



T.C.

GAZİOSMANPAŞA ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**İSKELET KASI İSKEMİ REPERFÜZYON HASARINA KARŞI
KRİLL YAĞININ VE İSKEMİK ÖNKOŞULLAMANIN
KORUYUCU ETKİSİ**

Nihal ÇİFTÇİ

Tıbbi Biyokimya Anabilim Dalı
Doktora Tezi

Danışman
Prof. Dr. Hüseyin ÖZYURT

TOKAT – 2015



T.C.

GAZİOSMANPAŞA ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**İSKELET KASI İSKEMİ REPERFÜZYON HASARINA KARŞI
KRİLL YAĞININ VE İSKEMİK ÖNKOŞULLAMANIN
KORUYUCU ETKİSİ**

Nihal ÇİFTÇİ

Tıbbi Biyokimya Ana Bilim Dalı
Doktora Tezi

Danışman
Prof. Dr. Hüseyin ÖZYURT

TOKAT – 2015

**İSKELET KASI İSKEMİ REPERFÜZYON HASARINA KARŞI
KRİLL YAĞININ VE İSKEMİK ÖNKOŞULLAMANIN
KORUYUCU ETKİSİ**

Tezin Kabul Ediliş Tarihi: 15 / 09 / 2015

Jüri Üyeleri (Ünvanı, Adı Soyadı)

Başkan : Prof. Dr. Şemsettin ŞAHİN
Üye : Prof. Dr. Hüseyin ÖZYURT
Üye : Doç. Dr. Köksal DEVECİ
Üye : Yrd. Doç. Dr. Ali OKUYUCU
Üye : Yrd. Doç. Dr. Osn.an ŞALIŞ

İmzası


Bu tez, Gaziosmanpaşa Üniversitesi Sağlık Bilimler Enstitüsü Yönetim Kurulunun 15 / 09 / 2015 tarih ve 19/02 sayılı oturumunda belirlenen jüri tarafından kabul edilmiştir.

Enstitü Müdürü: Doç. Dr. Hacı Ömer Ateş

Mühür
İmza

T.C.
GAZİOSMANPAŞA ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLER ENSTİTÜSÜ MÜDÜRLÜĞÜ'NE

Bu belge ile, bu tezdeki bütün bilgilerin akademik kurallara ve etik ilkelere uygun olarak toplanıp sunulduğunu, bu kural ve ilkelerin gereği olarak, çalışmada bana ait olmayan tüm veri, düşünce ve sonuçlara atıf yaptığımı ve kaynağını gösterdiğimi beyan ederim.

(.../.../2015)

Nihal Çiftçi

TEŞEKKÜR

Tezimde büyük emeği olan tez danışmanım Prof. Dr. Hüseyin ÖZYURT'a, tıbbi biyokimya anabilimdalı başkanı Sayın Prof. Dr. Şemsettin ŞAHİN'e, bilgi ve tecrübelerini esirgemeyen anabilim dalının değerli öğretim üyesi Sayın Doç. Dr. Köksal DEVECİ'ye, tez jüri komitesinin değerli üyeleri Sayın Yrd. Doç. Dr. Ali OKUYUCU ve Sayın Yrd. Doç. Dr. Osman ŞALIŞ'a, histoloji ve embriyoloji anabilim dalı öğretim üyesi Sayın Yrd. Doç. Dr. Fikret GEVREK'e, sonuçların istatistik olarak değerlendirilmesindeki yardımlarından dolayı Sayın Öğr. Gör. Osman DEMİR'e ve anabilim dalındaki diğer tüm öğretim üyelerine en içten teşekkürlerimi sunarım. Her zaman olduğu gibi tez çalışmam sırasında da desteklerini esirgemeyen ve her daim bana inanıp cesaret veren sevgili aileme sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

Nihal ÇİFTÇİ

ÖZET

İSKELET KASI İSKEMİ REPERFÜZYON HASARI ÜZERİNE KRİLL YAĞININ VE İSKEMİK ÖNKOŞULLAMANIN KORUYUCU ETKİSİ

İskemi reperfüzyon hasarı temel olarak iskemik dokuda ve perfüzyon yeniden sağlandıktan sonra doku oksijen ile tekrar karşılaştığında ortaya çıkan serbest oksijen radikallerinin (SOR) oluşturduğu hasarların tümüdür. İskemi sonrası reperfüzyonun yol açtığı ağır oksidatif stres ciddi işlevsel ve yapısal hasara yol açmaktadır. Bu hasardan başlıca serbest oksijen radikalleri sorumlu tutulmaktadır. Son yıllarda farklı organlarda yapılan çalışmalarda reperfüzyon kaynaklı hasara karşı iskemik önkoşullama gibi yöntemlerin yanı sıra birçok antioksidan maddenin koruyucu etkileri gösterilmiştir. Bu deneysel çalışmada, bir sıçan modelinde oluşturulan iskelet kası iskemisi reperfüzyon hasarında krill yağı ve iskemik önkoşullama etkinliği, biyokimyasal ve histopatolojik parametreler yardımı ile araştırıldı.

Ekstremitelerde iskemisi, femoral artere klemp konularak sağlandı. Sıçanların alt ekstremitesinde femoral arter ve ven dışında bütün dokuların disseke edilmesini takiben femoral artere 2 saat süreyle mikrovasküler klemp konmuş, reperfüzyon gruplarında 1 saat reperfüzyon yapılmıştır. Kırk erkek Wistar albino türü sıçan 5 eşit gruba ayrıldı. Grup 1'de yalnızca sham operasyonu yapıldı. Grup 2'de yer alan sıçanlarda yalnızca İR uygulandı. Grup 3'te 120 dakikalık iskemisi öncesinde tek bir siklus şeklinde 10 dakika kısa süreli iskemisi ve 10 dakika reperfüzyon oluşturuldu. Grup 4 ve grup 5'de yer alan deneklere reperfüzyon öncesi sırasıyla 200 mg/kg krill yağı (KO) intraperitoneal (ip) yoldan verildi. Biyokimyasal analiz ve histopatolojik inceleme için kas örnekleri ve kanları alındı. Malondialdehit (MDA), nitrik oksit (NO) seviyeleri, tümör nekroz faktör- alfa (TNF- α), interlökin-6 (IL-6) seviyeleri ve süperoksit dismutaz (SOD), katalaz (CAT), glutatyon peroksidaz (GSH-Px) aktiviteleri ölçüldü ve istatistiksel olarak karşılaştırıldı. Kas dokuları histolojik ve immunohistokimyasal olarak incelendi.

Krill yağı (KO) ve iskemik önkoşullama (İÖK) uygulanan sıçanlarda İ/R grubuna göre doku MDA düzeyi, doku NO düzeyi anlamlı şekilde azalırken ($p < 0.001$, $p < 0.001$), ve CAT aktivitesi ($p < 0.05$), GSH-Px ($p > 0.05$) aktivitesi ise artmıştır. Serum SOD aktivitesi ($p = 0.001$) istatistiksel olarak anlamlıdır. KO ve İÖK uygulanan sıçanlarda İ/R grubuna göre serum TNF- α düzeyi azalırken, IL-6 düzeyi değişmemiştir. Sham grubu ile karşılaştırıldığında İ/R

grubunda kas lif organizasyon dejenerasyonu ve inflamatuvar hücre infiltrasyonu önemli derecede arttı.

Bu sonuçlar deneysel KO ve İÖK uygulamalarının iskelet kası İ/R hasarına karşı koruyabileceğini düşündürmektedir. Akut vasküler yaralanmalı ekstremite travmaları, uzamış turnike süreli ekstremite cerrahisi ve akut kompartman sendromu gibi olgularda serbest radikallerin doku hasarını azaltmak için, KO ve İÖK uygulamalarının koruyucu etkisinin klinik çalışmalarla araştırılmasının uygun olacağı kanaatindeyiz.

Anahtar kelimeler: İskemi reperfüzyon hasarı, iskelet kası, femoral arter, krill yağı, iskemik önkoşullama, serbest oksijen radikalleri

ABSTRACT

PROTECTIVE EFFECTS OF KRILL OIL AND AND ISCHEMIC PRECONDITIONING ON ISCHEMIA-REPERFUSION INJURY OF SKELETAL MUSCLE

Ischemia-reperfusion injury is the damage caused by free oxygen radicals those are released after reperfusion of the ischemic tissue as a result of the ischemic tissue re-oxygenation. Oxidative stress due to reperfusion after ischemia causes severe functional and structural damage. Free oxygen radicals are responsible for this damage. Besides techniques such as ischemic preconditioning the protective effects of many antioxidant substances has been shown in many of the lately carried out studies. In this experimental study, the effect of krill oil infusion and ischemic preconditioning event was studied by using both biochemical and histopathological parameters in a rat model.

Limb ischemia was achieved by clamping femoral arteries. All the tissues except femoral artery and vein of the hind limb were dissected in an attempt to prevent collateral circulation. Animals were subjected to 2 hours of ischemia followed by 1 hour reperfusion depending on the experimental group. Fifty male adult Wistar albino rats were randomly allocated into 5 groups. Group 1 was served as untreated controls. The rats in Group 2 were subjected to I/R only. In group 3, IPC was created as a single of 10-minute transient ischemia and 10-minute reperfusion given before the 120-minute ischemia. In groups 4 and 5, the rats were treated with intraperitoneal (i.p.) injection of 200 mg/kg i.p. injection of KO before reperfusion. Muscle and blood samples were collected for biochemical analysis and histopathological examination. Malondialdehyde (MDA), nitric oxide (NO), tumor necrosis factor alpha (TNF- α), interleukin-6 (IL-6) levels and superoxide dismutase (SOD), glutathione peroxidase (GSH-Px), catalase (CAT) activities were measured and compared statistically. Histologic and immunohistochemical analysis of the rat skeletal tissues were performed.

While tissue malondialdehyde (MDA), tissue nitric oxide (NO) levels were significantly decreased ($p < 0.001$, $p < 0.001$), catalase (CAT) ($p < 0.05$), glutathione peroxidase (GSH-Px) ($p > 0.05$) activities increased in krill oil (KO) and ischemic preconditioning (IPC) compared to I/R group. Serum superoxide dismutase (SOD) activity is statistically significant.

Tumor necrosis factor alpha (TNF- α) level was decreased and interleukin-6 (IL-6) level was unchanged in KO and IPC compared to I/R group. Degeneration of muscle fibers and inflammatory cell infiltration were significantly increase in the I/R group when compared with the sham group.

The result suggest that experimental applications of ischemic preconditioning and krill oil may protect the skeletal muscle against I/R injury. We suggest that the protective effect of experimental applications of ischemic preconditioning and krill oil against I/R damage in cases of extremity injuries with acute vascular compromise, extremity surgery with prolonged tourniquet time and acute compartment syndrome should be investigated with clinical trials.

Key words: Ischemia-reperfusion injury, skeletal muscle, femoral artery, krill oil, ischemic preconditioning, free oxygen radicals.

İÇİNDEKİLER**KONU BAŞLIĞI***Sayfa*

1. GİRİŞ	1
2. GENEL BİLGİLER	3
2.1. İskelet kası	3
2.1.1. İskelet kası gelişimi	3
2.1.2. İskelet kasının yapısı	4
2.1.2.1. Kas lifleri	6
2.1.2.2. Motor ünite	8
2.1.2.3. Bağ dokusu	9
2.1.2.4. Ekstrasellüler matriks patolojik değişiklikler	11
2.1.2.5. Myoblastlar	12
2.1.2.6. Satelit hücreler	12
2.1.3. İskelet kasının işlevi, iyileşmesi	14
2.1.3.1. Kasılma	14
2.1.3.2. İyileşme	15
2.1.3.3. Kas dejenerasyonu ve enflamasyon	16
2.1.3.4. Kas rejenerasyonu	16
2.1.3.5. Fibrozis	17
2.1.4. Sıçan gastroknemius kasının anatomisi	18
2.2. Serbest oksijen radikalleri	19
2.2.1. Serbest oksijen radikal kaynakları	20
2.2.2. Serbest oksijen radikal türleri	20
2.2.3. Serbest radikallerin etkileri	24
2.3. İskemi	27
2.3.1. Reversibl (geri dönüşümlü) iskemik hasar	27
2.3.2. İrreversibl (geri dönüşümsüz) iskemik hasar	28
2.4. Reperfüzyon	29
2.5. İskemi reperfüzyon hasarını oluşturan mekanizmalar	30
2.5.1. İskemi reperfüzyon hasarında serbest radikaller	31

