaya başlar ve lokal laktik asit konsantrasyonları artar, sonuçta oluşan asidoz, normal enzim kinetiklerini değiştirir, daha az oranda yüksek enerjili bağ yapımı olur ve hemostazı sürdürebilmek için gerek duyulan enerji sağlanamaz (Grace PA, 1994). İskemik organ ve dokulara tekrar kan akımının sağlanmasını takiben reperfüzyon sendromu olarak bilinen bir grup komplikasyon görülebilir. İlk olarak ön iskelet, ekstremitenin yeniden kanlandırıldığı hastalarda tarif edilmiş olmasına rağmen kalp cerrahisi, organ transplantasyonu ve iskemik barsağın revaskülarizasyonunu takiben de geliştiği bilinmektedir. Reperfüzyon sendromu iki komponenti içermektedir (Cotran RS ve ark, 1994). Birincisi ilgili damar bölgesinde iskeletle indüklenmiş, reperfüzyon sonrası ise artmış hasarla sonuçlanan lokal komponent ve ikincisi iskemik dokudan uzaktaki organlarda yetmezlikle sonuçlanan sistemik komponenttir.

İR mekanizmasında biyokimyasal elemanlardan bir tanesi olan ATP (Adenin trifosfat) yer almaktadır. ATP depoları iskelet sırasında kreatin fosfat ve inorganik fosfata dönüşmesi sonucu başlangıçtaki seviyelerini 3 saat süreyle koruyabilirler. Uzamış iskelet ile birlikte, ATP seviyelerinde ilerleyici bir düşüş meydana gelir. Anaerobik metabolizma sonucu glikojen laktata metabolize olur ve ATP tüketimi üretimini geçer. ATP seviyesindeki bu düşüş daha sonra ortaya çıkan kas nekrozu ile

sıkı ilişki içerisindedir (Aybey B ve ark, 1996). Dolaşımın kesilmesini takiben oluşan ilk değişiklik kapiller endotel hücrelerindedir. Hücre membranları sitoplazmaya doğru invaginasyon ve kapiller lümene doğru parmaklı çıkıntılar oluştururlar. İskeminin uzamasıyla endotelial veziküllerin sayısında artma oluşur. Oluşan bu membran değişiklikleri kapiller endotel hücreleri arasında geniş boşluklar oluşturur ve ilerleyici endotelial hücre ödemi meydana gelir. Ancak bu olay uniform olmayıp ödematoz ve non-ödematoz hücreler bir aradadır. Lökosit ve trombositler nadirdir, kapiller lümene sıkıca dolmuş eritrositler hücreler mevcuttur. Erken reperfüzyon döneminde eritrositlerin yüzeyde yoğunlaştıkları görülür; bu da deformasyona ve kapiller duvar yüzeyinde kırıklara yol açar. Hammerson ve arkadaşları, iskemiden 4 saat sonra özellikle reperfüzyonu takiben post-kapiller venüllerde trombositlerin lümen içinde kitleler oluşturduklarını tesbit etmişlerdir. Aynı zamanda lökositlerin kapiller duvara aşırı miktarda yapışmış olduğunu ve ekstravasküler mesafeye göç ettiklerini gözlemlemişlerdir (Cotran RS ve ark, 1994). Mikrosirkülasyondaki değişiklikler, plazma proteinlerine karşı vasküler permeabilitede artışa ve ilerleyici interstisiyel ödeme yol açmaktadır (Kurose I ve ark, 1994, Lu YT ve ark, 1997). Lokal reperfüzyon hasarını başlatan anahtar olay, kas dokusu içinde oksijen kökenli serbest radikallerin serbestleşmesidir. Bu hipotezin temel dayanağı reperfüzyon ile ilgili yapılan hayvan modellerinde deneysel olarak artmış kas hasarının serbest radikal temizleyicileri kullanılarak azaltıldığının gösterilmesidir (Novelli GP ve ark, 1996, Prem JT ve ark, 1999, Schlag MG ve ark, 2001). İn vitro çalışmalarda reperfüzyon esnasında hidroksil radikalleri ve süperoksit anyonlarının üretimini arttırdığı, postiskemik kas içerisinde normal ya da iskemik kasa oranla daha yüksek seviyelerde lipid peroksidasyonu olduğu belirlenmiştir (Lum H ve ark, 1992, Patwell D ve ark, 2001).

Reperfüzyon esnasındaki oksidan atağın kalsiyum hemostazını da bozduğu gösterilmiştir (Grace PA, 1994). Buna göre intraselüler kalsiyum seviyeleri artar, kalsiyum bazı proteazlar ile fosfolipaz A enzim aktivasyonuna neden olur. Bu proteazlar aktive olduğu zaman hücre iskeletini harap etme yeteneğine sahip ksantin dehidrojenazın (KD) ksantin oksidaza (KO) dönüşümünü artırır. ATP, hipoksantine metabolize olurken kanlanması normal olan dokularda KD enzimi hipoksantinden NAD ve bir molekül su eşliğinde ürik asit oluşturur. Ortamda KO arttığında ise hipoksantin, KO ile ürik aside çevrilirken oksijen molekülü kullanıldığı için ortama süperoksit anyonlar çıkar. Süperoksit anyonlar ( $O_2^-$ ), spontan olarak hidrojen peroksit ( $H_2O_2$ )

reaksiyonunaa girerek süperoksit anyondan çok daha reaktif olan hidroksil radikali oluştururlar (Hobson RW ve ark, 1996). Haber-Weiss reaksiyonu olarak da isimlendirilen bu reaksiyon normal oksijenli koşullarda çok yavaş ilerlerken, iskemik ortamda katalizör metallerin varlığında 'Fenton Reaksiyonu' adını alır ve çok hızlı seyreder (Resim 1.7). Oluşan hidroksil radikalleri oldukça reaktif, güçlü oksidan ve stabil olmayan bir yapıya sahiptir. Protein, polisakkaritler, nükleik asitler, poliansatüre yağ asitleri gibi tüm biyolojik maddelerle reaksiyona girerler. Hücre membranları içerisinde poliansatüre yağ asitlerinin lipid peroksidasyonu hücresel bütünlük ve fonksiyon kaybı ile sonuçlanır (Grace PA, 1994).

Reperfüzyon esnasında çok sayıda nötrofil revaskülarize kas içerisine sekestre olur (Grace PA, 1994, Hobson RW ve ark, 1996). Nötrofillerin de serbest oksijen radikali üretme yeteneği olduğu bilinmektedir ve iskelet kası İR hasarının gelişmesinde, nötrofillerin önemli bir role sahip olduğu kabul edilmektedir. Bunu lökosit filtreleri kullanarak göstermişlerdir (Cavanagh SP ve ark, 1998). Lökosit deplesyonunun reperfüzyon kontrol gruplarına göre vasküler permeabilite ve rezistansı azalttığını saptamışlardır. Yaptıkları bir çalışmada Ferrante ve Silva (Ferrante RJ ve Silva MB, 1993), reperfüzyonda lökosit adezyonunun inhibisyonu sonucu, miyosit membran hasarının ve kas kontraktıl disfonksiyonunun azaldığını, aynı zamanda post-iskemik lipid peroksidasyonunun ve kas nekrozunun genişliğinin sıfırlandığını tesbit etmişlerdir. Süperoksit anyonları ve  $H_2O_2$ , nötrofillerde membran ilişkili redükte nikotinamid adenin dinükleotid fosfat (NADPH) oksidaz ve ilave olarak klorlayıcı oksidanlarla oluşturulur. Klorlayıcı oksidanlar hipoklorik asit ve kloraminlerdir. Post iskemik iskelet kası hasarında granülositlerin varlığını saptamada granülosit spesifik bir enzim olan myeloperoksidaz (MPO) analizi kullanılır. Myeloperoksidaz, nötrofiller tarafından üretilen  $H_2O_2$ 'in hipoklorik asite dönüşümünde rol oynar (Hobson RW ve ark, 1996, Knight KR ve ark, 1997).

Nötrofiller ile endotel arasındaki etkileşim reperfüze doku içerisinde nötrofillerin kemotaksis ve aktivasyonuna bağlıdır. Serbest radikallerin salınımı lökositlerin kemotaksisi ile sonuçlanır. Ayrıca trombosit aktive edici faktör (PAF) ve lökotrien  $B_4$  ( $LTB_4$ ) gibi diğer kemoatraktanların salınımını başlatabilir. Bu oksidanlar, intrasellüler adezyon moleküllerinin ekspresyonuna (ICAM-1, ICAM-2) ve endotel lökosit adezyon molekülü (ELAM) oluşumuna da yol açarak, endotelial hücre yüzey adezyon

özelliklerini değiştirir ve nötrofil adezyonunu artırır. (Hobson RW ve ark, 1996, Cavanagh SP ve ark, 1998, Klausner JM ve ark, 1998)

İskelet kası reperfüzyon hasarında araşidonik asit metabolitleri önemli bir role sahiptir. Hücre membranında lipid peroksidasyonu ve fosfolipaz A<sub>2</sub>'nin aktivasyonunu takiben araşidonik asit serbestleşir (Grace PA, 1994, Hobson RW ve ark, 1996). Reperfüzyonun aracılık ettiği hasar iki araşidonik asit ürününün önemli olduğu bilinmektedir. Bunlar LTB<sub>4</sub> ve PAF'dür. PAF kısa ömürlü fosfolipid yapıda bir vazokonstriktör olup esas olarak endotelial hücrelerde bulunmaktadır. Mikrovasküler geçirgenliğin kuvvetli bir destekleyicisidir ve lökositler için güçlü bir kemoatraktandır (Dillon PK ve ark, 1988, Dillon PK ve Duran WN, 1988). Yapılan invitro çalışmalarda hidrojen peroksidin PAF'ın sentezi için stimulan role sahip olduğu gösterilmiştir. Endotelial hücrelerde aktive olan PAF, lökositlerin yüzeyinde bulunan ve endotelial hücrelere sıkı şekilde yapışmasına yol açan CD11/CD18'in artmasına neden olmaktadır. Deneysel İR modellerinde PAF antagonistlerinin verilmesiyle reperfüzyon boyunca lökosit adezyon ve ekstravazasyonu azaltılmıştır (Kubes P ve ark, 1990, Duran WN ve ark, 1996). LTB<sub>4</sub> de güçlü bir kemoatraktandır ve reperfüzyonun indüklediği nötrofil infiltrasyonuna aracılık eder. İR takiben plazmada olduğu gibi dokuda da LTB<sub>4</sub> yapımının belirgin derecede arttığı gösterilmiştir (Hoffer E ve ark, 1997). Bu mekanizmalar ışığında birçok metabolik faktörün İR patolojisinde yer aldığı ve uzak organ hasarını oluşturduğu düşünülmüştür (Resim 1.7).

#### **1.4. İR Sonrası Uzak Organ Hasarı ve Akciğer**

İskemi sonrası uzak organ hasarının sistemik etkiyle olduğu ve uzak organdaki mikrosirkülasyonu etkileyerek patolojiyi başlattığı en çok çalışıldığı ekstremitelerde gösterilmiştir. Özellikle geçici alt ekstremitelerde iskemilerinde İR sonrası uzak organlarda özellikle de akciğerlerde hasara neden olduğu saptanmıştır (Resim 1.8) (Gaines GC ve ark, 1999). Buradaki İR sonrası hasarın sadece iskelet kasında vasküler permeabilite artışı sonucu değil, aynı zamanda akciğerde nonkardiyojenik vasküler hasara bağlı olduğu bilinmektedir. Alt ekstremitenin herhangi bir sebeple İR maruz kalması interstisyel ödemle karakterize pulmoner hasara ve disfonksiyona yol açmaktadır (Rocker GM, 1997).

Akciğer hasarına neden olan mekanizmalar akciğerden tamamen uzak bir alanda başlatılır. Reperfüzyon süreci, iskemik alanda oluşan serbest radikallerin sistemik dolaşıma karışmasına neden olur. Bunlar da ya direkt olarak hasarı başlatır ya da indirek olarak nötrofillerin aktivasyonu ve endotelde sitokinlerin üretimi için bir stimulan etki gösterir. Bu mediatörlerin çoğu nötrofil - endotel etkileşimini sağlayarak nötrofillerin dokulara migrasyonuna yol açmakta ve göç eden bu nötrofiller de degranüle olarak dokuya hasar vermektedir (Welbourn CR ve Young Y, 1992, Windsor AC ve ark, 1993). Pulmoner vasküler yatak dolaşan nötrofil havuzunun %50-60'ını ihtiva etmektedir. Nötrofiller, proteaz ve serbest radikalleri içeren toksik metabolitleri açığa çıkararak pulmoner hasara yol açar (Weiss Sj, 1989). Akut akciğer hasarından sorumlu faktörlerin içinde serbest radikaller, nötrofiller, endotelden açığa çıkan faktörler ve humoral faktörler bulunmaktadır. Serbest radikaller, reperfüzyon hasarı tarafından indüklenen sistemik süreçlerden sorumludur (Resim 1.8). Ksantin dehidrojenaz / oksidaz sistemi, İR boyunca oluşan serbest radikallerin çoğunluğundan sorumludur (Pararajasingam R ve ark, 1999).

Nötrofillerin yanı sıra endotel kaynaklı etkenlerin de uzak organ hasarında etkili olduğu düşünülmüştür. Endotel normalde araşidonik asit metabolitleri, sitokinler, NO ve bazı humoral faktörleri salgılar (Lien DC ve ark, 1987). Endotelde oluşan hasar sonucunda düz kas relaksasyonuna neden olan ve trombosit agregasyonunu azaltan prostasiklin sentezi azalır (Hobson RW ve ark, 1996, Pararajasingam R ve ark, 1999). Prostrasiklinin yarı ömrü 1-2 dakikadır ve etkilerini adenilat siklazı aktive edip siklik adenozin monofosfat (cAMP) yapımını artırarak gösterir (Novick RJ ve ark, 1996).

Endotel tarafından salgılanan diğer bir madde 21 aminoasitli "endotelinler"dir. Özellikle endotelin-1 (ET-1) vasküler dokuda dihidropiridine duyarlı kalsiyum kanallarını düzenleyerek vazokonstriksiyona neden olur ve nötrofil-endotel etkileşimlerini kuvvetlendirir (Lien DC ve ark, 1987). Fizyolojik şartlarda endotel ve NO'in antagonist etkileri vasküler tonusu düzenler. Nitrik oksit, ET-1'in akciğer damarları üzerindeki etkisini antagonize eder (Güray A ve ark, 1997). Patolojik haller bu düzeni bozar, vasküler vazokonstriksiyona ve damarların tıkanmasına neden olur (Güray A ve ark, 1997, Pararajasingam R ve ark, 1999, Tanahashi Y ve ark, 1999). Endotel hücreleri tarafından gelişen hasar sonucu üretilen bir diğer proinflamatuvar madde fosfolipid yapıdaki PAF olur. PAF, lökosit kemotaksisinin önemli bir

mediatördür. Mikrosirkülasyonda platelet agregasyonunu artırarak trombus oluşumunu sağlar ve mikrovasküler geçirgenliği değiştirir (Lien DC ve ark, 1987). Ek olarak izole akciğerlerde bronkokonstriksiyonu, pulmoner hipertansiyonu ve ödemi trombositlerden bağımsız olarak indükler (Hamasaki Y ve ark, 1984). PAF aktivitesinin net etkisi vasküler permeabilitede ve akciğer hasarında belirgin artıştır. Deneysel akciğer ve kalp akciğer transplant modellerinde PAF antagonistlerinin reperfüzyon sonrası akciğer fonksiyonunu belirgin olarak artırdığı gösterilmiştir (Conte JV ve ark, 1991, Qayemi AK ve ark, 1991).

### **1.5. NOS (Nitrik Oksit Sentetaz)**

Furchgott ve Zawadski tarafından ilk kez 1980'de endotel kökenli vazodilatasyon yapıcı bir madde endotel kökenli gevşeme faktörü (EDRF) tanımlandı. Dr. Furchgott, asetilkolin ile yaptığı deneysel çalışmada halka şeklinde hazırladığı aort kesitlerinde gevşeme yanıtı alırken, heliks şeklinde hazırlanan preparatlarda kasılma yanıt aldığını gözlemiş ve burada endotelin hasara uğramasıyla ilişkilendirmiştir. Böylece asetilkolinin vazodilatör etkisinin ortaya çıkmasında rol oynayan endotelden kaynaklanan bir maddenin varlığı işaret edilmiş ve bu maddeye de EDRF adı verilmiştir (H Brune B ve ark, 1996). Daha sonraki yıllarda EDRF'nin yapısı araştırılmış ve NO ya da benzeri ürün olduğu 1987'de ortaya çıkarılmıştır. Günümüzde EDRF, NO olarak kullanılmaktadır. NO üzerine yapılan çalışmalar daha sonraki yıllarda artmış ve organizmada birçok önemli rolü olduğu saptanmıştır (Gardner TJ ve ark, 1983, Frostell CG ve ark, 1991, Ganong WF, 1995, Galle J ve ark, 1996).

Nitrik Oksidin kimyasal özelliklerine ilişkin ilk yayın 1772'de Joseph Priestly tarafından yapılmış ve *in vivo* olarak varlığı 1914'de Sir Henry Dale tarafından rapor edilmiştir. Araştırmacı intravenöz uyguladığı asetilkolinin tavşankulağında kan akımını arttırdığını gözlemiştir. Daha sonraki çalışmalar *in vitro* olarak asetilkolin etkisini gözlemeye yönelmiş ancak bir sonuç alınamamıştır. Çünkü damar *in vitro* koşullarda gevşeme yerine kasılma ile cevap vermiştir. İlk kez Jelliffe'nin 1962'de yayınladığı makalede Aort'un gevşeme ile yanıt verdiği belirtilmiştir.

NO alveoler makrofaj ya da havayolu epiteli kökenli olabilir. Genelde arter ve arterioller, ven ve venüllere göre daha fazla NO sentezler. NO aktif ve reaktif hiperemi gelişiminde etkilidir. Karotid cisimciklerinde ve damarlarında NOS enziminin varlığı



gösterilmiştir (Ferro CJ, Webb JD, 1996, Noll G ve ark, 1996). NO böbrek gelişiminde etkilidir. En çok makula densa'da olmak üzere proksimal tübül efferent ve afferent arteriolde bulunur. Renal kan akımı ile yakından ilişkilidir. Sistemik NO inhibisyonu afferent ve efferent arteriolde direnç artışına neden olur. NO böbrek mikrosirkülasyonunda tonik olarak vazodilatör etkilidir. Ayrıca basınç natriürezisinde fonksiyonu vardır ve tübül epiteline direkt etki ile Na reabsorbsiyonunu inhibe eder. Detrüsör kas, trigon ve üretra'da NOS tespit edilmiştir (Andersson KE ve Persson K, 1995, Galle J ve Wanner C, 1996, Navar LQ ve Majid DS, 1996).

NOS (nitric oksit sentetaz) enziminin yapısal (cNOS) ve uyarılabilir (iNOS) formlarından cNOS endotel, nöronal ve diğer hücrelerde bulunur ve  $Ca^{++}$  kalmodulin bağımlıdır (Tablo 1.1). Bir yüzey reseptörünün aktivasyonu sonucu hücre içi  $Ca^{++}$  artışı ile aktive olur (Moncade S ve ark, 1991, Nathan C, 1992). iNOS sitokin ya da lipopolisakkaritlerce aktivasyon sonucu indüklenir ve cNOS'dan daha fazla NO oluşumuna neden olur (Kwoo NS ve ark, 1989). iNOS sitokin veya endotoksin uyarımı ile oluşabilir ve tetrahydrobiopterine gerek duyar (Kwoo Ns ve ark, 1989). Son zamanlarda yapılan çalışmalarda NO'nun vazodilatör, bronkodilatör, nonadrenerjik, non-kolinergik transmitter ve inflamatuvar aracı olarak rol oynadığına dair bilgiler elde edilmiştir. Bu özellikleri nedeni ile NO'nun akciğer fonksiyonlarının düzenlenmesinde ve bazı akciğer hastalıklarının fizyopatolojisinde önemli rolü olduğu sanılmaktadır. NO, hücre içinde guanilsiklazı aktive eder ve cGMP artar. Bu NO'nun pek çok nörojenik ve kardiyovasküler etkilerinin nedenidir (Lincoln TM, 1989). Ancak NO'nun cGMP'den bağımsız etkisi olduğuna ilişkin yayınlar da vardır (Garg UC ve Hassid A, 1991). Bu konu henüz yeterince açık değildir. NO'nun endojen olarak salınmasının pulmoner vazokonstriksiyonu önleyici bir mekanizma olduğu anlaşılmaktadır (Crawley DF ve ark, 1990). NO akciğer damarlarında seçici olarak vazodilatasyon yapmaktadır. Çünkü kana geçince hızla hemoglobinle birleşen NO inaktive olur ve sistemik vazodilatasyon oluşturmaz. Sonuçta NO salınımı hipoksiyi azaltmaktadır (Adnot S ve ark, 1991). NO'nun vazodilatör etkisinin inhalasyonla oluşturulabileceği düşünülmüş ve bu konuda hem insan hem de hayvanlar üzerinde yapılan çalışmalarda akciğerlerde vazodilatör etki izlenmiştir (Frostell CG ve ark, 1991).

Deney hayvanlarının trakealarında epiteli olanlarda, epiteli sıyrılmış olanlara göre bronkodilatör etkisi az bulunmuştur (Munakata M ve ark, 1990). Bilindiği gibi insan havayollarında bronkodilatör etkili NANC sinirleri tek bronkodilatör yolaktır.

NO'nun burada bir transmitter gibi davrandığı kabul edilmektedir. Hayvan ve insan deneyleri NO'nun NANC sistemin relaksan etkisinin aracısı olduğunu düşündürmektedir (Huang Z ve ark, 1994, Wolin MS, 1996). NO'nun endotelial ve nöronal hücreler dışında makrofaj, mast hücreleri, düz kas hücreleri, epitel hücreleri ve fibroblastlarda da üretildiği gösterilmiştir (McCall ve ark, 1989, Tayeh MA ve Marietta Mp, 1989). NO endojen ve inhaler olarak akciğer inflamasyonunda rol oynayabilir. Endojen NO özellikle çok üretildiğinde postkapiller venüllerde eksüdasyona neden olabilir, inhale NO ise 20.000 ppm üzerinde havayolu direncini arttırmaktadır (Van Snick J, 1990). Steroidler iNOS'u inhibe ederken cNOS üzerinde etkileri izlenmemiştir. Steroidler endotoksik şokta iNOS inhibisyonu ile NO'nun oluşumunu azaltır (Di Rosa M ve ark, 1990, Radomski MW ve ark, 1990). Bu bulgu steroidin, endotoksik şoktaki anti- inflamatuvar etkisini açıklayabilir. NO endojen olarak oluşan, akciğerlerde seçici vazodilatör ve bronkodilatör etkisi olan, inflamasyon ve doku haraplanmasına da yol açabilen bir birleşiktir. Bu bileşiğin inhaler formları pulmoner hipertansiyon ve bronş hiperreaktivitesi olan durumlarda tedavi amaçlı kullanılırken NO'yu inhibe eden ajanlar da septik veya endotoksik şok tedavisinde yeni tedavi seçeneklerini oluşturabilirler.

Geçici az miktarda NO salınımının hücre haberleşmesinde rolü olmasına rağmen yüksek miktarlardaki NO mitokondriyal solunumu inhibe edip, glikolizi deprese ederek ve intrasellüler glutatyon seviyesini azaltarak sitotoksositeye neden olur. Ayrıca ribonükleotid redüktaz aktivitesini azaltarak DNA sentezini inhibe eder (Kwoo Ns ve ark, 1991). DNA nitrasyonu, oksidasyonu ve deaminasyonu ile de DNA yapısını zedeler (Liu RH ve Hsstckiss JH, 1995). NO'nun programlı hücre oluşumunda da rol aldığı kondrositler, makrofajlar, mastositlerde gösterilmiştir (Blanco FJ ve ark, 1995, Mittal OK, 1995). İskemide intrasellüler  $Ca^{++}$  artışını takiben NO aktiviteleri artar. cNOS istirahat değerinden hafif yüksek  $Ca^{++}$  seviyelerinde aktive olur (Jenkinson SC, 1984, Silver IA ve Erecinska M, 1992). NO guanilat siklaz'ın Hem molekülüne bağlanarak cGMP artışına ve sonuçta hücre içi  $Ca^{++}$  azalmasına;  $Ca^{++}$  la aktive Olan  $K^+$  kanal açılmasına neden olur.  $K^+$  hücre dışına çıkarak hiperpolarizasyon oluşur ve düz kas gevşemesi meydana gelir. cGMP'den bağımsız olarak da NO etkisini göstermekte, bir tümör baskılayıcı gen olan  $P_{53}$  artışı ile apoptoz sonucu hücre ölümüne neden olmaktadır. Ayrıca mitokondrial Hem içeren enzimlerin inaktivasyonunu sağlamakta bu yolla da tümör gelişimini önlemektedir (Baron AD, 1996, Brune B ve ark, 1996, Stuehr DJ ve Nathan CF, 1989). İR hasarı sırasında oluşan SOR (serbest oksijen radikalleri)

örneği süperoksit radikali O<sub>2</sub> ile NO radikali reaksiyona girerek peroksinitrit (ONOO<sup>-</sup>) oluşturur. Fizyolojik pH da peroksinitrit hızla hidroksil ve nitrojendioksit radikaline çevirilir. (Beckman JS ve ark, 1995, Chan PH, 1996).

NO, NOS'a ait hem molekül ile birleşerek NO sentezini ihhibe eder. nNOS ve eNOS, iNOS'tan daha fazla bu geri beslenme mekanizmasından etkilenmektedir. NO'nun Hemdeki Fe<sup>+++</sup> formuna inhibitör etkisinin daha fazla olduğu gözlenmektedir. Tetrahidbiopterin'de (BH<sub>4</sub>) Fe<sup>+++</sup> formuna dönüşü gerçekteştirerek, inhibitör etkiyi sağlamaktadır (Galle J ve Wanner C, 1996, Baron AD, 1996). Nöronal ve Endotelial form yapıcı olup Ca<sup>++</sup> Calmoduline bağımlıdır ve intraselüler Ca<sup>++</sup> artışı ile aktive olur. İndüklenen formu ise intraselüler Ca<sup>++</sup> değişikliklerinden bağımsız ve sitotoksik inflamatuvar yanıt oluşturan NO'yu sentezler (Moncade S ve ark, 1991, Nathan C, 1992, Dawson VL ve ark, 1993, Zhang L ve ark, 1993, Bredt SD ve Synder SH, 1994). NO sentezini azaltan faktörlerin başında, Monomethyl-L-Arjinin (L-LMMA), Asymmetric dimethyl-L-Arjinin (L-ADMA), Nitro (L-NNA), Nitro-L-Arjinin methyl ester (L-NAME) gelir. Bunlardan L-NAME daha çok cNOS için; L-NMMA ise her iki NOS için inhibitördür. Yine L-NNA, NOS I ve III için daha etkilidir. iNOS glukokortikoid, deksametazon, progesterone, TGF (Tumor Growth Factor) beta, IL (interlökin)-4, IL-8, EGF (epidermal büyüme faktörü), PDGF (trombosit kökenli büyüme faktörü), sikloheksimid, aktinomisin D gibi maddeler tarafından ihhibe edilir (Sessa WC, 1994, Ignarro U, 1996, Baron AD, 1996). NO sentezini artıran faktörlerin başında perfüzyon bozukluğu, parsiyel oksijen basıncında değişme, asetilkolin, adenosin difosfat, adenosin trifosfat, bradikinin, kalsiyum iyonofor, vazoaktif intestinal peptid, trombin, kalsitonin generelated peptid, histamin, noradrenalin, substance P, serotonin ve insülin gelir (Bredt SD ve Synder SH, 1994, Baron AD, 1996). Ayrıca iNOS, LPS, TNF- $\alpha$ , IL-1, IL-2 gibi sitokinler tarafından da uyarılır (Sessa WC, 1994, Baron AD, 1996, Ignarro U, 1996).

Peroksinitrit güçlü bir peroksidan madde olup NO'ya bağlı hücre ölümünde ana mekanizmayı oluşturur. Hipokside meydana gelen hücre hasarı da peroksinitritin mitokondri DNA'sı, lipitler ve proteinleri disfonksiyone etmesine bağlıdır (Beckman JS ve ark, 1995, Chan PH, 1996, Simonian NA ve Coyle JT, 1996). Özellikle süper oksitten zengin ortamda NO intraselüler Fe<sup>+++</sup> salınımına neden olur ve Haber-Weiss reaksiyonunu tetikler. Böylece reaktif oksijen türevleri oluşur. (Hidroksil radikali) (Chan PH, 1996). Damar duvarında yapılan NO kana geçer, oksijen ve redükte Hb ile

bağlanır. Oksi hemoglobinle birleşen NO dönüşür ve metHb oluşur. NO redükte Hb ile nitrozohemoglobin (HbNO) birleşimini de oluşturur ve bu da oksijenin fazla olduğu ortamlarda methemoglobin (metHb) ile nitrata dönüştürür. NO sadece hem molekülü ile birleşmesine karşın, nitrit hemoglobinin globin bölümü ile de reaksiyona girebilmektedir (Lefer MA ve Lefer DJ, 1996, Mizutani T ve Layon J, 1996).

NOS inhibisyonu nötrofillerde CD II a, b, c, CD 18 ekspresyonunu arttırarak damar duvarına yapışmalarına neden olur. NO, P-selektin yapımını ve ICAM-1'in de yüzeyde oluşumunu inhibe eder. Mikrosirkülasyon, reperfüzyonu takip eden 2,5–5 dk içinde endotelde fonksiyon bozukluğuna ve dolayısı ile NO azalmasına yol açar. NO azalması hücrel adezyon molekülleri özellikle P-Selektin'in reperfüzyonun 20. dakikasında oluşumuna neden olur. Bu dakikadan itibaren lökosit adezyonu başlar. 2–3 saat içinde nötrofiller damar altı dokulara infiltre olur, böylelikle 3 saatten itibaren reperfüzyon hasarı başlar. Ağırlıklı olarak da 4,5 saatte meydana çıkar (Katusic SZ, 1996). NO ayrıca siklooksijenaz aktivitesini de uyarır (Warder TD, 1996). ET-1 endotel üzerindeki reseptörlerini etkileyerek NO ve prostosiklin salınımını arttırdığı halde NO, endotel hücrelerinden ET-1 salınımını inhibe eder (Wenmalm A, 1994, Ferro CJ ve Webb JD, 1996, Noll G ve ark, 1996).

### **1.6. Apoptoz (Programlı Hücre ölümü)**

Apoptoz; gelişmiş organizmalarda hücreler arası ilişkilerin gereği olarak gereksinim duyulmayan ve fonksiyonları bozulan hücrelerin, çevreye zarar vermeden programlı ölümüdür. Apoptoz ile biyolojik olayların devamı sırasında istenmeyen hücrelerin ortadan kaldırılması sağlanırken, dokuda herhangi bir inflamasyon belirtisi ortaya çıkmamaktadır. Embriyo döneminden başlayarak tüm yaşam boyunca apoptotik mekanizma ve programlı hücre ölümü vardır. Bazı hücreler yıllarca yaşarken bir kısmı sadece birkaç saat yaşarlar (Cohen JJ, 1998). Hücre ölümünün diğer bir şekli olan nekrozda ise dokuda inflamasyon belirgin olarak gözlenmektedir. Nekrozda ortaya çıkan değişikliklerden fiziksel veya kimyasal uyarılar sorumlu tutulurken, apoptozte gen aktivasyonları sorumlu mekanizmayı oluşturmaktadır.

Apoptoz terimi ilk olarak 1972 yılında İskoç araştırmacılar Kerr, Wyllie ve Currie tarafından canlı dokulardaki hücre azalmalarını tanımlamak amacıyla kullanılmıştır (Kerr JFR ve ark, 1972). Apoptoz biyokimyasal yöntemlerle ilk kez 1983

yılında ise Duke ve arkadaşları tarafından tanımlanmıştır (Duke RC ve ark, 1983). Bu araştırmacılar agaroz jel elektroforezi kullanarak, apoptotik hücrede endonükleazların aktive olduğunu ve bu enzimlerin DNA kırıklarına neden olduğunu bildirmişlerdir.

Apopitoz, programlanmış ve kontrollü hücre ölümüdür. Bu hücre ölüm tipinde, hücreler grup halinde değil tek tek etkilenmektedir. Apopitoz sonucu oluşan hücre ölümleri, morfolojik ve biyokimyasal değişimler ile tanımlanabilmektedir. Apopitozde, hücreler küçülür, büzülür ve hacim kayıpları gözlenir. Komşu hücrelerden ayrılan apoptotik hücrelerin çekirdekleri parçalanır ve kromatin ağı yoğunlaşır. Apopitozda hücreler tek tek etkilenir; hacimce küçülür, komşu hücrelerle temasını kaybeder. Mikrovillus gibi özel yüzey farklanmaları ve diğer hücrelerle olan bağlantı yapıları bozulur. Bu olay hızla gerçekleşirken aynı anda hücrede değişik yüzey çıkıntıları ve kıvrıntıları oluşur. Bunların membranla çevrili olarak hücreden ayrılmasıyla apoptotik cisimler meydana gelir. Bu hücrelerde endoplazmik retikulum (ER) genişler, genişlemiş sarnıçların hücre yüzeyi ile birleşmesi sonucu hücre yüzeyinde krater gibi oyuklar gözlenir. Hücre iskeleti filamanları hücre yüzeyine paralel kenarlarda toplanır. ER dışında diğer hücre organelleri yapılarını korurlar. Sitoplâzma yoğunluğu arttığı için organeller kalabalık görülür. Mitokondriyonlar, nekrozla ölen hücrelerin aksine başlangıçtan itibaren normal yapıdadır. Nekrozdan farklı olarak apoptozda hücre zarı sağlamdır. Bu nedenle inflamasyona neden olmaz.(Kerr JFR ve ark, 1972, Wyllie AH ve ark, 1984, Arends M ve Wyllie AH, 1991, Kerr JFR ve ark, 1994, Sunguroğlu ve ark, 1996, Kanduc D, 2002, Orrenius S, 2004).

Apopitozun önemi hem embriyonik gelişim döneminde, hem de erişkin döneminde istenmeyen hücrelerin ortadan kaldırılmasında önemli rol oynamaktadır. Embriyonik dönemin pre-implantasyon döneminde ortaya çıkan boşlukların oluşmasında, dokuların şekillenmesinde, gastrulasyon ve nörolasyon olaylarının gerçekleşmesinde apoptoz önemli rol oynamaktadır. Embriyonik gelişimin sonraki aşamalarında gözlenen kol ve bacak tomurcuklarının gelişimi apoptoz ile gerçekleşmektedir (Saunders JW, 1966, Cooper GM, 2000). Erişkin hayatta ise; derideki keratinositlerin yüzeye göç edip epidermisin en üst tabakası olan stratum korneum tabakasını oluşturmasında (Nemes Z ve Steinert PM, 1999, Kalinin AE, 2002), menstrual siklus sırasında endometriumda hormon çekilmesinden sonraki involusyonda ve laktasyon sırasında meme bezlerinin gerilemesinde apoptoz ana kontrol mekanizmasını oluşturur. Ayrıca rejenerasyon ve dejenerasyonun sık gözlemlendiği

mukozalar ve epitel gibi dokuların organizasyonunda, timusta aşırı üretilen T hücrelerinin ortadan kaldırılmasında da apoptoz önemli rol oynamaktadır (Ovalı E, 1999). İskemik beyin hasarında, miyokard infarktüsünden sonra iskemik hasarda, darbe ve reperfüzyonda, hepatit ve graft versus host gibi oto-immün hastalıklarda da apoptoz gözlenmektedir (Li P ve ark, 1995, Rink A ve ark, 1995, Cooper GM, 2000, O'Hare M ve ark, 2002).

Apoptoz mekanizması hücre içinden kaynaklanan mitokondriyal yolla (B-cell leukemia/Lymphoma-2 [Bcl-2] protein ailesinin kontrolünde) gerçekleşen ve hücre yüzeyi ölüm reseptörleri TNF protein ailesinin üyeleri ve bunların reseptörleri ile düzenlenen hücre dışından kaynaklanan olmak üzere esas olarak iki yolla düzenlenir (Marsden VS ve Strasser A, 2003, Borner C, 2003, Scorrano L ve Korsmeyer SJ, 2003). Mitokondriyal yolla hücrenin apoptoze uğraması, hücrede ölüm sinyal yolunun tetiklenmesi ile ortaya çıkan proteinler olan kaspazları aktive eden protein ailesini içermesi nedeniyle çok önemlidir.

Apoptoze ilişkin birçok mitokondriyal protein, mitokondrilerin iç membranında bulunur. Apoptotik tetiklenme sonucunda, mitokondriyal proteinler sitoplazma ve/veya çekirdeğe salınarak mitokondriyal ve sitoplazmik apoptozu kontrol eden proteinlerin etkileşimi sonucunda hücrenin yaşam ve ölüm dengesi sağlanır (Wang X, 2001). Mitokondriyal yolla gerçekleşen apoptozda, Bcl-2 ailesinin üyeleri memelilerde programlı hücre ölümünde rol oynar ve kaspazları aktive eder (Cooper GM, 2000). Bcl-2 ailesi domain yapısına göre 2 ana gruba ayrılır: Bcl-2, Bcl-X<sub>L</sub>, Bcl-w gibi anti-apoptotik üyeler mitokondri dışı zarı ile bağlantılıdır ve mitokondri bütünlüğünü korurlar, Bax, Bak, Bcl-X<sub>s</sub> gibi pro-apoptotik üyeler ise apoptoz süresince dış mitokondriyal zarla bağlantılıdır ve onun bütünlüğünü bozarlar (Vaux DL ve ark, 1992, Wang X, 2001).

Hücre yüzeyi ölüm reseptör yolu, TNF $\alpha$ , FasL/CD95L, TWEAK ve TRAIL gibi üyeleri içeren TNF superailisinin, ekstrasellüler ölüm sinyalini başlatmasıyla gerçekleşir. Hücre yüzeyi ölüm reseptörleri ve ligandları olarak görev alırlar (Sprick MR ve Walczak H, 2004). Kaspazlar sitoplazmada inaktif olarak bulunan, aktif merkezlerinde sistein bulunduğundan sistein proteaz olarak adlandırılan bir grup enzimdir. Kaspaz ismini sahip oldukları aktif cysteine bölgelerinden ve proteinlerin içindeki aspartik asitten sonraki kısımları parçaladığı için Aspartaz adını alırlar (Scaffidi C ve ark, 1998, Cooper GM, 2000). Apoptotik uyarıyla başlayan ölüm sinyallerini

efektör kaspazlara iletirler. Efektör kaspazlar ise ilgili proteinleri parçalayarak apoptotik hücre morfolojisini meydana getirirler (Orrenius S, 2004). Kaspazların parçalanmasının ardından hücrede apoptotik morfoloji meydana gelir. Örneğin kromatin kondenzasyonu, nükleozomal DNA fregmantasyonu, nükleer membran yıkımı, fosfotidilserinlerin hücre zarının dışına geçmesi ve apoptotik cisimlerin şekillenmesi gözlenir (Budiharjo L ve ark, 1999).

Apoptozun tanı yöntemleri farklılıklar, avantajlar ve dezavantajlar içermektedir. Hücre biyolojisine giriş ile birlikte hücrede apoptoz ve nekroz arasındaki farklılıklar araştırılmaya başlanmıştır. Apoptoz ilk olarak hücre morfolojisi esas alınarak incelenmeye çalışılmış daha sonra histokimyasal ve biyokimyasal teknikler kullanılarak hücrede DNA kırıklarının belirlenmesi ile çalışmalar devam etmiştir (Huppertz B ve ark, 1999, Willingham MC, 1999).

Apoptoz süresince özel bazı proteinlerin salınması ya da protein fragmentlerinin oluşması Apoptozun nekrozdan bağımsız olan belirleyici özellikleri olarak ortaya çıkmıştır (Srinivasan A ve ark, 1998, Yang F ve ark, 1998). Bunu takiben, ölüm reseptörleri, bunların ligandları, pro ve antiapoptotik düzenleyici proteinlerden söz edilmeye başlanmış ve dokularda kullanılabilir hale gelmiştir (Huppertz B ve ark, 1999). Bu çalışmalar sonucunda apoptozun saptanması için birçok yöntem geliştirilmiştir.

Apoptotik hücre morfolojisini incelemek için çeşitli yöntemler kullanılmaktadır. Rutin histolojik yöntemlerle hücrede çekirdek ve sitoplâzmayı ayrı ayrı boyayan boyalar kullanılır. Işık mikroskopunda hematoksilen-eozin boyaması yapılmış örnekler incelendiğinde, yoğunlaşmış ve büzüşmüş bir sitoplâzma ile göze çarpan çekirdeksel değişiklikler gözlenir. Ardından kromatin kondenzasyonu ve çekirdek zarının çevresinde toplanması, çekirdeğin küçülmesi ve parçalara ayrılması gözlenir (Kerr JFR ve ark, 1972, Wyllie AH ve ark, 1972). Floresan mikroskopu ile incelenirken ise akrinin orange ve etidyum bromür gibi floresan boyaların özelliklerinden yararlanır. Bu boyalar nükleik asite özgün boyalardır ve DNA'ya bağlanırlar, hücrenin kromatini yani çekirdek görünebilir hale gelir ve morfolojik özellikleri incelenebilir. Elektron mikroskopu organeller düzeyinde morfolojik değişikliklerin en iyi gözlendiği yöntemdir (Goping G ve ark, 1999).

Morfolojik özellikler dışında, DNA fragmentasyonu yani DNA'nın 180–200 baz çifti ve bunun katları şeklinde kırılması programlı hücre ölümünün belirleyici özelliğidir (Kerr JFR ve ark, 1972, Wyllie AH ve ark, 1972, Arends MJ ve ark, 1990). TUNEL (terminal deoxynucleotidyl transferase (Tdt)-mediated dUTP-biotin nick-end labeling) gibi enzimatik yöntemler, tek ya da çift iplikli DNA kırıklarına işaretlenmiş nükleotidlerin bağlanması esasına dayanır. İn situ hibridizasyon teknikleri apoptotik DNA'nın denaturasyona duyarlılığı, formalin ile fikse edilip parafine gömülmüş dokularda Apoptozun belirlenmesi için işaretlenmiş poly (A) problemleri kullanılması esas alınarak belirlenir (Hilton DA ve ark, 1997, Didenko ve ark, 1998). Didenko (1998) tarafından tanımlanan bu teknik apoptotik DNA fragmentasyonunun rölatif olarak erken dönemde belirlenmesine yardımcı olmaktadır. Anneksin V yönteminde ise; normalde hücrenin iç yüzeyinde bulunan fosfotidilserinlerin apoptoz süresince hücrenin dış yüzüne çıkmaları özelliğinden yararlanır. Bu fosfotidilserinler FITC (Floresan izotiyosiyanat) gibi bir floresan madde ile işaretlenmiş Anneksin V kullanılarak görünür hale getirilebilir ve apoptotik hücreler saptanmış olur. Bu belirleme flow sitometri yöntemi ve kullanılarak yapılar ve floresan mikroskopu ile incelenir (Martin SJ, 1995, Loo DT ve Rillema JR, 1998).

Apoptoze özgü proteinlerin belirlenmesi de başka bir yöntemdir. Western blotting ya da immunohistokimya yöntemleri kullanılarak sadece apoptotik hücrelerde kaspazlar örneğinde olduğu gibi aktif hale gelen ya da Bcl-2 gibi eksprese olan bazı proteinlerin dokuda tespit edilmesi esasına dayanır. Flow sitometri yardımı ile floresan bir madde ile işaretlenmiş antikor kullanılarak apoptozte eksprese olduğu bilinen herhangi bir hücre yüzey proteininin saptanması mümkündür.

Apoptozisin tanı yöntemlerinden her biri bir basamak oluşturmaktadır. Sadece bir tanesini kullanarak bir hücrenin apoptoze gittiğini ya da ölen bir hücrenin apoptoz nedeniyle mi, nekroz ile mi öldüğü söylenemez. Bu yöntemler birbirini destekleyecek şekilde bir arada kullanılmalıdır. Apoptoz mekanizmasının belirlenmesi ile embriyonik dönemde birçok soruya yanıt bulunacaktır. İlerleyen çalışmalar yardımı ile bu mekanizmanın açıklığa kavuşturulması ve kontrol edilebilir hale getirilebilmesi ile birçok hastalığın etki mekanizması anlaşılacak ve bu hastalıkları engelleyebilecek tedavi protokolleri geliştirilebilecektir.



## 1.7 AMAÇ

İki taraflı karotid arter oklüzyonu yöntemi ile oluşturulan deneysel beyin iskemisinde oluşan solunumsal asidoza bağlı olarak değişen metabolik durum, reperfüzyon sonrası hasarın kritik belirleyicisi olmakta ve yapılan birçok çalışmada alınan sonuçların yorumlanmasına etki etmektedir. Klinik yansımaları da hastanın prognozu belirlemede büyük önem taşımaktadır. Metabolik bozukluğa bağlı gelişen asidozun akciğerde inflamasyona neden olduğu miyeloperoksidaz aktivitesinin artması ve histopatolojik skorlama ile gösterilmiştir. Bu bulgulara ek olarak SOR (serbest oksijen radikali) artımı ve tansiyon düşüklüğü saptanmıştır. Endotel hücreden salınan SOR komşuluğundaki düz kas hücrelerine yayılarak damarda serbestleşmeye neden olarak endotel adezyonunun artmasını sağlamıştır. Hücrelerin SOR üretiminin hücre içi pH ile ilişkili olduğu gösterilmiştir. Bizim çalışmamızda beyin iskemisini etkinleştirmek için yapılan kan alma yönteminin oluşturduğu hipotansiyonunda metabolik bozukluk ve akciğer hasarında önemli olabileceği bu çalışmayla gösterilmektedir (Pedoto A ve ark, 1999). CO<sub>2</sub> artımına bağlı olarak ortaya çıkan damar düz kaslarında ve beyin arterlerinde oluşan değişiklikler; NO ve SOR üzerinden birçok mekanizmayı tetiklemesine bağlı olarak beyin iskemisi ve hasarını aynı zamanda ön tanıttım (ÖT) ve reperfüzyonla gelen korumayı etkileyebilmekte ve metabolik duruma bağlı lokal etkilerin önemini göstermektedir. (Barzaghi F ve ark, 1982, Bederson JB ve ark, 1986, Bentahila S ve ark, 1991, Bortolotto ZA ve ark, 1991, Hall E ve ark, 1995, Frenette PS ve Wagner DD, 1996, Horstick G ve ark, 1999, Corbett D ve Nurse S, 1998, Bart RD ve ark, 1998, Iijima T, 2006, Loh KP ve ark, 2006).

Yapılan çalışmalarda, iskeminin şiddetinden bağımsız sonuçlar alınmasının bir nedeni de metabolizmanın oluşturduğu değişikliklerden kaynaklanmaktadır. Ortalama arteriyel basıncının yarıya düşürülmesi ile kan gazı sonuçlarında pH düşmekte ve nöral dansite azalmaktadır (Hamann GF ve ark, 1995, Kato H ve Wood PL, 1998, Gursoy-Ozdemir Y ve ark, 2000). Mekanik ventilasyonun sağlandığı, % 30–40 oksijen desteğinin verildiği ve halotan anestezisi altında yapılan torakotomi uygulamalarında bile metabolik durumun değiştiği ve sonuçları etkilediği saptanmıştır (Agardh CD ve ark, 1980, Hamann GF ve ark, 1995, Hara A ve ark, 1995, Chen JC ve Simon R, 1997, Carbonell T, 2007). Femoral kateter yöntemi ile oluşturulan hipovolemiyi izleyen reperfüzyondan 15 dakika sonra bile pH, pO<sub>2</sub> ve pCO<sub>2</sub>'lerin normal düzeylerine döndükleri belirtilmiştir. Bu faktörlerin dışında, hemodilüsyon da kan viskozitesinin

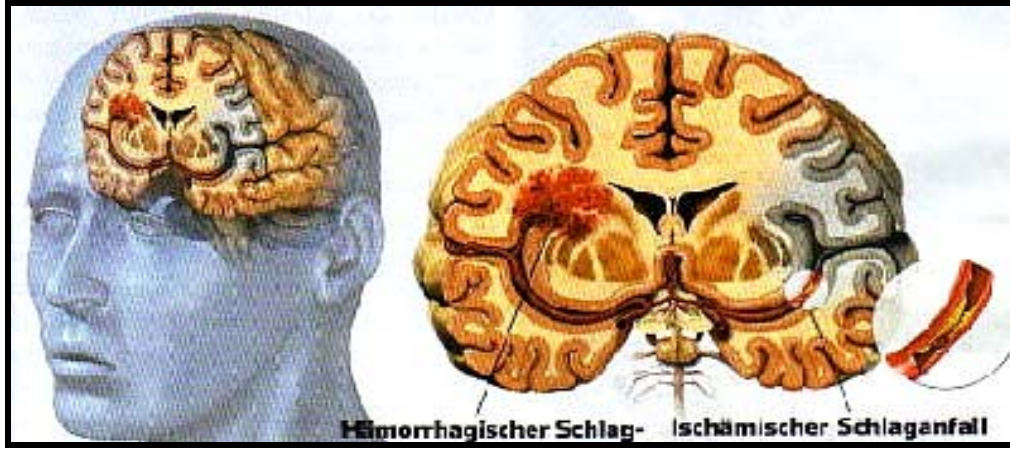
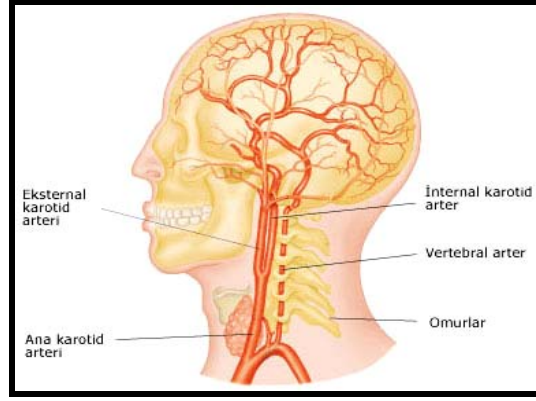
azalmasına, reperfüzyonun etkinliğinin artmasına ve oksijenasyonun daha başarılı olmasını sağlaması nedeniyle önemlidir. Özellikle hipotermi ile birleştirildiğinde beyin hasarının azalmasında oldukça etkin koruma sağlamaktadır (Fagan SC ve ark, 2004).

İR inflamasyon ve onu takibeden olaylardan oluşan bir fenomen olup yeni protein senteziyle karakterizedir. İn vivo ve invitro çalışmalar bir antioksidan enzim olan NOS proteinlerinin mekanizmada yer aldığını düşündürmektedir. Aynı zamanda bu proteinler kısa süreli İR hasarının oluşmasında yer almaktadırlar. Önceki çalışmalarda endotelial hücrelerin oksidatif bir stres altında kaldığında sitotoksik bir hasara uğradığını göstermiştir. Oluşan oksidatif stresin bir birikime ulaştığında hücre ölümünü de tetiklediği gösterilmiştir. Dokunun tekrar oksijenlenmesi döneminde nötrofillerin adezyon yeteneğini artırarak endotel hücrelerine çok daha sıkı yapıştığı bulunmuştur. Yani inflamasyon sürecinde nötrofiller ve endotel hücreler arasındaki artan adezyon beyin dışındaki organlarda İR hasarının uzak organlardaki etkisini açıklamakta temeli oluşturmaktadır (Cepinskas G ve ark, 2001, Demiryürek ve ark, 2004). Klinik çalışmalarda alt ekstremitelerde İR durumunda intersitisyel ödem ile karakterize pulmoner hasar ve disfonksiyon olduğu gözlemlenmiş ve hayvan deneyleriyle bu hasarın nötrofil aktivasyonu doku ödemi ve konjesyonuyla ilişkili olduğu gösterilmiştir. Artmış SOR'nin ve nötrofil infiltrasyonunun İR sonrası uzak organ hasarında rol oynadığı düşünülmüştür. Özellikle polimorf nüveli lökosit degranülasyonu sonucu artan SOR ve proteazlar akciğer endotel hasarını ve buna bağlı gelişen artmış pulmoner kapiller geçirgenliğe neden olmaktadır. Sonuç olarak pulmoner vasokonstriksiyon, hipertansiyon ve artmış pulmoner vasküler geçirgenlik endotel hücre fonksiyonunun bozulması en sık görülen durumdur. Sıçanlarda ayrıca akciğer dokusunda TNF konsantrasyonunda NO üretimine bağlı olarak arttığı saptanmıştır. NO gibi serbest radikallerin yanı sıra etkileşime girdiği ve peroksinitrit gibi moleküllerin oluşuyla sitotoksik etkiler artmaktadır. Artmış pulmoner kapiller geçirgenliğin sürfaktanın inaktive olduğu alveollerde plazma transüstasyonuna neden olduğu saptanmıştır (Ekim H ve ark, 2005, Nelson K ve ark, 1991, Kandilci ve Gümüşel, 2005). Akciğer dokusunda oluşan tüm bu değişikliklerde IL-12 ve 18 gibi sitokinlerin ve TNF ile IFN gibi proteinlerin yer aldığı gösterilmiştir (Resim 1.8). Beyin dışındaki organlarda İR sonrası oluşan sistemik asidozisin hipotansiyon ile birleşerek NO üretimini arttırdığı ve böylece akciğerde inflamasyona neden olduğu gösterilmiştir (Pedoto A ve ark, 1999, Gao Y ve ark, 1999, White BC ve ark, 2000). Bu düşünce asidoz ile artmış karbondioksit ile ilişkisinin

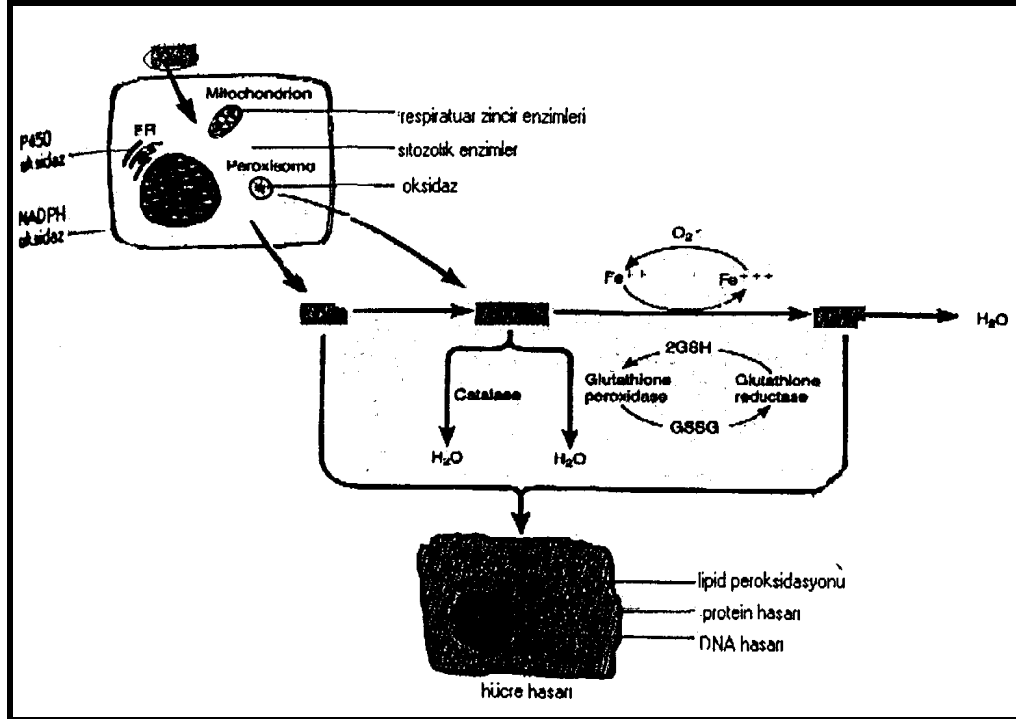
mikrodamarlarda değişikliğe neden olarak iNOS artımına sebep olduğu ve böylece akciğer doku hasarı yaptığını düşündürmüştür (Resim 1.9). Önemli bir klinik saptama olarak akciğer transplantasyonu için hazırlanan beyin ölümü gerçekleşmiş insanların akciğer dokusunda oluşan değişikliklerin incelenmesi amacıyla yapılan hayvan deneyinde, sıçan akciğeriyle elektro mikroskopik olarak kapiller-alveol membran hasarı gözlenmiş ve hipertansiyon tedavisi yapıldığı takdirde akciğer hasarındaki inflamasyonun azaltıldığı görülmüştür. Aort klempleme yöntemiyle yapılan deneysel yöntemlerde iskemik alanda kan akımının yeniden sağlanması ile o alanla ilgili reperfüzyon sağlansa bile ölümcül seyredebilen özellikle akciğer olmak üzere miyokard ve böbrekler gibi uzak organlarda hasar gözlenebilmektedir. İR çalışmalarında uzak organ hasarı olarak gerçekleşen akciğer patolojisinde (Resim 1.10A) interstisyel ödem ile karakterize hasar pinömosit ve bronşiyol epitel hücrelerini içeren apopitoz saptanmıştır. Oluşan hasarın artmış inflamatuvar hücre infiltrasyonu, alveoler endotelial hücre hasarı ve artmış mikrosirkülasyon geçirgenliği olduğu görülmüştür (Resim 1.10Ba-g). Bu mekanizmalarda yer alan sitokin ve proteinlerin kaspaz aktivasyonu ile apopitozi tetiklediği düşünülmüştür. Ayrıca artmış oksijen basıncının artmış apoptotik hücre sayısı ile uyumlu olduğu bulunmuştur (Naoki ve ark, 2002, Collange O ve ark, 2005).

Bu çalışmada amaçlanan, oldukça kompleks, birçok mekanizmanın birlikte çalıştığı, beyinde oluşturulan global iskemi sürecine, metabolizmanın etkisini ve akciğer dokusunda yaptığı değişikliklerin araştırılmasıdır. Böylece metabolik bozuklukta oluşan değişikliklerin en önemli bölümünü olan akciğer dokusu histolojik, immunohistokimyasal ve morfometrik yollarla histopatolojisi olarak araştırılacaktır. Burada kullanılan mekanizmaların aydınlatılması, bu konu ile ilgili alınan sonuçların yorumlanması ile özellikle tedavinin yönlendirilmesi ve prognozda önemli rol oynayacaktır.

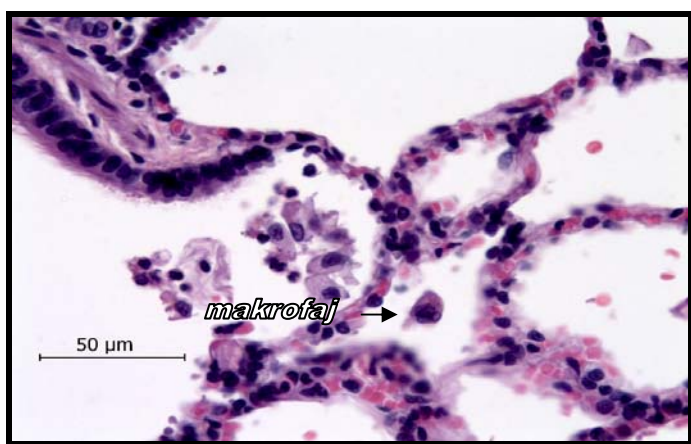
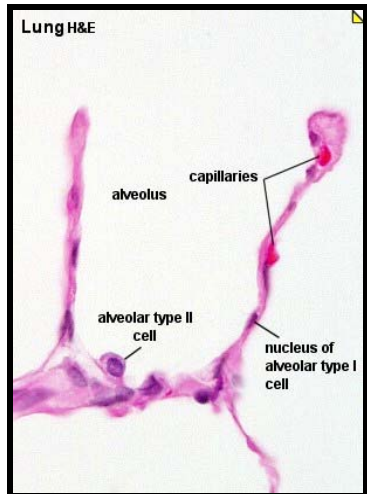
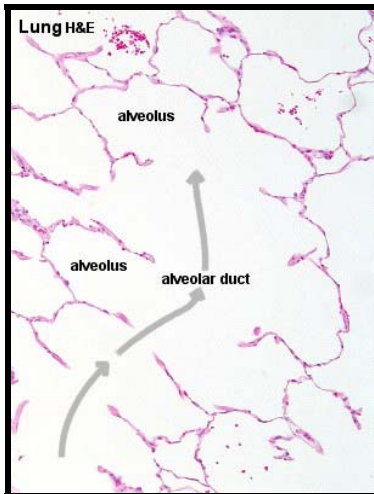
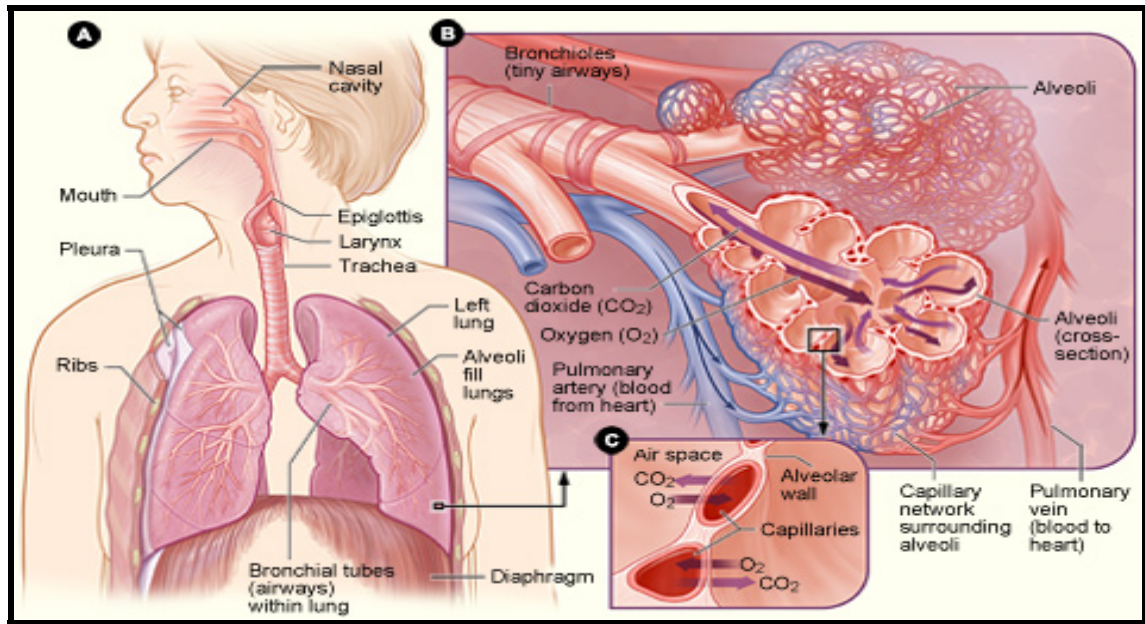