2.5.2. İskemi reperfüzyon hasarında komplemanlar	35
2.5.3. İskemi reperfüzyon hasarında sitokinler	36
2.5.4. İskemi reperfüzyon hasarında endotel hücrenin rolü	37
2.5.5. İskemi reperfüzyon hasarında polimorf nüveli lökositler (PMNL)	38
2.6. Antioksidan savunma sistemleri	40
2.6.1. Endojen antioksidanlar	42
2.6.1.1. Enzim olan antioksidanlar	42
2.6.1.2. Enzim olmayan antioksidanlar	44
2.6.2. Ekzojen antioksidanlar	45
2.6.2.1. Vitamin ekzojen antioksidanlar	45
2.6.2.2. İlaç olarak kullanılan antioksidanlar	46
2.7. İskemi reperfüzyon hasarını önlemek için tedavi stratejileri	46
2.7.1. İskemik önkoşullama	47
2.7.1.1. Erken dönem koruma mekanizmaları	48
2.7.1.2. Geç dönem korunma mekanizmaları	49
2.8. Krill yağı	50
3. GEREÇ VE YÖNTEMLER	55
3.1. Gereçler	55
3.1.1. Deneysel hayvanları	55
3.1.2. Deneysel kullanılabilmeyen sarf malzemeleri	55
3.1.3. Deneysel kullanılabilmeyen alet ve cihazlar	56
3.2. Yöntemler	56
3.2.1. Deneysel gruplarının oluşturulması	56
3.2.2. İskemi reperfüzyon oluşturulması, kan ve dokuların alınması	57
3.2.3. Biyokimyasal inceleme	59
3.2.3.1. Kas doku örneklerinin homojenize edilmesi	59
3.2.3.2. SOD enziminin (total SOD) aktivite tayini	60
3.2.3.3. CAT enziminin aktivite tayini	61
3.2.3.4. GSH-Px enziminin aktivite tayini	62
3.2.3.5. MDA miktarının tayini	63
3.2.3.6. NO miktarının tayini	63
3.2.3.7. Lowry metodu ile protein tayini	64
3.2.3.8. Tümör nekroz faktör-alfa (TNF- α) düzeylerinin ölçümü	65
3.2.3.9. İnterlökin-6 (IL-6) düzeylerinin ölçümü	69

3.2.4. Histopatolojik inceleme	73
3.2.4.1. Hematoksilen-eozin boyama metodu	74
3.2.4.2. İmmünohistokimyasal metod	74
3.2.5. İstatistiksel analizler	76
4. BULGULAR	77
4.1. Biyokimyasal Bulgular	77
4.1.1. Gruplarda MDA miktarları	78
4.1.2. Gruplarda NO miktarları	79
4.1.3. Gruplarda SOD aktivitesi	80
4.1.4. Gruplarda CAT aktivitesi	81
4.1.5. Gruplarda GSH-Px aktivitesi	81
4.1.6. Gruplarda TNF- α düzeyleri	82
4.1.7. Gruplarda IL-6 düzeyleri	83
4.2. Histopatolojik bulgular	84
4.2.1. Hematoksilen eozin boyama bulguları	84
4.2.2. İmmünohistokimyasal bulgular	89
5. TARTIŞMA	94
6. SONUÇVE ÖNERİLER	101
7. KAYNAKLAR	102
ÖZGEÇMİŞ	119

TABLolar LİSTESİ**TABLO BAŞLIĞI***Sayfa*

Tablo 1. Antioksidanlar	41
Tablo 2. Deney gruplarının dağılımı	56
Tablo 3. Gruplarda kas dokusunda enzim sonuçları	77
Tablo 4. Gruplarda serumda enzim sonuçları	77
Tablo 5. Kas dokusunda gruplararası MDA ve NO miktarları	77
Tablo 6. Serumda gruplararası MDA ve NO miktarları	78
Tablo 7. Gruplararası TNF- α ve IL-6 düzeyleri	78
Tablo 8. Gruplararası histolojik hasar skorlarının sonuçları	85
Tablo 9. Semikantitatif HSCORE analizlerinin sonuçları	90

ŞEKİLLER LİSTESİ

ŞEKİL BAŞLIĞI

Sayfa

Şekil 1. Çizgili kas lifinin oluşumu	4
Şekil 2. Çizgili kas kütesinin yapısı ve kılıfları	6
Şekil 3. Kas liflerini saran bağ dokusu ve tendonla ilişkisi	10
Şekil 4. Normal ve fibrotik kas rejenerasyonunda yer alan süreçler	11
Şekil 5. Kas rejenerasyonu ve onarım boyunca fibroadipojenik öncüllerin çoklu rolleri	13
Şekil 6. Yaralanma sonrası kas rejenerasyonu	17
Şekil 7. PCO oluşumuna yol açan radikal aracılı (primer) modifikasyon reaksiyonları	26
Şekil 8. İ/R hasarında yer alan olaylar dizisi	31
Şekil 9. Ksantin-hipoksantin metabolizması ve serbest oksijen radikal oluşum şeması	33
Şekil 10. Lökositlerin damar endoteli ile etkileşim mekanizması	40
Şekil 11. Hücresel antioksidan enzim sistemi ve lipid peroksidasyon zinciri gösteren şema	42
Şekil 12. Erken ve geç önkoşullamada sinyal ve iletim yolları	49
Şekil 13. Karotenoidlerin poliizoprenoid yapısı	50
Şekil 14. Gıdalarda bulunan bazı karotenoidler	51
Şekil 15. Astaksantin yapısal formülü	52
Şekil 16. EPA ve DHA içeren fosfatidilkolinin yapısı	53
Şekil 17. Supin pozisyonda yapılan inguinal insizyon	57
Şekil 18. Femoral arter, femoral ven ve femoral sinirim ortaya konması	58
Şekil 19. Femoral arter, femoral ven ve femoral sinirim askıya alındıktan sonra tüm dokuların disseke edilmesi	58
Şekil 20. Sağ gastroknemius kasının alınması	59
Şekil 21. Standart TNF- α grafiği	69
Şekil 22. Standart IL-6 grafiği	73
Şekil 23. Doku MDA düzeylerinin gruplara göre dağılımını gösteren grafik	79

Şekil 24. Doku NO düzeylerinin gruplara göre dağılımını gösteren grafik	79
Şekil 25. Serum SOD aktivitelerinin gruplara göre dağılımını gösteren grafik	80
Şekil 26. Doku SOD aktivitelerinin gruplara göre dağılımını gösteren grafik	80
Şekil 27. Doku CAT aktivitelerinin gruplara göre dağılımını gösteren grafik	81
Şekil 28. Serum GSH-Px aktivitelerinin gruplara göre dağılımını gösteren grafik	82
Şekil 29. Doku GSH-Px aktivitelerinin gruplara göre dağılımını gösteren grafik	82
Şekil 30. TNF- α düzeylerinin gruplara göre dağılımını gösteren grafik grafik	83
Şekil 31. IL-6 düzeylerinin gruplara göre dağılımını gösteren grafik	83

RESİMLER LİSTESİ**RESİM BAŞLIĞI***Sayfa*

Resim 1. İskelet kasının mikroskopik görünümü	7
Resim 2. Sıçan arka bacak anatomisi	18
Resim 3. Sham grubu mikroskopik görünümü	86
Resim 4. İ/R grubu mikroskopik görünümü	87
Resim 5. İÖK grubu mikroskopik görünümü	87
Resim 6. İ/R+KO grubu mikroskopik görünümü	88
Resim 7. İÖK+KO grubu mikroskopik görünümü	89
Resim 8. Sham grubu kas dokusu; güçlü İHC boyanma görüntüsü	91
Resim 9. İ/R grubu kas dokusu; zayıf İHC boyanma görüntüsü	92
Resim 10. İÖK grubu kas dokusu; zayıf İHC boyanma görüntüsü	92
Resim 11. İ/R+KO grubu kas dokusu; orta İHC boyanma görüntüsü	93
Resim 12. İÖK+KO grubu kas dokusu; orta İHC boyanma görüntüsü	93

KISALTMALAR VE SİMGELER LİSTESİ

İ/R	İskemi-reperfüzyon
KO	Krill oil
İÖK	İskemik önkoşullama
ATP	Adenozin trifosfat
AMP	Adenozin monofosfat
TGG-B	Dönüştürücü büyüme faktörü beta
XO	Ksantin oksidaz
ROR	Reaktif oksijen radikalleri
ROS	Reaktif oksijen türleri
NADH	Nikotinamid adenin dinükleotid
NOS	Nitrik oksit sentaz
MDA	Malondialdehit
NO	Nitrik oksit
SOD	Süperoksit dismutaz
CAT	Katalaz
GSH-Px	Glutatyon peroksidaz
TNF-α	Tümör nekroz faktör-alfa
NFκB	Nükleer faktör kapa beta
IL	İnterlökin
DNA	Deoksiribonükleik asit
ICAM	İntersellüler adezyon molekül
VCAM	Vasküler adezyon molekül
PAF	Platelet aktive edici faktör
PGI₂	Prostaglandin I ₂
PGE₂	Prostaglandin E ₂
H₂O₂	Hidrojen peroksit
PGG₂	Prostaglandin G ₂
PMNL	Polimorf nüveli lökositler
MAPK	Aktive edilen protein kinaz
PKC	Protein kinaz C
EPA	Eikosapentaenoik asit
DHA	Dokosaheksaenoik asit
LCPUFA	Uzun zincirli çoklu doymamış yağ asidi

IGF	İnsülin benzeri büyüme faktörü
MMP	Matriks metalloproteinaz
Fe⁺²	Ferröz demir iyonu
Fe⁺³	Ferrik demir iyonu
ELİSA	Enzim bağlı immün ölçüm
Ca	Kalsiyum

1. GİRİŞ

İskemi reperfüzyon hasarı teorik olarak önlenebilir bir hasardır. Serbest oksijen radikali oluşumunu önleyen, oluşmuş radikalleri enzimatik veya kimyasal olarak gideren, radikallerin oluşumunu izleyen lökosit kemotaksisi, adhezyonu ve enzim sekresyonu gibi sonuçları durdurabilen pek çok etken ile reperfüzyon hasarının engellenebildiğini gösteren çok sayıda çalışma vardır (3). Serbest oksijen radikallerinin yol açtığı reperfüzyon hasarını önlemek için pek çok tedavi modalitesi kullanılmış ve çok sayıda çalışma yapılmıştır. Ancak klinik kullanıma giren birçok ajanın varlığına rağmen, reperfüzyon hasarını kesin bir biçimde önleyen tedavi henüz ortaya konulamamıştır (1, 2, 3).

İskemi-reperfüzyon hasarı (İRH) koroner arter hastalıkları, trombolitik tedavi, balon anjiyoplasti, kardiyopulmoner bypass, oklüzif arter hastalıkları, aort / periferik arter klempleme, inme, turnike uygulaması, organ transplantasyonu, miyokütanöz doku transferi ve ampute olmuş dokunun replantasyonu gibi klinik durumlarda karşılaşılan bir durumdur. Hastanın morbidite ve mortalitesini iyileştirmek adına, İRH'nin önlenmesi ve/veya olumsuz sonuçlarının en aza indirilmesi için değişik tedavi araçlarının geliştirilmesi önemli bir araştırma alanı olmuştur (4).

Hastalıkların tedavisindeki amaç, dokuların temel gereksinimlerini karşılayabilmek için, dolaşım bütünlüğü ve sürekliliğini sağlamaktır. Dolaşımı kesintiye uğrayarak iskemik kalan canlı dokuda, dolaşım tekrar sağlandığında oluşan reperfüzyonun neden olduğu zararlı etkiler, iskemik hasardan daha geniş çaplı ve daha ciddidir. İskemik dokunun kütlesi, bir ekstremitenin tümü ya da geniş bir kısmını kapsadığında reperfüzyon yalnızca lokal doku zedelenmesine değil, aynı zamanda uzak organ hasarına da yol açabilmektedir. İskemi ve reperfüzyon sürecinde hasarın büyük bölümünün reperfüzyon periyodunda olduğu ve doku hasarından reaktif oksijen radikallerinin sorumlu olduğu bilinmektedir (5).

İRH, iskemiye maruz kalmış dokuların reperfüzyonu neticesinde hücrelerin ölümünün hızlanması olarak tanımlanabilir. İRH'nin fizyopatogenezi ile ilgili birçok araştırma yapılmıştır. Bu araştırmaların ışığında gelinen noktada, SOR'un çok önemli bir rolünün olduğu sonucu ortaya çıkmıştır (6). Fizyolojik şartlarda gelişen biyokimyasal reaksiyonlar esnasında süperoksit anyonu (O_2^-), hidrojen peroksit (H_2O_2) ve hidroksil radikali (OH^*) gibi temel moleküller açığa çıkmaktadır (6). SOR'un oluşması reperfüzyon ile anlamlı şekilde artarken, fizyolojik şartlarda antioksidan mekanizmalar sayesinde bunların miktarı hücrelere zarar vermeyecek bir düzeyde tutulur (6,7). Benzer olarak iskemik iskelet kasının reperfüzyonuyla da SOR üretimi gösterilmiştir (8). Her ne kadar İRH'deki SOR oluş mekanizması tam olarak çözümlenmediyse de, reperfüzyonla dokuya tekrar sunulan oksijenin bu olayda rolünün olması muhtemeldir. Nitekim reperfüzyonda oksijen miktarının azaltılmasının hasarı azalttığı çeşitli araştırmacılar

tarafından gösterilmiştir (9,10). Ayrıca ksantin oksidaz, aktive olmuş lökositler ve mitokondriyal elektron transport zincirinin de SOR üretimine katkısının olabileceği düşünülmektedir(11). Bunlar arasında, çizgili kas söz konusu olduğunda, ksantin oksidaz ve nötrofilik nikotinamid adenin dinukleotid fosfat (NADPH) oksidazın ön plana geçtiği görülmektedir (12).