Resim 1.1 Karotid arter oklüzyonuna bağlı beyin iskemisi

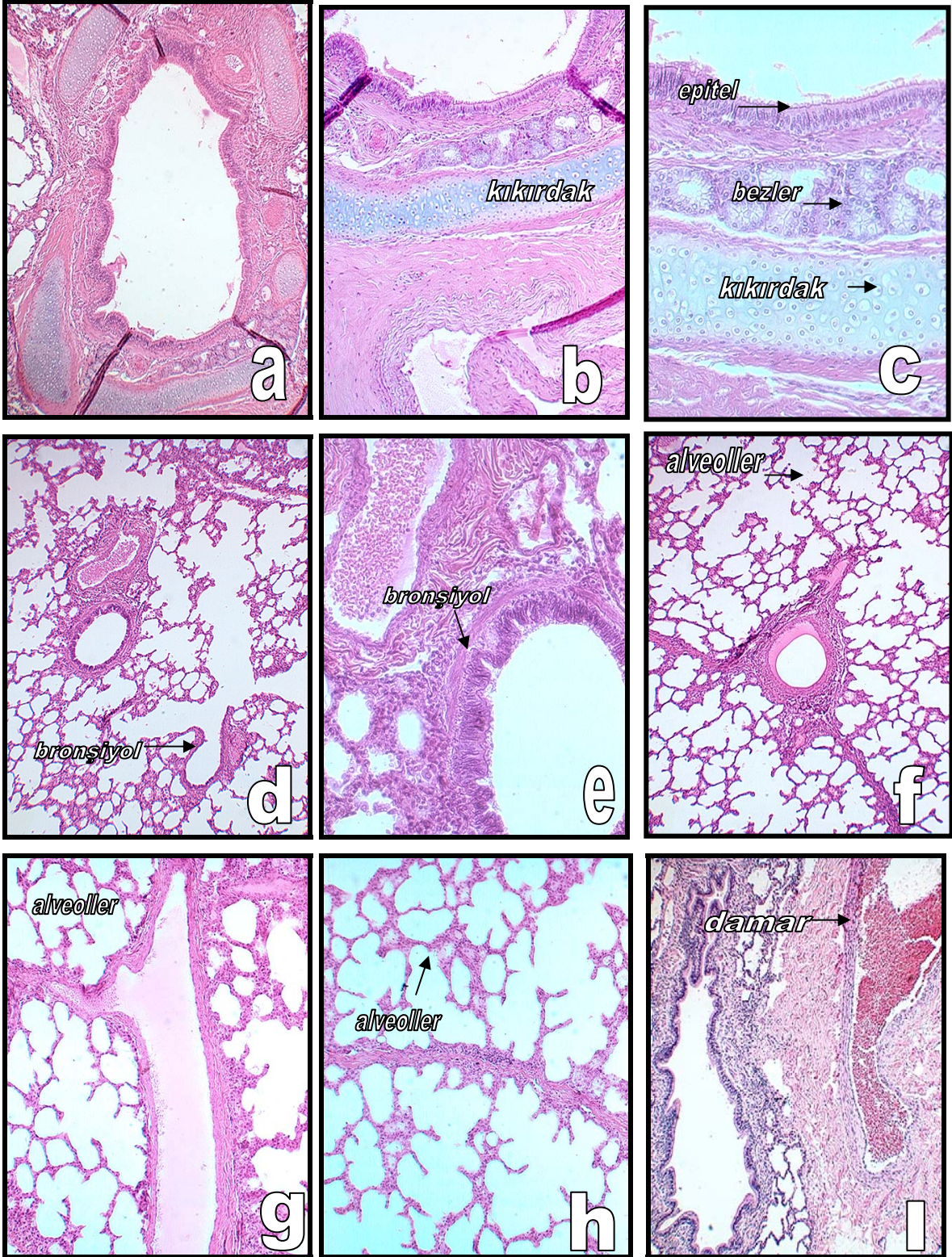


Resim 1.2 İskemi Reperfüzyon hasarı



**Resim 1.3** Akciğerin anatomisi ve histolojisi.  
[http://anatomy.iupui.edu/courses/histo\\_D502/D502f04/Labs.f04/respiratory%20lab/Respiratory%20System%20Lab.html](http://anatomy.iupui.edu/courses/histo_D502/D502f04/Labs.f04/respiratory%20lab/Respiratory%20System%20Lab.html)

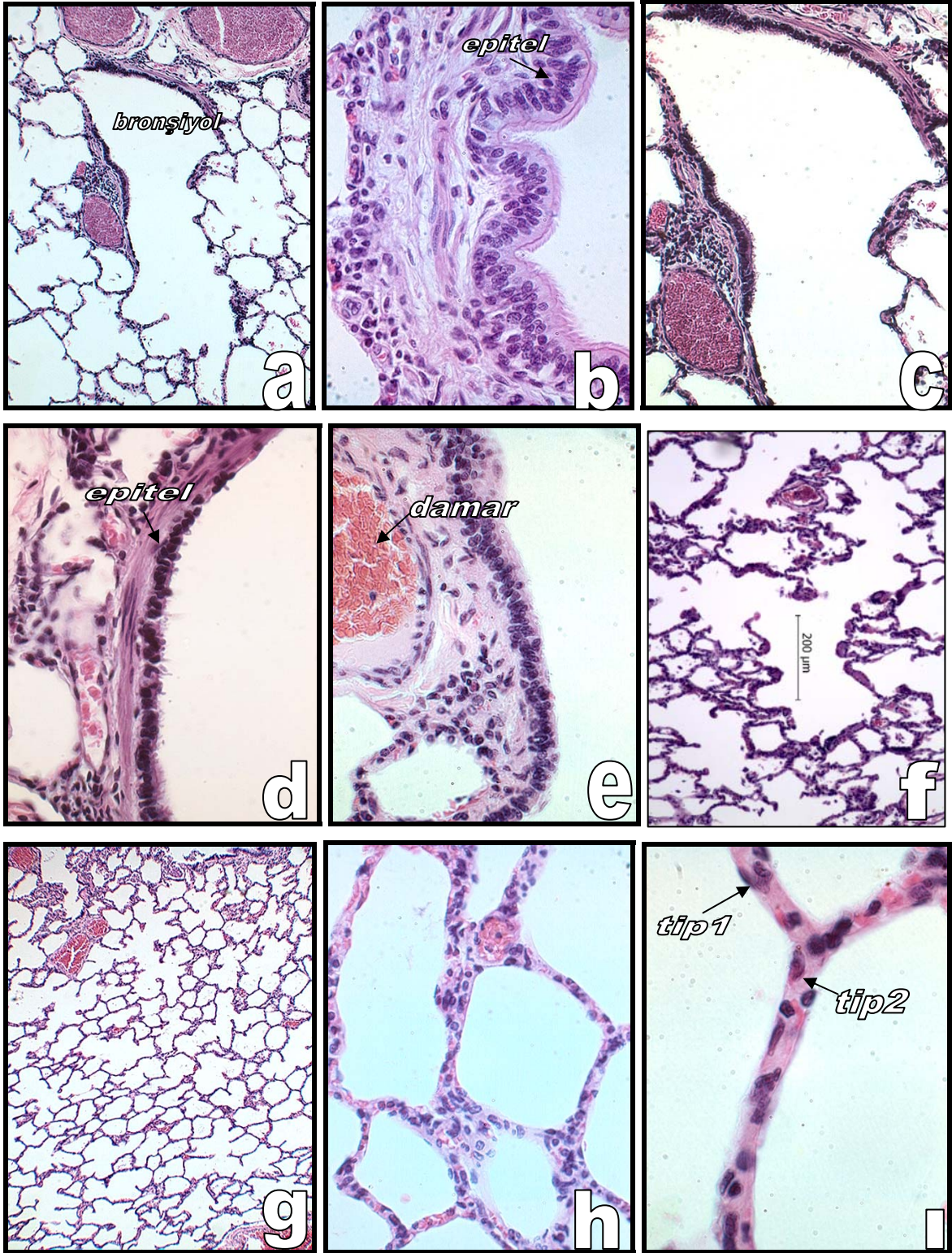




Resim 1.4A Akciğerin histolojisi.

- [http://anatomy.iupui.edu/courses/histo\\_D502/D502f04/Labs.f04/respiratory%20lab/Respiratory%20System%20Lab.html](http://anatomy.iupui.edu/courses/histo_D502/D502f04/Labs.f04/respiratory%20lab/Respiratory%20System%20Lab.html)

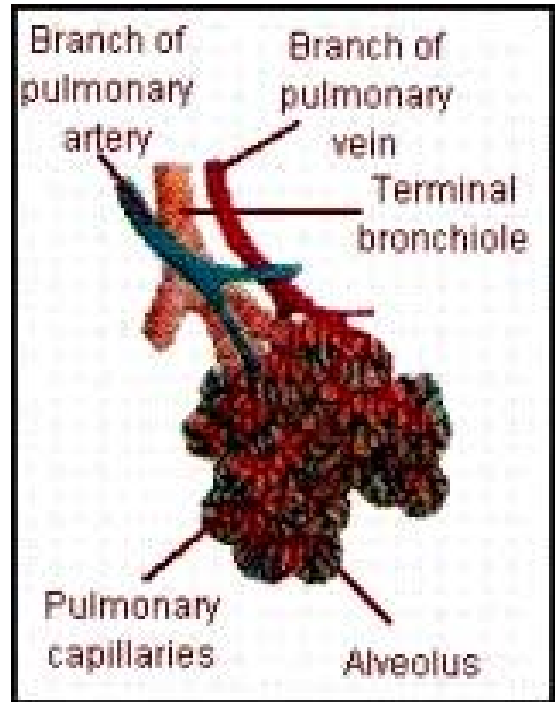
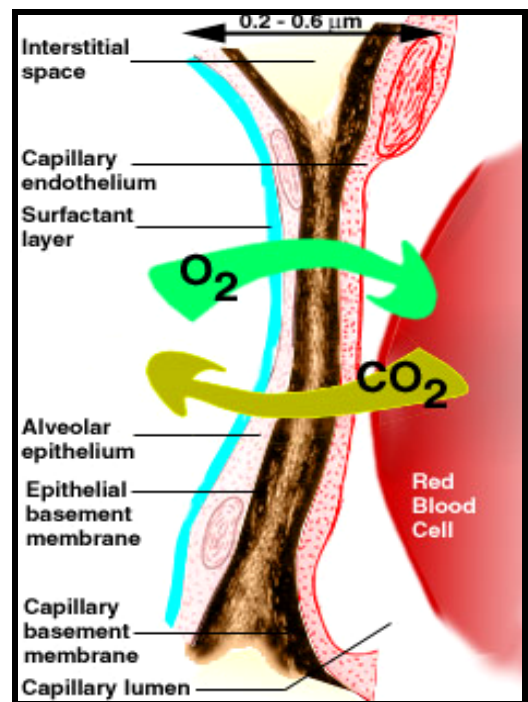
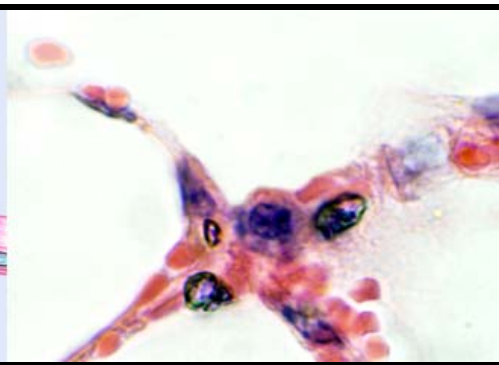
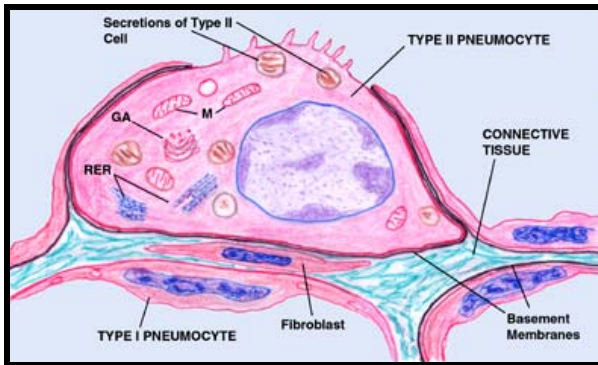
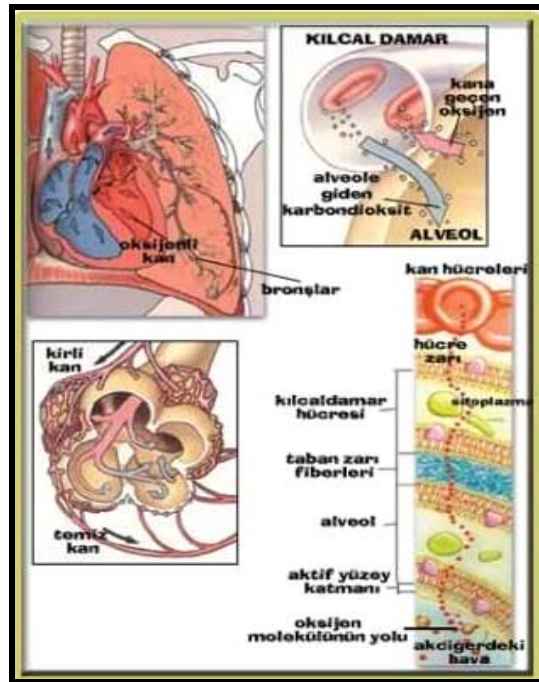
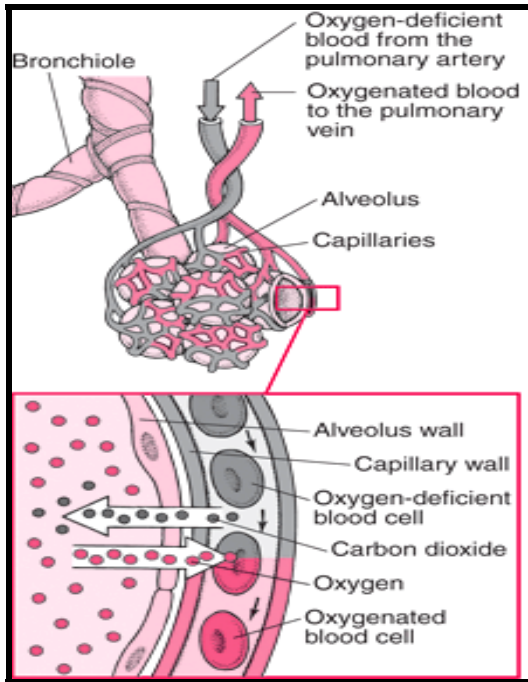




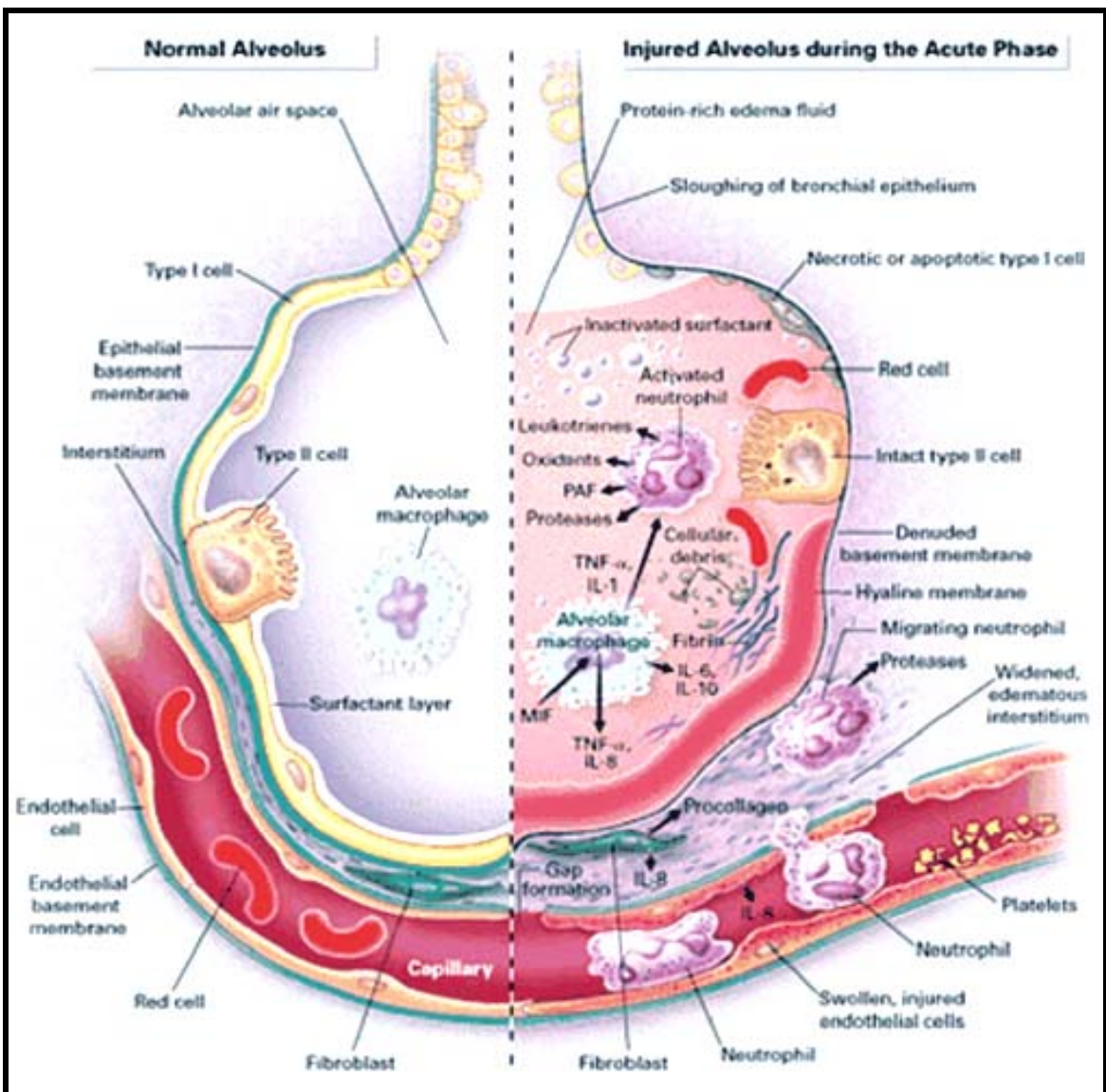
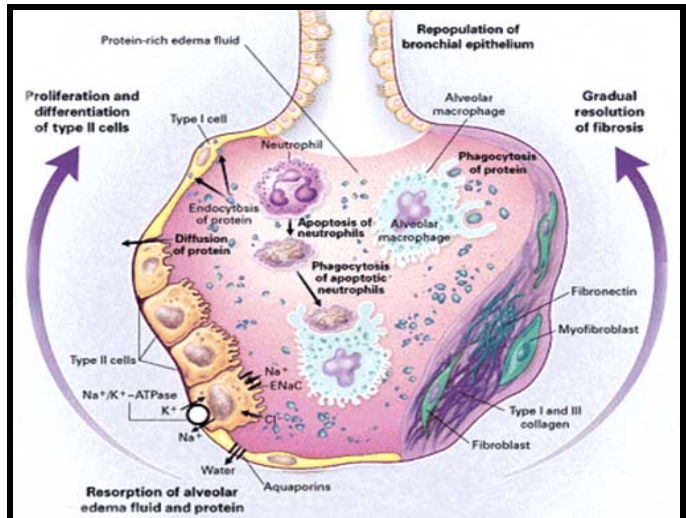
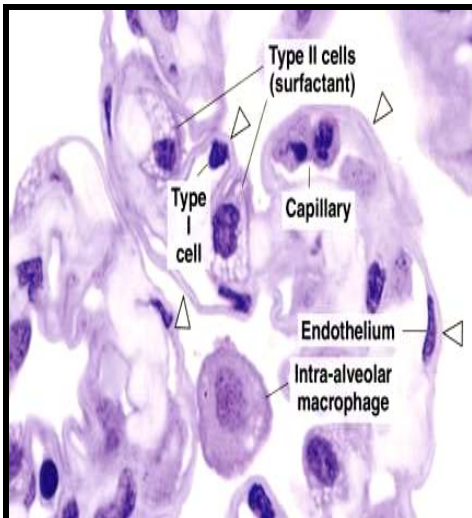
Resim 1.4B Akciğerin histolojisi.

- [http://anatomy.iupui.edu/courses/histo\\_D502/D502f04/Labs.f04/respiratory%20lab/Respiratory%20System%20Lab.html](http://anatomy.iupui.edu/courses/histo_D502/D502f04/Labs.f04/respiratory%20lab/Respiratory%20System%20Lab.html)

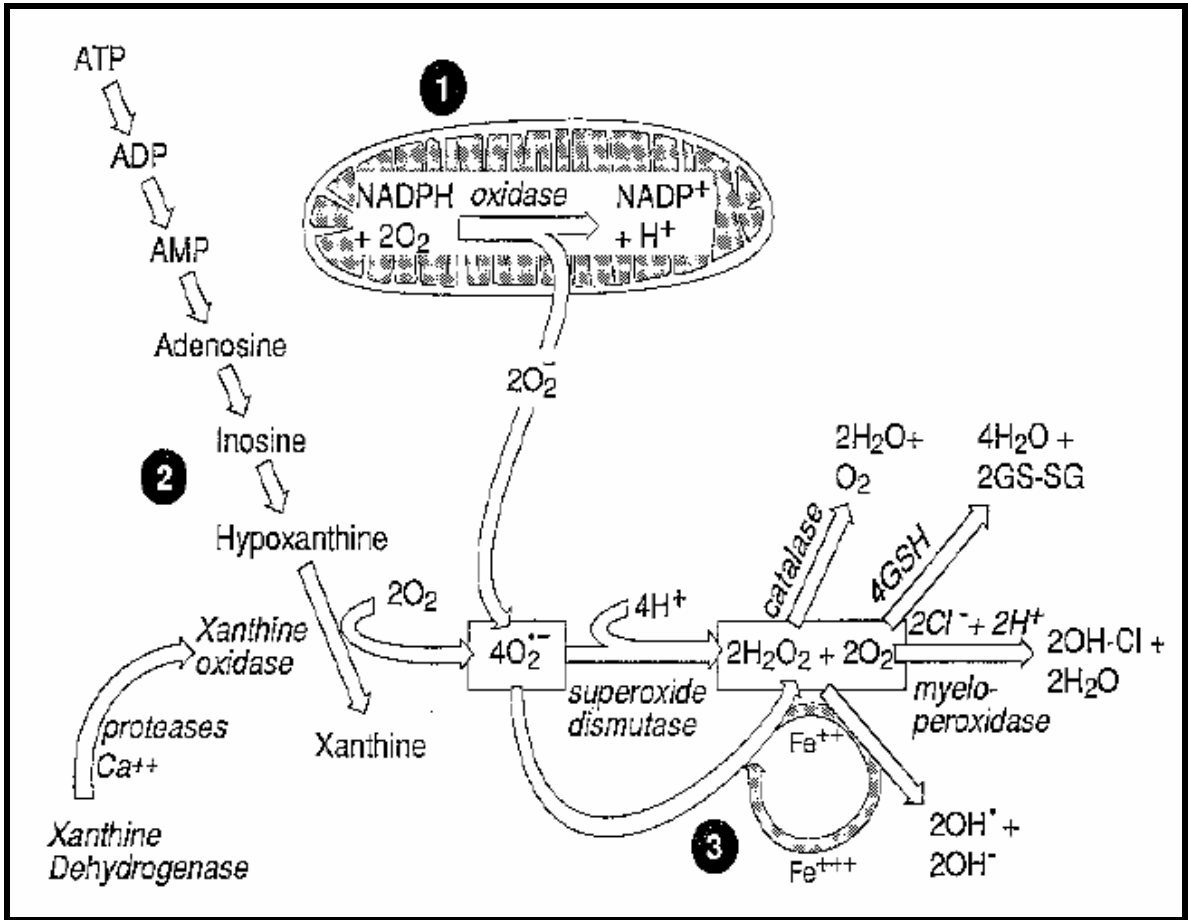
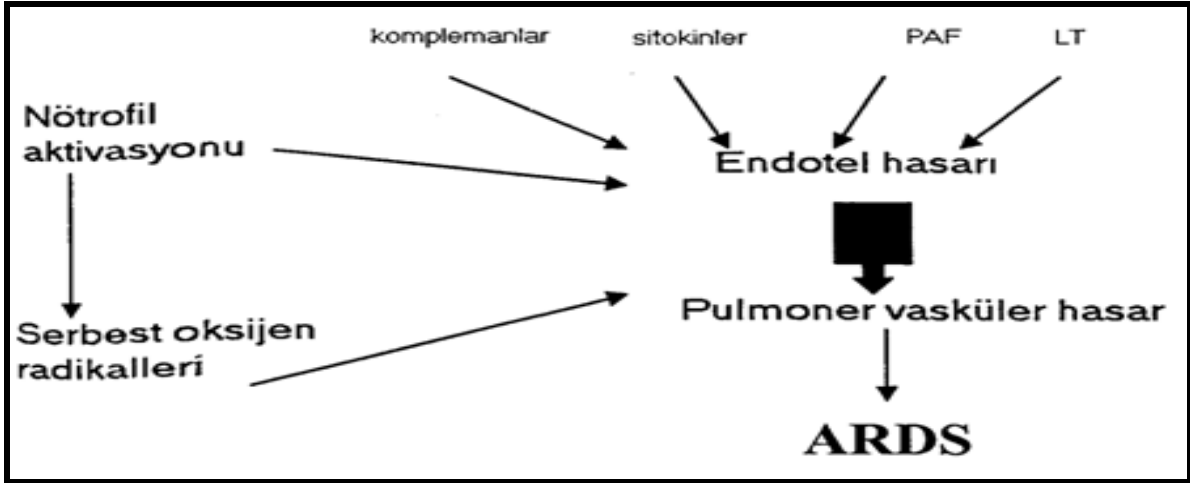




Resim 1.5 Akciğerin kan hava bariyeri.  
[education.vetmed.vt.edu/.../labs/Lab25/lab25.htm](http://education.vetmed.vt.edu/.../labs/Lab25/lab25.htm)

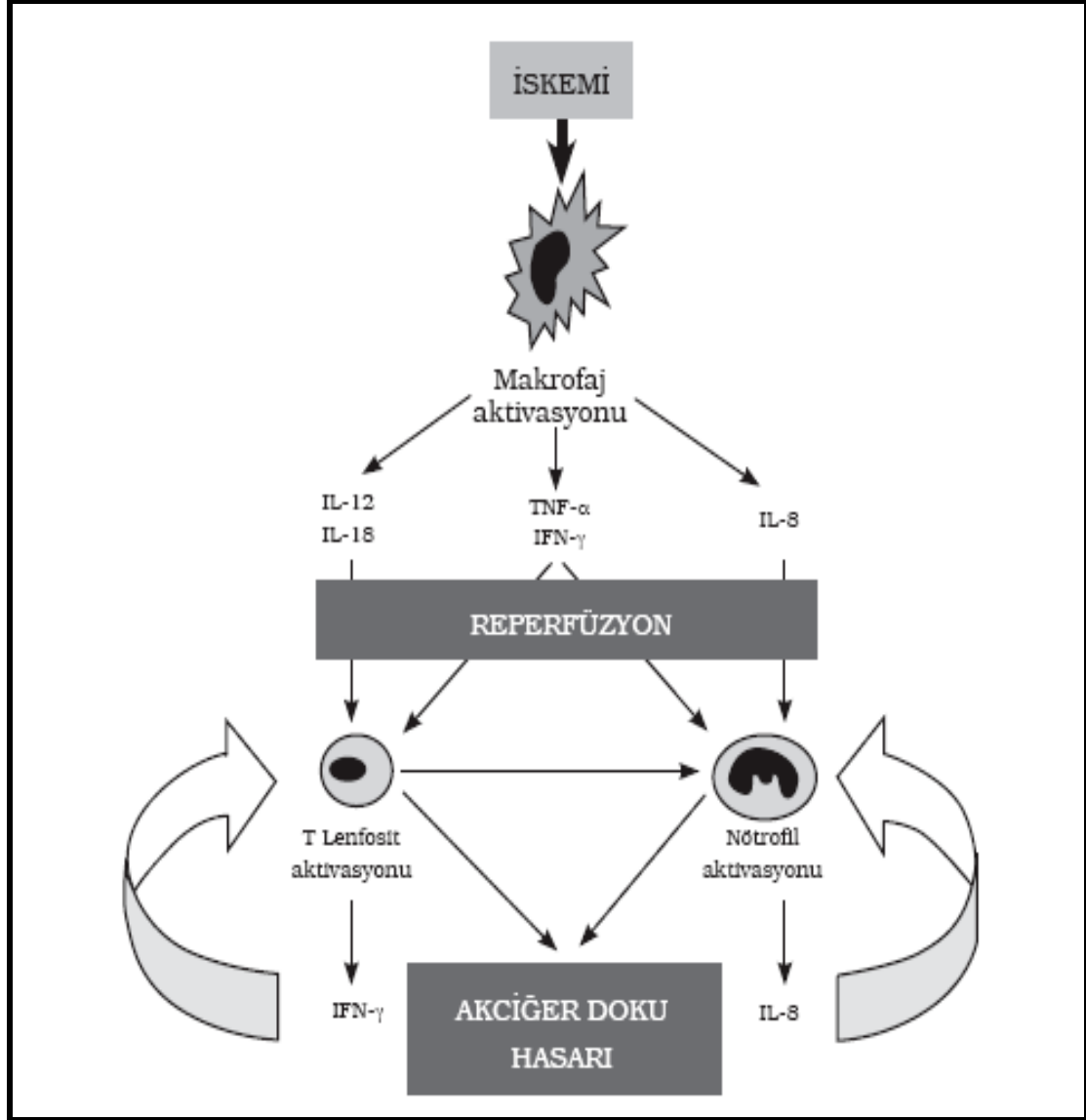
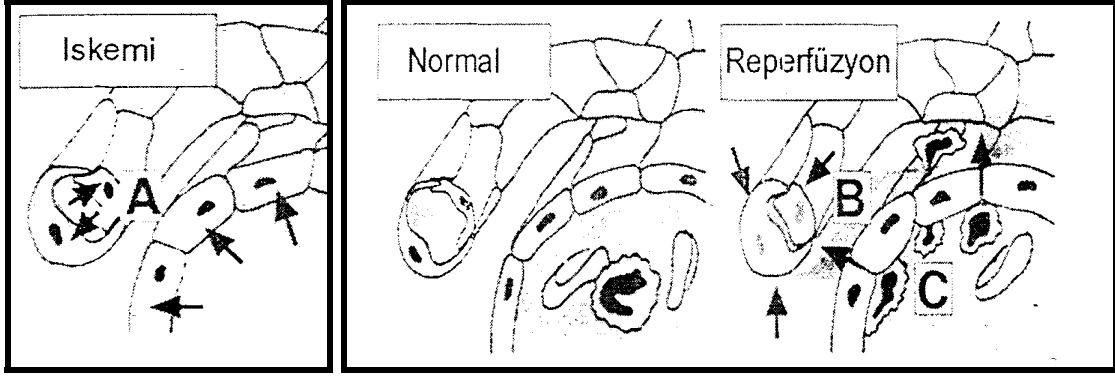


**Resim 1.6** Akciğerin histopatolojik mekanizmaları.  
[www.nature.com/.../n1s/fig\\_tab/0707603f4.html](http://www.nature.com/.../n1s/fig_tab/0707603f4.html)

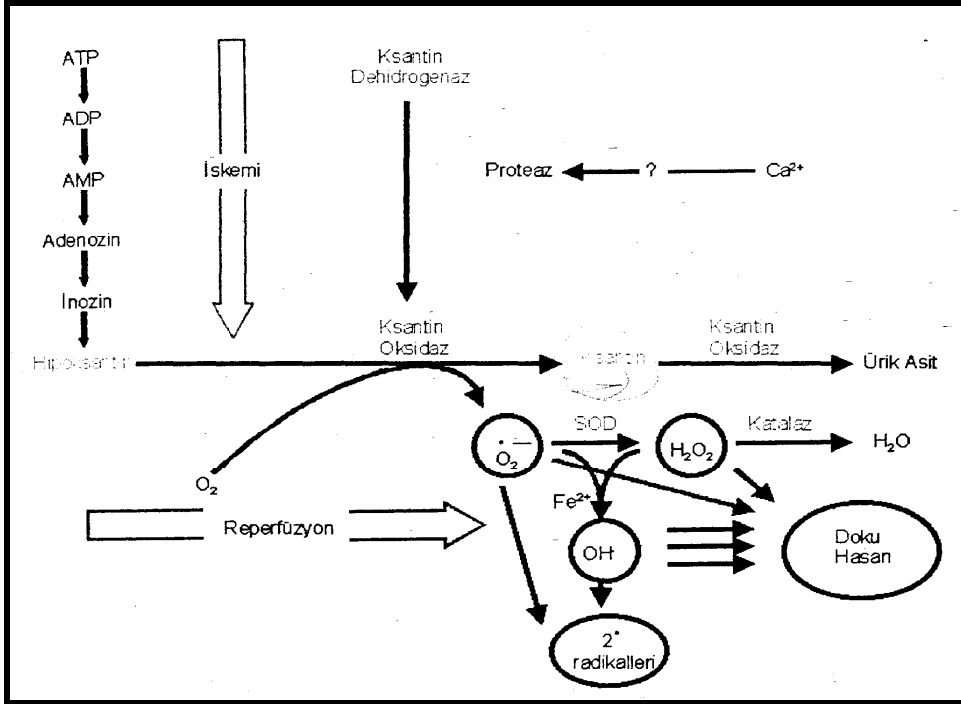
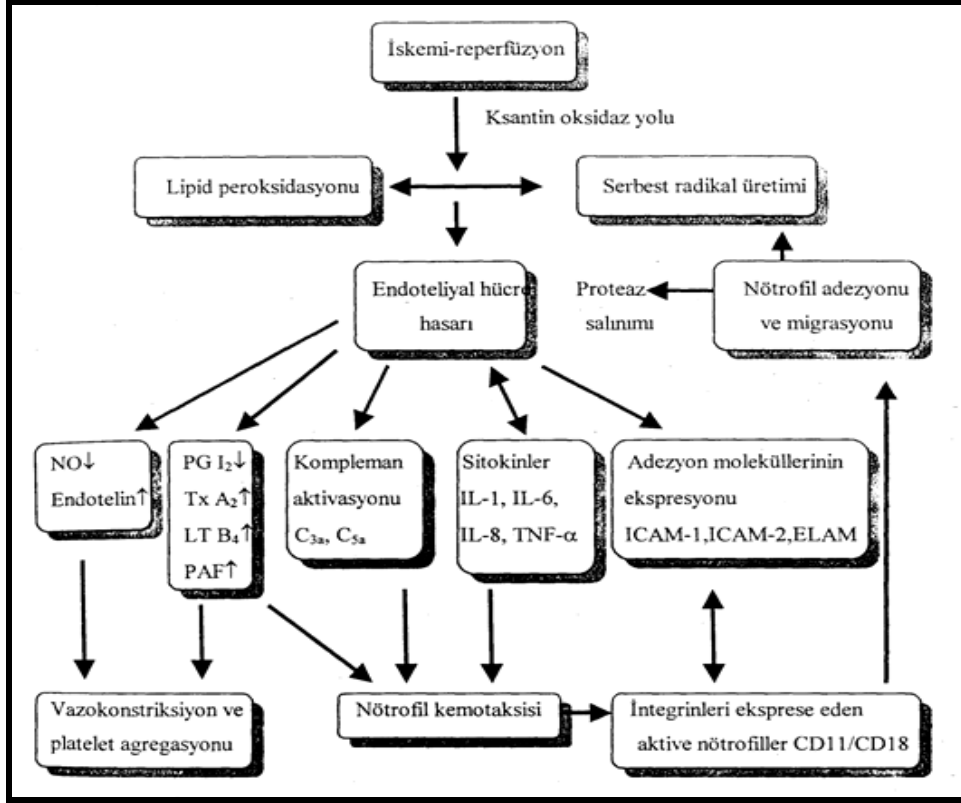


**Resim 1.7** İR sonrası gelişen akciğer hasarı oluşumunda yer alan faktörler. 1. Solunum işleminin sonucunda normal fizyolojik koşullarda, oksijen radikalleri esas olarak hücrenin mitokondrilerinde olmak üzere, aynı zamanda nötrofillerde ve makrofajlarda üretilir. 2. İskemik periyotta ATP hipoksantine indirgenir, ksantin dehidrogenaz ksantin oksidaza dönüştürülür. 3. Perfüzyon gerçekleşince hipoksantin ksantine dönüştürülürken bu sırada O<sub>2</sub> ve H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> üretilir. Fe<sup>+2</sup> varlığında OH<sup>-</sup> radikali üretilir (Haber-Weiss reaksiyonu).

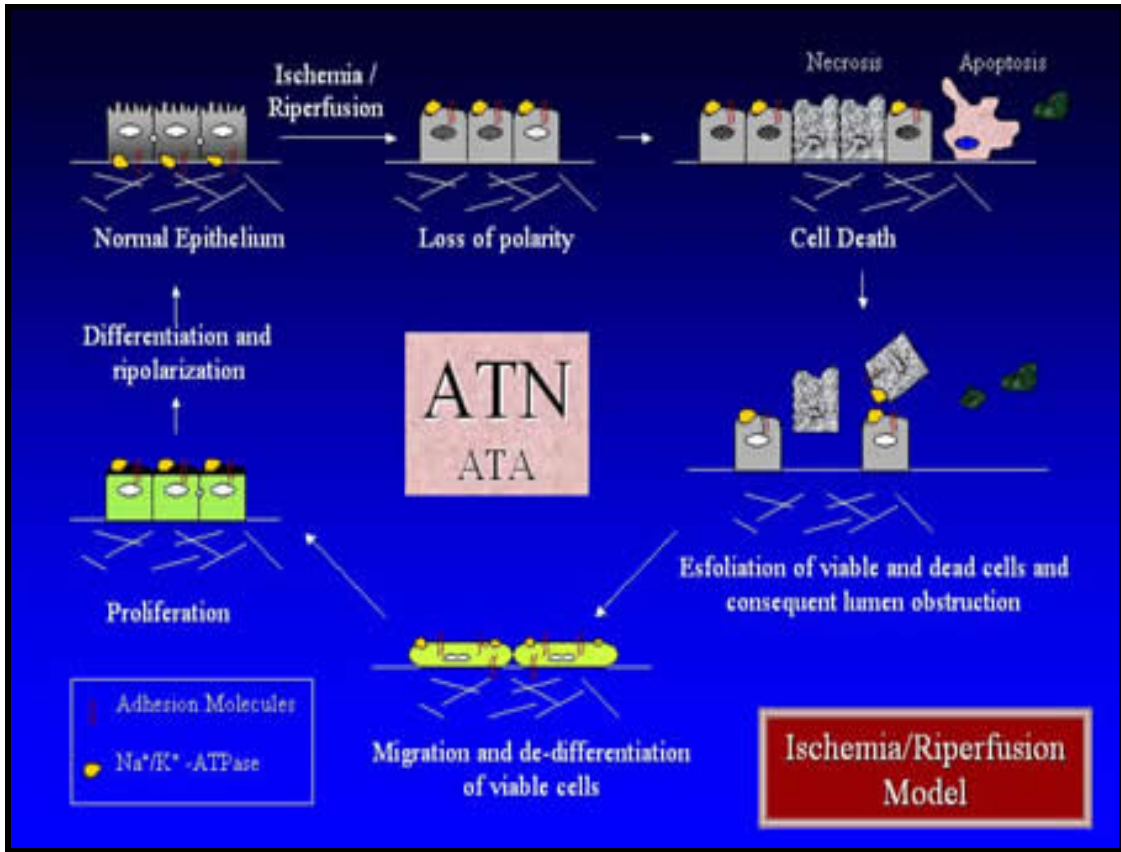
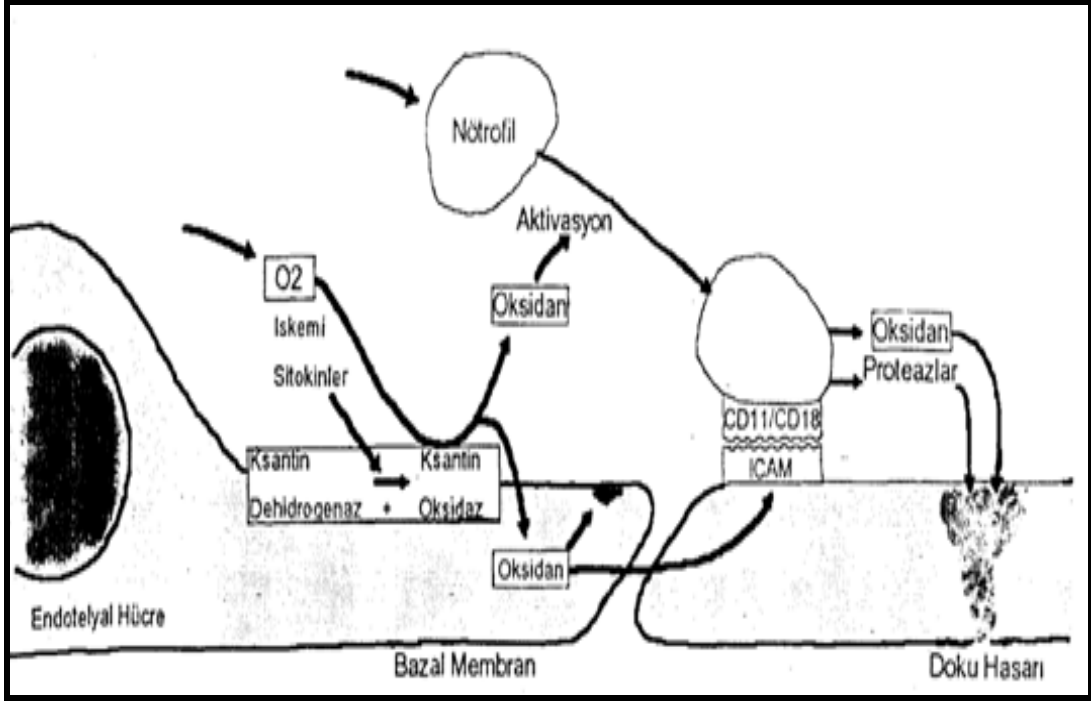




**Resim 1.8** İR sonrası gelişen mikrodolaşım bozukluğu. İskemi sırasında enerji bağımlı sodyum/potasyum pompa yetersizliği ile endotel hücre bozukluğu görülür. İskemik dokuya oksijenize kanın dönüşü lökosit adezyonu ve migrasyonunu stimüle eder. SOR inflamatuvar mediatörlerin oluşumuna neden olur ve endotel bariyeri bozularak sıvı ve makromoleküllerin ekstravazasyonuna yol açar. Bu mekanizmaların içerisinde İL ve TNF benzeri mediyatör proteinler yer alır (Kandilci ve Gümüşel, 2005).

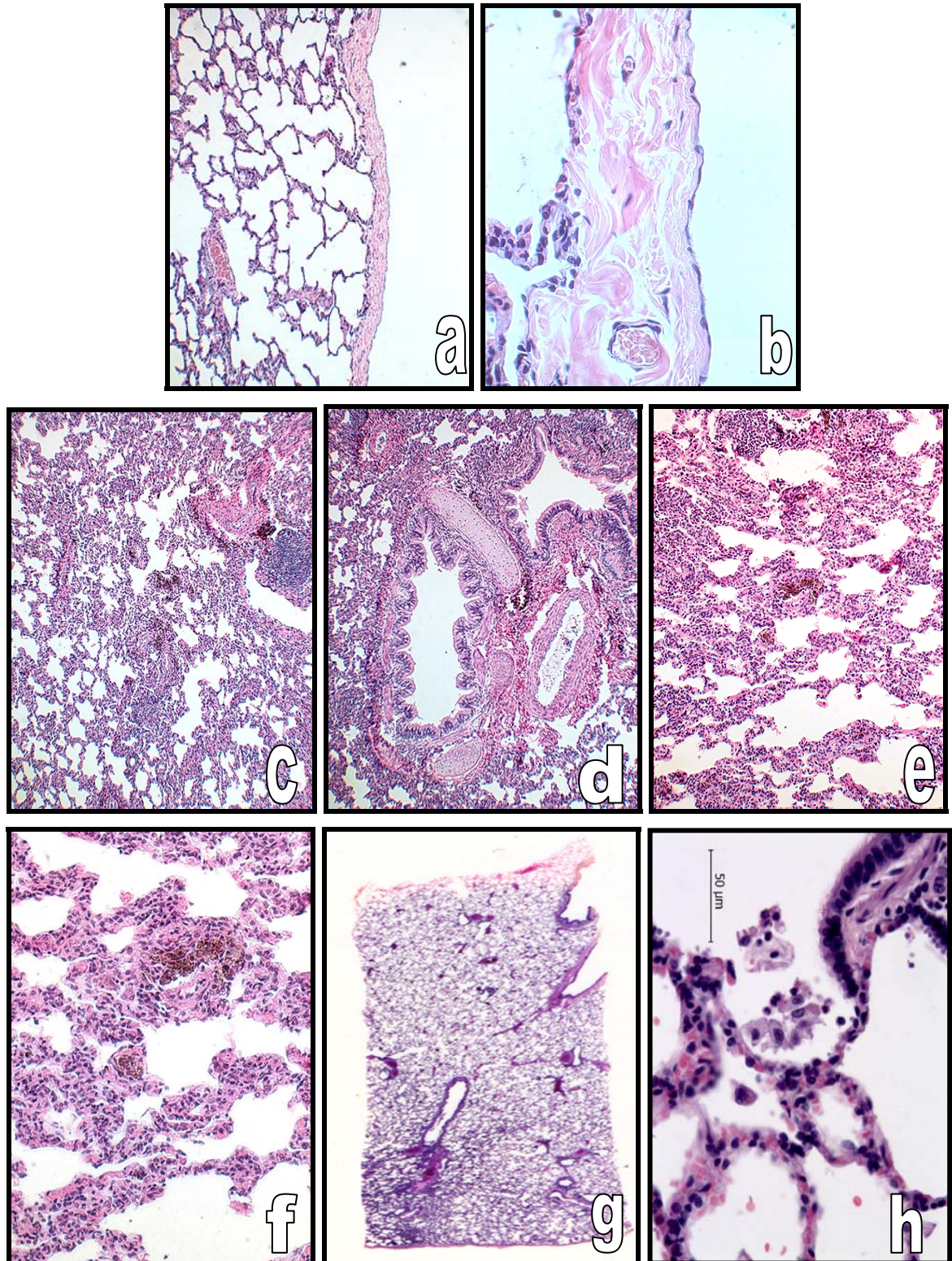


**Resim 1.9.** İR hasarında endotel hücreleri için ksantin yolağı ve nötrofil aktivasyonunun ürettiği moleküller ve etkileri (üst). Ortama reperfüzyon sırasında yeniden oksijenin girmesi, süperoksit anyonun ve diğer reaktif oksijen metabolitlerinin ortaya çıkmasına yol açarak Hidroksil radikali Fe veya Cu katalizörlüğünde Haber-Weiss reaksiyonu ile veya sadece Fe katalizörlüğünde H ile etkileşerek Fenton reaksiyonu ortaya çıkar. İR hasarında endotel hücreleri ile SOR üretimi ve nötrofil hareketi ile doku hasarı oluşur (alt).



**Resim 1.10.** İskemi sonrası oluşan oksidatif stres ve fagositer hücre aktivasyonu ile (üst) reperfüzyonun birleşmesi ile gelişen hücre davranışları ve ölümü.





**Resim 1.11** Akciğerin histopatolojisi.

- [http://anatomy.iupui.edu/courses/histo\\_D502/D502f04/Labs.f04/respiratory%20lab/Respiratory%20System%20Lab.html](http://anatomy.iupui.edu/courses/histo_D502/D502f04/Labs.f04/respiratory%20lab/Respiratory%20System%20Lab.html)

## NOS TİPLERİ

Özellikleri	1. Tip	2. Tip	3. Tip
Adı	cNOS	iNOS	eNOS
Bulunduğu Doku	Nöron ve Epitel	Makrofajlar ve Düz Kas Hücreleri	Endotel Hücreleri
Kalsiyum bağımlılığı	Gerekli	Gereksiz	Gerekli

**Tablo 1.1** NOS tipleri.

## APOPİTOZ İLE NEKROZ ARASINDAKİ FARKLAR

ÖZELLİK	NEKROZ	APOPİTOZ
Dağılım	Komşu hücre grupları	Dokuda tek tek hücreler
Nedenler	Her zaman patolojik	Fizyolojik/ patolojik
Eksüdatif yangı	Genellikle var	Yok
Işık mikroskopi	Bazofili, piknoz karyoreksis, karyolizis	Kresentik görünüm eozinofilik partikül
Elektron mikroskopi	Hücrede şişme, membranda yırtılma, kromatinde erime, kayıp	Volüm kaybı, apoptotik cisimcikler
Fagositoz	Mononükleer hücreler	Fagositik hücreler ve komşu
Mekanizma	Kimyasal ya da yapısal parçalanma	Makromolekül sentezini gerektiren aktif hücresel yıkım

## APOPİTOZ VE GENLER

APOPİTOZU BASKILAYAN GENLER	APOPİTOZU İNDÜKLEYEN GENLER
Bcl-2 grubundan BHRL-1, bcl-xl, bcl-w, bfl-1, brang- 1, mcl-1, Al	Bcl-2 grubundan Bad, Bax, Bak, Bcl-xS, bad, bik, Hrk 1
c-abl geni	c-myc
Ras onkogeni	p53, p21
Çözünebilir fas	Fas (CD95 / APO1) FADD /MORT, RIP, FAST
p35	İnterlökin dönüştürücü enzim benzeri proteinler (İCE)
A 20	LOH (MTS1/CDK41)

**Tablo 1.2** Apoptoz ile Nekrozun farkları ve genler ile ilişkisi.



## 2. GEREÇ VE YÖNTEM

Çalışma Celal Bayar Üniversitesi Tıp Fakültesi Deney Hayvanları Etik Kurulu tarafından onaylanmış ve çalışma sırasında Helsinki Deklarasyonu Laboratuvar Hayvanları Komitesi tarafından yayınlanan ‘Laboratuvar Hayvanlarının Kullanım ve Bakım İlkeleri’ bildirisinin ilgili maddelerine uyuldu. Denekler işlemler süresince ışık kaynağı ile ısıtılmış ve vücut ısıları  $37 \pm 0,5$  °C olacak şekilde ayarlandı. Bu çalışmada erişkin, erkek, Wistar sıçanların ( $250 \pm 20$  g) kullanılması amaçlandı. Deney hayvanlarına ketamin (90 mg/kg) + ksilazin (8 mg/kg) anestezisi altında, daha önceden literatürde tanımlanmış olan global iskemi (Gİ) yöntemlerinden 2 damar oklüzyonu (2-VO) ve hipovolemi metodu ile iskemi ve reperfüzyon uygulandı (Kato H ve ark, 1991). Femoral arter kateteri yerleştirilerek, hipovolemi için gereken kan alındı, kan basıncı monitorizasyonu sağlandı (PowerLab bilgisayarlı sistemi ile) ve kan gazı için örnek alındı. Deneylerde her grupta 5 deney hayvanı kullanıldı. Ön tanımlama için hipovolemi sağlandıktan sonra iki taraflı karotis arterleri tanımlama amaçlı olarak 10 dk süre ile travmatik iplikle kapatıldı. Gİ grubu ÖT’den 48 saat sonra gerçek iskemi için, 20 dk süreyle iki taraflı karotis arteri oklüzyonu uygulandı. İR grubu için iskemi sonrası 48 saat beklenildi. Kontrol olarak sham (SH) grubuna karotislere iskemi uygulamadan bağlanıp hemen açıldı. Cerrahi işlemler ameliyat mikroskobu (Möller Spectra) altında yapıldı. İskemi sürelerinin sonunda anestezisi altında intrakardiyak perfüzyon fiksasyonu takiben beyin ve akciğerler çıkarılarak histokimyasal ve immunohistokimyasal boyamalar için takibe alındı. Her aşamadan önce ve sonra metabolik durumun takibi için kan gazı (Roche OPTI-CCA kan gazı analiz cihazı) analizi yapıldı (Tuğlu ve ark, 2004).

İnfarkt alanlarını belirlemek için, bazı hayvanların beyinleri kardiyak perfüzyon yapılmadan alınıp, hızlı bir şekilde 2 mm lik kesitlere bölünerek 20 dakika süre ile 37°C de % birlik 2, 3, 5 triphenyltetrazolium chloride (TTC) solüsyonuna alındı. Normal beyin dokusu kırmızı boyanırken iskemik dokular soluk pembe veya kirli beyaz renkte görülüp boyama göstermedi. Bu kesitler disseksiyon mikroskobu ve dijital kamera aracılığı ile bilgisayar ortamına alındı ve fotoğraflandı. İnfarkt, iki boyutlu ortamda kesitler üzerinde boyanmayan alanların tüm alana oranı şeklinde saptandı (Bederson JB ve ark, 1986, Maier CM ve ark, 1988).

Beyinler formalin ile fiske edilip hücresel komponentlere ışık mikroskopik, immunohistokimyasal (S100beta, GFAP, NOS, TUNEL) ve morfolometrik yöntemlerle

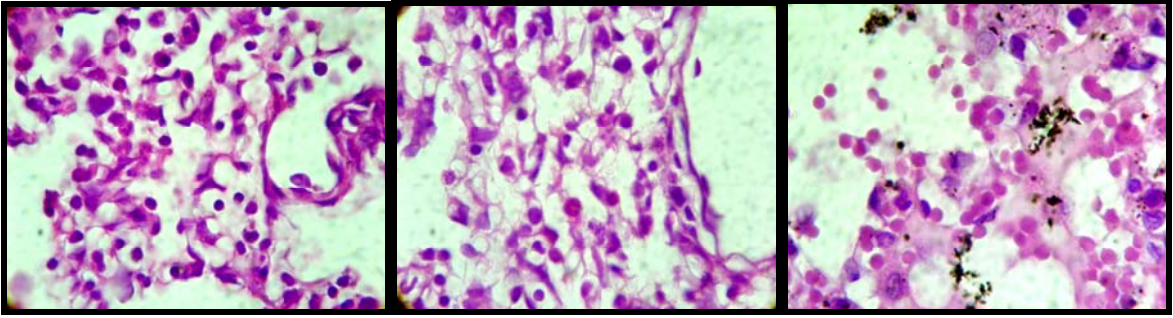
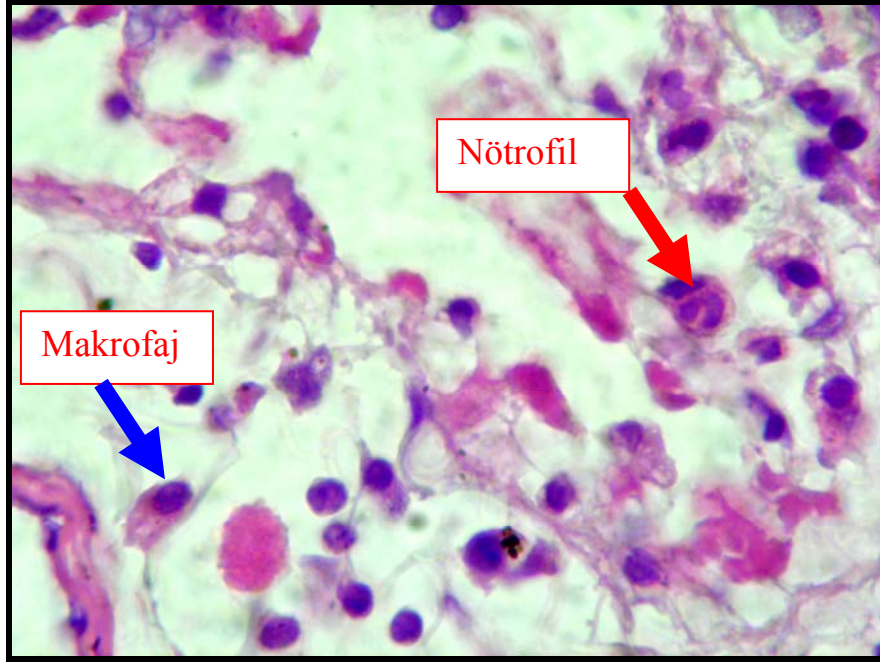
incelendi. İmmunohistokimyasal değerlendirme için S100beta (anti-S100, DAKO, Carpintera, CA), GFAP (anti-GFAP, Sigma, St. Louis, MO), NOS (anti-eNOS (lot-1711P501A) ve anti-iNOS (lot- # C1005 FC651) Neomarkers, Fremont, CA-) ve TUNEL (Promega G7130 kit Madison, Wisconsin, USA) antikorları kullanıldı.

Çıkarılan akciğerler uzunlamasına ikiye bölünüp formalin fiksatif ile 24 saat daha fiske edildi ve alkol serisinde dehidrate edilip parafine gömüldü. 5 µm seri kesitler deparafinize edilip, H-E ile boyandı (Tablo 2.1). Konuyu ve preparatları bilmeyen gözlemci tarafından mikroskop altında histolojik ve morfometrik bakıları yapıldı. Alınan akciğer örneklerine rutin H-E boyaması, oksidatif stres için NOS ve apoptotik hücreleri saptamak için TUNEL immunohistokimyası uygulandı (Mikuz ve ark, 1985, Nguyen ve ark, 1999, Stadelmann ve Lassmann 2000). Kesitlerin değerlendirilmesinde preparatların Olympus BX-40 model ışık mikroskobu altında alınan görüntüleri bilgisayar dijital ortama aktarıldı. Deney gruplarında, bilateral karotid arter oklüzyonu (BKAO) ile Gİ için taklit (SH) grubu, BKAO ile 10 dk iskemi uygulaması (ÖT), aynı gruba 48 saat sonra BKAO ile 20 dk. iskemi uygulaması (Gİ) ve 20 dk. iskemi sonrası 48 saatlik reperfüzyon (İR) grubu olarak her grupta 5 adet erkek sıçan kullanıldı. Histopatolojik incelemede alınan kesitler ışık mikroskopisi ile 40, 100, 400 ve 1000'lük büyütme ile incelendi (Tablo 2.2). Tüm kesitler kör olarak, ödem, alveoler yapı bozukluğu ve inflamasyon hücrelerinin irritasyonu açısından değerlendirildi. Bu değerlendirmeye göre akciğer hasarı, normal veya teknik hasar (+), konjesyon (++), vasküler konjesyon ve interstisyel ödem (+++), alveol yapısında minimal bozulma ve inflamasyon hücrelerinin minimal infiltrasyonu (++++) , alveol yapısında masif bozulma ve inflamasyon hücrelerinin masif infiltrasyonu (+++++) olarak derecelendirildi (Resim 2.1). Kesitlerde immunohistokimyasal boyanma, yarı-kantitatif inceleme ile sırasıyla çok az veya yok (+1), az (+2), orta (+3), şiddetli (+4) ve çok şiddetli (+5) olarak değerlendirildi (Temeltas G ve ark, 2005, Ochs M, 2006, Vatansever D ve ark, 2008).

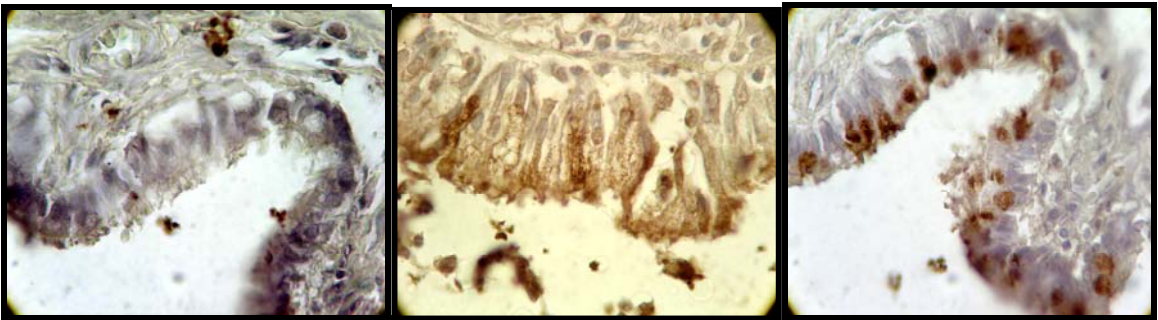
NOS immunohistokimyasında dokular alınarak 48 saat 10% formalin ile fikse edildi. Alınan kesitler immunohistokimyasal boyama için bir gece 60°C'lik etüvde tutulduktan sonra, 30'ar dakika iki saat değişim ksilen ile şeffaflaştırma işlemi gerçekleştirildi. Ardından azalan alkol dereceleri serileri ile rehidratasyon sağlanarak distile suda 5 dakika bekletildi. % 0,5'lik tripsin solüsyonu içinde oda sıcaklığında 15 dakika tutulan kesitlere, doku endojen peroksidazını inhibe etmek amacıyla 5 dk %3'lük H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> uygulandı. 3 defa 5'er dakika fosfat tampon solüsyonu (PBS) ile yıkanan kesitlere

bloklama amacıyla 1 saat bloklama solusyonu ile muamele edildi. Bloklama solusyonu dokudan uzaklaştırıldıktan sonra primer antikorlar ile bir gece inkübe edildi. Ertesi gün tampon solusyonu ile 3 defa yıkanan kesitler, anti hidrojen peroksidaz ikincil antikorlu ile 30'ar dakika boyandı. Yine üç defa 5'er dakika tampon solusyonu solusyonu ile yıkanan kesitler, oluşturulan immunohistokimyasal reaksiyonun görünürlüğünü saptamak amacıyla diaminobenzidin tetrahidroklorit (DAB) ile 5 dk boyandı. Mayer's hematoksilen ile artalan boyaması sağlandıktan sonra distile su ile 10 dk yıkanan kesitler kapatma medyumu (Tablo 2.3 - Resim 2.2) ile kapatıldı (Vatansever D ve ark, 2008).

TUNEL yöntemi ile apoptosis DeadEnd Colorimetric TUNEL system, Promega G7130 kiti kullanılarak 5 µm kalınlığındaki parafin bloklardan alınmış kesitlere uygulandı. Kesitler 1 gece 60°C'lik etüvde deparafinize edildi. Ardından 1 saat ksilen ile tekrar deparafinize edildi. Azalan alkol serileri ile rehidratasyon uygulandıktan sonra dokular serum fizyolojik ile muamele edildi. 20 µg/ml proteinase K ile 10 dakikalık işleme tabi tutuldu. PBS ile yıkamayı takiben %3'lük hidrojen peroksit ile endojen peroksidasyon bloklandı. % 4'lük paraformaldehit uygulamasından sonra Equilibrium buffer ile 5 dakika muamele edildi. TdT enzimi ile nemli atmosferik ortamda 37 °C de 60 dakika tutuldu. SCC yıkamasının ardından 5 dk hidrojen peroksit uygulanması sonrası antistreptavidin-peroksidaz ile 30 dakikalık inkübasyona tabi tutuldu ve ardından DAB ile boyama yapıldı. Aralarda PBS yıkama solusyonu ile yıkamalar yapıldı. Artalan boyaması Mayer's Hematoksileni ile yapıldı (Tablo 2.4). Kör yöntemle tunel pozitif hücreler saptanmaya çalışıldı. Negatif kontrol için primer antikor yerine PBS, positif kontrol olarak da apopitoz olduğu bilinen testis dokuları kullanıldı. İmmunohistokimyasal değerlendirmede preperatlara boyanın yoğunluğu ve dağılımına göre sırasıyla çok az veya yok (+1), az (+2), orta (+3), şiddetli (+4) ve çok şiddetli (+5) olarak değerlendirildi. Ortalamalar istatistiksel olarak değerlendirildi. İstatistiksel değerlendirmede veriler graphpad 3,0 for Windows 2000 programı ile tüm sayısal değerlerin ortalaması ve standart sapması hesaplandı. Değerler ortalama ve standart deviasyon (SD) olarak belirtildi. Kruskal Wallis nonparametrik ANOVA çoklu karşılaştırma testleri çalışma ve kontrol grubunu karşılaştırmak için kullanıldı ve p değeri <0,05 ise istatistiksel olarak anlamlı kabul edildi (Turnage ve ark, 1998, Vural KM ve Öz MC, 2000).



**Resim 2.1** Beyin İR sonrası akciğer dokusu üzerine göç eden makrofaj (mavi ok) ve nötrofil (kırmızı ok) gösterimi ile hasarın HE boyamasına göre en az (+1, sol), orta (+2, orta) ve en çok (+5, sağ) boyamaları için örnekleme.



**Resim 2.2** Beyin İR sonrası akciğer dokusunda yapılan immunohistokimyasal morfometride kullanılan en az (+1, sol), orta (+3, orta) ve en çok (+5, sağ) boyamaları için örnekleme.