İyi bir tedavi stratejisi geliştirebilmek için her şeyden önce İ/R esnasında oluşan hasarın ilişkili olduğu düşünülen sistemlerde yaptığı değişikliklerin bütün boyutlarıyla ortaya konması gerekir. Bu yüzden enzimatik antioksidan sistemin ana öğeleri olan SOD, CAT ve GSH-Px aktiviteleri; İ/R hasarındaki rolü tartışmalı olan (hasardan koruyan veya hasarı arttıran) nitrik oksit (NO) ve lipid peroksidasyonunun önemli bir göstergesi olan malondialdehit (MDA) seviyelerinin biyokimyasal yöntemlerle ölçülmesi planlandı. İRH'de, SOR ile antioksidan savunma sistemlerinin SOR lehine bir dengesizliği olduğu düşünüldüğünde, bu enzimlerin değerlendirilmesinin gerekliliği de ortaya çıkmaktadır. Ayrıca bu enzimlerin ölçülmesi, araştırma ilaçlarımızın etki mekanizmalarının aydınlatılmasına da zemin hazırlayabilir.

Çalışmamızın amacı, klinik pratikte sık karşılaştığımız, ciddi morbidite ve mortaliteye neden olabilen iskemi reperfüzyon hasarında krill yağı ve iskemik önkoşullamanın koruyucu etkilerini, birbirlerine olan üstünlüklerini değerlendirmektir. Ayrıca, iskemi reperfüzyon hasarında kas dokusunda meydana gelen ve sistemik dolaşımında ortaya çıkan bazı değişimleri tespit etmek, iki ayrı ajanın tek başına veya birlikte uygulandıklarında bu hasarın engellenmesi için yeni bir tedavi modalitesi olabilir mi sorusuna cevap aramak ve bu alanda yapılacak yeni çalışmalara ışık tutmaktır.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. İskelet kası

Bu kaslar çoğunlukla iskelet sistemine bağlı olduklarından iskelet kası, enine çizgilenme gösterdiklerinden çizgili kas lifleri olarak adlandırılırlar (13).

Kas dokusu vücudun yaklaşık %30–40'ını oluşturan ve kontraksiyon (kasılma) yapabilen bir dokudur (14). Kimyasal enerji kullanılarak mekanik iş olarak yapılan bu fonksiyonla vücudun bütünü ya da bir bölümü hareket edebilmektedir. Ayrıca kalbin devamlı çalışması, solunum, bağırsakların hareketleri gibi organizmanın yaşaması için çok önemli olan birçok olay da kas hücrelerinin kasılmasıyla sağlanmaktadır (15).

Kas dokusunun % 70–78 'ini su, % 15-22'sini protein , %1-13'ünü yağ, %1-2'sini karbonhidrat, %1-2'sini mineral ve vitaminler, %1,5–1,8'ini protein olmayan azotlu bileşikler oluşturmaktadır (16).

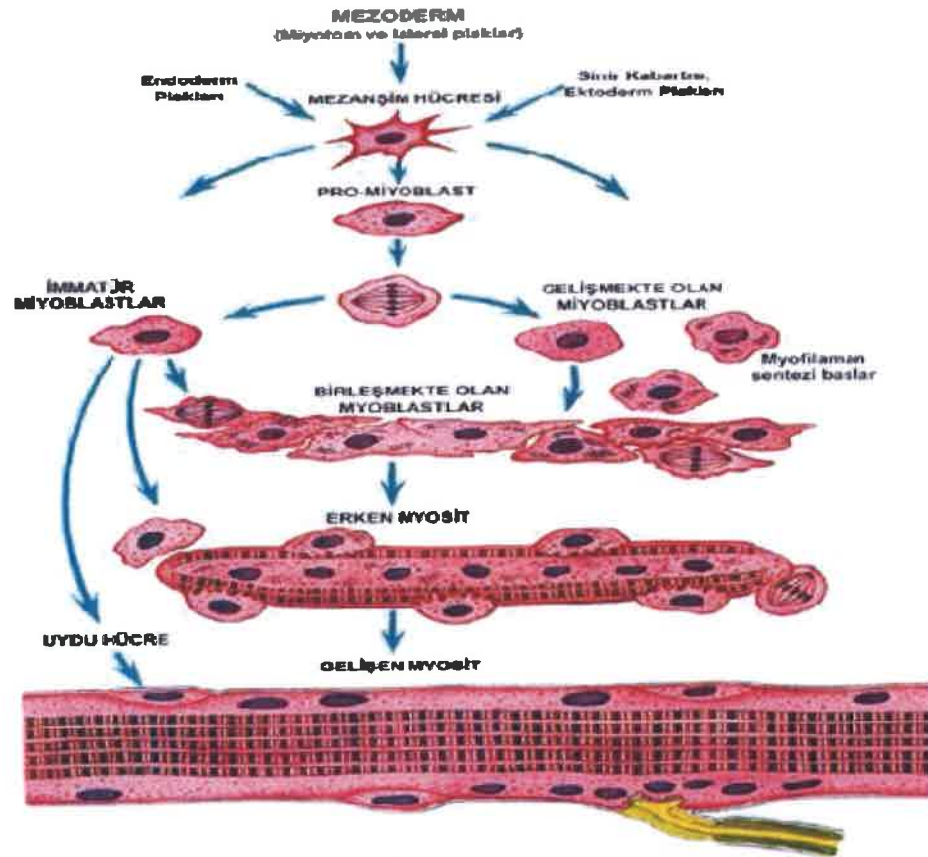
2.1.1. İskelet kası gelişimi

İskelet kaslarının çoğu doğumdan önce gelişir. Diğerleri ise birinci yılın sonuna kadar şekillenirler. İlk yıldan sonra daha çok miyofibrilin şekillenmesi ile liflerin çapları artar ve böylece kas boyutunda artış olur. Büyüyen iskelet ile birlikte kaslar uzunluklarını ve genişliklerini artırır. Bir kas lifinin ulaşabileceği boyut, yapılan egzersiz miktarına koşut artar. Ancak oluşan her kas lifi gelişimini tamamlayamaz ve bazıları dejenere olur (17).

Genel olarak tüm kas dokusu mezodermden gelişir. Çizgili kasın gelişmesinde önce mezenşim hücreleri mitozla çoğalmakta ve kas hücrelerine dönüşmektedirler (Şekil 1). Embriyoda somit denen yapılardan miyotomların oluşmasıyla vücuttaki kasların büyük bir bölümü gelişmektedir (18).

Miyotomdan köken alan hücreler ilk olarak kas hücreleri olan miyoblastlara farklılaşırlar. Öncü miyoblastlar ard arda mitoz bölünme geçirirler. Hücreler birbirlerinden ayrılmaz ve kaynaşarak uzun, çok çekirdekli kas liflerini oluştururlar. Miyoblastların birleşmesi kusursuz bir süreçtir. Öncelikli olarak miyoblastların sıralanmasını, Ca^{+2} bağımlı tanıma düzeneğiyle yapışmasını ve son olarak da sarkoplazmalarının birleşmesini içerir. Hücreler daha sonra uzamayı sürdürerek silindir şeklini alırlar. Bu süreçte hücreler IGF' nin etkisiyle, yoğun olarak mRNA (Mesajcı ribonükleik asit) ve protein sentezi yaparlar. Aktin ve miyozini oluşturmak için troponin ve tropomiyozin gibi kas kasılmasını düzenleyici proteinler sentezlerler. Sentezlenen proteinler miyofibrillerin içine yerleşerek işlevsel birim olan sarkomeri şekillendirir. Sarkoplazmada miyofibrillerin belirmeye başlamasıyla, 3. ayın

sonunda iskelet kasları için özgün olan çapraz çizgilenmeler ortaya çıkar. Baş bölgesinde, oksipital somitlerin rostralinde yer alan yedi adet somitomerde de benzer bir süreç olaylanır. Somitomerler hiçbir zaman sklerotom ve dermomiyotom segmentlerine ayrılamayan ancak gevşek şekilde düzenlenmiş yapılar olarak kalırlar (19, 20).



Şekil 1. Çizgili kas lifinin oluşumu

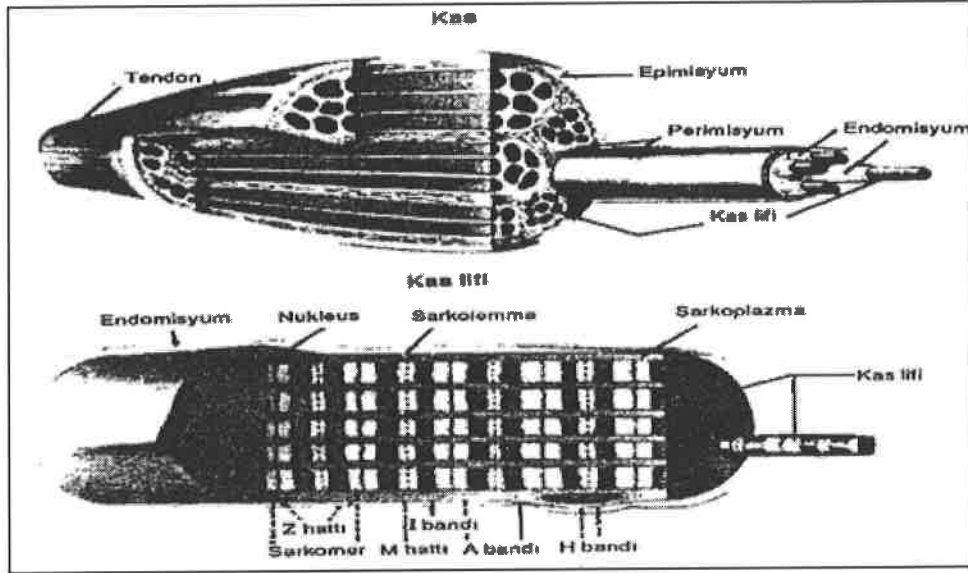
2.1.2. İskelet kasının yapısı

Bol damarlı ve sinirli bir yapıya sahip olan çizgili kas dokusu birbirine paralel olarak sıralanmış çok sayıda kas lifinin demet halinde bir araya gelerek fasikülleri oluşturması ve bu fasiküllerin bir araya gelmesiyle oluşur (21). Çizgili kas dokusunun her bölümü bir bağ dokusuyla ilişki halindedir. Kas kütesinin bütünü epimisyum adı verilen bağ dokudan oluşmuş bir kılıfla sarılıdır. Epimisyumun bağ dokusu kasın derinlerine girerek fasikülleri kuşatan perimisyum denilen kılıfı oluşturur. Perimisyumun ince uzantıları da her kas lifini saran endomisyumu oluşturur (Şekil 2.3). Bağ dokusu bir kılıftan diğerine devamlı olup kollajen, elastik ve retikulum liflerce zengin ve fibroblast, makrofaj, yağ hücresi gibi değişik bağ dokusu hücrelerini içeren gevşek bir yapıya sahiptir (15).

Çizgili kas lifinin (hücresinin) hücre zarı (sarkolemma) diğer hücrelerin zarları gibi Angström kalınlıkta birim zar yapısındadır. Çizgili kas lifinin sarkoplazmasının içerisinde organeller dışında homojen ve az yoğun bir esas madde olan matriks bulunur. Matriks miyoglobulin gibi protein yapısında pigmentler, glikojen, lipid damlacıkları ve bir miktar da enzim içerir. Miyoglobulin kasın rengini veren pigment olup aynı zamanda oksijen deposudur. Sarkoplazma içerisindeki organellerin başlıcaları ise sarkolemmaya yakın yerleşimli olan çok sayıda çekirdek, fazla sayıda mitokondri, çekirdeğe yakın sayıda golgi kompleksi, sarkoplazmik retikulum ve miyofibrillerdir. Uzun oval biçimli çekirdekler bir kas lifinde birkaç yüz tanedir ve lifin uzun eksenine paralel olarak sarkolemmanın altında yerleşiktirler (22). Kas hücreleri sarkolemma altına yerleşik çok sayıda çekirdek kapsar. Çekirdek birkaç çekirdekcik içerir ve kromatin orta yoğunluktadır (23, 24, 25, 26). Çekirdekler lif boyunca oldukça düzenli aralıklar ile dizilmiş fakat tendona bağlanma yerinde sayıları daha fazla ve düzensiz bir dizilim halindedirler (27).

Sarkoplazma organel ve inklüzyonları kapsar. Mitokondriyonlar sarkolemmanın altında ve miyofibrillerin arasında yayılmıştır. Mitokondriyonların bol miktarda yoğun kristalleri vardır ve kasılma için gereken enerjiyi sağlarlar. Sarkoplazmada ince glikojen tanecikleri ve lipid damlaları bulunur. Oksijeni bağlayıcı bir pigment olan aynı zamanda kasa rengini veren miyoglobulin de burada yer alır. Kasılma özelliği olmayan miyoalbumin ve bir albumin karışımı olan miyogen de sarkoplazmada yer alan yapılardır (24).