**Tablo 2.1. Parafin doku takibi**

<b>İşlem</b>	<b>Madde</b>	<b>Süre</b>
<b>Tespit</b>	%10 formalin,	48 saat
<b>Fiksatifin uzaklaştırılması</b>	Akar su	1 gece
<b>Dehidratasyon</b>	% 60 etil alkol	30 dk
	% 70 etil alkol	30 dk
	% 80 etil alkol	30 dk
	% 95 etil alkol	50 dk
	% 95 etil alkol	50 dk
<b>Şeffaflaştırma</b>	Ksilen – Alkol	30 dk
	Ksilen	60 dk
	Ksilen	60 dk
<b>Emdirme %60 C etüv</b>	Ksilen parafin	30 dk
	Parafin	60 dk
	Parafin	60 dk
<b>Gömme</b>	Parafin	

**Tablo 2.2. Hematoksilen - Eozin Boyaması**

<b>İşlem</b>	<b>Madde</b>	<b>Süre</b>
<b>Deparafinizasyon</b>	60°C etüvde	1 gece
<b>Deparafinizasyon</b>	Ksilen I	30 dakika
	Ksilen II	30 dakika
<b>Rehidratasyon</b>	% 95 alkol	2 dakika
	% 80 alkol	2 dakika
	% 70 alkol	2 dakika
	% 60 alkol	2 dakika
<b>Yıkama</b>	Akar su	5 dakika
<b>Boyama</b>	Hematoksilen	2 dakika
<b>Yıkama</b>	Akar su	5 dakika
<b>Diferansiyasyon</b>	Asit alkol	2-3 saniye
<b>Boyama</b>	Eosin	1 dakika
<b>Yıkama</b>	Akar su	5 dakika
	% 80 alkol	1 dakika
	% 95 alkol	1 dakika
<b>Şeffaflaştırma</b>	Ksilen	1 saat
<b>Kapama</b>	Entellan	

**Tablo 2.3. İndirek immunohistokiya boyaması**

<b>İşlem</b>	<b>Madde</b>	<b>Süre</b>
<b>Deparafinizasyon</b>	60°C etüvde	1 gece
<b>Deparafinizasyon</b>	Ksilen	30 dakika
	Ksilen	30 dakika
<b>Rehidratasyon</b>	% 95 alkol	2 dakika
	% 80 alkol	2 dakika
	% 70 alkol	2 dakika
	% 60 alkol	2 dakika
<b>Yıkama</b>	Distile su	10 dakika
<b>Dokuların etrafını çizme</b>	Dakopen	
<b>Yıkama</b>	PBS	3x5 dakika
	%3'lük hidrojen peroksit	5 dakika
<b>Yıkama</b>	PBS	3x5 dakika
<b>Bloklama</b>	Blok solusyonu	1 saat
<b>Antikor ile inkübasyon</b>	iNOS, eNOS	1 gece, +4° de
<b>Yıkama</b>	PBS	3x5 dakika
	İkincil antikor	30 dakika
	Avidin-biotin kompleksi	30 dakika
<b>Yıkama</b>	PBS	3x5 dakika
<b>Boyama</b>	DAB	5 dk
<b>Yıkama</b>	Distile su	10 dakika
<b>Zıt Boyama</b>	Mayer hematoksilen	5 dakika
<b>İşlem</b>	<b>Madde</b>	<b>Süre</b>
<b>Dehidratasyon</b>	%80- %90'lık alkol serileri	2 dakika
<b>Şeffaflaştırma</b>	Ksilen	30 dakika
<b>Kapama</b>	Entellan	

**Tablo 2.4 TUNEL boyaması**

<b>İşlem</b>	<b>Madde</b>	<b>Süre</b>
<b>Deparafinizasyon</b>	60°C etüvde	1 gece
<b>Deparafinizasyon</b>	Ksilen	30 dakika
	Ksilen	30 dakika
<b>Rehidratasyon</b>	% 95 alkol	2 dakika
	% 80 alkol	2 dakika
	% 70 alkol	2 dakika
	% 60 alkol	2 dakika
<b>Yıkama</b>	Distile su	10 dakika
<b>Dokuların etrafını çizme</b>	Dakopen	
<b>Yıkama</b>	PBS	3x5 dakika
	%4'lük paraformaldehit	15 dakika
<b>Yıkama</b>	PBS	3x5 dakika
	Proteinaz K solusyonu	15 dakika
<b>Yıkama</b>	PBS	3x5 dakika
	%4'lük paraformaldehit	5 dakika
<b>Yıkama</b>	PBS	3x5 dakika
<b>Tamponlama</b>	equilibration tampon sol.	5 dk
<b>Primer antikor</b>	Enzim solusyonu	37°De 1 saat
	SSC solusyonu	10 dakika
<b>Yıkama</b>	PBS	3x5 dakika
	% 3'lük hidrojen peroksit	5 dk
<b>Yıkama</b>	PBS	3x5 dakika
	Streptavidin HRP	30 dakika
<b>Yıkama</b>	PBS	3x5 dakika
<b>Boyama</b>	DAB boyası	5 dakika
<b>Yıkama</b>	Distile su	10 dakika
<b>Zıt boyama</b>	Mayer's hematoksilen	4 dakika
<b>İşlem</b>	<b>Madde</b>	<b>Süre</b>
<b>Dehidratasyon</b>	%80- %90'lık alkol serileri	2 dakika
<b>Şeffaflaştırma</b>	Ksilen	30 dakika
<b>Kapama</b>	Entellan	



### 3. BULGULAR

ÖT grubunda 10 dk iskemi sonrası denekler, 48 saat sonra uygulanan 20 dk iskemi sonrası ile karşılaştırıldığında daha az şekilde metabolik ve nörolojik bozukluklar gösterdiler. Çok az denek İR sonrası 48 saat yaşayabildi. Çoğu deneğin özellikle metabolik bozukluktan ölmesi nedeniyle nörolojik skorlama, reperfüzyonun değerlendirilmesi ve iskemik ÖT ile ilişkilendirilmesi mümkün olmadı.

Hayvanların vücut ısılarında anlamlı bir farklılık görülmezken ( $37,1\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 1,2\text{ }^{\circ}\text{C}$ ), kan gazlarında önemli değişiklikler saptandı. İskemik tanıtım öncesi ve sonrası alınan kan gazı sonuçlarında,  $p\text{O}_2$ ,  $p\text{CO}_2$  ve pH değerlerinde, global kalıcı iskemi yapılmadan önce, metabolizmanın bozulduğu ve iskemi sonrasında bu bozukluğun daha da ilerlediği saptandı. Kan gazı analizine göre SH ve ÖT benzerlik gösterirken Gİ ve İR grubunda oldukça fazla metabolik bozukluk saptandı (Tablo 3.1). TTC boyaması yapılan kesitlerde genellikle orta hatta yerleşmiş, soluk renkte görülen infarkt alanları gözlemlendi. Alanlar asimetric yerleşmiş, lateralize, değişik büyüklüklerde yerleşim gösterdiler (Resim 3.1).

Histolojik kesitlerde beynin değişik bölgelerinde, TTC boyamasından bağımsız bir şekilde hasarlanmış, ödemli, sitoplazmik büzülme ve eosinofili gösteren, piknotik, apoptotik veya tamamen nekroze olmuş, kavite göstermiş, sayıca azalmış, nöron kaybının belirgin olduğu görüntüler saptandı. Histopatolojik bulguların TTC boyamasında görülen infarkt alanlarından bağımsız olması ve alanların heterojen şekilde asimetric dağılması dikkat çeken bulgular oldu. 48 saatlik İR sonrası H-E histokimyası ve GFAP, s100b, iNOS, eNOS ve TUNEL immunohistokimya boyamaları (Resim 3.2) ile hasar ve etkileri incelendi. İR ile oluşan gliozisi gösteren GFAP, astrosit reaktifliğini gösteren s100b, oksidatif hasarı gösteren eNOS ve iNOS ve apoptozisi gösteren TUNEL boyamaları ile fonksiyonel anlamda İR hasarı ve beyindeki etkileri morfolometrik olarak ortaya kondu (Tablo 3.2)

Metabolik bozukluğa bağlı akciğer dokusunda oluşan değişiklikler histolojik olarak incelendi. Bu amaçla yöntemde belirtilen şekilde akciğer dokuları interstisyel ödem, vasküler konjesyon, alveol yapısında bozulma ve inflamatuvar hücre infiltrasyonu açısından değerlendirildi. Grupların küçük büyütmelerinde (Resim 3.3) SH ve ÖT grubunda normal akciğer histolojisine yakın görüntüler elde edilirken Gİ ve İR

grubunda patolojik bulgular saptandı. Patolojik bulguların detayları grupların büyük büyütme görüntülerinde (Resim 3.4) gösterildi. Yapılan histomorfometrik incelemede SH ile ÖT ( $p<0,05$ ), Gİ ( $p<0,01$ ) ve İR ( $p<0,001$ ) karşılaştırıldığında akciğerde oluşan bozukluğun Gİ ve İR için anlamlı bir şekilde arttığı, ÖT ile İR arasında hasarın anlamlı ( $p<0,05$ ) olarak farklı olduğu bulundu. Gİ ve İR arasında anlamlı fark saptanmadı (Tablo 3.3).

Bağ dokusu değişikliklerinin daha detaylı anlaşılması için yapılan Mason Trikrom (MT) boyamalarında inflamasyon hücrelerinin yoğunluğuna göre H-E ile benzer sonuçlar gösterdiği ve uyumlu olduğu bulundu. SH ve ÖT grubunda normale yakın bir akciğer dokusu görülürken Gİ ve İR grubunda intraalveoler kanama, kan damarları etrafında ödem ve nötrofil infiltrasyonunun olduğu saptandı. İntraalveoler septum kalınlığında ve alveol yapısında değişiklikler gözlemlendi. Ancak kollajen ve elastik lif artışı ile ilgili gruplar arasındaki farklılığı gösterecek ve fibrozise işaret edecek bariz bir boyanma bulgusu saptanmadı (Resim 3.5).

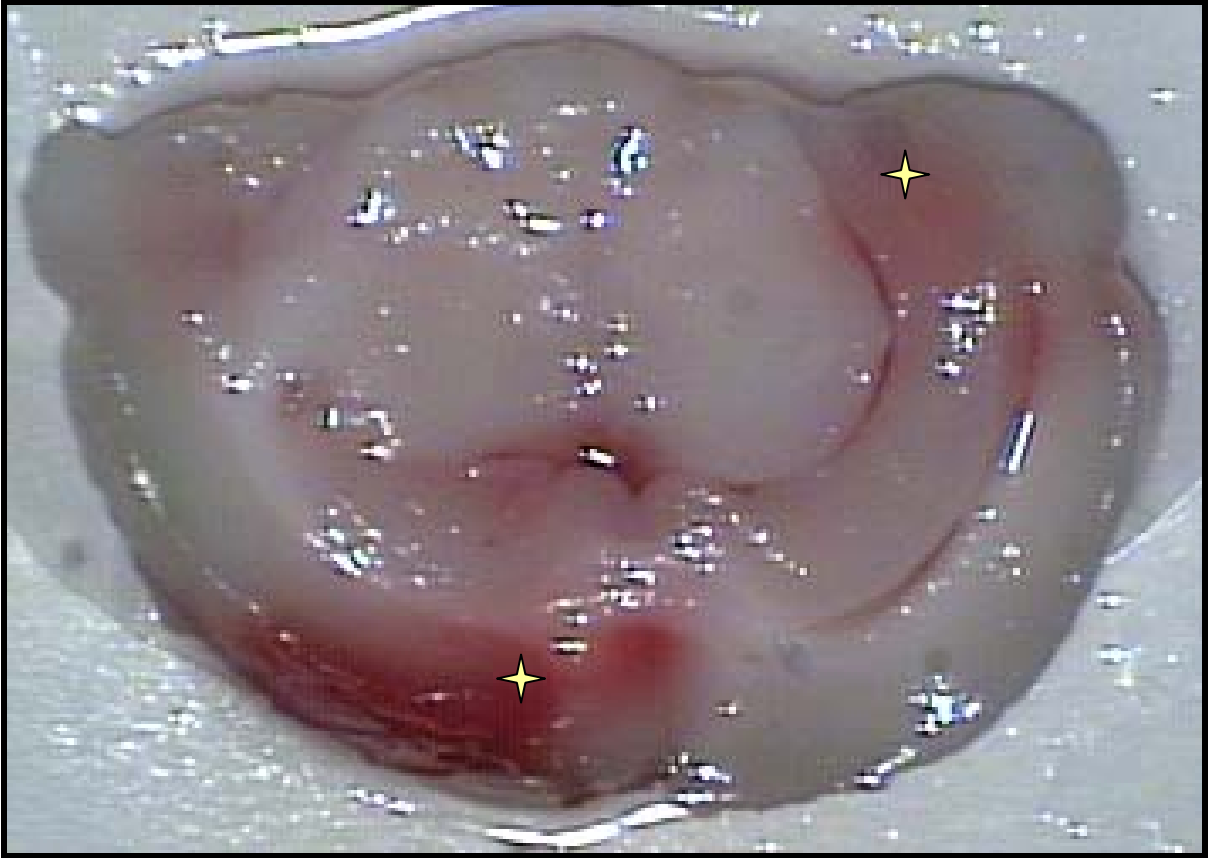
İskemi sonrası akciğerde saptanan histopatolojik değişikliklerin ortamda oluşan oksidatif strese bağlı serbest radikallerle ilişkisinin araştırılması için NOS immunohistokimyası yapıldı. iNOS boyamalarında (Resim 3.6) H-E ile uyumlu şekilde histopatolojik değişikliklerin olduğu hasarlı akciğerlerde SH grubunda bulunan bazal seviyenin üzerinde artmış boyama saptandı. Boyamanın epitelde ve bağ dokuda yoğunlaştığı, inflamasyon hücrelerine lokalize olduğu görüldü. eNOS boyamalarında (Resim 3.7) iNOS ile karşılaştırıldığında benzer artışın varlığı ve daha fazla boyamanın olduğu görüldü. SH ile ÖT arasındaki fark anlamsız iken ( $p>0,05$ ), Gİ ( $p<0,05$ ) ve İR ( $p<0,01$ ) karşılaştırıldığında akciğerde oluşan bozukluğun Gİ ve İR için anlamlı bir şekilde arttığı, ÖT ile İR arasında hasarın anlamlı ( $p<0,05$ ) olarak farklı olduğu bulundu. Gİ ve İR arasında anlamlı fark saptanmadı (Tablo 3.3).

Akciğerde histopatolojik değişiklere göre artan NOS immünoaktivitesinin artmış serbest radikal ve oksidatif stresten kaynaklanmasından dolayı, ortamda oluşabilecek hücre intiharının anlaşılması için TUNEL boyaması yapıldı (Resim 3.8). Apoptozun tanımlandığı bu boyamada yapılan morfometrik inceleme ile SH ile ÖT arasındaki fark anlamsız iken ( $p>0,05$ ), Gİ ( $p<0,05$ ) ve İR ( $p<0,01$ ) karşılaştırıldığında akciğerde oluşan bozukluğun Gİ ve İR için anlamlı ( $p<0,05$ ) bir şekilde arttığı, ÖT ile İR arasında hasarın anlamlı ( $p<0,05$ ) olarak farklı olduğu bulundu. Gİ ve İR arasında

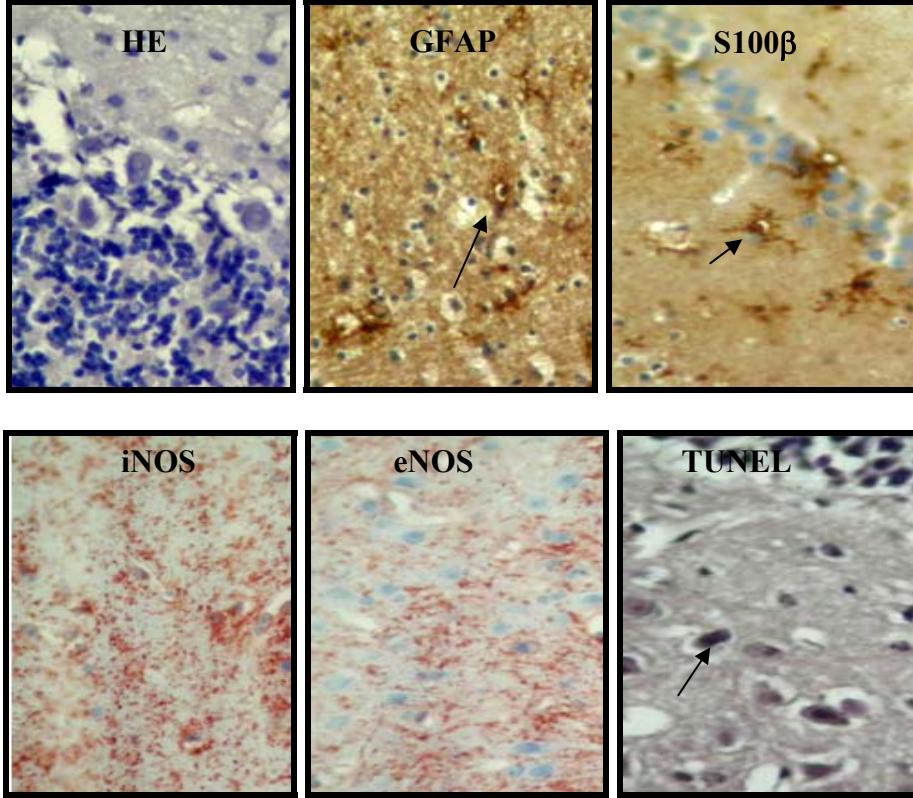
anlamli fark saptanmadı (Tablo 3.3). SH ve ÖT ile karşılaştırıldığında akciğerdeki histopatolojik bozukluğa bağı apoptotik hücre ölümünün Gİ ve İR için oldukça anlamlı ( $p<0,001$ ) bir şekilde arttığı anlaşıldı.

	pH	pO2	pCO2
SH	7.44+0.06	76.62+16.12	44.05+07.62
ÖT	7.23+0.07	77.65+24.02	54.04+17.51
Gİ	7.20+0.18	34.65+12.24	71.88+16.43
İR	7.18+0.16	23.66+17.88	80.78+19.78

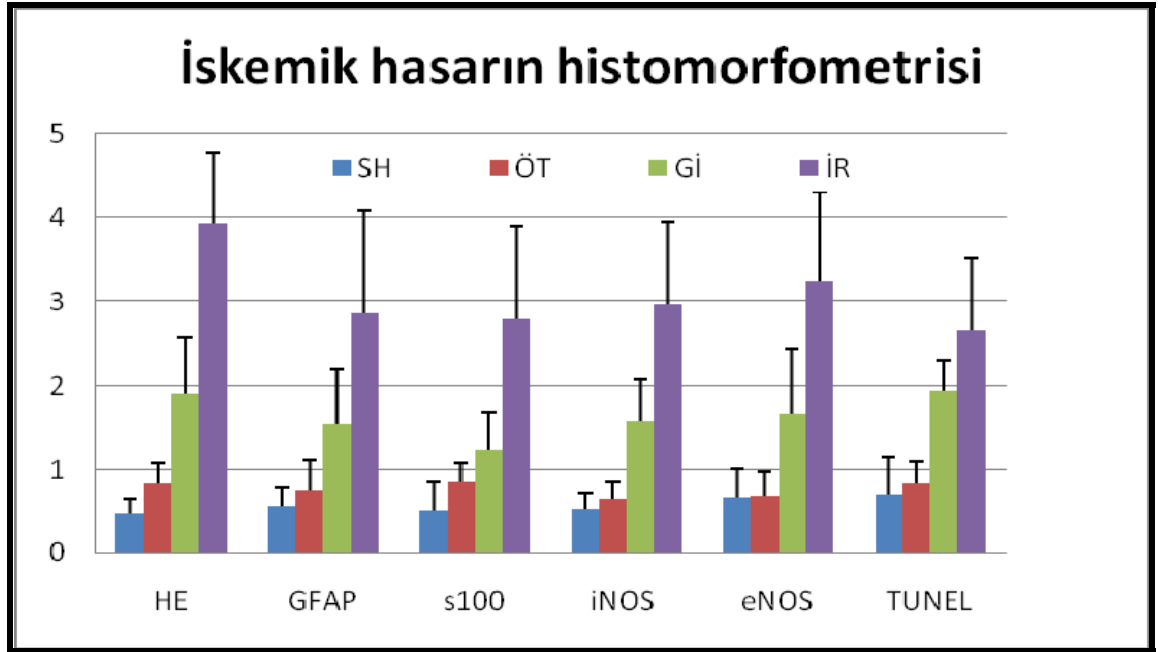
**Tablo 3.1** SH, ÖT, Gİ ve İR sonrası kan gazı analiz sonuçları. Gİ ve İR sonrasında metabolik durumun anlamlı ( $p<0.05$ ) bir şekilde bozulduğu görüldü.



**Resim 3.1** İR sonrası alınan beyin örneklerinde TTC boyaması ile iskemik alanların görüntüsü (☆).

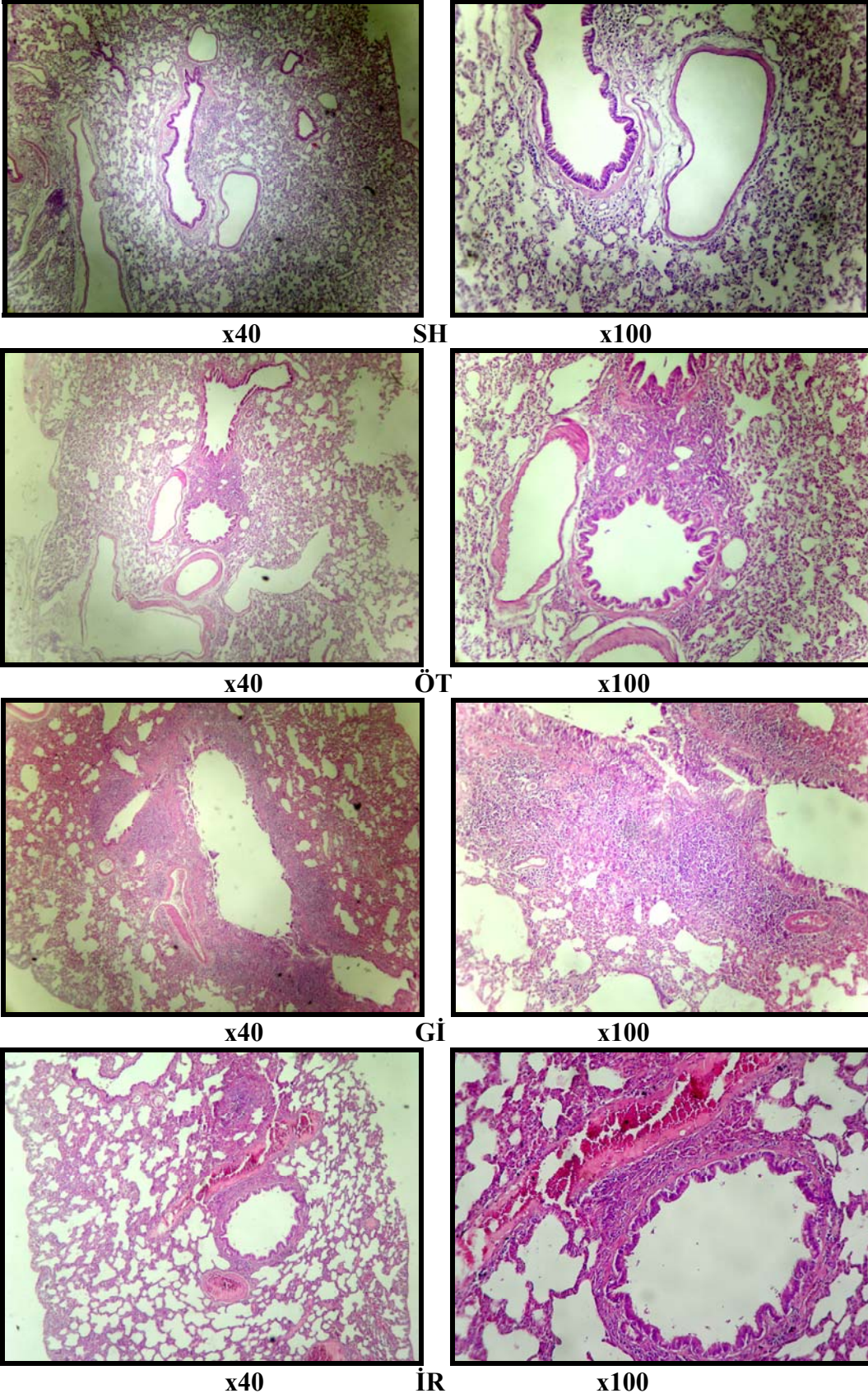


**Resim 3.2** İskemik hasar bölgesinde H-E histokimyası ve GFAP, S100β, iNOS, eNOS ve TUNEL immunohistokimya boyamaları (X40 büyütme).



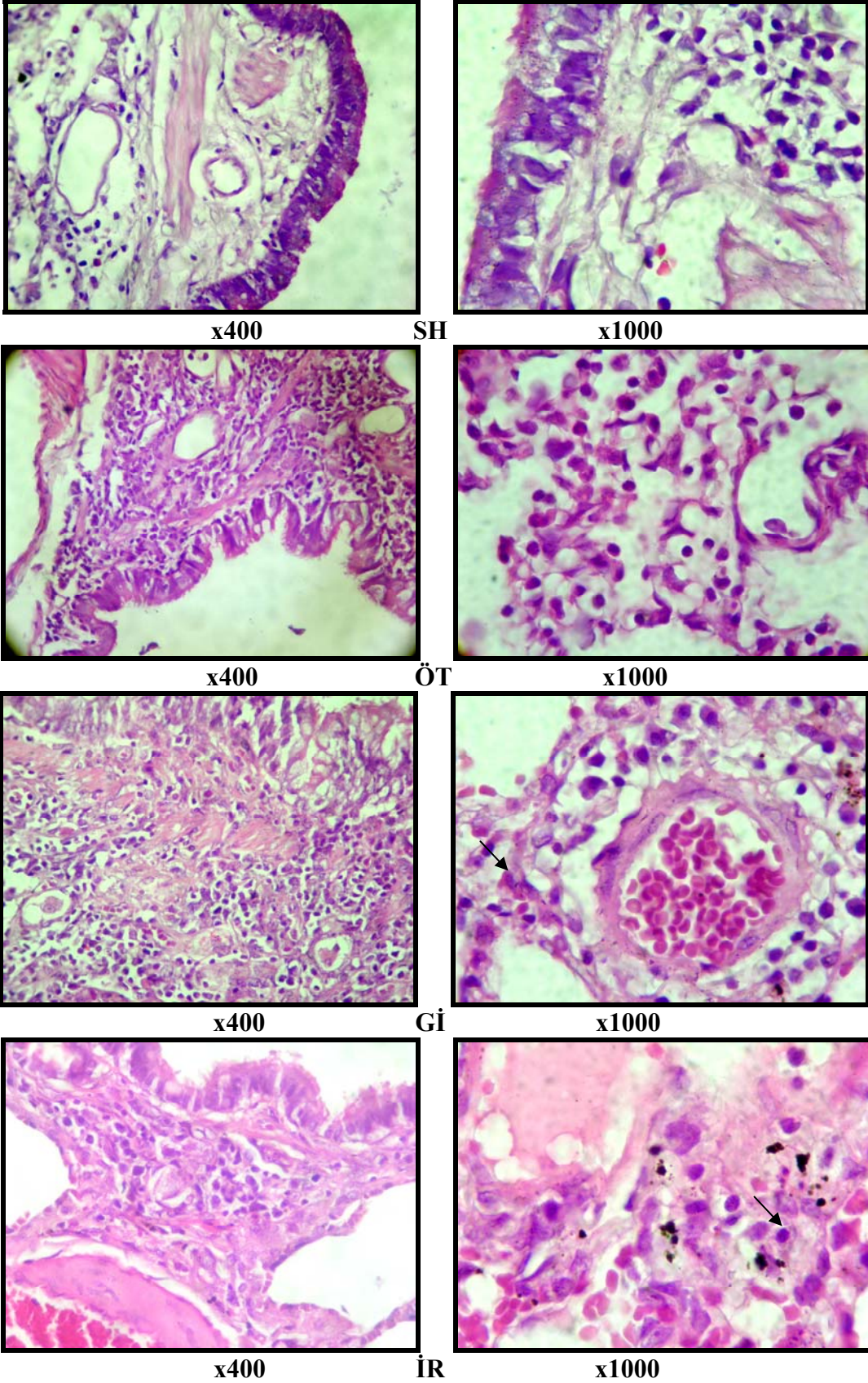
**Grafik 3.2** SH, ÖT, Gİ ve İR sonrası alınan beyin örneklerinde yapılan histomorfometrik analiz.





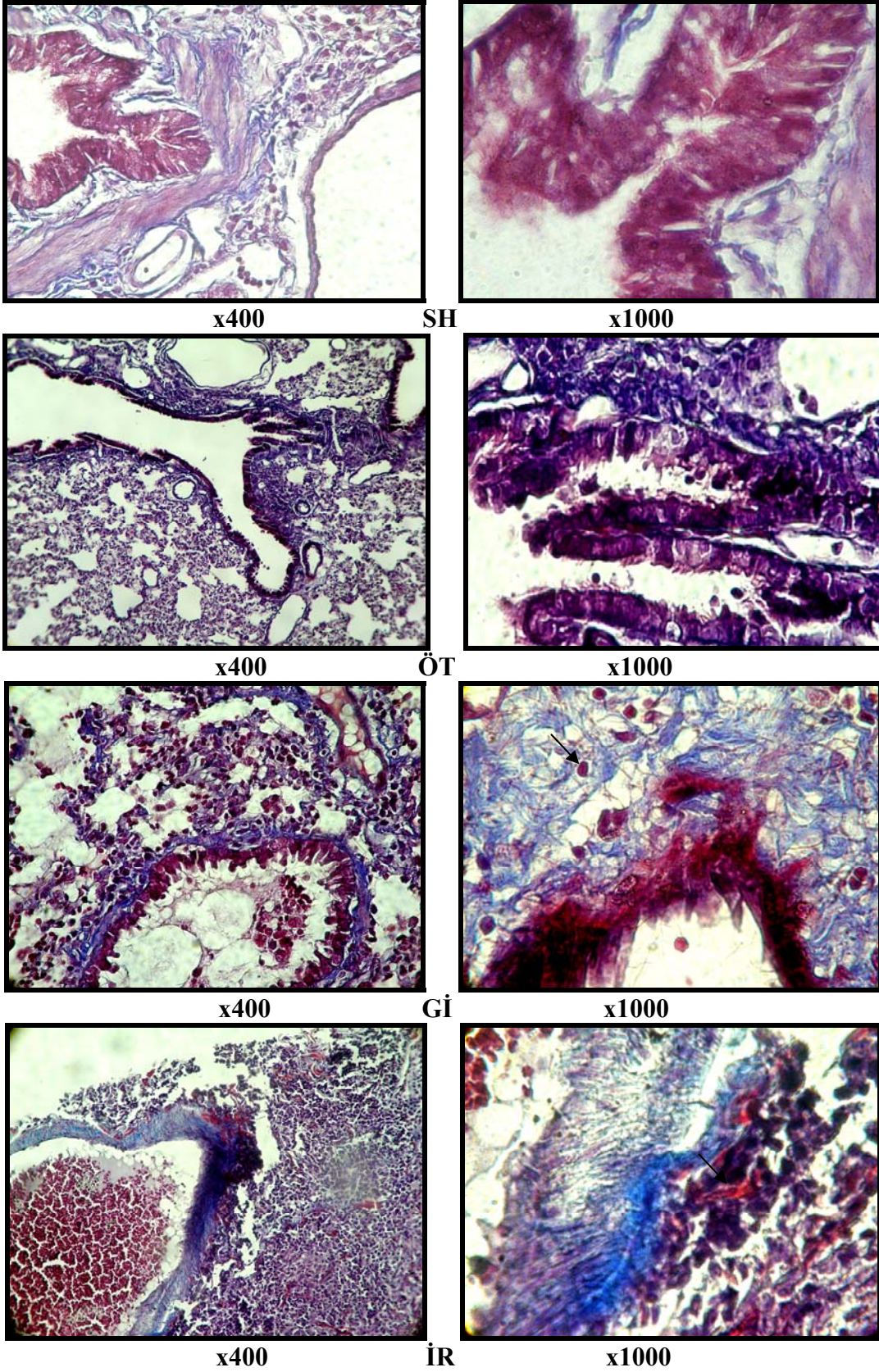
**Resim 3.3** SH, ÖT, Gİ ve İR sonrası alınan akciğer örneklerinde yapılan HE boyamaları. Sol kolon x40, sağ kolon x100.





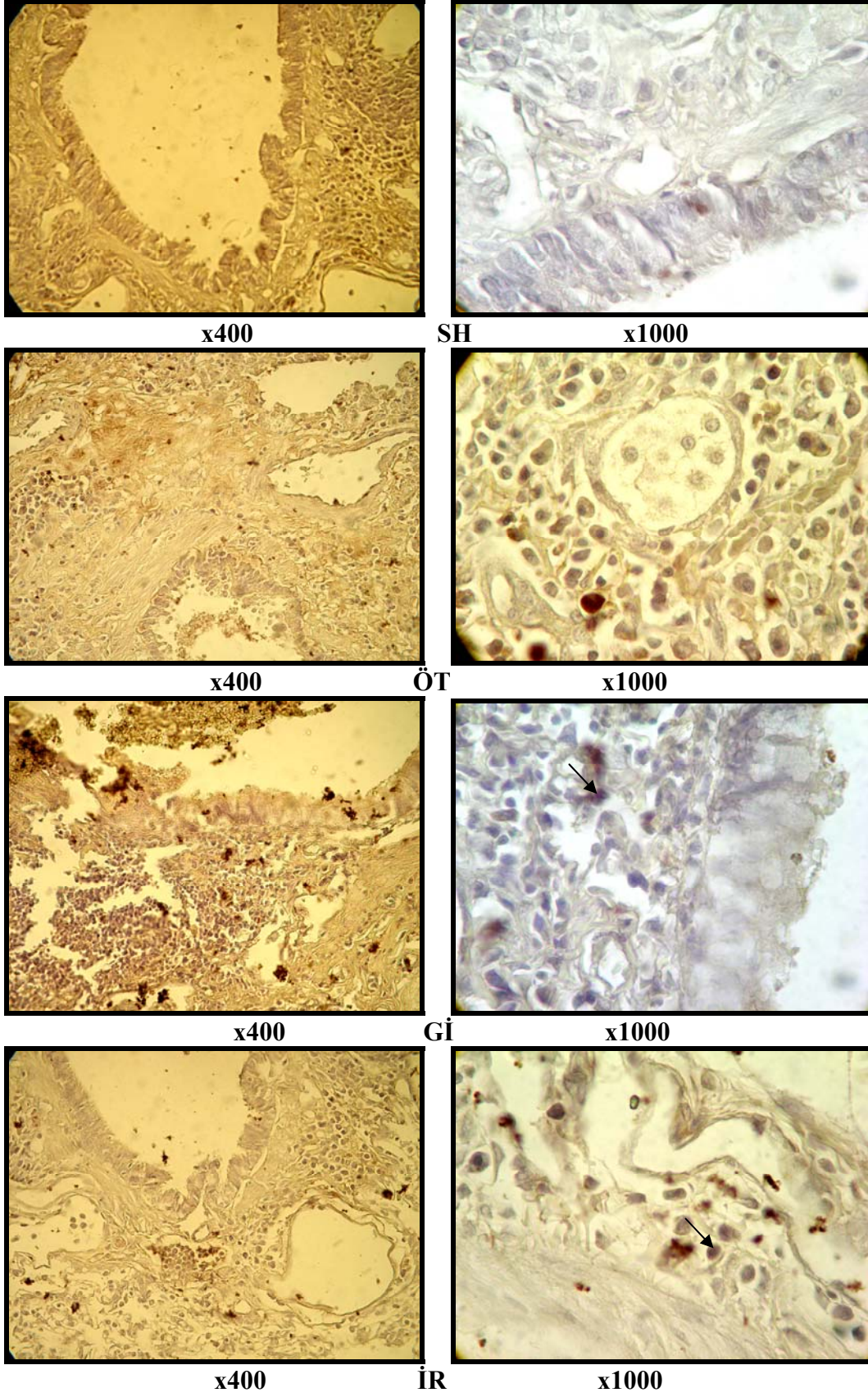
**Resim 3.4** SH, ÖT, Gİ ve İR sonrası alınan akciğer örneklerinde yapılan HE boyamaları. Sol kolon x400, sağ kolon x1000.





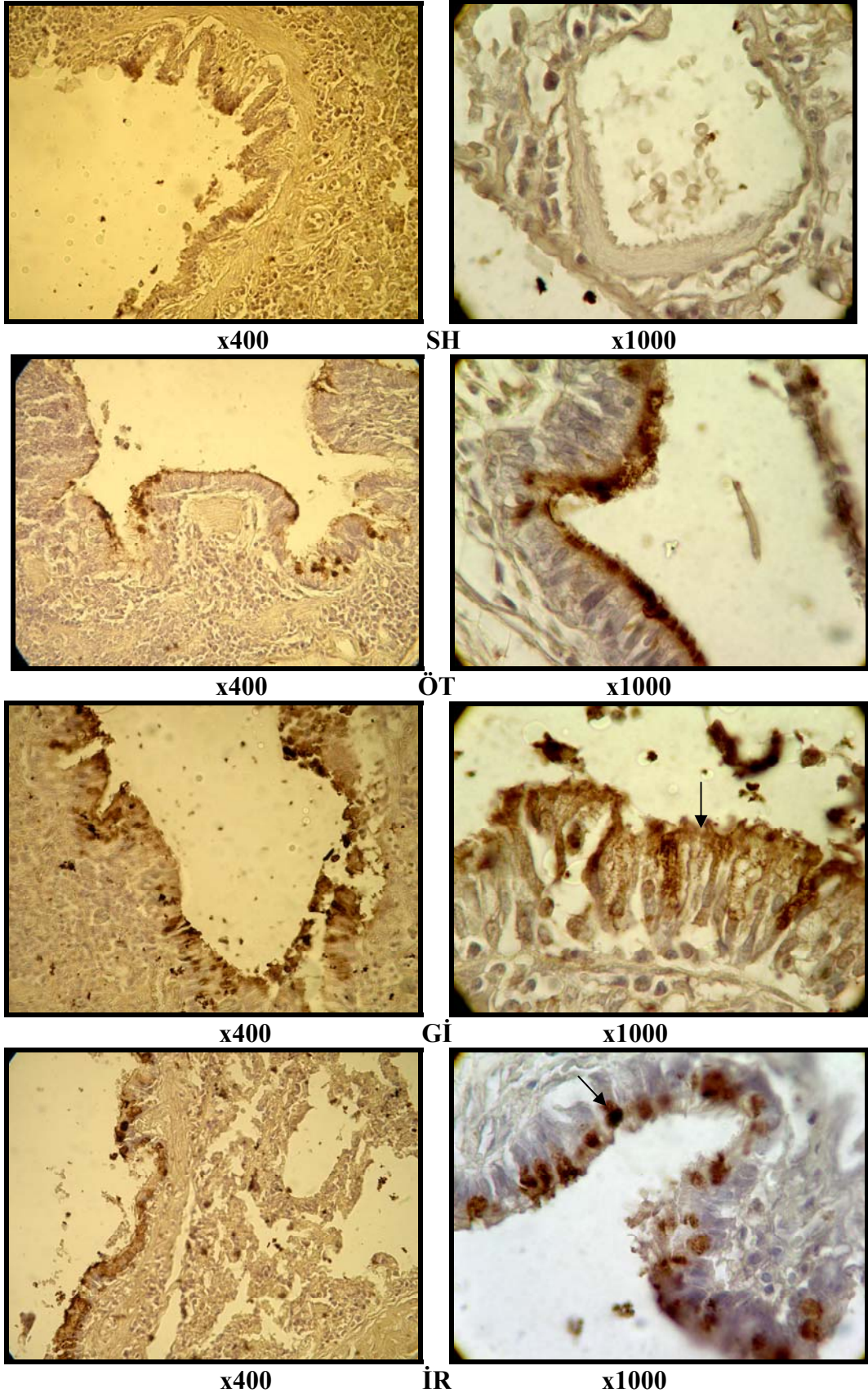
**Resim 3.5** SH, ÖT, Gİ ve İR sonrası alınan akciğer örneklerinde yapılan Masson Trikrom boyamaları. Sol kolon x400, sağ kolon x1000.





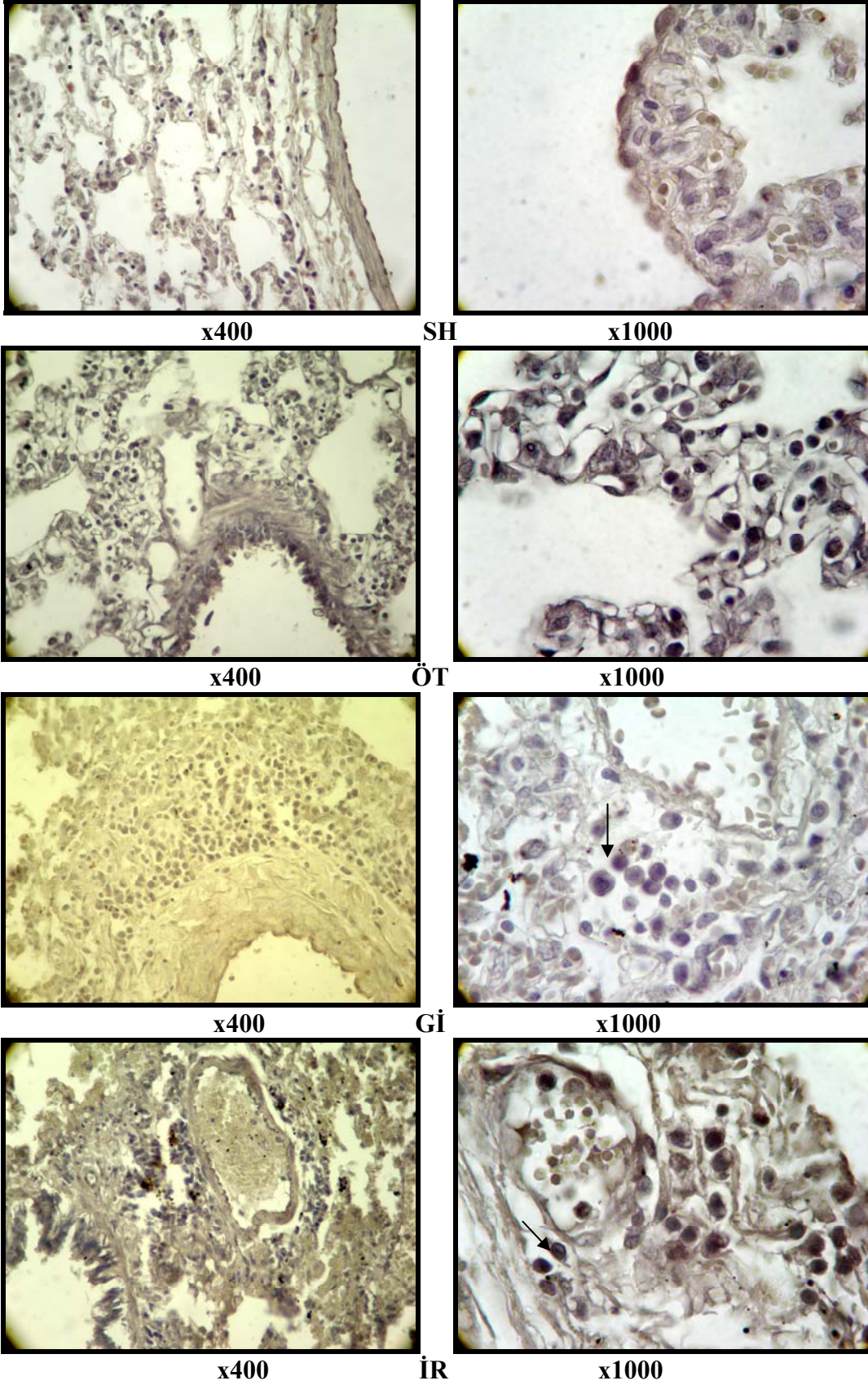
**Resim 3.6** SH, ÖT, Gİ ve İR sonrası alınan akciğer örneklerinde yapılan iNOS immünoreaktivitesi. Sol kolon x400, sağ kolon x1000.



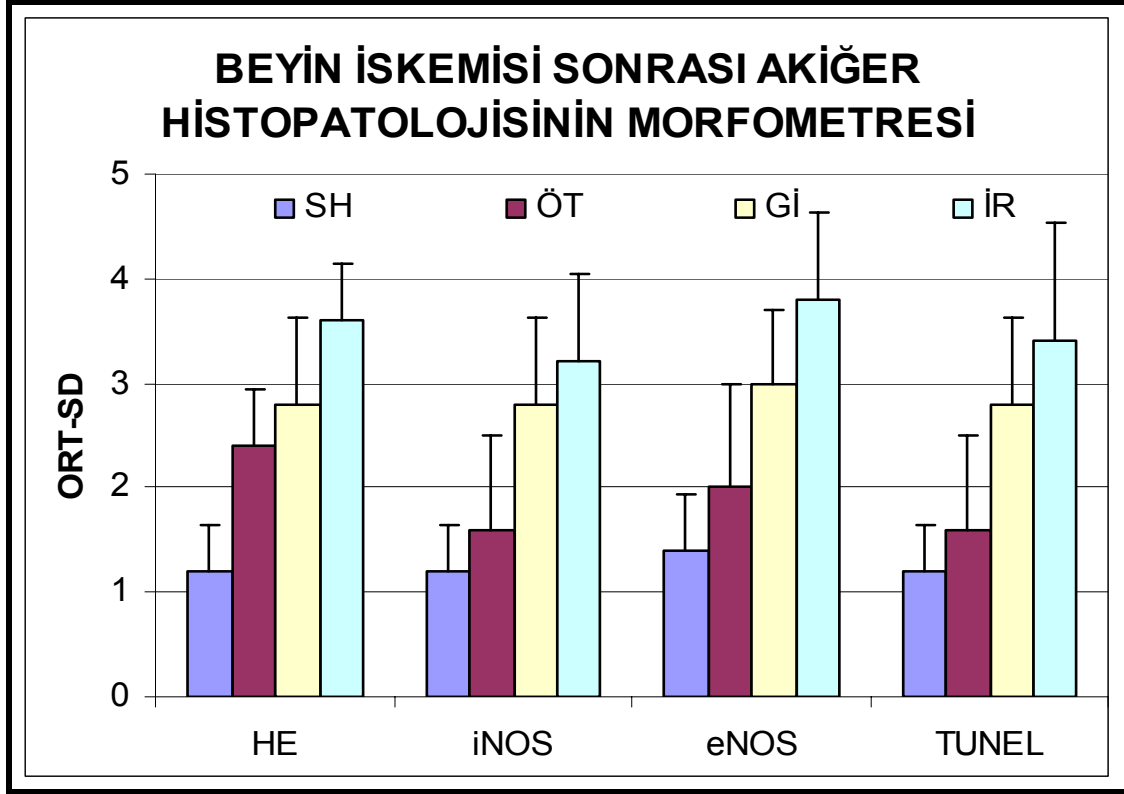


**Resim 3.7** SH, ÖT, Gİ ve İR sonrası alınan akciğer örneklerinde yapılan eNOS immünoreaktivitesi. Sol kolon x400, sağ kolon x1000.





**Resim 3.8** SH, ÖT, Gİ ve İR sonrası alınan akciğer örneklerinde yapılan TUNEL boyamaları. Sol kolon x400, sağ kolon x1000.



**Grafik 3.3** Beyin iskemisi yapılan deneklerde gruplara göre yapılan histokimyasal ve immünohistokimyasal boyamaların her grupta 5 denek olmak üzere ortalama  $\pm$  standart sapmaları. HE boyamasında SH grubuna göre diğer tüm gruplarda belirgin bir artış görüldü ve ÖT, Gİ ve İR için arttığı saptandı. HE boyamasında görülen bu artışın diğer gruplar içersinde anlamlı bir şekilde benzer olduğu bulundu. SH grubunda görülen bazal seviyedeki NOS immünoreaktivitesinin yanı sıra eNOS immünoreaktivitesinin iNOS immünoreaktivitesine göre daha fazla olduğu anlaşıldı. Yine SH grubunda minimal düzeyde saptanan apoptotik hücre varlığının iskemi ile arttığı ve reperfüzyonla en üst düzeye çıktığı bulundu. Boyama derecesinin özellikle Gİ ve İR için her grupta daha fazla olduğu anlaşıldı.

## 5. TARTIŞMA

İR hasarı, iskemi sonrası kan akımının sağlanması ile ortaya çıkan en önemli komplikasyon olup iskemik hasarın gidişatının belirlenmesini sağlayan önemli bir parametredir. Birçok farklı organ için İR sonrası organın kendisine ait hasar ve bundan kaynaklanan uzak doku hasarı gösterilmiştir. Beyin iskemisi farklı mekanizmalar nedeniyle oldukça çok çalışılmış ve alınan sonuçların karmaşıklığı nedeniyle tam olarak açıklanamamış İR hasarı için iyi bir örnektir. Ancak literatürde beyin İR hasarı sonrası gelişen uzak doku değişiklikleri çalışılmamış ve bu nedenle tam olarak bilinmemektedir. Oysaki oluşan değişikliklere bağlı ortaya çıkan yeni mekanizmalar beyin iskemisinin prognozunu oldukça etkileyen önemli faktörlerdir. Beyin İR hasarı sonrası uzak doku değişiklikleri için önemli örnekler akciğer, böbrek ve barsaklardır. Ancak akciğer bu dokular içerisinde metabolik durumu en çabuk etkileyen ve bu nedenle de ayrıcalıklı bir organdır. Çalışmamızda sıçanların beyin İR sonrasında oluşan akciğer hasarı araştırıldı. Beyinde İR sonrası akciğer hasarının olduğu histolojik kesitlerde gösterildi ve hasarın oluşmasında SOR'nin etkisi NOS immünohistokimyası ve bu etki sonucu gerçekleşen hücre ölümü TUNEL yöntemiyle belirlendi.

İR hasarının temelinde reperfüzyon sırasında dokunun oksijenasyonu sonucu ortaya çıkan oksijen radikalleri bulunmaktadır. (Prem JT ve ark, 1999). SOR birçok kaynaktan salınabilir, bunların arasında en önemli olanı ise aktive olmuş nötrofillerdir. Nötrofiller degranülasyona uğrayarak ortama serbest oksijen radikalleri bırakmakta ve proteazlar aracılığıyla endotel hasarının yanı sıra artmış pulmoner kapiller geçirgenliğine neden olmaktadır. Böylece interstisyel ödem meydana gelir. Bu reperfüzyon sonrası nötrofillerin salgıladığı SOR ve proteolitik enzimleri bir kısır döngü aracılığıyla arttırmakta böylece pulmoner vazokonstriksiyon ve hipertansiyona neden olmaktadır. Süperoksit dismutaz, allopurinol, katalaz, askorbik asit ve mannitol gibi çeşitli antioksidan maddeler kullanarak bu mekanizma engellenmeye ve uzak organ hasarı azaltılmaya çalışılmaktadır (Ekim H ve ark, 2005). Bu çalışmada beyinde ortaya çıkan serbest radikal oluşumu ve beraberindeki apoptotik hücre ölümü anlamlı bir şekilde uzak dokuya taşındı ve sistemik bir etki olarak gözlemlendi. Sonuçlarımız beyin İR hasarı sonrası akciğerlerin etkilendiğini ve reaksiyon gösterdiğini ortaya koydu. Akciğerde oluşan değişikliklerin incelenmesi için normal akciğer dokusu ile karşılaştırılmalar yapıldı. Normal akciğer histolojisi; trakea, primer bronş ve akciğer içi yapılar olan sekonder bronş ve bronşiolardan meydana gelir. Bu yolların yapısına

giderek azalan bir şekilde kas, bağ, kıkırdak ve epitel dokusu katılır. Solunum yollarının alveollere doğru çapları daralırken duvar yapısında doku elemanlarından bazılarının azalması veya yok olması nedeniyle incelmeye görülür. Alveol epitelinde altıncı dokusu elemanlarının retikulum ve elastik lifleri, fibrositler, histiyositler, lökositler ve çok seyrek olarak düz kas hücreleri yer alır. Bağ dokusu retikulum, kollajen ve elastik liflerden oluşur. Solunum yolunu döşeyen epitel içerisinde kinosilyalı prizmatik örtü hücreleri, aralarında muköz salgı yapan kaliform hücreler, bazal hücreler ve fırçamsı kenarlı hücreler bulunmaktadır. Ayrıca apikal yüzeyinde lümeneye doğru kabartı yapan, merkezi çekirdekli silyasız ve açık renkli sitoplazmalı klara hücreleri de özel hücrelerdir. Yassı görümlü tip 1 hücreleriyle prizmatik görümlü tip 2 hücreleri büyük önem taşımaktadır. Yine APUD hücrelerinin varlığı da akciğer savunma sistemindeki önemlerini ortaya koymaktadır.

Beyin iskemisi sonrasında etkilenen akciğer dokusundaki değişik düzeylerde histopatolojik bulguların ortaya koyduğu bu çalışmada akciğer dokusunda nekroz, alveoler yapıda bozulma ve artmış nötrofil infiltrasyonu gözlemlendi ve beyindeki iskemik hasarla ilişkili olduğu saptandı. Çalışmamızda, karotid arterleri bağlanıp açılmış ve hiç iskemik yapılmamış kontrol grubu SH ile 10 dk süreyle iskemik uygulanmış ÖT grubu, ÖT uygulamasından 48 saat sonra 20 dk iskemik uygulanmış Gİ grubu ve Gİ sonrası 48 saat reperfüzyon için bekletilen sıçanlarda beyin ve akciğer dokuları morfolojik ve histolojik yönden incelendi ve alınan sonuçların metabolik ve nörolojik durumla ilişkisi değerlendirilmeye çalışıldı. Akciğerde oluşan histopatolojik hasarın erken, geç ve kalıcı olmak üzere 3 farklı evresi bulunmaktadır. Erken dönem eksüdatif bir evre olup interstisyel ve intraalveoller ödem, kanama, nötrofil birikimi, fibrin plazma proteinleri ve sürfaktandan oluşan hiyalin membranlar ile karakterizedir. İnce yapı düzeyinde şişme kapiller endotel ve Tip 1 alveolar epitel hücrelerinde nekroz, ve bazal laminada bozulma görülür. Geç ve fibroproliferatif evrede Tip 2 alveolar epitel hücrelerinin çoğalması şeklinde bir küboidal metaplazi gözlenip, alveolar duvar kalınlığı ve fibrozis saptanır. Oluşan ödemin öncelikle bronş ve büyük damar duvarlarında olduğu daha sonra alveol duvar interstisyumuna ve sonunda da alveol boşluğuna geçtiği görülür. Tip 2 hücrelerinin patolojik etkiye karşı daha dirençli olduğu bilinmektedir. Hava kan bariyeri alveol epitel ile kapiller endoteli ve aralarındaki interstisyumdan oluşur. Bu bariyerin bozulması bu 3 komponentin kalınlığındaki değişiklik ve de şişme veya parçalanma şeklinde gerçekleşir (Ochs M, 2006). Çalışmamızda saptanan bulgular

uygulanan iskemi süresinin ve akciğerde beklenen patolojik değişikliklerin 48 ve 96 saatlik sürelerde kalması nedeniyle akut faz olarak değerlendirildi ve daha hafif olarak gerçekleşti. Bu erken evre değişiklikleri TNF-alfa ve IL-1-beta gibi inflamasyon öncesi sitokinler denen araçlarla şekillendirilmekte, örneğin bu iki faktöre karşı geliştirilen antikorlar akciğerdeki nötrofil birikimini engelleyebilmektedir.

İR çalışmalarında 3, 5 ve 10 dk'lık süreler kullanılmakta olup, 3 dk iskemik tanıtım, 5 ve 10 dk lar ise iskemi için yeterli bulunmaktadır (Greenwood J, 1968, Murry CE ve ark, 1986, Hall E ve ark, 1995, Horstick G ve ark, 1999). Alınan sonuçlar süre dışındaki etkenlere fazlaca bağlı bulunduğundan dolayı biz çalışmamızda güvenli ve etkin olması nedeni ile 10 ve 20 dk süreleri seçtik. Önceki çalışmalarda olduğu gibi hipovolemiye ve yapılan işleme bağlı olarak hayvanların çoğunluğu ya metabolik bozukluktan ya da nörolojik problemlere bağlı olarak öldü. Benzer çalışmalarda da belirtildiği gibi, iskemik tanıtım ve reperfüzyonu değerli kılan, yaşayan hayvan miktarı olup çalışmaların yorumunu oldukça etkilemektedir. Hemorajik şok, kardiyak resüsitasyon ve kardiyopulmoner bypass gibi durumlara benzemesi ve kliniği daha çok taklit etmesi nedeni ile tercih ettiğimiz global iskemide (Karibe H ve ark, 1994, Johansson BB, 2003) damarlarlarda oluşan hasar, hipovoleminin etkinliği, moleküler düzeyde gerçekleşip birbirini etkileyen mekanizmalar (Mabe H ve ark, 1982, Nagasawa H ve Kogure K, 1989, Timsit SG ve ark, 1993) ve benzeri birçok durum deneylerin optimizasyonunu zorlaştırmakta ve bunun üzerine eklenen metabolik bozukluk standardizasyonu daha da güçleştirmektedir (Maier CM ve ark, 1998, Sugawara T ve ark, 2000, Liu Y ve ark, 2003, Macko RF ve ark, 2004).

TTC boyaması ile bizim uyguladığımız teknikte, heterojen dağılım gösteren, iskeminin şiddetinden bağımsız infarkt bölgeleri asimetrik yerleşim gösterdiler. Bu boyama yöntemi diğer çalışmalarda da sorun olarak karşılaşılmaması ve tekniğin etkinliğinin tartışılır olmasına rağmen iskemi hakkında kabaca fikir vermesi açısından anlamlıdır (Bederson JB ve ark, 1986, Chen JC, 1997). Az sayıdaki araştırmalarda TTC boyaması ile H-E boyaması arasında anlamlı bir ilişki bulunmuştur (Bederson JB ve ark, 1986). Ancak, özellikle histolojik kesitlerde görülen boyanmış alanlardaki hasar bu tekniğin iyi uygulandığında bile çok doyurucu sonuçlar veremeyeceğini de göstermektedir (Lassen NA, 1982). Özellikle morfometrik çalışmalarda tekniğin sorunları dikkate alınmalıdır. Ayrıca bu tekniğin iskemiden 24 saat sonraki aşamada

infarkt alanları için daha etkin olduğu belirtilmiştir (Leifer D, 1993). Çalışmamızda TTC boyama tekniği ile yapılan morfometrik değerlendirmede, TTC boyamasının iskemik ile anlamlı ancak şiddeti ile bağımsız sonuçlar verdiği görülmektedir. Hem TTC boyaması, hem de histolojik değerlendirmelerin nörolojik tablo ile ilişkisi için de, cerrahi sonrası video kamera izlemesi daha etkin yorumların yapılmasına yardımcı olacaktır (Lin TN ve ark, 1993).

İskemik hasar sonucu nöronların şişme reaksiyonu göstermeleri, sitoplazmik büzülme ve eosinofili, apoptotik hal almaları veya tamamen nekroze olmaları, sadece nekroze olmayıp ortadan kalkarak sayıca azalmaları, görülen histolojik bulgulardandır. İskemik alanlarda bu belirtiler ortadan başlayıp, çevreye yayılan ve azdan çoğa doğru ilerleyen bir süreç izler (Smith ML, 1984, Lin TN ve ark, 1993, MacManus JP, 1993). Ultrastrüktürel olarak heterokromatin yoğunlaşması, endoplazmik retikulum sisternalarında dilatasyon ve mitokondriyal iç matrikste belirgin şişme saptanan bulgular olup, genellikle geri dönebilir. Geri dönemeyen geciken iskemik hasarın belirtileri ise plazma ve çekirdek zarında bozulma, piknosis ve eosinofilidir. Bu belirtilerden ışık mikroskopik düzeyde olanlar bizim çalışmamızda da saptanmış ve femoral arterden kan alma yöntemi ile hipovolemi oluşturulan çalışmalarla karşılaştırıldığında iskemik hasarın oldukça etkinleştiği bulunmuştur (Snolleau S, 1998, Johansson BB, 2003, Del Zoppo GJ ve Mabuchi T, 2003).

İskeminin şiddetinden bağımsız olarak sadece anestezi etkisi ile bile arteriyel pH'nın düştüğü bilinmektedir (Kida E ve ark, 1995, Sugawara T ve ark, 2000). Genellikle iskemik uygulamasına bağlı olarak değişen 7.12 ile 7.31 arasında pH değerleri, bizim çalışmamızda 7.30 civarında saptanmıştır. Beynin fonksiyonları kan akımı, kan volümü, kapiller dansite, iyon transportu, oksijenlenme, enerji metabolizması ve intrasellüler pH ile ilişkilidir. Sadece kan akımının azalması ile bozulan bu faktörlerin getirdiği iskemik, hayvan modellerinde çalışılarak mekanizmalarının anlaşılması amaçlanmaktadır. Burada metabolik durumdaki bozukluğun bu mekanizmalara ve iskemik üzerine etkileri tam olarak açıklanamamıştır. Ancak yapılan çalışmalarda iskemiden etkilenen alanların farklılığı ve şiddetinin sınırlarının değişkenliği birçok değişik faktörün bu mekanizmada yer aldığını göstermektedir (Ames A ve ark, 1968, Agardh CD ve ark, 1980, Bounds JV ve ark, 1981, Nagasawa H ve Kogure K, 1989, DeBow S ve Colbourne F, 2003).

Gİ sonrasında grup halinde nöronların selektif bir biçimde zarar gördüğü saptanmıştır (Garcia JH, 1992, Garcia JH ve ark, 1993). Burada kırmızı nöronlar yani



eosinofili şeklinde ortaya çıkan zarar görmüş nöronların, saatler süren bir gecikme ile öldükleri saptanmıştır (Kawai N ve ark, 2000, DeBow S ve ark, 2003). Gİ ile karotidlerin suladığı alanlarda birbirlerinden değişik şiddetlerde etki görülmüş ve kavitasyonlu tam nekroz olmuş alanlarla, onların yanında seçilmiş nekrotik hücreler bulunmuştur (Memezawa H ve ark, 1992, Hall E ve ark, 1995). Geçiş bölgelerinde, lokal doku atrofisinin olduğu alanlarda yaşayan astrosit ve nöronların varlığı, beyin dokusu iskeletini koruması nedeni ile kavitasyona izin vermez (Kato H ve ark, 1991, Perez-Pinzon MA ve ark, 1997, Kato H ve Wood PL, 1998). Sonuçlarımızda bulduğumuz, histolojik kesitlerde infarkt alanlarının heterojen dağılımı ve histopatolojik bulguların bundan bağımsızlığı bu şekilde açıklanabilir. Ayrıca, iskemik hasarda moleküler düzeyde etkili olan yerel faktörlerin (Shaw CM ve ark, 1959, Smith ML ve ark, 1984, Leifer D ve Kowall NW, 1993, Timsit SG, 1993, Hamann GF ve ark, 1995, Hara A ve ark, 1995) değişkenliği de göz önüne alınmalıdır.

Bu çalışmada 10 dk ÖT takiben 48 saat sonra 20 dk Gİ yapılan sıçanlarda 48 saat sonra ortaya çıkan İR hasarına bağlı metabolik durum kan gazı ile beyinde hasar histoloji, immunohistokimya ve morfometri ile araştırıldı. Metabolik durumun deneklerde bozulduğu ve ölüm öncesi bu bozukluğun sistemik etki ile beyinde oluşan iskeminin derinliğini ve etkinliğini yönlendirdiği bulundu. Beyinde oluşan histolojik hasarın, GFAP ve S100 $\beta$  boyaması ile ılımlı bir gliosis başlattığı; NOS boyamaları ile oksidatif stres üzerinden gerçekleştiği ve iNOS tan çok eNOS aktivasyonuna bağlı olduğu; TUNEL boyaması ile nekroz ile birlikte anlamlı bir apoptozun olduğu gösterildi. Çalışmanın önemli bir sonucu beyinde gelişen iskeminin oluşturduğu metabolik bozukluğa akciğerlerin eşlik etmesi ve iki organ arasındaki bu ilişkinin oldukça anlamlı olduğudur.