Bir diğer organel olan sarkoplazmik retikulum, her bir kas hücresinde, miyofibriller çevresinde yerleşik, boyuna ve enine tübüllerden oluşan zarla kaplı kanalcıklar sistemidir. Ribozomları yoktur. Boyuna tübüller, birbirleriyle ağzlaşan ve miyofibrilin uzun eksenine yerleşik geniş sarnıçlar şeklindedir. A bandının çevresini uzunlamasına sararlar. Bu tübüller A bandının ortasındaki, açık renkli alan olan H bandı bölümünde birbirleriyle anastomozlar yaparlar. Enine olanlar ise, daha dar çaplı tübüllerden oluşur ve miyofibrilin uzun eksenine dikey olarak yerleşiktirler. A-I çizgisi birleşim bölgelerinde ya da Z çizgisinde uç kesecikleri (terminal kesecikler) oluştururlar. Sarkolemma birçok bölgeden hücrenin içine doğru girerek T tübüleri (enine, transversal tübüller) denilen parmaklı çıkıntılar yapar. Alttan ve üstten, sarkoplazmik retikulumun genişlemiş uç keseciklerinin arasında kalan T tübüleri, sarkoplazmik retikulumun membranöz kese ve kanalları ile ilişkilidir. Bunun nedeni iki lateral sarkoplazmik retikulum kesesinden ve bir merkezi T tübülden oluşmasıdır (25).

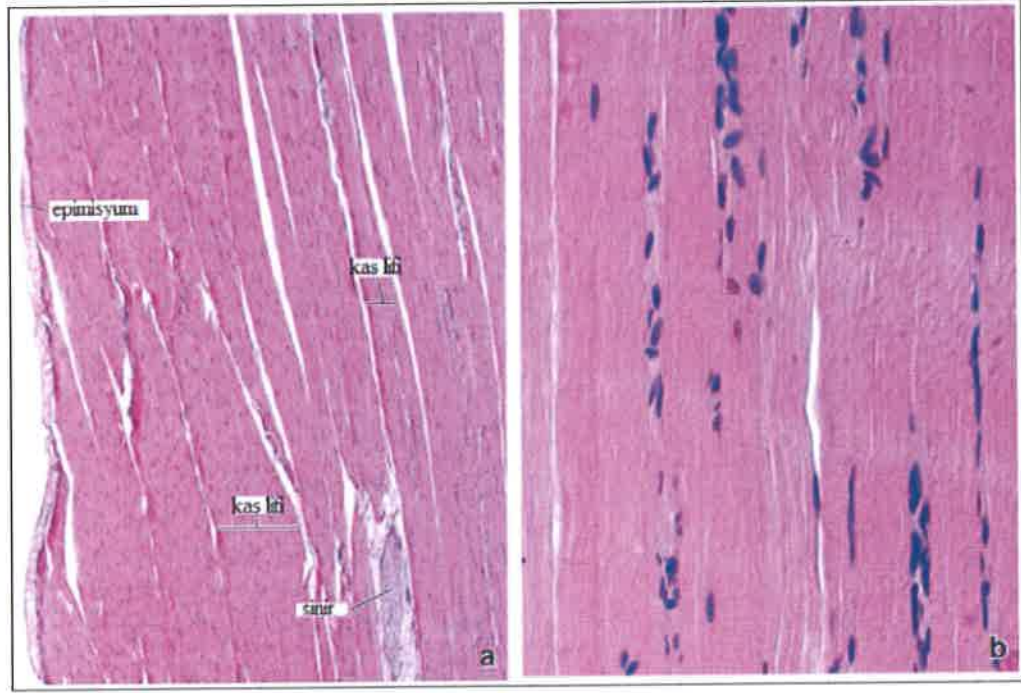


Şekil 2. Çizgili kas kütesinin yapısı ve kılıfları (15).

2.1.2.1. Kas Lifleri

İskelet kasında kas lifi olarak adlandırılan her bir kas hücresi, esasen çok çekirdekli bir hücre topluluğudur. Bir kas lifi gelişim sırasında myoblast adı verilen küçük, birbirinden ayrı kas hücrelerinin füzyonuyla meydana gelir. Yatay kesitte incelendiğinde, olgun çok çekirdekli kas lifleri 10–100 μm çapında poligonal şekilli olarak görülür. Uzunlukları, sartorius kasında olduğu gibi bir metreye yakın olabileceği gibi, orta kulaktaki stapedius kasında olduğu gibi birkaç milimetre kadar küçük de olabilir (Resim 1) (28).

İnsan vücudunda 2 tip iskelet kas lifi bulunur; yavaş (Tip 1) ve hızlı (Tip 2). Kas liflerinin çoğu uyarandan sonra 0.01 saniye gibi çok kısa bir zamanda kasılmaya başladığı için “hızlı” olarak adlandırılır. Hızlı liflerin çapları geniştir, büyük ve yoğun glikojen stoklarıyla göreceli olarak daha az mitokondri bulunur. Bir kas lifinin ürettiği gerilim, sarkomerlerin sayısı ile doğru orantılıdır. Çoğunluğu Tip 2 liflerden oluşan kasların kontraksiyonları daha güçlü olur. Ancak çok miktarda ATP kullandıkları ve temelde glikoliz yaptıkları için çabuk yorulurlar. Tip 1 kas lifleri uyarı sonrasında 3 kat daha yavaş kasılırlar. Ancak sahip oldukları zengin kapiller yatağı ve myoglobin sayesinde yüksek oksijen rezervi ve oksidatif fosforilasyon kapasitesi sayesinde daha fazla ATP sentezleyebilirler. Kas liflerinin yavaş veya hızlı olması, sahip oldukları myozin ağır zincir izoformlarıyla belirlenmektedir.



Resim 1. İskelet kasının mikroskopik görünümü

a. Paralel dizilmiş kas liflerinin uzunlamasına kesiti. X 160. b. Daha büyük büyütmede kas liflerinin çapraz çizgilenmeleri ve plazma membranının hemen altında yerleşmiş iskelet kası liflerinin çekirdekleri. X 360 (1).

Enine kesitlerde miyofibriller, noktacıklar halinde görülürler ve bu yapı Chonheim alanları olarak adlandırılır. Bu görüntünün nedeni, miyofibrillerin ince iplikçik halinde, kasılabilir proteinlerin yaptığı iki ana filmandan oluşmasıdır. İskelet kasında iki tip miyofilaman vardır. Bunlar ince olan aktin ve kalın olan miyozin filamanlarıdır (25).

a) Aktin filamanları (İnce filamanlar):

Yaklaşık 1 μm uzunluğunda 5-7 nm genişliğindedirler. Z bandından başlarlar ve A bandına doğru uzanıp bir miktar A bandına girerler (28).

F aktin (ipliksi) ve G aktin (globüler) moleküllerinin, çift sarmal olarak birbirleri etrafına dolanmasıyla oluşan uzun iplikçi yapılarıdır. G-aktin molekülleri yapısal asimetri gösterirler. G-aktin F-aktini oluşturmak için polimerize olduğundan, kutuplaşma gösteren filamanlar yaparak arkadan öne doğru bükülür. G-aktin monomerleri miyozin için bağlanma bölgeleri bulundurur. Z çizgisi üzerinde dik açıyla oturan aktin filamanları çizginin her iki tarafında karşıt kutuplaşma oluştururlar. Aktin filamanları α -aktin ve β -aktin olarak iki tiptir. Z çizgisinin ana yapısı olan α -aktin, elastik olmayan nebulin proteininin yardımıyla aktin

filamanlarına bu bölgede tutunur. α -aktinin, aktin filamanlarını Z çizgisine tutundurmaktadır. β -aktin ise, H bandının M çizgisinde yer alır (28).

Aktin filamanları tropomiyozin ve troponin proteinlerini de içerir.

Tropomiyozin proteini; birbiri etrafında bükülmüş, hemen hemen birbirine özdeş olan iki α -heliks polipeptit zincir içeren, uzun bir moleküldür. Bu moleküller, birbirine dolanan iki aktin uzantısı arasındaki çukurcuğun dış kenarı boyunca, aktinin alt birimleri üzerinde filamanlar yapar. Her bir tropomiyozin molekülü, yedi aktin monomerinin uzunluğu boyunca uzanır ve troponin bileşiğine bağlanır (28).

Troponin proteini; üç alt birimden oluşur. Bunlar tropomiyozine sıkıca tutunan troponin T (TnT), kalsiyum iyonlarını bağlayan troponin C (TnC) ve aktin miyozin bileşkesini bozan troponin I (TnI)' dir. Bir troponin yapısı her tropomiyozin molekülü üzerinde belirli bir noktayla ilişkidir (28).

Aktin filamanları ile dış laminada bulunan laminin ise distrofin proteini aracılığıyla bağlanır. Distrofinin işlevi; hücre iskeleti ve hücre dışı matris arasında mekanik bir bağlantı oluşturarak, kasın kasılma stresi süresince, sarkolemmayı sabitlemek ve güçlendirmektir (28).

Miyozin filamanları (Kalın filamanlar):

2-3 nm kalınlığında 150 nm uzunluğundadırlar. A bandında bulunurlar. A bandının orta bölümleri miyozinden başka filaman içermez ve burası H bandıdır. Elektron mikroskopunda H bandı açık renktedir. H bandının esas elemanı fosfokreatin ve adenozin difosfattan (ADP), adenozin trifosfat (ATP) oluşumunu katalize eden kreatin kinaz enzimidir.³¹ Bu bandın ortasında, kasılmayan filamanlar miyozin filamanlarını sıkıca bağlayarak düzenli bir birlik oluştururlar. Bağlanma bölgeleri koyu ince bir bant halinde görülür ve M çizgisini yapar. M çizgilerinde, miyozin filamanlarını birbirine sıkıca tutunduran protein myomezindir. Miyozin filamanlarını M çizgisine tutunduran protein ise C proteindir. I bantlarının ortasındaki Z çizgileri de iki taraftan gelen aktin filamanlarının bu bölgede dallanarak birbirlerine bağlanmaları ile oluşur. Miyozin filamanlarını Z çizgilerine tutundurarak sarkomere esneklik kazandıran protein ise titin (connectin)' dir. Titin milyonlarca alanda görülen, moleküler ağırlığı oldukça büyük bir proteindir. Kas gerildiğinde elastik ve gergindir. Elastik geri çekilme özelliği ile miyozin filamanlarını kuşatırlar (29,30).

2.1.2.2. Motor Ünite

İskelet kasının işlevi motor noktadan kasa giren bir sinirin kontrolü altındadır. Her bir kas lifi bir sinir ucuyla temas halindedir, bu temas noktası nöromuskuler bileşkenin motor son plağı adını almaktadır. Nöromuskuler bileşke üç temel yapısal bileşen içerir. Bunlar presinaptik akson, sinaptik yarı ve kas lifleri üzerindeki postsinaptik alandır. Tek bir sinir aksonu ve temas ettiği tüm kas liflerinin oluşturduğu yapıya motor ünite adı verilir.

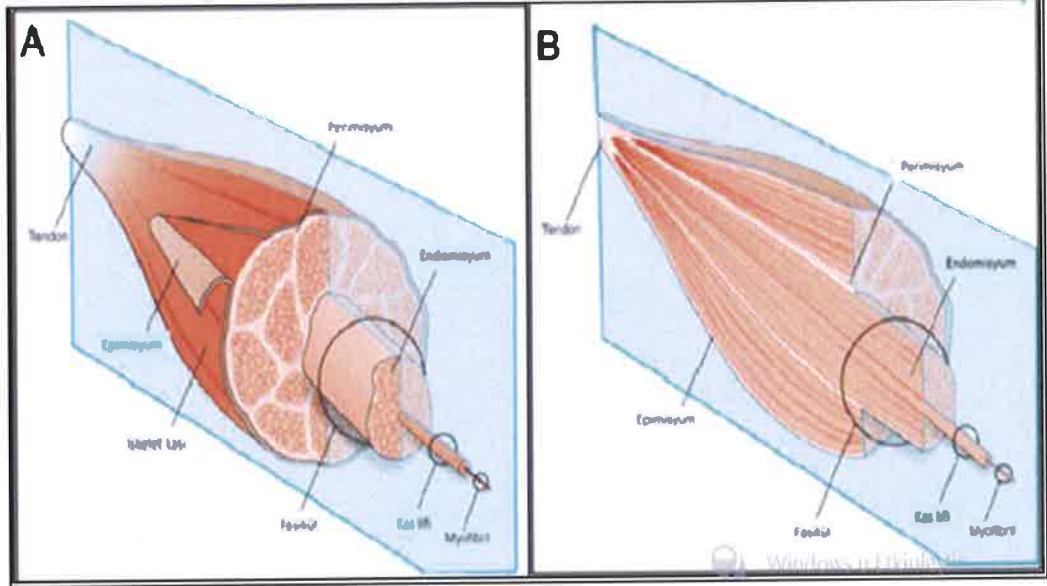
Bir motor ünite içindeki kas liflerinin sayısı ve iskelet kası başına var olan motor ünite sayısı o kasın yaptığı işi türüne göre değişmektedir. Ekstraoküler kaslarda motor ünite başına 10 kadar sayıda kas lifi uyarılırken, gastroknemius kasında bu motor ünite başına 1000 kadar kas lifini bulabilmektedir (20).