Beyin İR hasarı klinikte çok sık karşılaşılan bir durumdur. Postoperatif dönemde morbidite ve mortaliteyi belirgin ölçüde arttırmaktadır. Hipoksi, azalmış akciğer kompliansı, pulmoner hipertansiyon ve pulmoner ödem İR hasarının birer bulgusu olarak ortaya çıkarak akut akciğer hasarı gibi tamamen subklinik seyreden geçici bir durumdan, Adult Respiratuar Distres Sendromuna (ARDS) kadar ilerleyebilen çok ciddi bir tabloya neden olabilmektedir (Zimon IN ve Mavlianova NA, 1997). Reperfüzyonu takiben oluşan akciğer hasarındaki en önemli patolojik olay, aktive olmuş nötrofiller tarafından salınan serbest radikallerin neden olduğu endotel hücre hasarıdır (Messent M ve ark, 1993). Hasarı başlatan mekanizma ne olursa olsun sonuçta artmış nötrofil aktivitesi, kemoatraksiyonu ve infiltrasyonu sonucu nötrofil degranülasyonu

gözlenmektedir. Degranülasyon sonrası SOR ve proteazlar artmakta ve endotel hasarı gelişmektedir (Karakurum M ve ark, 1994, Raijmakers PG ve ark, 1997, Van Griensven M ve ark, 1999). Pulmoner vazokonstriksiyon, pulmoner hipertansiyon ve pulmoner vasküler geçirgenlikte artış, endotel hücre fonksiyonu bozulmasının en sık görülen sonuçlardır. Plazmada bulunan proinflamatuvar ajanlardan kompleman faktörleri, bazı sitokinler, PAF ve lökotrienler de endotel hücre hasarına sebep olmaktadır. Tüm bu bilgiler ışığında beyin İR sonrası oluşan uzak organ hasarının engellenmesinde yapılması gereken, nötrofil infiltrasyonunun önlenmesidir (Reilly PM ve ark, 1991, Wagner DD, 1996, Bengisun U ve ark, 1997, Del Zoppo GJ ve Mabuchi T, 2003).

Uzak organ hasarının önemli araçlarından olan lokal faktörlerden önemli bir tanesi inflamasyon sürecidir (Smith ML ve ark, 1984, McCarron RM ve ark, 1994, Del Zoppo GJ ve Mabuchi T, 2003). Lökositlerin mikrodamarlara 30 dakika içinde göç ettiği ve belki de iskemiye önlemek amaçlı oldukları düşünülmüştür. Son zamanlarda bu etkinin geciken bir yönünün olduğu ve dokuda oluşan atıkları temizlemeye çalıştığı da saptanmıştır. Lökositlerin damar duvarında endotel hücreleriyle etkileştikleri adezyon molekülleri, vazokonstriktif mediyatörler, sitotoksik enzimler ve SOR aracılığı ile etkileşimler, bazal membran ve kan beyin bariyerinin bozulmasına ve post iskemik ödem oluşmasına neden olmaktadır (Garcia JH ve ark, 1995, 2003, Frenette PS ve Johansson BB, 2003).

Bu çalışmada akciğerde artmış iNOS ve eNOS bulguları tek başına oksidatif stresin göstergesi olarak değerlendirilmemeli ve özellikle SOR aktivitesi için aracı bir mekanizma oldukları bilinmelidir. Yapılan bir çalışmada iNOS artımının makrofaj, nötrofil ve kuffer hücreleri, hepatositler ve endotel hücreleri için inflamasyona bir yanıt olarak arttığı gösterilmiştir. SOR için kemotaktik bir ajan olduğu ve hücreye toksik etki ettiği düşüncesi vardır (Pedoto ve ark, 1999). Bunun önemli bir destekleyici çalışması ilaçla NOS aktivitesinin engellenmesi durumunda gösterilmiştir. Beyindeki İR'u takip eden dönemde akciğerde 2 saatte başlayan 12 saatte pik yapan ve 24 saate kadar süren artmış toplam NOS aktivitesinin azaltıldığı düşünülmüştür (Zeng AY ve ark, 2007). Barsak İR sonrası akut akciğer hasarında nötrofil endotel hücre etkileşimlerinin ve sitokinlerin rol aldığı bulunmuştur. Bu ilişki sonrasında artan NOS düzeylerinin hasardaki etkilerinin yanı sıra ön tanımlı şekilde gösterildiklerinde hasarı azalttıkları da düşünülmüştür. Oksidatif strese bağlı akciğer hasarının olduğu bir başka çalışmada iNOS düzeyinin arttığı ve bunun P-selektin ve nitrotirozin ile ilişkili olduğu ve dolayısıyla adezyonu yönlendirdiği saptanmıştır. eNOS artımının ise iskemi sonrası

inflamasyon cevabını yönlendirdiği hem endoteliyal adezyon moleküllerinin hem de lökosit göçünün yönlenmesine katkıda bulunmuştur. Endojen NO sentezinin inhibe edildiği bir barsak İR çalışmasında uzak organ hasarının arttığı görülmüş ve bu da NOS ile ilişkilendirilmiştir. Yine bir başka çalışmada sıçan akciğer transplantasyonu sırasında 2 saatlik reperfüzyon süresinin sonunda hem iNOS hem de eNOS'un belirgin şekilde arttığı görülmüştür (Liu M ve ark, 2000, Bolli R, 2001, Kozlov AV ve ark, 2002, Kaminski A ve ark, 2004, Ovechkin AV ve ark, 2005, Zweier JL ve Talukder MA, 2006, Breithaupt-Faloppa AC ve ark, 2008). Tüm bu çalışmalarla bizim çalışmamız arasında anlamlı ve olumlu bir ilişki olup beyin İR sonrası uzak organ hasarı olarak akciğerde de benzer mekanizmaların çalıştığını göstermektedir.

Hücrede oluşan toksik etkinin bir sonucu da programlanmış bir intihar şekli olan apoptotik mekanizmadır. Akciğer dokusunda oluşan hasar sonrası bu tür bir ölüm şekli bu çalışmada saptandı ve NOS ile ilişkili olduğu düşünüldü. Önceki çalışmalarda akciğer dokusunda bu mekanizmanın varlığı gösterilmiş akciğerlerde oluşan İR hasarında 20 dakikalık iskemiye takiben 18 saat gibi uzun sürelerle gerçekleşen reperfüzyonlarda büyük hücre nekrozlarının yanı sıra apoptotik hücrelere de rastlanmıştır. Reperfüzyon süresinin kısaltılması ile nekrozun yerini apoptozun aldığı gösterilmiştir. Öncelikle alveolar epitelde gerçekleşen apoptozun NOS ile ilişkisi gösterilmiştir. Hatta insan çalışmalarında akciğer transplantasyonu sonrası metabolik bozukluk ile apoptotik hücre sayısı arasında ilişki olduğu görülmüştür. İnterlökin 15 gibi sitokinlerin, Fas ve ligandlarının ve TNF'nin özellikle kaspazlar üzerinden ve mitokondriyal yolu da içeren bir şekilde apoptozu yönlendirdiği bulunmuştur. Daha önemli olarak akciğer hasarında artan inflamasyon öncesi sitokinlerin nötrofil apoptozunu engelleyerek Fas salınımını arttırdıkları ve özellikle birçok organda hasara neden oldukları saptanmıştır. Yine başka çalışmalarda NOS ilişkili serbest radikallerin aktive olmuş nötrofiller tarafından salındığı ve NADPH üzerinden pulmoner hücreleri hasara uğratarak apoptozu neden olduğu düşünülmüştür (Ng CS ve ark, 2005, De Perrot ve ark, 2003).

İR ile apoptoz arasındaki ilişkide adezyon moleküllerinin de yer aldığı düşünülmüş ve lökositlerin göçünde yuvarlanma, yapışma, aktive olma ve ekstrasvazasyon aşamalarında selektin, integrin ve benzeri farklı moleküllerin yer aldığı gösterilmiştir. İR sonrası hasarda pulmoner endotel hücrelerinde bu adezyon moleküllerinin arttığı ve özellikle nötrofillerin önem kazandığı dönemde büyük rol oynadıkları bulunmuştur. Selektin moleküllerine karşı oluşturulan güçlü ligandların

reperfüzyon öncesi kullanımı ile iskemik hasarın azaltıldığı görülmüştür. Yine bu nötrofil aktivasyonunun reperfüzyon hasarının gecikmiş kısmı ile ilgili olduğu çalışmalarda bu adezyon moleküllerinin yönlendirilmesinde sitokinlerinde yer aldığı saptanmıştır. Makrofajların ve lenfositlerin bloklandığı çalışmalarda iskemik hasarın daha da az gerçekleştiği görülmüştür. Bizim çalışmamız da akciğerde yapılan bu İR çalışmalarını destekler biçimde beyinde gerçekleştirilen İR sonrası akciğer dokusundaki hasarın benzer olduğunu göstermiş olup aynı mekanizmaların kullanıldığını düşündürmektedir (Carraway MS ve ark, 1998, Jaeschke H, 2002, De Perrot ve ark, 2003).

İR sonrası gelişen akciğer hasarının önlenmesi için birçok farmakolojik ajan kullanılmıştır ancak bu çalışmalar çoğunlukla deneysel olup, klinik kullanıma henüz geçememiştir. Kullanılan ajanların ortak özelliği nötrofil infiltrasyonunu ve bunun sonucunda ortaya çıkan serbest oksijen radikal oluşumunu engellemeleridir. Serbest oksijen radikal hasarına karşı intraselüler koruyucu mekanizmaların varlığı bilinmektedir. Bunlar süperoksid dismutaz (SOD), glutatyon peroksidaz ve katalaz enzimlerinin katalize ettiği reaksiyonlardır. SOD süperoksid radikalleri dismutasyonunu katalize eder. Katalaz veya GSH peroksidaz tarafından dönüştürülür. Glutatyon sistemi, serbest oksijen radikal hasarı, lenfosit aktivasyonu ve lenfosit kaynaklı sitotoksositeye karşı antioksidan savunmaya dayalı bir mekanizmadır (Botha AJ ve ark, 1995, Stein HJ ve ark, 1996).

Yapılan bir çalışmada alt ekstremitte hasarı sonrası akciğerde uzak organ hasarı olarak ortaya çıkan doku MPO aktivitesindeki belirgin artışın nötrofil akümülyasyonunun kantitatif ölçümünde güvenilir bir gösterge olduğu düşünülmüştür. Belirlenen MPO aktivitesi ile dokudaki hücre sayısı arasında lineer bir ilişki olduğunu kanıtlanmış akciğer dokusu MPO aktivitesi ile histopatolojik verilerin paralel olduğu öngörülmüştür (Allan G ve ark, 1985). Bu sonucun, bilateral ekstremitte İR modelinde farklı süreler uygulanmasına karşın, alveoler kapillerlerde nötrofil akümülyasyonunu saptayarak uzak organ hasarını ortaya koyan çalışmacıların verileri ile de uyumlu olduğu gözlenmiştir (Klausner JM ve ark, 1988, Anner H ve ark, 1987, Klausner JM ve ark, 1989, Welbourn R ve ark, 1991, Goldman G ve ark, 1992). Bu çalışmacılardan bazıları (Anner H ve ark, 1987, Klausner JM ve ark, 1988, Klausner JM ve ark, 1989) lökositlerin uzak organ-akciğer hasarına aracılık ettiği şeklindeki bulgularını, öncelikle histopatolojik değerlendirme sonucu saptadıkları nötrofil akümülyasyonu ve adezyonu ile açıklamışlardır. Bizim çalışmamızda da benzer şekilde ancak beyin İR ile oluşan bu

mekanizmalar sonucu akciğer dokusunda hasar meydana gelmesi, hasarın oksidatif stres ile ilişkisi ve sonucunda hücreyi ölüme kadar sürükleyebilen intihar mekanizması olan apoptozu indüklemesi görülerek beyin iskemisi sonrasında gelişen bu olayların prognoza ve tedaviye olan etkilerinin önemini ortaya koymuştur.

## 6. YORUM

Beyin İR hasarı klinikte çok sık karşılaşılan ve önemli mortalite ve morbiditeye neden olan bir durumdur. İskemik bölgeye kan akımının sağlanması ile hasarın durdurabilmesine rağmen reperfüzyon sonrası multisistem organ hasarı ve hatta ölüm görülebilir. İR sonrası doku hasarının büyük bir bölümü reperfüzyon sırasında oluşmaktadır. Hayvan deneylerinde alt ekstremitte İR’u takiben nötrofil infiltrasyonuna ve SOR’ne bağlı olarak akciğerde hasar olduğu gösterilmiş ve bunun prognozu etkileyen önemli bir faktör olduğu düşünülmüştür. Çalışmamız ile beyin İR sonrası benzer akciğer hasarı olduğu ve kan gazı analizi ile bunun metabolik bozuklukla ilişkili olduğu gösterildi. Oluşan metabolik bozukluğa önemli bir katkı olarak akciğer dokusunda gelişen histopatolojik hasarın varlığı saptandı. Akciğer dokusundaki histopatolojik hasar alveol harabiyeti, ödem ve yoğun nötrofil infiltrasyonu ile gösterildi. Hasarın SOR’nin oluşumuna bağlı oksidatif stres ile ilgili olduğu ve hücreyi apoptoze sokarak ölüme sürüklediği ortaya kondu. Bu bulguların özellikle İR hasarı ile hayatı tehdit eden beyin iskemisi tedavisine ve prognozuna katkı sağlayacağı düşünüldü.

## 7. KAYNAKLAR

- Adnot S, Raffestin B, Eddamibi S, Braquet P, Chabrier PE. Loss of endothelium-dependent relaxant activity in the pulmonary circulation of rats exposed to chronic hypoxia: **J Clin Invest** 1991; 87: 155 – 162.
- Agardh CD, Kalimo H, Olsson Y, Siesjo BK. Hypoglycemic brain injury. I. Metabolic and light microscopic findings in rat cerebral cortex during profound insulin-induced hypoglycemia and in the recovery period following glucose administration. **Acta Neuropathol (Berlin)** 1980; 50: 31 – 41.
- Allan G, Bhattacharjee P, Brook CD, Read NG, Parke AJ. Myeloperoxidase activity as a quantitative marker of polymorphonuclear leukocyte accumulation into an experimental myocardial infarct--the effect of ibuprofen on infarct size and polymorphonuclear leukocyte accumulation. **J Cardiovasc Pharmacol.** 1985 Nov-Dec;7(6):1154 – 60.
- Ames A, Wright LW, Kowade M, Thurston JM, Majors G. Cerebral ischemia, II: the no-reflow phenomenon. **Am J Pathol.** 1968; 52: 437– 453.
- Andersson KE, Persson K: Nitric Oxide Synthase and the lower urinary tract: possible implications for physiology and pathophysiology. **Scand J Urol Nephrol Suppl** 1995; 175: 43 – 53.
- Anner H, Kaufman RP Jr, Kobzik L, Valeri CR, Shepro D, Hechtman HB. Pulmonary hypertension and leukosequestration after lower torso ischemia. **Ann Surg.** 1987 Nov; 206 (5): 642 – 8.
- Arends M, Wyllie A.H, Apoptosis: mechanism and roles in pathology, **Int. Rev. Exp. Pathol**, 1991, 32: 223 – 254.
- Arends MJ, Morris RG. Wyllie AH, Apoptosis: The role of the endonuclease, **Am. J. Pathol**, 1990, 136: 593 – 608.
- Awerbuck D, Luong V, Plyley MJ, McKee NH. Skeletal muscle form and function after 4 hr ischemia-hypothermia. **J Surg Res** 1994; 57: 480 – 6.
- Aybey B, Tufan H, Ergenekon G. Serbest radikaller. **Türkderm** 1996; 30: 116 – 122.
- Baron AD: The coupling of glucose metabolism and perfusion in human skeletal muscle. The potential role of endothelium derived nitric oxide. **Diabetes** 1996; 45: 105 – 9.
- Bart RD, Sheng H, Laskowitz DT, Pearlstein RD, Warner DS. Regional cerebral blood flow in apolipoprotein E deficient versus wild type mice undergoing middle cerebral artery occlusion. **NeuroReport.** 1998; 9: 2615 – 2620.
- Barzaghi F, Dragonetti M, Formento M.L, Boissier J. R, Cerebral energy metabolism and computerized EEG. Analysis following transient ischemia in the rat, **J. Pharmacol** 1982, 13(4) : 553 – 63.
- Beckman JS, Chen J, Conger Carl: The importance of superoxide in nitric oxide dependent cerebral ischemic injury: Cerebrovascular disease. Moskowitz MA, Caplan LR (eds). Butterworth-Heinemann, **Newton MA.** 1995, S: 25 – 37.
- Bederson JB, Pitts LH, Germano SM, Nishimura MC, Davis RL, Bartkowski HM. Evaluation of 2, 3, 5 - triphenyltetrazolium chloride as a stain for

- detection and quantification of experimental cerebral infarction in rats. **Stroke** 1986 Nov-Dec; 17 (6) : 1304 – 8.
- Bengisun U, Tunç G, Kesenci M, Kuzu I, Demirci S, Aliç B. Surgical treatment of advanced alveolar hydatid disease of the liver: a report of five cases. **Surg Today**. 1997; 27 (3) : 261 – 5.
  - Bentahila S, Atkinson A, Capdeville C. Protective effects of antihypertensive treatment with isradipine on the consequences of cerebral ischaemia in the spontaneously hypertensive rat. **J Hypertens**. 1991; 9: 121 – 129.
  - Blanco FJ, Dchs RL, Schwarz H, Lotz M: Chondrocyte apoptosis induced by nitric oxide. **Am J Pathol**, 1995; 146: 75 – 85.
  - Bolli R. Cardioprotective function of inducible nitric oxide synthase and role of nitric oxide in myocardial ischemia and preconditioning: an overview of a decade of research. *J Mol Cell Cardiol*. 2001 Nov;33(11):1897-918. Review.
  - Borner C, The Bcl-2 protein family: sensors and checkpoints for life or-death decisions, **Mol Immunol**, 2003, 39: 615 – 647.
  - Bortolotto Z.A, Heim C, Sieklucka M, Block F, Sontag K.-H, Cavaleiro E.A. Effects of bilateral clamping of carotid arteries on hippocampal kindling in rats. *Physiol. Behav*, 1991, 49, 667 - 671.
  - Botha AJ, Moore FA, Moore EE, Sauaia A, Banerjee A, Peterson VM. Early neutrophil sequestration after injury: a pathogenic mechanism for multiple organ failure. **J Trauma**. 1995 Sep;39 (3): 411 – 7.
  - Bounds JV, Wiebers DO, Whisnant JP, et al: Mechanisms and timing of deaths from cerebral infarction. **Stroke** 1981; 12: 474 – 477.
  - Brecht SD, Synder SH: Nitric oxide: a physiological messenger molecule. **Ann Rev Biochem** 1994; 63: 175 – 195.
  - Breithaupt-Faloppa AC, Vitoretti LB, Coelho FR, Dos Santos Franco AL, Domingos HV, Sudo-Hayashi LS, Oliveira-Filho RM, de Lima WT. Nitric oxide mediates lung vascular permeability and lymph-borne IL-6 after an intestinal ischemic insult. **Shock**. 2008 Oct 6.
  - Budiharjo L, Oliver H, Lutter M, Luo X, and Wang X, Biochemical pathways of caspase activation during apoptosis. **Annu rev. Cell Dev. Biol**, 1999, 15: 269 – 290.
  - Carbonell T, Iron, oxidative stress and early neurological deterioration in ischemic stroke. **Curr Med Chem**. 2007;14(8):857 – 74.
  - Carraway MS, Welty-Wolf KE, Kantrow SP, Huang YC, Simonson SG, Que LG, Kishimoto TK, Piantadosi CA. Antibody to E- and L-selectin does not prevent lung injury or mortality in septic baboons. **Am J Respir Crit Care Med**. 1998 Mar;157(3 Pt 1):938-49.
  - Cavanagh SP, Gough MJ, Homer-Vanniasinkam S. The role of the neutrophil in ischemia-reperfusion injury: Potential therapeutic interventions. **Cardiovasc Surg** 1998; 6: 112 – 118.
  - Cepinskas G, Rui T, Kvietys PR Neutrophil-endothelial cell interactions during the development of tolerance to ischaemia/reperfusion in isolated cells. **Acta Physiol Scand**. 2001 Sep; 173 (1): 23 – 33.
  - Chan PH: Role of oxidants in ischemic brain damage. **Stroke** 1996; 27: 1124 – 1129.
  - Chen JC, Simon R. Ischemic tolerance in the brain. **Neurology**. 1997; 48: 30 – 63.
  - Cohen JJ. Apoptosis. To be or not to be. **Postgraduate Syllabus (AAAA-I)**



- 1998; 1: 1 – 19.
- Collange O, Fabienne T, Nathalie R, Christian T, Vincent R, Bertrand D, Didier P. Pulmonary apoptosis after supraceliac aorta clamping in a rat model. **J Surg Res.** 2005 Dec; 129 (2) : 190 – 5.
  - Conte JV, Katz NM, Wallace RB, Foegh ML. Long term lung preservation with the PAF antagonist BN-52021. **Transplantation** 1991; 51: 1152 – 1156.
  - Cooper GM, Cell signaling, In: The Cell: a molecular approach, ASM press, 2th, **Washington D.C**, 2000, 13, PP: 523 – 552.
  - Corbett D, Nurse S. The problem of assessing effective neuroprotection in experimental cerebral ischemia. **Prog Neurobiol** 1998; 54: 531 – 548.
  - Cotran RS, Kumar V, Robbins SL. Temel Patoloji. Çevikbaş. U (Çeviren). 4. Baskı, **İstanbul: Nobel**, 1994.
  - Crawley DF, Liu SF, Avans TW. Barnes PJ; Inhibitory role of endothelium derived nitric oxide in rat and human pulmonary arteries. **Br J Pharmacol** 199-; 101:166 – 170.
  - Dawson VL, Dawson TM, Bartley DA, Uhl OR, Snyder SH: Mechanism of nitric oxide mediated neurotoxicity in primary brain cultures. **J Neurosci** 1993; 13: 2651 – 2661.
  - De Perrot M, Liu M, Waddell TK, Keshavjee S. Ischemia-reperfusion-induced lung injury. **Am J Respir Crit Care Med.** 2003 Feb 15;167(4):490 – 511.
  - DeBow S, Colbourne F. Brain temperature measurement and regulation in awake and freely moving rodents. **Methods.** 2003 Jun; 30 (2) : 167 – 71.
  - Del Zoppo GJ, Mabuchi T. Cerebral microvessel responses to focal ischemia. **J Cereb Blood Flow Metab.** 2003 Aug; 23 (8) : 879 – 94.
  - Demiryürek AT, Karasu C, Stefek M, Stolic S. Effect of stobadine on leukocyte free radical generation in streptozotocin-diabetic rats: comparison with vitamin E. **Pharmacology.** 2004 Jan; 70 (1): 1 – 4.
  - Didenko VV, Tunstead JR, Hornsby PJ. Biotin-labeled hairpin oligonucleotides: probes to detect double-strand breaks in DNA in apoptotic cells. **Am J Pathol.** 1998 Apr; 152(4) : 897 – 902.
  - Di Rosa M, Radomski M, Carnuccio R, Moncada S: Glucocorticoids inhibit the induction of nitric oxide synthase in macrophage. **Biochem Biophys Res Commun** 1990; 172: 1246 – 52.
  - Dillon PK, Duran WN. Effect of platelet-activating factor on microvascular permselectivity: dose-response relations and pathways of action in the hamster cheek pouch microcirculation. **Circ Res** 1988; 62: 732 – 740.
  - Dillon PK, Ritter AB, Duran WN. Vasoconstrictor effects of platelet-activating factor in the hamster cheek pouch microcirculation: dose-related relations and pathways of action. **Circ Res** 1988; 62: 722 – 731.
  - Duke RC, Chervenak R, Cohen JJ. Endogenous endonuclease-induced DNA fragmentation: an early event in cell-mediated cytolysis. **Proc Natl Acad Sci U S A.** 1983 Oct; 80 (20) : 6361 – 5.
  - Duran WN, Milazzo VJ, Sabido F, Hobson RW. Platelet-activating factor modulates leukocyte adhesion to endothelium in ischemia-reperfusion. **Microvasc Res.** 1996; 51: 108 – 115.
  - Eisenhut T, Sinha B, Grottrup-Wolfers E, et al. Prostacyclin analogs

- suppress the synthesis of tumor necrosis factor- $\alpha$  in LPS-stimulated human peripheral blood mononuclear cells. **Immunopharmacol** 1993; 26: 259 – 264.
- Ericson LE, Hakanson R, Larson B, Owman CH and Sundler F. Fluorescence and Electron Microscopy of Amine. Storing Enterochromaffin like Cells in Tracheal Epithelium of Mouse. **Z. Zellforsch**, Vol. 124, 532 – 545, 1972.
  - Fagan SC, Hess DC, Hohnadel EJ, Pollock DM, Ergul A, Targets for vascular protection after acute ischemic stroke. **Stroke** 2004 Sep; 35 (9) : 2220 – 5. Epub 2004 Jul 29.
  - Ferrante RJ, Silva MB. inhibition of leukocyte adhesion at reperfusion decrease tissue damage in postischemic skeletal muscle. **Surg Forum** 1993; 44: 367 – 369.
  - Ferro CJ; Webb JD; The clinical potential of endothelin receptor antagonists in cardiovascular medicine. **Drugs** 51: 12 – 27, 1996.
  - Förstermann U, Schmidt HH, Pollock JS, Sheng H, Mitchell JA, Warner TD, Nakane M, Murad F. Isoforms of nitric oxide synthase. Characterization and purification from different cell types. **Biochem Pharmacol**. 1991 Oct 24; 42 (10): 1849 – 57.
  - Frenette PS, Wagner DD. Adhesion molecules, part I. **N Engl J Med**. 1996; 334: 1526 – 1529.
  - Frostell CG, Fratacci M-D, Wain JC, Zapol WM. Inhaled nitric oxide: a selective pulmonary vasodilator reversing hypoxic pulmonary vasoconstriction. Circulation of rats exposed to chronic hypoxia. **J Clin Invest** 1991; 87: 155 – 162.
  - Gaines GC, Welborn MB, Moldawer LL, Huber TS, Harward TR, Seeger JM. Attenuation of skeletal muscle ischemia/reperfusion injury by inhibition of tumor necrosis factor. **J Vase Surg** 1999; 29: 370 – 376.
  - Galle J, Wanner C: Impact of nitric oxide on renal hemodynamics and glomerular function: modulation by atherogenic lipoproteins. **Kidney Blood Press Res** 1996; 19: 2 – 15.
  - Ganong WF. **Fizyoloji** 1995 s.335.
  - Garcia JH, Liu K-F, Ho K-L. Neuronal necrosis after middle cerebral artery occlusion in Wistar rats progresses at different time intervals in the caudoputamen and the cortex. **Stroke**. 1995; 26: 636 – 643.
  - Garcia JH, Yoshida Y, Chen H, Li Y, Zheng GZ, Lian J, Chen S, Chopp M. Progression from ischemic injury to infarct following middle cerebral artery occlusion in the rat. **Am J Pathol**. 1993; 142: 623 – 635.
  - Garcia JH. The evolution of brain infarcts: **J Neuropathol Exp Neurol**. 1992; 51: 387 – 393.
  - Gardner TJ, Stewart JR, Casale AS, Downey JM, Chambers D.E. Reduction of myocardial ischemic injury with oxygen-derived free radical scavengers. **Surgery** 1983; 94 (3) : 423 – 427.
  - Garg UC, Hassid A. Nitric oxide decreases cytosolic free calcium in Balb/c 3T3 fibroblasts by a cyclic GMP-dependent mechanism, **J Biol Chem** 1991; 266; 9 – 12.
  - Giffard RG, Xu L, Zhao H, Carrico W, Ouyang Y, Qiao Y, Sapolsky R, Steinberg G, Hu B, Yenari MA. Chaperones, protein aggregation, and brain

- protection from hypoxic/ischemic injury. **J Exp Biol.** 2004 Aug; 207 (Pt 18) : 3213 – 20.
- Goldman G, Welbourn R, Rothlein R, Wiles M, Kobzik L, Valeri CR, Shepro D, Hechtman HB. Adherent neutrophils mediate permeability after atelectasis. **Ann Surg.** 1992 Sep; 216 (3) : 372 – 8.
  - Goping G, Wood K.A, Sei Y, Pollard H.B, Detection of fragmented DNA in apoptotic cells embedded in LR White: A Combined Histochemical (LM) and Ultrastructural (EM) Study, **J. Histochem Cytochem**, 1999, 47: 561 – 568.
  - Grace PA. Ischemia-reperfusion injury. **Br J Surg** 1994; 81: 637 – 647.
  - Greenwood J Jr: Acute brain infarctions with high intracranial pressure: surgical indications. **John Hopkins Med** 1968; J 122: 254 – 260.
  - Gursoy-Ozdemir Y, Bolay H, Saribas O, Dalkara T (2000) Role of endothelial nitric oxide generation and peroxynitrite formation in reperfusion injury after focal cerebral ischemia. **Stroke** 31: 1974 – 1980.
  - Güray A, Samancı N, Ovalı F, Dagoğlu T. Nitrik oksit: Fizyolojisi ve klinik önemi. **Türkiye Klinikleri Tıp Bilimleri Dergisi** 1997; 17: 115 – 119.
  - H Brune B, Mohr S, Messmer UK: Protein thiol modification and apoptotic cell death as cMP-independent nitric oxide-NO signaling pathways. **Rev Physiol Biochem Pharmacol** 1996; 127: 1 – 30.
  - Hall E, Oostveen J, Dunn E, Carter D. Increased amyloid protein precursor and apolipoprotein E immunoreactivity in the selectively vulnerable hippocampus following transient forebrain ischemia in gerbils. **Exp Neurol.** 1995; 135: 17 – 27.
  - Hamann GF, Okada Y, Fitridge R, del Zoppo GJ. Microvascular basal lamina antigens disappear during cerebral ischemia and reperfusion. **Stroke.** 1995; 26: 2120.
  - Hamasaki Y, Mojarad M, Saga T, Tia HH, Said SI. Platelet activating factor raises airway and vascular pressures and induces edema in lungs perfused with platelet-free solution. **Am Rev Respir Dis** 1984; 129: 742 – 76.
  - Hara A, Yoshimi N, Hirose Y, Ino N, Tanaka H, Mori H, DNA fragmentation in granular cells of human cerebellum following global ischaemia, **Brain Res**, 697: 247 – 250, 1995 – 30.
  - Harukuni I, Bhardwaj A. Mechanisms of brain injury after global cerebral ischemia. **Neurol Clin.** 2006 Feb; 24 (1): 1 – 21.
  - Hasan Ekim, Hasan Basri Erdoğan, Veysel Kutay, Halil Başel, Süleyman Özen, Abdüssemet Hazar, Hakan Akbayrak, Hanefi Özbek. Abdominal Aortaya Kros Klemp Konmasının Neden Olduğu İskemi/Reperfüzyon Hasarının Akciğerlere Etkisi. **Van Tıp Dergisi**: 12 (3):175–178, 2005.
  - Hilmi Burak Kandilci, Bülent Gümüşel. Akciğerlerde İskemi-Reperfüzyon Hasarı ve İskemik Önkoşullama. Hacettepe Üniversitesi, **Eczacılık Fakültesi Dergisi** Cilt 25 / Sayı 1 / Ocak 2005 / pp. 35 – 49.
  - Hobson RW, Milazzo VJ, Duran WN. Pathophysiology of skeletal muscle ischemia-reperfusion injury. Haimovici H (editor). Haimovici's Vascular Surgery. 4 th ed. Chapter 39. Cambridge. **Blackwell Science** 1996: 497 – 508.
  - Hoffer E, Shenker L, Baum Y, Tabak A. Paraquat-induced formation

- of leukotriene B4 in rat lungs: modulation by N-acetylcysteine. **Free Rad Biol Med** 1997; 22: 567 – 572.
- Horstick G, Berg O, Heimann A, Darius H, Lehr HA, Bhakdi S, Kempfski O, Meyer. J. Surgical procedure affects physiological parameters in rat myocardial ischemia: need for mechanical ventilation. **Am J Physiol.** 1999 Feb; 276 (2 Pt 2) : H 472 – 9.
  - Houston M, Estevez A, Chumley P. Binding of xanthine oxidase to vascular endothelium. **J Biol Chem** 1999; 274: 4985 – 4994.
  - Huang Z, Huang PL, Panahian N, Dalkara T, Fishman MC, Moskowitz MA: Effects of cerebral ischemia in mice deficient in neuronal nitric oxide synthase. **Science** 1994; 264: 1883 – 1885.
  - Huppertz B, Frang H. G, Kaufmann P, The apoptosis cascade-morphological and immunohistochemical methods for its visualization, **Anat. Embryol,** 1999, 200: 1 – 18.
  - [http://anatomy.iupui.edu/courses/histo\\_D502/D502f04/Labs.f04/respiratory%20lab/Respiratory%20System%20Lab.html](http://anatomy.iupui.edu/courses/histo_D502/D502f04/Labs.f04/respiratory%20lab/Respiratory%20System%20Lab.html)
  - Ignarro U: Physiology and pathophysiology of NO. **Kidney International Suppl.** 1996; 55: 2 – 5.
  - Iijima T, Mishima T, Akagawa K, Iwao Y. Neuroprotective effect of propofol on necrosis and apoptosis following oxygen-glucose deprivation--relationship between mitochondrial membrane potential and mode of death. **Brain Res.** 2006 Jul 12; 1099 (1): 25 – 32.
  - Jaeschke H. Molecular mechanisms of hepatic ischemia-reperfusion injury and preconditioning. **Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol.** 2003 Jan; 84(1):G15 – 26.
  - Jenkinson SC, Lawrence RA, Tucker WY: Clutathione peroxidase superoxide dismutase and Clutathione 5-transferase activities in human lung. **Am. Rev. Respir. Dis.** 1984, 130: 302 – 304.
  - Johansson BB. Environmental influence on recovery after brain lesions--experimental and clinical data. **J Rehabil Med.** 2003 May ; (41 Suppl) : 11 – 6.
  - Junqueira Luis Carlos ve Carneiro Jose, Temel Histoloji, Çev: Aytekin Yener, Solakoğlu Seyhun, **Nobel Yay.**2006, 349 – 368.
  - Kainoh M, Imai R, Umetsu T, et al. Prostacyclin and beraprost sodium as suppressors of activated rat polymorphonuclear leukocytes. **Biochem Pharmacol** 1990; 39: 477 – 484.
  - Kalinin A.E, Kajava A.V, Steinert P.M, Epithelial barrier function: assembly and structural features of the cornified cell envelope, **Bio-essays,** 2002, 24: 789 – 800.
  - Kaminski A, Pohl CB, Sponholz C, Ma N, Stamm C, Vollmar B, Steinhoff G. Up-regulation of endothelial nitric oxide synthase inhibits pulmonary leukocyte migration following lung ischemia-reperfusion in mice. **Am J Pathol.** 2004 Jun; 164 (6) : 2241 – 9.
  - Kanduc D, Mittelman A, Serpico R, et al, Cell death: Apoptosis versus necrosis, **International journal of oncology,** 2002, 21: 165 – 170.
  - Karakurum M, Shreeniwas R, Chen J, Pinsky D, Yan SD, Anderson M, Sunouchi K, Major J, Hamilton T, Kuwabara K, et al.Hypoxic induction of interleukin - 8 gene expression in human endothelial cells. **J Clin Invest.** 1994 Apr; 93 (4) : 1564 – 70.