Kas içiği ya da kas mekiği olarak adlandırılan yapı, iskelet kaslarının tümünde bulunmaz. İçi sıvı dolu bir boşluğu saran bağ dokusu kapsülü ile mekik ya da iç şeklindeki yapılardır. Bir duyu olarak kasılıp gevşeme sırasında kasın uzunluğunu algırlar. Kas kitlesi boyu ile kendi boylarını oranlayıp, mekiğin reseptör sinirlerini uyararak merkezlere bilgi verirler. Kas içiği, birkaç mm uzunluğunda değişikliğe uğramış iskelet kası liflerini kapsar. Kas liflerinin arası proteoglikanla doludur. Sinir sonlanmaları kapsül içinde bu kas lifleriyle ilişki kurar. Kas içiği içinde yer alan bu özelleşmiş hücrelere intrafüzal kas lifleri (mekik içi kas lifleri) denir. İntrafüzal kas lifleri daha kalın olan ektrafüzal kas lifleri (mekik dışı kas lifleri) ile sarılmıştır. Ektrafüzal kas lifleri; dinlenme halindeki kasın gerginlik derecesinden ve daha fazla uyarı durumunda ise tüm kasın kasılmasından sorumludur. Kas mekiklerinin içine birkaç duysal sinir lifi girer ve mekik dışı kas liflerindeki gerilmeyi saptayarak bu bilgileri omuriliğe iletir. Omurilikte refleksler etkinleşir ve böylece vücut duruşu sağlanır. Aynı zamanda yürümede görev alan kas gruplarının erki de düzenlenir (23).

İskelet kas hücrelerinin tendona bağlandığı bölge yakınında bağ dokusundan oluşan bir kapsül miyelinsiz sinir telleri ile çevrili kollajen lif demetlerini kuşatır. Duyu sinirleri bu bağ dokusu kapsülünün içine girerek tendonlardaki gerilme değişikliklerini algırlar ve bunu merkezlere iletirler. Kasın kasılması çok olduğunda bunu engelleyici ve durdurucu reseptör olarak görev yapar. Bunlara Golgi tendon organları denir. Golgi tendon organları aşırı kasılmaya karşı duyarlı olarak çalışırlar ve değişik düzeylerde kas hareketi için gerekli gücü denetlerler (23).

2.1.2.3. Bağ dokusu

Her bir kas lifi ve kas lifleri demeti, kuvvet iletiminde gerekli olan, pasif yük taşıyabilen bağ dokusuyla sarılıdır. Kollajen iskelet kası ekstrasellüler matriksteki majör yapısal proteindir ve kuru kas ağırlığının % 1-10'unu oluşturur. Kasın sonunda bu bağ dokusu tendon veya kası genellikle kemiğe bağlayan kollajen liflerinin diğer düzenlemeleri olarak devam eder. Kollajen liflerden zengin bu ekstrasellüler matriks, kas lifleriyle ilişkisine göre adlandırılır (Şekil 1).



Şekil 3. Kas liflerini saran bağ dokusu ve tendonla ilişkisi

a. Endomisyum, perimisyum ve epimisyum.

b. Perimisyumun tendonla devamlılığını gösteren kesit (34).

Bol damarlı ve sinirli bir yapıya sahip olan iskelet kası, buldukları yere göre adlandırılmış kılıflarla sarılıdır. Tüm kası saran sıkı bağ dokusundan oluşan kılıf epimisyumdur. Epimisyum bol miktarda kollajen lif ile daha az olarak da elastik ve retiküler lifleri kapsar. Bu lifler arasında da çeşitli bağ dokusu hücreleri bulunur. Epimisyumdan köken alan ve kas hücre demetlerini saran kılıf perimisyumdur. Her bir kas hücrelerini (kas lifi) saran kılıf ise endomisyum olarak adlandırılır.³¹ Bu bağ dokusu kılıfları; kasılma birimlerinin ve bu birimlerin yaptıkları demetlerin birbirine bağlanmasını sağlayarak, birlikte uyumlu bir şekilde kasılmalarına yardımcı olurlar. Aynı zamanda birimler arasında hareket özgürlüğünün de oluşmasını sağlarlar. Kaslara damarlar bu bağ dokusuyla girerler. Kapillerler kas liflerinin uzun eksenine koşut uzanır. Erişkin iskelet kasında yan populasyon hücreleri olarak adlandırılan bir kök hücre topluluğu, tüm kan hücre serilerine dönüşebilme erkine sahiptir (26,31,32).

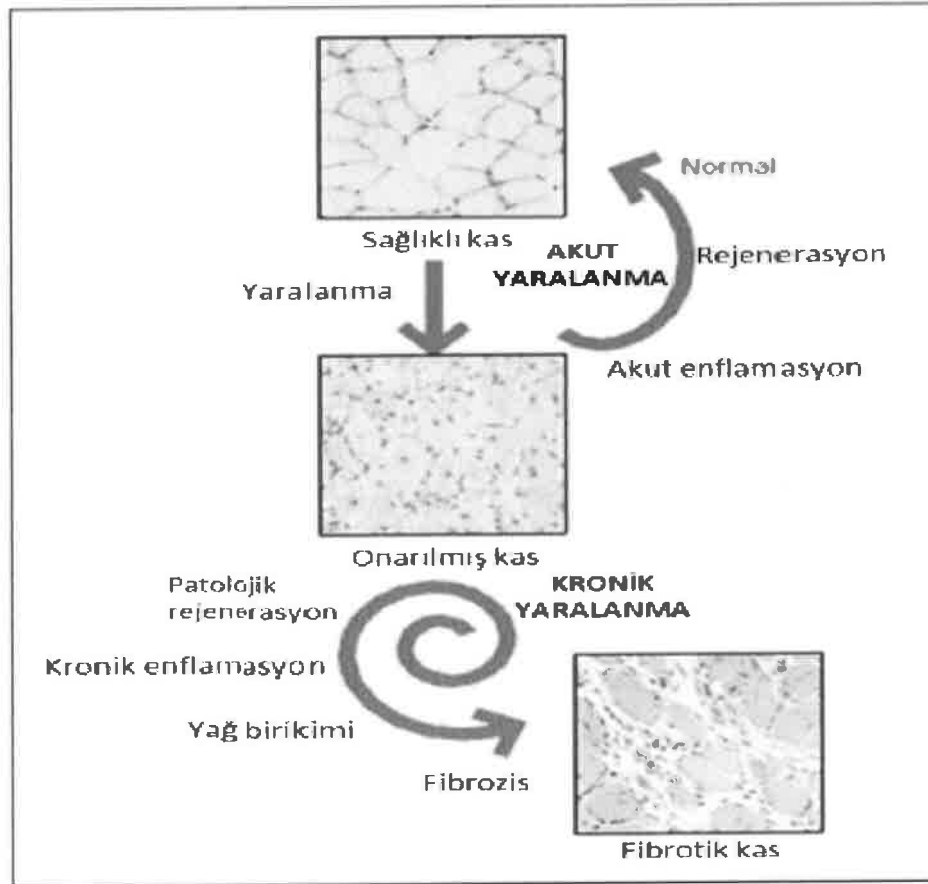
Bağ dokusunun içerisinde ekstrasellüler matriks ve kollajen sentezinden sorumlu fibroblastlar, hastalık ve yaşlanmada kas liflerinin yerine geçen adipositler ve fibroblastlara veya adipositlere dönüşebilme potansiyeli olan fibro/adipojenik öncüller vardır. Bu hücreler başarılı kas rejenerasyonunda önemli rol oynarlar; ancak kontrol altında olmazlarsa kendini sürdüren fibrosis sürecine katkıda bulunurlar (33). Yani rejenerasyon başarısız olduğunda fibrotik skar fibrositlerin yanı sıra adipositlerle de dolacaktır.

2.1.2.4. Ekstrasellüler matriks patolojik değişiklikleri

a. Fibrozis

Hemen tüm myopatilerin ortak noktası fibrozis olarak tanımlanan aşırı ekstrasellüler matriks birikimidir. Fibrozisin histolojik bulguları artmış endomisyum ve perimisyumla tanımlanabilir. İskelet kasında fibrozis, ekstrasellüler matriksin kas işlevindeki mekanik etkisini bozabilir. Fibrotik kasta kollajen üretimine sadece fibroblastlar değil enflamatuvar hücreler, kas lifleri, endotel hücreleri ve satellit hücreler de katkıda bulunabilir. TGF- β fibroblastların tip I kollajen, fibronektin ve bağ dokusu büyüme faktörü üretimlerini tetikler ve MMP'leri baskılar. Tekrarlayan kas yaralanmaları meydana geldiğinde artmış TGF- β ekstrasellüler matriks üretimini uyararak fibrotik yanıtı yol açar (Şekil 4) (35)

Fibrozis, kas yapısındaki değişikliklerin yanı sıra kas mekaniğinde de değişikliklere yol açar. Serebral palsili hastaların spastik kasları artmış ekstrasellüler madde ve katı liflerle karakterizedir. Spastik kaslarda kollajen miktarı artmıştır ve kas spastisitesinin klinik ağırlığıyla orantılıdır (35).



Şekil 4. Normal ve fibrotik kas rejenerasyonunda yer alan süreçler (36)

b. Kas içi yağlanma

Kas içi, hücre dışı yağ birikimi iskelet kasının hastalığa veya yaralanmaya verdiği başka bir patolojik yanıttır. Örnek olarak ileri DMD vakaları, obezite, tip 2 diyabet, yaşlanmış kas ve rotator kaf yırtıklarına eşlik eden yağlı atrofi sayılabilir. Henüz aktivasyon mekanizmaları ve çoğalmalarını düzenleyen etkenlerin tam bilinmeyen adipojenik potansiyeli olan satellit hücreler ve mezenkimal kök hücreler bu patolojik yanıtta yer alır (35).

2.1.2.5. Myoblastlar

Myoblastlar, embriyoda bölünmemiş paraksiyel mezodermden (kranial kas öncülleri) veya somitlerin bölünmüş mezoderminden (epaksiyel ve hipaksiyel kas öncülleri) köken alan kendi kendini yenileyen multipotent myojenik kök hücrelerden meydana gelir. Embriyonik gelişimin erken dönemlerinde bu hücreler, diğer myojenik düzenleyici faktörlerle birlikte MyoD transkripsiyon faktörü de ortaya çıkararak tüm iskelet kası soylarının farklılaşmasında anahtar görev oynarlar. İskelet kası gelişimi üzerinde dengeleyici etki negatif düzenleyici myostatin geninin ifadesiyle elde edilir. TGF- β ailesinden olan myostatin, kas büyümesi ve farklılaşması üzerinde baskılayıcı bir etkiye sahiptir. Bu etkinin baskılanmasıysa kronik kas hastalıklarının hayvan modellerinde artmış kas büyümesi ve azalmış fibrozisle sonuçlanır (33).

2.1.2.6. Satellit hücreler

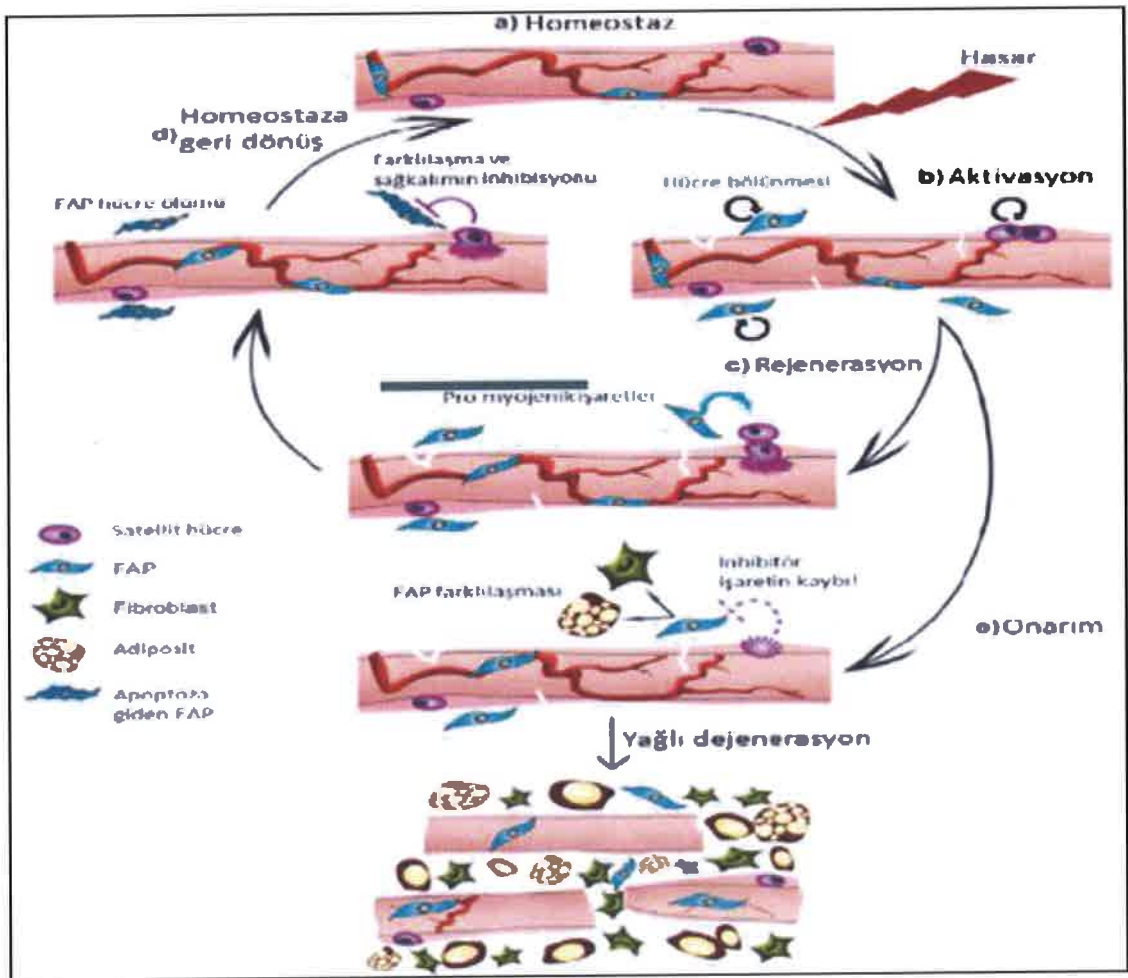
İlk defa 1961 yılında Alexander Mauro tarafından tanımlanan satellit hücreler kas lifinin plazma membranı ve bunun dış tabakası arasında bulunur (37). Az sitoplazmalı küçük hücrelerdir. Sitoplazmaları tipik olarak kas hücresinin sarkoplazması içine karışarak ışık mikroskopu altında tanımlanmasını güçleştirir. Kas hücresininkinden daha yoğun ve kalın kromatin ağa sahip tek çekirdekleri vardır.

Satellit hücreler embriyonik hayatta somitlerin merkezi dermomyotom bölgesinden köken alırlar. Büyümenin erken dönemlerinde, kas satellit hücreleri çekirdek sayısının % 30'una denk gelirken sağlıklı erişkinlerde kas hücresi içindeki çekirdek sayısının % 2-7'sini temsil etmektedir (38). Kas lifi veya kesit alanı başına düşen satellit hücre sayısı kaslar arasında değişkenlik gösterir. Örneğin, hızlı kasılan ekstensör digitorum longus kası yavaş kasılan soleus kasına göre daha az sayıda satellit hücre içerir.

Satellit hücreler iskelet kasının yenilenme yeteneğinden sorumludur. Bu kas hücrelerinin myojenik öncülleri normalde edilgendir ve myojenik düzenleyici faktörler üretmezler (39). Hücre veya kas transplantasyon çalışmaları, canlıda erişkin kas dokusunda

bir yaralanma meydana geldiğinde, satellit hücrelerin yeniden hücre döngüsüne girdiğini ve yeni myoblastlar ortaya çıkardıklarını göstermektedir (41). Dış tabaka sağlam kaldığı sürece, myoblastlar dış tabaka içinde myotüpleri oluşturmak için birleşirler, sonra da yeni bir lif şekline olgunlaşırlar. Tersine, eğer dış tabaka bozulmuşsa, yaralanma alanını fibroblastlar onararak geride skar dokusu bırakırlar (39). Satellit hücre aktivasyonu ile yeni myotüplerin oluşması sınırlı sayıda tekrarlanabilir ve bundan sonra hasar tamir edilemez, kas dokusunun yerini bağ ve yağ dokusu alır.

Satellit hücrelerin etkinleşmesinde etkili olan diğer faktörler arasında hepatosit büyüme faktörü, nöronal nitrik oksit sentaz ve fibroblast büyüme faktörleri sayılabilir.



Şekil 5. Kas rejenerasyonu ve onarım boyunca fibroadipojenik öncüllerin çoklu rolleri (41).

Sağlıklı erişkin kasında fibro/adipojenik öncüller kas liflerinin arasındaki boşluklarda kan damarlarının komşuluğunda yerleşmişlerdir. Akut yaralanma sonrasında fibro/adipojenik öncüller satellit hücrelerden önce hücre döngüsüne girer ve rejenerasyon olan

kas liflerinin arasındaki boşlukları doldurmak için çoğalırlar. Myoblastların farklılaşmasına yol açan trofik faktörler üreterek rejenerasyon üzerinde olumlu etki gösterirler. Rejenerasyon etkin bir şekilde ilerlerse, bu öncüller dokuda azalarak baştaki sayılarına geri dönerler. Tersine, rejenerasyon başarısız olursa dokuda kalarak adipositlere dönüşürler ve yağlı dejenerasyona yol açarlar (Şekil 5) (41).

2.1.3. İskelet kasının işlevi ve iyileşmesi

İskelet kasının temel işlevi vücudun hareketini sağlamaktır. Kasların kasılmasıyla tendonlarda oluşan çekme hareketi iskelet kemiklerinin hareketini sağlar. Hareket dışındaki görevi ise, dinlenme anındaki gerilimi vücudun normal durumunda durmasını sağlamaktır.

2.1.3.1. Kasılma

İlk basamağını presinaptik aksonlardan sinaptik yarıklara asetilkolin salınımı oluşturur. Kas liflerinin bileşke sonrasındaki kıvrımlarında yer alan reseptörlere bağlanan asetilkolin hücrenin depolarize olmasına neden olur. Depolarizasyon tarafından tetiklenen aksiyon potansiyeli kas lifleri boyunca ilerler ve bu durum kas kasılmasıyla sonuçlanır. Kas kasılması sonunda asetilkolinesteraz enzimi tarafından asetilkolinin yıkımı kasın gevşemesine yol açar.

Farklı kas kasılma türleri görülebilir. İzometrik kasılmada kas tarafından üretilen kuvvet direnç uygulanan yüke eşittir, bundan dolayı kasın boyu değişmez. Konsentrik kasılmada kasın uyguladığı kuvvet direnç uygulanan yükten daha büyüktür ve kas boyunun kışalmasına neden olur. İzometrik kasılma gönüllü olarak oluşturulabilir, gerilme miktarı kas boyunda kışalma başlayana kadar kas liflerinin eklenmesiyle artırılabilir. Kışalma başladığı anda konsentrik kasılmaya dönüşür. Eksentrik kasılmada ise direnç gösterilen yük iskelet kası tarafından oluşturulan kuvvetten daha büyüktür, bu durumda kasın boyu uzar (42).

İskelet kasları, motor sinirlerle sinirlendirilirler. Bu sinirler, kas lifi yüzeyinde dallanan ve motor plak olarak adlandırılan uçlarla sonlanır. Kas liflerinin kasılmasını sağlayan uyarımlar kas liflerine bu motor son plaklardan geçer. Yer yer kas lifindeki enine tubuluslara doğru ilerler. Sarkolemmada oluşan uyarımlar, bu kanalcıklarla miyofibrillerin yakınına kadar giderler. Kanalcıklar yakınında kesecikler yapan kas lifleri ise bol miktarda Ca^{+2} iyonları içerir. Uyarımlar sonucu kesecikleri oluşturan membranların duvarındaki Ca^{+2} kanalları açılır ve iyonlar pasif taşınma ile keseciklerden dışarı çıkarak miyozin ve aktin filamanlarının aralarına girerler ve böylece kasılma gerçekleşir. Bu olay için gereken büyük miktardaki enerji ise filamanlar çevresinde bolca bulunan ATP ve kreatin fosfatın parçalanması ile elde edilir.

Kasılma için gerekli olan ATP mitokondriyonlarda, kreatin fosfat ise sarkoplazmada yapılır. Uyarımın kesildiği ve kasılmanın bittiği anda Ca^{+2} iyonları aktif taşınım ile yeniden keseciklere çekilir ve kas gevşer (24).

Kas lifinin polarizasyon mikroskobu ile incelenmesi sonucunda bazı görüntü özellikleri belirlenmiştir. Bu değerlendirmeye göre göre; koyu alanlar polarize ışığı çift kıran anizotrop bölgelerdir ve A bandı olarak adlandırılır. Açık renk gözlenen alanlar ise polarize ışığı tek kıran izotrop bölgelerdir ve I bandı olarak bilinirler. Kasın kasılıp gevşemesinde A bandının boyu değişmezken, kasılmada I bandının boyu kısalmır. Işık mikroskobu ile büyük büyültmelerde incelenen kas lifinde I bandının ortasında koyu bir çizgi gözlenir. Bu Z çizgisidir. A bandının ortasında görülen açık renkli alana ise H bandı denir. Elektron mikroskobu ile daha büyük büyültmelerde açık renkli H bandının ortasında koyu renkli bir M çizgisi gözlenir. Her miyofibril üzerinde, iki Z çizgisinin arasında kalan bölüm sarkomer olarak adlandırılır. Sarkomer sadece yapısal bir bölüm değildir, aynı zamanda işlevsel olarak kasın kasılma birimidir (43).

2.1.3.2. İyileşme

İskelet kasları terminal olarak farklılaşmış bir dokudur. Kas lifleri mitoz bölünmeyle çoğalamazlar, kas dokusunun sürekliliği ve hasar tamiri satellit hücreler tarafından sağlanır. Epimisyum ve perimisyum içinde devamlı bulunan makrofajlar yaralanma sonrasında, sitokinle indüklenen nötrofil kemoatraktan ve monosit kemoatraktan protein 1 salarak dolaşımdan nötrofiller ve monositlerin toplanmasına yol açarlar (33). Hasarlanmış kan damarlarından ve yaralanma alanına gelen enflamatuvar hücrelerden sitokinler ve büyüme faktörleri salınır. Bu faktörler de enflamatuvar hücrelerin göçünü uyarırlar, hücre çoğalması ve sağ kalımına aracılık ederler. Enflamatuvar hücreler, hasarlanmış hücre artıklarını fagositozla uzaklaştırırlar (44).

Enflamasyondan sonra onarımın diğer bir aşaması, satellit hücrelerden yeni kas liflerinin oluşumudur. Etkili kas onarımı enflamatuvar ve satellit hücrelere ek olarak fibroblastların göçü ve çoğalmasını gerektirir. Bu fibroblastlar tip I kollajen, tip III kollajen, fibronektin, elastin, proteoglikanlar ve laminin gibi dokuyu sağlamlaştıran ve yeni lifler için kalıp görevini gören, yeni ve geçici ekstrasellüler matriks bileşenlerini üretirler. Doku onarımı boyunca ekstrasellüler matriksin oluşumu ve yıkımı, pek çok proteazlar ve bunların özgün inhibitörleriyle yürütülür. Ekstrasellüler matriksin yeniden şekillenmesine ek olarak, anjiyogenez yaralanma alanında yeni damar ağlarının gelişmesine olanak tanırken yeni oluşan kas lifleri büyür ve olgunlaşır (36).

2.1.3.3. Kas dejenerasyonu ve enflamasyon

İlk olay kas dejenerasyonu ve enflamasyondur, ilk dakikalarda başlayıp bir-iki haftaya kadar devam eder. Kas dokusuna travma sarkomer, sarkolemma ve bazal laminanın bütünlüğünü bozar. İntrinsik proteazlar parçalanmış nekrotik kas liflerini sindirmeye başlar. Mekanik travmaya ek olarak, kas lifleri intramüsküler sinir dallarının tahrip olması ve nöromüsküler bileşke içeren lif bölümünün geri kalan kas lifinden ayrılmasıyla denerve hale gelir (45).