- Karibe H, Zarow GJ, Graham SH, Weinstein PR (1994) Mild intransischemic hypothermia reduces postischemic hyperperfusion, delayed postischemic hypoperfusion, blood-brain barrier disruption, brain edema, and neuronal damage volume after temporary focal cerebral ischemia in rats. **J Cereb Blood Flow Metab** 14: 620 – 627.
- Kato H, Wood PL (1998) Inflammatory markers in stroke. **In Neuroinflammation: mechanisms and managements**, pp 91–107. Totowa, NJ: Humana.
- Kato H, Liu Y, Araki T, Kogure K, Temporal profile of the effects of pretreatment with brief cerebral ischemia on the neuronal damage following secondary ischemic insult in the gerbil: cumulative damage and protective effects, **Brain Res**, 1991; 553: 238 – 242.
- Katusic, SZ: Superoxide anion and endothelial regulation of arterial tone. **Free Radical Biology and Medicine** 1996; 20: 443 – 448.
- Kawai N, Okauchi M, Morisaki K, Nagao S (2000) Effects of delayed intransischemic and postischemic hypothermia on a focal model of transient cerebral ischemia in rats. **Stroke** 31: 1982 – 1989.
- Kerr JFR, Winterford CM, Harmon BV, Apoptosis- its significance in cancer and cancer therapy, **Cancer**, 1994, 73: 2013 – 2026.
- Kerr JFR, Wyllie A.H, Currie AR, Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics, **Br J Cancer**, 1972, 26: 239 – 257.
- Kida E, Pluta R, Lossinsky A, Golabek A, Choi-Miura N-H, Wisniewski H, Mossakowski M. Complete cerebral ischemia with short-term survival in rat induced by cardiac arrest, II: extracellular and intracellular accumulation of apolipoproteins E and J in the brain. **Brain Res**. 1995; 674: 341 – 346.
- Kitagawa K, Matsumoto M, Kuwabara K, Tagaya M, Ohtsuki T, Hata R, Ueda H, Handa N, Kimura K, Kamada T, 'Ischemic tolerance' phenomenon detected in various brain regions, **Brain Res**, 1991; 561: 203 – 211.
- Klausner JM, Anner H, Paterson IS, et al. Lower torso ischemia-induced lung injury is leukocyte dependent. **Ann Surg** 1988; 208: 761 – 767.
- Klausner JM, Paterson IS, Kozbik L, et al. Leukotrienes but not complement mediate limb ischemia-induced lung injury. **Ann Surg** 1989; 209: 462 – 470.
- Klausner JM, Paterson IS, Valeri CR, Shepro D, Hechtman HB. Limb ischemia-induced increase in permeability is mediated by leukocytes and leukotrienes. **Ann Surg**. 1988 Dec; 208 (6) : 755 – 60.
- Knight KR, Zhang B, Morrison WA, Stewart AG. Ischemia-reperfusion injury in mouse skeletal muscle is reduced by N-nitro-L-arginine methyl ester and dexamethasone. **Eur J Pharm** 1997; 332: 273 – 278.
- Kozlov AV, Sobhian B, Duvigneau JC, Costantino G, Gemeiner M, Nohl H, Redl H, Bahrami S. Nitric oxide synthase inhibitors affect nitric oxide synthesis in normoxic but not in ischemic organs during intestinal ischemia and early reperfusion. **J Lab Clin Med**. 2002 Nov; 140(5):303 – 11.
- Krishnadasan B, Naidu BV, Byrne K, Fraga C, Verrier ED, Mulligan MS. The role of proinflammatory cytokines in lung ischemia-reperfusion injury. **J Thorac Cardiovasc Surg**. 2003 Feb; 125 (2): 261 – 72.
- Kubes P, Ibbotson G, Russell J, Wallace JL, Granger DN. Role of platelet-activating factor in ischemia – reperfusion induced leukocyte adherence. **Am J Physiol** 1990; 259: G300 – 305.

- Kurose I, Anderson DC, Miyasaka M, Tamatani T, Paulson JC, Todd RF, et al. Molecular determinants of reperfusion - induced leukocyte adhesion and vascular protein leakage. **Circ Res** 1994; 74: 336 – 343.
- Kwoo NS, Stuehr DJ, Nathan CF: Inhibition of tumor cell ribonucleotide reductase by macrophage-derived nitric oxide. **J Exp Med** 1991;174: 761 – 7.
- Kwoo NS, Nathan CF, Stuehr DJ; Reduced biopterin as a cofactor in the generation of nitrogen oxides by murine macrophages. **J Biol Chem** 1989; 264: 20496 – 501.
- Lassen NA. Incomplete cerebral infarction: focal incomplete ischemic tissue necrosis not leading to emollon. **Stroke**. 1982; 13: 522 – 523.
- Lefer MA, Lefer DJ: The role of NO and cell adhesion molecules on the microcirculation in ischemiareperfusion. **Cardiovascular Research** 1996; 32: 743 – 751.
- Leifer D, Kowall N.W,Imunohistochemical patterns of selective cellular vulnerability in human cerebral ischemia, **J. Neurol. Sci**, 119: 217 – 218, 1993.
- Li P, Chopp M, Jiang N, Zagola C, In situ detection of DNA fragmentation after focal cerebral ischemia in mice, **Brain Res. Mol**, 1995, 28: 164 – 168.
- Lien DC, Wagner WW, Capen RL, Haslett C, Hanson WL, Hofmeister SE, et al. Physiological neutrophil sequestration in the lung: visual evidence for localization in capillaries. **J Appl Physiol** 1987; 62: 1236 – 1243.
- Lin TN, He YY, Wu G, et al: Effect of brain edema on infarct volume in a focal cerebral ischemia model in rats. **Stroke** 1993; 24: 117 – 21.
- Lincoln TM. Cyclic GMP and mechanism of vasodilatation **Pharmacol Ther** 1989; 233; 119 – 25.
- Liu M, Tremblay L, Cassivi SD, Bai XH, Mourgeon E, Pierre AF, Slutsky AS, Post M, Keshavjee S. Alterations of nitric oxide synthase expression and activity during rat lung transplantation. **Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol**. 2000 May; 278 (5): L1071 – 81.
- Liu RH, Hsstckiss JH: Potential genotoxicity of chronically elevated nitric oxide: **A Mutation Res** 1995; 339: 73 – 89.
- Liu Y, Song XD, Liu W, Zhang TY, Zuo J. Glucose deprivation induces mitochondrial dysfunction and oxidative stress in PC12 cell line. **J Cell Mol Med**. 2003 Jan – Mar; 7 (1) : 49 – 56.
- Loh KP, Huang SH, De Silva R, Tan BK, Zhu YZ.Oxidative stress: apoptosis in neuronal injury. **Curr Alzheimer Res**. 2006 Sep; 3 (4) : 327 – 37.
- Loo DT, Rillema JR, Measurement of cell death, In: Mather JP, Barnes D, Animal Cell Culture Methods, **Academic Pres**, 1998, 57, PP: 252 – 265.
- Lu YT, Hellewell PG, Evans TW. Ischemia-reperfusion lung injury: contribution of ischemia, neutrophils and hydrostatic pressure. **Am J Physiol** 1997; 273 (1 Pt 1): L46 – 54.
- Lum H, Barr AD, Shaffer JR, Gordan RJ, Ezrin AM, Malik AB. Reoxygenation of endothelial cells increases permeability by oxidant-dependent mechanisms. **Circ Res** 1992; 70: 991 – 998.
- Mabe H, Umemura S, Yoshida T, Iwayama K, IwamaM, Nagai H, Correlation between local cerebral blood flow and EEG in experimental cerebral ischemia, **No To Shinkei**, 1982; 34: 585 – 589.

- Macko RF, Ameriso SF, Barndt R, Clough W, Weiner JM, Fisher M. Precipitants of brain infarction: roles of preceding infection/inflammation and recent psychological stress. **Stroke**. 1996; 27: 1999 – 2004.
- MacManus JP, Buchan AM, Hill IE, Rasquinha I, Preston E. Global ischemia can cause DNA fragmentation indicative of apoptosis in rat brain. **Neurosci Lett**. 1993; 164: 89 – 92.
- Maier CM, Ahern KV, Cheng ML, Lee JE, Yenari MA, Steinberg GK (1998) Optimal depth and duration of mild hypothermia in a focal model of transient cerebral ischemia: effects on neurologic outcome, infarct size, apoptosis, and inflammation. **Stroke** 29: 2171 – 2180.
- Mana Riva C, Morganroth ML, Ljungman AG, et al. Iloprost inhibits neutrophil - induced lung injury and neutrophil adherence to endothelial monolayers. **Am J Resp Celi Mol Biol** 1990; 3: 301 – 309.
- Marsden VS, Strasser A, Control of apoptosis in the immune system: Bcl-2, BH3-only protein and more, **Annu. Rev. Immunol**, 2003, 21: 71 – 105.
- Martin SJ, Reutelingsperger CP, McGahon AJ, Rader JA, van Schie RC, LaFace DM, Green DR. Early redistribution of plasma membrane phosphatidylserine is a general feature of apoptosis regardless of the initiating stimulus: inhibition by overexpression of Bcl-2 and Abl. **J Exp Med**. 1995 Nov 1; 182 (5) : 1545 – 56.
- McCall, Broughton Smith NK, Palmer RMJ, Whittle JR, Moncada S. Synthesis of nitric oxide from L-arginine by neutrophils, Release and interaction with superoxide anions, **Biochem J** 1989; 261 ~ 293 – 8.
- McCarron RM, Wang L, Siren AL, Spatz M, Hallenbeck JM. Adhesion molecules on normotensive and hypertensive rat brain endothelial cells. **Proc Soc Exp Biol Med**. 1994; 205: 257 – 262.
- Memezawa H, Smith ML, Siesjö BK: Penumbra tissues salvaged by reperfusion following middle cerebral artery occlusion in rats. **Stroke**, 1992; 23: 552 – 559.
- Messent M, Griffiths MJ, Evans TW. Pulmonary vascular reactivity and ischaemia-reperfusion injury in the rat. **Clin Sci (Lond)**. 1993 Jul; 85 (1) : 71 – 5.
- Mittal OK: Oxygen-radical/nitric oxide mediate calcium-dependent hormone action on cyclic GMP system: a novel concept in signal transduction mechanisms. **Mol Cell Biochem**, 1995; 149–150: 257 – 62.
- Mizutani T, Layon, J: Clinical applications of NO, **Chest**. 110: 506 – 24, 1996.
- Moncade S, Palmer RMJ, Higgs EA; Nitric oxide; physiology patophysiology and pharmacology. **Pharmacol Rev** 1991; 43: 109 – 141.
- Munakata M, Masaki Y, Saxuma I, Ukita H, Dbuka Y, Homma Y. Pharmacological differentiation of epithelium - derived relaxing factor from nitric oxide. **J Appl Physial** 1990; 69: 665 – 70.
- Murry CE, Jennings R.B, Reimer K.A,Preconditioning with ischemia: a delay of lethal cell injuryin ischemic myocardium, **Circulation**, 1986; 74: 1124 – 1136.
- Nagasawa H, Kogure K: Correlation between cerebral blood flow and histologic changes in a new rat model of middle cerebral artery occlusion. **Stroke** 1989; 20: 1037 – 1043.

- Naoki K, Kudo H, Suzuki K, Takeshita K, Miyao N, Ishii M, Sato N, Suzuki Y, Tsumura H, Yamaguchi K. NOS and COX isoforms and abnormal microvessel responses to CO<sub>2</sub> and H<sup>+</sup> in hyperoxia-injured lungs. **Eur Respir J.** 2002 Jul; 20 (1) : 43 – 51.
- Nathan C. Nitric oxide as a secretory product of mammalian cells, **Faseb J** 1992; 6; 3051 – 3064.
- Navar LQ, Majid DS: Interactions between arterial pressure and sodium excretion. **Curr Opin Nephrol Hypertens**, 1996; 5: 64 – 71.
- Nelson K, Herndon B, Reisz G. Pulmonary effects of ischemic limb reperfusion: evidence for a role for oxygen-derived radicals. **Crit Care Med.** 1991 Mar; 19 (3) : 360 – 3.
- Nemes Z, Steinert P.M, Bricks and mortar of epidermal barrier, **Exp. Mol. Med**, 1999, 31: 5 – 9.
- Ng CS, Wan S, Yim AP. Pulmonary ischaemia-reperfusion injury: role of apoptosis. **Eur Respir J.** 2005 Feb; 25 (2): 356 – 63.
- Noel AA, Hobson RW, Duran WN. Platelet- Activating Factor and Nitric Oxide Research 1996, 52; 3: 210 – 220.
- Noll G; Wenzel RR, Luscher TF: Endothelin and endothelin antagonists: potential role in cardiovascular and renal disease. **Mol Cell Biochem**, 1996; 157: 259 – 61.
- Novelli GP, Adembri C, Gandini E, Orlandini SZ, Papucci L, Formigli L, et al. Vitamin E protects human skeletal muscle from damage during surgical ischemia-reperfusion. **Am J Surg** 1996; 172: 206 – 209.
- Novick RJ, Gehman KE, All IS, Lee J. Lung preservation: the importance of endothelial and alveolar type II cell integrity. **Ann Thorac Surg** 1996; 62: 302 – 314.
- Ochs M. Sterological analysis of acute lung injury. **Eur. Respir. Rew.** 2006; 15: 101,115 – 121.
- O'Hare M, Wang F, Park D.S, Cyclin –dependent kinases as potential targets to improve stroke outcome. **Pharmacol. Ther**, 2002, 93: 135 – 143.
- Okusawa S, Gelfand JA, Ikejima T, et al. Interleukin–1 induces a shock-like state in rabbits. **J Clin Invest** 1988; 81: 1162 – 1172.
- Orrenius S, Mitochondrial regulation of apoptotic cell death, **Toxicology Letters**, 2004, 149: 19 – 23.
- Ovalı E, Apoptozis, In: Ustaçelebi Ş, **Temel ve Klinik Mikrobiyoloji**, Ankara, Güneş Kitabevi, 1999, PP: 195 – 203.
- Ovechkin AV, Lominadze D, Sedoris KC, Gozal E, Robinson TW, Roberts AM. Inhibition of inducible nitric oxide synthase attenuates platelet adhesion in subpleural arterioles caused by lung ischemia-reperfusion in rabbits. **J Appl Physiol.** 2005 Dec; 99(6): 2423 – 32.
- Pararajasingam R, Nicholson ML, Bell PRF, Sayers RD. Non-cardiogenic pulmonary oedema in vascular surgery. **Eur J Vasc Endovasc Surg** 1999; 17: 93 – 105.
- Patwell D, McArdle A, Griffiths RD, Lackson MJ. Measurement of free radical production by in vivo microdialysis during ischemia reperfusion injury to skeletal muscle. **Free Rad Biol Med** 2001; 30: 979 – 985.
- Pedoto A, Caruso JE, Nandi J, Oler A, Hoffmann SP, Tassiopoulos AK, McGraw DJ, Camporesi EM, Hakim TS. Acidosis stimulates nitric oxide



- production and lung damage in rats. **Am J Respir Crit Care Med.** 1999 Feb;159 (2) : 397 – 402.
- Perez-Pinzon M.A, Xu G.P, Dietrich W.D, Rosenthal M, Sick T.J, Rapid preconditioning protects rats against ischemic neuronal damage after 3 but not 7 days of reperfusion following global cerebral ischemia, **J. Cereb. BloodFlow Metab**, 1997; 17: 175 – 182.
  - Prem JT, Eppinger M, Lemmon G, Miller S, Nolan D, Peoples J. The role of glutamine in skeletal muscle ischemia/reperfusion injury in the rat hind limb model. **Am J Surg.** 1999 Aug; 178 (2) : 147 – 50.
  - Qayemi AK, Jamieson WRE, Poostizadeh A, Effects of PAF antagonist CV-3988 in preservation of heart and lung for transplantation. **Ann Thorac Surg** 1991; 52: 1026 – 1032.
  - Radomski MW, Palmer RMJ, Moncada S. Glucocorticoids inhibit the expression of an inducible, but not the constitutive nitric oxide synthase in vascular endothelial cells, **Proc Natl Acad Sci.** 1990; 87: 10043 – 9.
  - Raijmakers PG, Groeneveld AB, Rauwerda JA, Teule GJ, Hack CE. Acute lung injury after aortic surgery: the relation between lung and leg microvascular permeability to <sup>111</sup>indium-labelled transferrin and circulating mediators. **Thorax.** 1997 Oct; 52 (10) : 866 – 71.
  - Raps SP, Lai JC, Hertz L, Cooper AJ. Glutathione is present in high concentrations in cultured astrocytes but not in cultured neurons. **Brain Res.** 1989 Jul 31; 493 (2) : 398 – 401.
  - Reilly PM, Schiller HJ, Bulkley GB. Pharmacologic approach to tissue injury mediated by free radicals and other reactive oxygen metabolites. **Am J Surg.** 1991 Apr; 161 (4) : 488 – 503.
  - Rhodes RS. DePalma RG. Mitochondrial dysfunction of the liver and hypoglycemia in hemorrhagic shock. **Surg Gynecol Obstet** 1980; 150: 347 – 352.
  - Rink A, Fung K. M, Trojanowsky J.Q, Lee V.M, Neugebauer E, McIntosh T. K, Evidence of apoptosis cell death after experimental traumatic brain injury in the Sıçan, **Am. J. Pathol**, 1995, 147: 1575 – 1583.
  - Rocker GM. ischemia-reperfusion inflammatory responses and acute lung injury. **Thorax** 1997; 52: 841 – 842.
  - Saito A, Maier CM, Narasimhan P, Nishi T, Song YS, Yu F, Liu J, Lee YS, Nito C, Kamada H, Dodd RL, Hsieh LB, Hassid B, Kim EE, González M, Chan PH. Oxidative stress and neuronal death/survival signaling in cerebral ischemia. **Mol Neurobiol.** 2005; 31 (1 – 3) : 105 – 16.
  - Saunders J.W, Death in embryonic systems, **Science**, 1966, 154: 604 – 612.
  - Scaffidi C, Fulda S, Srinivasan A, Friesen C, Li F, Tomaselli KJ, Debatin K M, Kramer PH, Peter ME, Two CD95 (APO-1/ Fas) signaling pathways, **EMBO J**, 1998, 17: 1675 – 1687.
  - Schlag MG, Harris KA, Potter RF. Role of leukocyte accumulation and oxygen radicals in ischemia-reperfusion-induced injury in skeletal muscle. **Am J Physiol** 2001; 280: H1716 – 1721.
  - Schmeling DJ, Caty MG, Oldham KT, et al. Evidence for neutrophil-related acute lung injury after intestinal ischemia-reperfusion. **Surgery** 1989; 106: 195 – 202.

- Scorrano L, Korsmeyer S.J, Mechanism of cytochrome c release by proapoptotic Bcl-2 family members, **Biochem. Biophys. Res. Commun**, 2003, 304: 437 – 444.
- Sessa WC: The NO synthase family of proteins. **J Vase Res**, 1994; 31: 131 – 143.
- Shaw CM, Alvord EC Jr, Berry GR: Swelling of the brain following ischemic infarction with arterial occlusion. **Arch Neurol**, 1959; 1: 161 – 177.
- Silver IA, Erecinska M: Ion homeostasis in rat brain brain in vivo: Intra and extracellular (Ca<sup>++</sup>) and (H<sup>+</sup>) in the hippocampus during recovery from short term transient ischemia. **J Cereb Blood Flow Metab**, 1992; 12: 759 – 72.
- Simonian NA, Coyle JT: Oxidative stress in neurodegenerative diseases. **Ann Rev Pharmacol Toxicol**, 1996; 36: 83 – 106.
- Smith ML, Auer RN, Siesjo BK, The density and distribution of ischemic brain injury in the rat following 2-10min of forebrain ischemia, **Acta Neuropathol**. 1984; (Berl.), 64: 319 – 332.
- Snolleau S, Aggoun-Zouaoui D, Ben-Ari Y, Charriaut-Marlangue C. A model of transient unilateral focal ischemia with reperfusion in the P7. neonatal rat: morphological changes indicative of apoptosis. **Stroke**. 1998 Jul; 29(7) :1454 – 60.
- Sorkine P, Setton A, Halpem P, et al. Soluble tumor necrosis factor receptors reduce bowel ischemia-induced lung permeability and neutrophil sequestration. **Crit Care Med** 1995; 23: 1377 – 1381.
- Sprick MR, Walczak H, The interplay between the Bcl-2 family and death receptor-mediated apoptosis, **Biochimica et Biophysica Acta**, 2004, 1664: 125 – 132.
- Srinivasan A, Roth K.A, Sayers R.O, Shindler K.S, Wong A.M, Fritz L.C, Tomaselli K, In situ immunodetection of activated caspase-3 in apoptotic neurons in the developing nervous system, **Cell Death Differ**, 1998, 5 : 1004 – 1016.
- Sunguroğlu A, Atabenli Erdemli E, Tekelioğlu M, Programlanmış Hücre Ölümü, Apoptozis, 1996.
- Tuğlu I, Vural K, Cezayirli E, Varol T. Metabolik Durumun Global Iskemi Ve Reperfüzyonda Beyin Hasarına Etkisi. **Ege Tip Dergisi**, 2004, 43(3):135 –143.
- Tuğlu, Vural, Cezayirli, Varol, Özbilgin. İskemik Ön Tanıtım (İÖT) – Reperfüzyon Ve Beyin Hasarının Metabolik Durum ile ilişkisi, Sendrom, 2004.
- Stein HJ, Feussner H, Siewert JR. Failure of antireflux surgery: causes and management strategies. **Am J Surg**. 1996 Jan;171(1) : 36 – 9.
- Stuehr DJ, Nathan CF: NO a macrophage product responsible for cytostasis and respiratory inhibition in tumor target cells. **J Exp Med** 1989; 169: 1543 – 55.
- Sugawara T, Fujimura M, Noshita N, Kim GW, Saito A, Hayashi T, Narasimhan P, Maier CM, Chan PH. Neuronal death/survival signaling pathways in cerebral ischemia. **NeuroRx**. 2004 Jan; 1 (1) : 17 – 25.
- Sugawara T, Kawase M, Lewen A, Noshita N, Gasche Y, Fujimura M, Chan PH. Effect of hypotension severity on hippocampal CA1 neurons in a rat global ischemia model. **Brain Res**. 2000; 877: 281 – 287.

- Sun WJ. Ischemia, reperfusion and no-reflow phenomenon. Swensson LG, Crawford ES (editors). Cardiovascular and Vascular Disease of The Aorta. Philadelphia: **W.B. Saunders Company**. 1997: 194 – 218.
- Tanahashi Y, Takeyoshi I, Aiba M, Ohwada S, Matsumoto K, Morishita Y. The effects of FK409 on pulmonary ischemia-reperfusion injury in dogs. **Transplant** 1999; 12: 402 – 407.
- Tateishi. Distribution of Argyrophil Cells in Adult Human Lung. **J. Pathol.** 96: 198 – 202, 1973.
- Tayeh MA, Marietta Mp Macrophage oxidation of L-arginine to nitric oxide, nitrite and nitrate. **J. Biol Chem.** 1989; 264: 19654 – 8.
- Temeltas G, Tikiz C, Dagci T, Tuglu I, Yavasoglu A. The effects of botulinum-A toxin on bladder function and histology in spinal cord injured rats: is there any difference between early and late application. **J Urol. Dec;** 174 (6): 2393 – 6, 2005.
- Timsit SG, Sacco RL, Mohr JP, Foulkes MA, Tatemichi TK, Wolf PA. Brain infarction severity differs according to cardiac or arterial embolic source. **Neurology.** 1993; 43: 728 – 733.
- Turnage RH, Wright JK, Iglesias J, LaNoue JL, Nguyen H, Kim L, Myers S. Intestinal reperfusion-induced pulmonary edema is related to increased pulmonary inducible nitric oxide synthase activity. **Surgery.** 1998 Aug;124 (2): 457 – 62.
- Van Griensven M, Stalp M, Seekamp A. Ischemia-reperfusion directly increases pulmonary endothelial permeability in vitro. **Shock.** 1999 Apr;11(4):259 – 63.
- Van Snick J. Interleukin - 6: an overview. **Ann Rev Immunol** 1990; 8: 253 – 278. 361.
- Vatansever D, Tekin İ, Tuglu İ, Erbuyun K, Ok G. A comparison of the neuroablative effects of conventional and pulsed radiofrequency techniques. **Clin J Pain.** 2008 Oct;24(8): 717 – 24.
- Vaux DL, Weismann IL: Kim SK, Prevention of programmed cell death in *Caenorhabditis elegans* by human bcl-2, **Science**, 1992, 258: 1955 – 1957.
- Vural KM, Öz MC. Endothelial adhesivity, pulmonary hemodynamics and nitric oxide synthesis in ischemia-reperfusion. **Eur J Cardiothorac Surg.** 2000 Sep; 18 (3): 348–52.
- Wang X, The expanding role of mitochondria in apoptosis, **Genes & Development**, 2001, 15: 2922 – 2933.
- Warder TD: Influence of endothelial mediators on the vascular smooth muscle and circulating platelets and blood cells, **Int Angiol.** 1996 Jun;15 (2): 93 – 9.
- Weiss SJ. Tissue destruction by neutrophils. **N Engl J Med** 1989; 320: 365 – 376.
- Welbourn CR, Young Y. Endotoxin, septic shock and acute lung injury: neutrophils, macrophages and inflammatory mediators. **Br J Surg** 1992; 79: 998 – 1003.
- Welbourn CR, Goldman G, Paterson IS, Valeri CR, Shepro D, Hechtman HB. Pathophysiology of ischaemia reperfusion injury: central role of the neutrophil. **Br J Surg.** 1991 Jun;78(6):651–5.

- Welbourn R, Goldman G, Kobzik L, Paterson I, Shepro D, Hechtman HB. Interleukin-2 induces early multisystem organ edema mediated by neutrophils. **Ann Surg.** 1991 Aug; 214 (2) : 181 – 6.
- Wenmalm A: Endothelial NO and cardiovascular disease. **J Intern Med.** 1994 Apr; 235 (4) : 317 – 27.
- White BC, Sullivan JM, DeGracia DJ, O'Neil BJ, Neumar RW, Grossman LI, Rafols JA, Krause GS. Brain ischemia and reperfusion: molecular mechanisms of neuronal injury. **J Neurol Sci.** 2000 Oct 1; 179 (S 1–2) :1 – 33.
- Willingham MC. Cytochemical methods for the detection of apoptosis, **J.Histochem. Cytochem,** 1999, 47: 1101 – 1109.
- Windsor AC, Mullen PG, Fowler AA, Sugeran HJ. Role of the neutrophil in adult respiratory distress syndrome. **Br J Surg** 1993; 80: 10 – 17.
- Wolin MS: Reactive oxygen species and vascular signal transduction mechanisms. **Microcirculation,** 1996; 3: 1 – 17.
- Wyllie A.H, Kerr J.F.R, Currie A.R, Cell death: the significance of apoptosis, **Int. Rev. Cytol,** 1980, 68: 251 – 306.
- Yang F, Sun X, Beech W, Teter B, Wu S, Sigel J, Vinters HV, Frautschy SA, Cole GM. Antibody to caspase-cleaved actin detects apoptosis in differentiated neuroblastoma and plaque - associated neurons and microglia in Alzheimer disease, **Am J. Pathol,** 1998, 152: 379 – 389.
- Zhang L, Andou Y, Masuda S, Mitani A, Kataoka, K. Dandelone protects against ischemic, delayed neuronal death in gerbil brain. **Neurosci Lett.** 1993 Aug 6;158 (1): 105 – 8.
- Zimon IN, Mavlianova NA. Respiratory disorders in patients with acute arterial occlusion of legs and ischemic syndrome. **Khirurgiia (Mosk).** 1997; (7): 16 – 8.
- Zeng AY, Tu EY, Han ZY, Yang GT.[Effects of rotundine injection on nitric oxide synthase in tissues of different organs after ischemia/reperfusion of brain in rats] **Zhongguo Wei Zhong Bing Ji Jiu Yi Xue.** 2007 Jun; 19(6):361 – 4.
- Zweier JL, Talukder MA. The role of oxidants and free radicals in reperfusion injury. **Cardiovasc Res.** 2006 May 1;70(2):181 – 90.