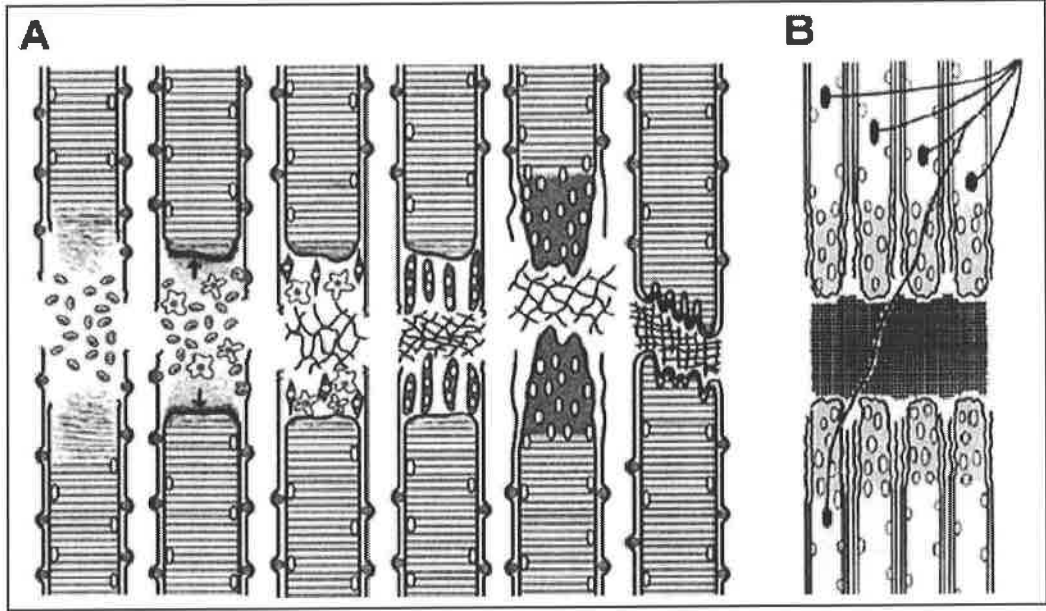
Yaralanmış kan damarlarından ve yaralanma alanına gelen enflamatuvar hücrelerden sitokinler ve büyüme faktörleri salınır. Bu faktörler enflamatuvar hücrelerin yaralanma alanına göçünü ve yaralanma alanında da hücre çoğalmasına ve sağ kalımına aracılık eder. Hücre artıkları fagositoz yoluyla ortadan kaldırılmaya başlar (46).

2.1.3.4. Kas rejenerasyonu

Kas rejenerasyonu yaralanmadan sonra ilk haftada başlar ve yaralanmadan sonra on dört günde zirve yapar. Bu süreçte normalde kas liflerinin bazal laminası altında edilgen halde bulunan satellit hücreler aktive olmaya, bir kısmı satellit hücre havuzunu yeniden doldurmak için kendini yenilemeye, diğer kısmı da farklılaşarak yeni kas lifleri oluşturmaya başlar. Enflamatuvar hücrelerin dışında, tip I ve III kollajen, fibronektin, elastin, proteoglikanlar ve laminin gibi yeni geçici ekstrasellüler matriks bileşenlerini üreten fibroblastlar da göçer ve çoğalır. Bu bileşenler dokuyu dengede tutar ve yeni lifler için çatı görevi görür. Satellit hücreler önceden var olan nekrotik liflerin bazal membranlarını kullanarak kas liflerinin benzer bir konum almasını sağlar. Bazal membranlar ve geçici ekstrasellüler matriks bileşenleri nöromüsküler bileşkelerin oluşumu için kılavuz görevi görür. Sonuçta, ekstrasellüler matriksin yeniden yapılanmasına ek olarak angiogenez de yaralanma alanında yeni damar ağlarının gelişimini sağlar (46).

Kas rejenerasyonu sonrasında değişik yeniden şekillenme örnekleri görülebilir. Aynı bazal lamina içindeki myotüpler birleşmeyip daha küçük lif kümeleri oluşturabildikleri gibi, sadece tek bir uçta birleşerek çatallaşmış liflerin oluşumuna yol açabilirler (40, 47,48).

Yaralanmadan sonraki kas rejenerasyonunun ilk aşamaları sinirin yokluğunda da meydana gelebilir, ancak yeni oluşmuş kas liflerinin büyümesi ve olgunlaşması sinirin varlığını gerektirir (40,47). Nöromüsküler bileşkeler yeniden kurulmazsa rejenerasyon olan kas lifleri atrofik kalır (Şekil 6).



Şekil 6. Yaralanma sonrası kas rejenerasyonu.

A. (soldan sağa sırasıyla) Yırtılmış kas lifi ve bazal membran. Yırtılmış lif uçlarını mühürleyen kontraksiyon ve yeni muskulotendinöz bileşkeleri oluşturmaya başlayan myotüpler. Organize skar dokusuyla tam iyileşmiş lif ve buna yapışmış muskulotendinöz bileşkeler. B. Nöromusküler bileşke içermeyen distal güdükler denerve hale gelir, ancak akson tomurcuklarıyla yeniden innerve olabilirler (40,47).

2.1.3.5. Fibrozis

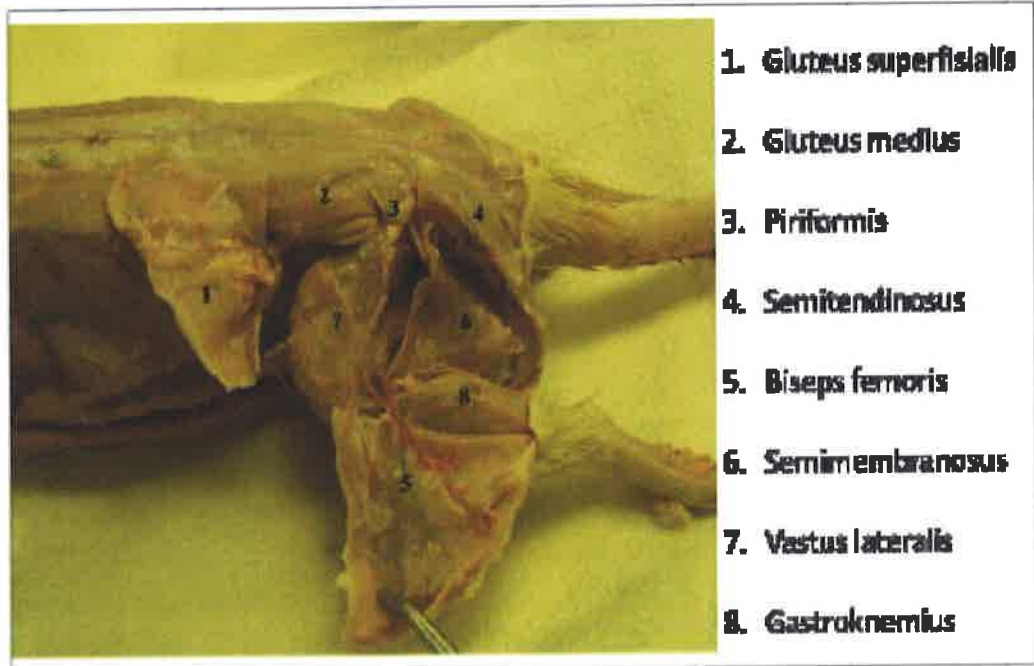
Dokuda yaralanma meydana geldiğinde fibroblastlar yaraya göç eder ve TGF- β gibi profibrotik sitokinlere yanıt olarak ekstrasellüler matriks üretmeye ve yeniden şekillendirmeye başlar. Fibrozis genelde yaralanmadan iki hafta sonra başlar ve zamanla yaralanmadan dört hafta sonraya kadar artar. Nekrotik kas dokusunun içindeki boşlukta, hasarlanmış kan damarlarının oluşturduğu hematoma yerini bağ dokusundan oluşan skara bırakır. Erken dönemde kas yeni oluşacak kas liflerine destek oluştursa da yaralanmadan sonraki 7 – 14 günde giderek yoğunlaşır ve kas liflerinin rejenerasyonunu kısıtlar. Ağır kas yaralanmalarından sonra oluşan yoğun fibrotik doku sadece kas lifi güdüklerinin tekrar birleşmesini engellemez, aynı zamanda nöromusküler bileşkeleri oluşturmak için yeni aksonların kas liflerine ulaşmasını da engelleyebilir (49). Skar olduğu müddetçe, kas dokusunun tam rejenerasyonu mümkün olmayacaktır.

Travmadan yaklaşık 10 gün sonra skar olgunlaşmaya başlasa da, kasa binen kuvvetli bir yük yenilenen kas lifleri ve skar dokusu arasında yeni oluşmuş küçük muskulotendinöz bileşkelerin komşuluğundaki kas dokusu içinde kopmalara neden olabilir. Kasın yaralanma öncesindeki seviyesine dönebilmesi için daha uzun bir zaman gerekmektedir (50).

Yaralanmış iskelet kası içinde meydana gelen fibrozis miktarı, kas uzun zaman hareketsiz bırakılmadığı sürece sanılanın aksine çok artmaz, hatta yara kontraksiyonu nedeniyle küçülebilir [23].

2.1.4. Sıçan gastroknemius kasının anatomisi

Yaralanmış iskelet kası içinde meydana gelen fibrozis miktarı, kas uzun zaman hareketsiz bırakılmadığı sürece sanılanın aksine çok artmaz, hatta yara kontraksiyonu nedeniyle küçülebilir (51). Sıçan gastroknemius kasının anatomisi insan gastroknemius kasına çok benzer yapıdadır. İğsi biçimlidir, değişebilen lif açılarıyla birlikte göreceli olarak kısa kas lifi boyuna ve uzun kas ve aponevroz boyuna sahiptir (52). Bu kasın ince olan medial başı femurun medial epikondilinden, grasilis ve semitendinöz kasların derininden başlar. Daha kalın olan lateral başı ise lateral epikondil üzerinde sıçanın arka bacağı saran pannikulus karnosusun derininden başlar. Bu iki baş birleşerek Aşil tendonunu oluşturarak kalkaneusa doğru ilerler (53). Tarsal eklemin ekstansiyonunu sağlar (Resim 6).



Resim 2. Sıçan arka bacak anatomisi.). Kaldırılmış biceps femoris kasının altında medial ve lateral başı ile gastroknemius kası yer almaktadır (54).

2.2. Serbest Oksijen Radikalleri

Serbest radikal bir veya birden fazla ortaklanmamış elektron ihtiva eden stabil olmayan bir molekül olarak tarif edilmektedir (55). Moleküler oksijenin indirgenmesi veya uyarılması sonucu birkaç serbest oksijen radikali oluşmaktadır. Bunlardan süperoksit; mitokondrial, endoplazmik retikulum, membran elektron transport işlemleri, hemoglobin, aldehid oksidaz ve XO tarafından üretilen bir yan üründür. İn vivo olarak süperoksit oluşumu hemen hemen tamamen hidrojen peroksit üretiminde artmayla birliktedir. Hidroksil radikali demirin rol aldığı Haber-Weiss (Fenton) reaksiyonu yoluyla üretilmektedir. Bu radikal biyolojik sistemlerdeki en reaktif serbest radikaldir ve lipid peroksidasyonu, sitokrom enzimlerin inaktivasyonu, membran transport proteinlerindeki değişiklikler sülfidril gruplarının oksidasyonu gibi yıkıcı olaylardan sorumludur (56).

Serbest oksijen radikalleri, sayısız enzimatik reaksiyon ve biyolojik fonksiyon için gereklidir. Ancak reperfüzyon gibi bazı patolojik durumlarda aşırı miktarlarda ortaya çıkarak hücelere zararlı etkilerde bulunurlar. Serbest radikallerin başlıca kaynağı moleküler oksijendir(57).Oksijenin indirgenmesi ile, negatif yüklü bir ara ürün olan süperoksit radikalleri ortaya çıkar. Bu radikallerden spontan ya da enzimatik dismutasyon ile, ikinci bir ara ürün olanhidrojenperoksit ortaya çıkar. Sonrasında yine bir dizi reaksiyon sonucu hidroksil radikali meydana gelir(57, 58).

Hücrede normal metabolik yollardaki enzimatik reaksiyonlarda enzimlerin aktif yerinde ara ürünler olarak devamlı şekilde serbest radikaller oluşabilir. Bazen bu serbest radikal ara ürünler enzimlerin aktif yerinden sızarlar, moleküler oksijenle kazara etkileşirler ve sonuçta ROR oluşur (59-61).

Atmosferde oksijenin varlığı yaşam için gerekli enerjinin sentezini sağlamasından beri hayatın temel taşı olmuştur. Oksijenin 3 doğal izomeri 16, 17 veya 18 nükleon içerir ve nükleon sayısı ile isimlendirilirler. Bu üç izomer sırayla %99,7, %0,04 ve %0,2 oranında bulunurlar(62).

Nükleon sayısı değişikliğine rağmen elektron sayısı hep 8 dir. İlk 3 yörüngede ikişer son iki yörüngede birer elektron vardır. Son yörüngede tek elektronu olan element serbest radikal olarak isimlendiğinden atomik oksijen (O) bir radikaldir. Moleküler oksijen de her iki atomunun yörüngeleri birleşmeyeceğinden diradikaldir, O_2^* veya O_2 şeklinde temsil edilir (62).

Reaktif türler hücrelerde reaktif oksijen türlerine dönüşme eğilimindedir. Bu eğilimin sebebi reaktif oksijen türlerinin reaksiyonlarında son ürününün H_2O olmasıdır. Vücutta büyük miktarda reaktif türün bulunması oksidatif stres denen duruma yol açar (62).

2.2.1. Serbest oksijen radikal kaynakları

Serbest oksijen radikallerinin iki önemli kaynağı vardır:

A) Eksojen kaynaklar

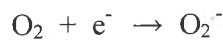
- Radyasyon etkisi
- Bağışıklık yapan maddeler: alkol, uyuşturucu vb.
- Ksenobiyotikler: hava kirliliği, hiperoksi, pestisitler, solventler, anesteziik maddeler, aromatik hidrokarbonlar, sigara dumanı vb.
- Antineoplastik ajanlar
- Stres; strese katekolamin düzeyi artıp, artan katekolamin oksidasyonu ise radikal üretimi artmaktadır.

B) Endojen kaynaklar

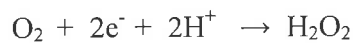
- Mitokondriyal elektron transportu
- Peroksizomlar
- Enzimler ve proteinler; XO, triptofan dioksijenaz, hemoglobin vb.
- Küçük moleküllerin otooksidasyonu; tiyoller, katekolaminler, hidrokinonlar, flavinler, tetrahidroproteinler, antibiyotikler vb.
- Endoplazmik retikulum ve nükleus membran elektron transport sistemleri (sitokrom p-450)
- Plazma membranı enzimleri; NADPH oksidaz, lipooksijenaz, prostaglandin sentetaz, lipid peroksidasyonu vb.
- Oksidatif stres durumları (iskemi, travma, intoksikasyon gibi durumlara bağlı olarak)
- Fagositik aktivasyonu (respiratory burst=solunumsal patlama)

2.2.2. Serbest oksijen radikal türleri: Serbest radikaller ortaklanmamış elektron taşıyan kimyasal bir yapı olarak tarif edilmektedir. Serbest radikaller, bir molekülün bir parçası olarak da kabul edilebilir.

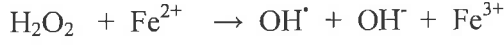
Biyolojik ortamlardaki en önemli serbest radikaller şüphesiz oksijen radikalleridir. Tek bir elektronun transfer yoluyla oksijene verilip redüklenmesi süperoksit serbest radikal anyonunu (süperoksit, O_2^-) oluşturmaktadır.



Oksijenin 2 elektronla redüklenmesi ise hidrojen peroksiti (H_2O_2) oluşturur.

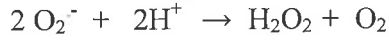


Hidrojen peroksit, serbest radikal biyokimyasında önemli bir bileşiktir. Çünkü geçiş metal iyonlarının varlığında kolaylıkla parçalanıp oksijen radikallerinin daha reaktifi ve biyolojik sistemlerde daha fazla hasar oluşturan hidroksil radikalini (OH[•]) oluşturur.



Bu ifade edilen reaksiyon demir katalizli Haber-Weiss (Fenton) reaksiyonu olarak adlandırılmaktadır.

Süperoksit dismutaz, O₂^{•-}'nin H₂O₂ ve moleküler oksijene (O₂) dönüşümünü aşağıdaki reaksiyonla katalizleyen antioksidan enzimdir:



O₂^{•-} hücrede enerji metabolizmasında oksidasyon sırasında ya da oksidazlar gibi bazı enzimlerin aktivitesi sonucu oluşur. O₂^{•-} SOD adlı enzimle inaktive edilir (kah sütçü-1). O₂^{•-} fagositlerin bakterisit etkilerinin temel mekanizmasını oluşturur. Aynı zamanda iltihabi olaylarda normal dokulara bile zarar verebilecek araçlardır (63).

Süperoksit radikali (O₂^{•-}): Serbest radikal olmasına rağmen hasar oluşturucu bir tür değildir. Asıl önemi, hidrojen peroksitin kaynağı olması ve geçiş metal iyonlarının redükleyicisi olmasıdır.

O₂^{•-} hücrede enerji metabolizmasında oksidasyon sırasında ya da oksidazlar gibi bazı enzimlerin aktivitesi sonucu oluşur. O₂^{•-} SOD adlı enzimle inaktive edilir (4).

Canlılarda olduğu ilk gösterilen radikal olan süperoksit, başlıca şu mekanizmalarla üretilmektedir:

1. İndirgeyici özellikteki biyomoleküller oksijene tek elektron verip kendileri oksitlenirken süperoksit radikali oluşur. Hidrokinonlar, şavinler, tiyoller, katekolaminler, ferrodoksinler, indirgenmiş nükleotidler gibi yüzlerce biyolojik molekül aerobik ortamda oksitlenirken süperoksit yapımına neden olurlar.

2. Başta çeşitli dehidrogenazlar ve oksidazlar olmak üzere, yüzlerce enzimin katalitik etkisi sırasında süperoksit radikali bir ürün olarak oluşabilir.

3. Mitokondrideki enerji metabolizması sırasında oksijen kullanılırken, tüketilen oksijenin % 1-5 kadarı süperoksit yapımı ile sonlanır. Buradaki radikal yapımının nedeni NADH dehidrogenaz ve koenzim Q gibi elektron taşıyıcılardan oksijene elektron kaçığının olmasıdır. Beklenilen aksine, oksijenin mitokondri solunumu sırasında bağlandığı ve suya indirgendiği sitokrom oksidaz basamağında radikal yapımı gösterilememiştir. Sitokrom oksidaz demir:bakır:çinko:magnezyum atomlarını 2:2:1:1 oranında içeren bir protein olup, süperoksit dismutaz, katalaz ve peroksidaz aktivitelerine sahiptir. Bu sayede,

sitokrom oksidaz üzerinde süperoksit veya H_2O_2 oluşsa bile, içerdği enzimatik aktivite sayesinde hızla ortamdaki temizlenir.

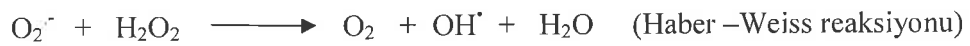
4. Aktive edilen fagositik lökositler bol miktarda süperoksit üreterek fagozom içine ve buldukları ortama verirler. Antibakteriyel etki için gerekli olan bu radikal yapımı, daha reaktif türlerin oluşumunu da başlatır. Bu örnekte görüldüğü gibi radikal yapımı bazı hücre fonksiyonları için gerekli de olabilir (65).

Hidrojen Peroksit (H_2O_2): Okside edici bir ajan olup reaktif değildir. Asıl önemi, geçiş metal iyonlarının varlığında hidroksil radikallerini oluşturmasıdır. Metal katalizörlerin yokluğunda süperoksit ve hidrojen peroksit kolaylıkla uzaklaştırılır ve zararsız hale getirilir.

$O_2^{\cdot-}$ dan SOD enzimi vasıtasıyla meydana gelen daha az toksik bir radikaldir. CAT ve/veya glutatyon peroksidaz enzimiyle H_2O ve O_2 'ye çevrilerek etkisiz hale getirilir (64).

Hidroksil radikali (OH^{\cdot}): Hemen hemen bütün biyomoleküllerle reaksiyona girebilen yüksek reaktivitesi olan bir ajandır. Reaksiyona girmeden önce hücrede difüze olması güçtür çünkü çok kısa ömürlüdür. Fakat küçük miktarları bile üretildiği yerde aşırı hasar yapabilecek kapasitededir.

OH^{\cdot} birkaç yolla oluşur: Suyun hidroliziyle ya da parçalanmasıyla hidrojen radikalleri ve hidroksil radikali oluşabilir. Aynı zamanda H_2O_2 üzerinden Fe ve Cu'nun rol aldığı fenton reaksiyonu ile de oluşur. Diğerleri de Haber-Weiss reaksiyonudur. Hidroksil radikalleri en reaktif serbest radikallerdir ve vücuttaki serbest radikal hasarının en önemli sorumlularındır (63).



Singlet oksijen (1O_2): Bir radikal olmayıp, sıklıkla serbest oksijen radikalleriyle birlikte anılan reaktif oksijen türüdür. Serbest radikal reaksiyonlarıyla üretilebilir.

Oksijenin enerjetik olarak uyarılan bu formunda spin kısıtlamasının kaldırılmış olması nedeniyle reaktivitesi çok yüksektir. Aldığı enerjiyi çevreye dalga enerjisi şeklinde verip oksijene geri dönebildiğinden, oluşumu kemilüminesans ölçümü ile izlenebilir. Başlıca şu mekanizmalarla vücutta oluşabilir:

1- Pigmentlerin (örneğin şavin içeren nükleotidler, retinal, bilirubin) oksijenli ortamda ışığı absorbe etmesiyle,

2- Hidroperoksitlerin metaller varlığındaki yıkım tepkimelerinde,

3- Kendiliğinden dismutasyon tepkimeleri sırasında,

4-Prostaglandin endoperoksit sentaz, bazı sitokrom p450 tepkimelerinde, miyelo/kloro/ laktoperoksidadaz enzimlerinin etkileri sırasındadır.

Singlet oksijen diğer moleküllerle etkileştiğinde ya içerdiği enejiyi transfer eder, ya da kovalent tepkimelere girer. Özellikle karbon-karbon çift bağları singlet oksijenin tepkimeye girdiği bağlardır. Bu moleküllerin başında tokoferoller, fenoller, bilirubin, DNA, karotenler, kolesterol, triptofan, methionin, sistein ve histidin gibi bileşikler gelir. Doymamış yağ asitleri ile doğrudan tepkimeye girerek peroksi radikalini (ROO \cdot) oluşturur ve bu şekilde lipid peroksidasyonunu başlatabilir (65).

Karbon merkezli radikaller (R \cdot): Lipid, nükleik asit, karbonhidrat veya protein gibi biyolojik bir molekülü okside edici bir radikalın etkilemesiyle oluşur (örneğin OH \cdot). Bunlar oksijen molekülü ile birlikte çok hızlı bir şekilde ilgili peroksil radiaklleri (ROO \cdot) oluşturmak üzere birleşirler. Diğer taraftan bu peroksil radiaklleri, alkoksil radikalleri (RO \cdot) üreten reaksiyonlara karışabilir. Sülfür atomları, yeni bir serbest radikal üretimi [thiyl (tiyo) radikaller, RS.] için kaynak olabilir.

Nitrik oksit: Nitrik oksit, moleküler oksijenin var olduğu şartlarda, L-arginin'in NOS (nitrik oksit sentazlar) olarak bilinen enzimler tarafından L-sitrülline dönüştürülmesi esnasında meydana gelmektedir (66). Normal ve birçok patolojik süreçte NO dokuya kan akımı ve doku hasarının modüle edilmesinde önemli rol oynamaktadır. İskemi, vasküler endotelde ve ardından dokuya infiltre olan nötrofiller ve makrofajlarda NOS aktivitesinde artışa sebep olur (67). İskemi esnasında doku NO düzeyi artarken reperfüzyon ile değişik mekanizmalarla süperoksit radikali üretimi artar. Bu iki bileşiğin reaksiyonu ile peroksinitrit (ONOO \cdot) oluşur. Nitrik oksidin O $_2^{\cdot-}$ ile ortamdan uzaklaştırılması reperfüzyon esnasında oluşan NO azalmasının sebebi olabilir (68).

NO sentezlendiği yerde çok kısa bir sürede nitrite (NO $_2^{\cdot-}$) ve daha sonra da nitrata (NO $_3^-$) okside olduğu için, NO son ürünleri olan NO $_2^{\cdot-}$ ve NO $_3^-$ biyolojik sıvılarda ölçülerek NO üretiminin invivo ve invitro belirleyicisi olarak kullanılabilir (69).

NO; diğer pek çok radikale oranla daha dengeli olmasına rağmen, oksijen, süperoksit radikali ve hidrojen peroksit ile reaksiyona girerek sonuçta sırasıyla NO $_2$, peroksinitrit (ONOO \cdot) ve nitrat/nitrit (NO $_3^-$ /NO $_2^-$) oluşturma eğilimine sahiptir. O $_2^{\cdot-}$ ile eşleşir ve zararlı bir bileşik olan ONOO \cdot oluşur (70). Peroksinitrit aromatik aminoasitleri, okside tiyoller ve lipidleri hidroksiller, proteine bağlı ve serbest tirozin rezidülerini nitratlar (103). Bu reaksiyonlar NO'ın yüksek oksidatif hasar oluşturma kapasitesini gösterir. Bunun tersine NO, lipid peroksil ve alkoksil radikallerinin zincirini sonlandırarak ve antioksidan enzim indüksiyonu yapan hücre sinyallerini düzenleyerek oksidasyon reaksiyonlarını doğrudan inhibe

de eder. Düşük NO konsantrasyonları düz kas gevşemesi gibi birçok fizyolojik olayda rol alırken, yüksek NO konsantrasyonları, özellikle oksidanların arttığı durumlarda, NO₂, ONOO⁻ ve diğer nitrozan, oksidan aracılardan üretimi ile doku hasarı ve inflamasyona yol açar (72).

2.2.3. Serbest radikallerin etkileri

Hücreler serbest oksijen radikallerinin hasarına bağışık değildir. Ancak genellikle glutatyon ve katalaz ile oksijen hasarına karşı korunmuşlardır. İskemik dokularda, serbest oksijen radikali üreten intrasellüler mekanizmalar tam aktive edilmiş durumdadır. Ancak oksijen sağlanmasındaki eksiklikten dolayı fonksiyon görmezler. Kan akımı ve oksijen sağlanmasının restorasyonu ile büyük miktarlardaki serbest oksijen radikali üretilerek reperfüzyon hasarı indüklenir (73)

Organizmada serbest oksijen radikalleri ortaya çıktıktan sonra radikal reaksiyon dizileri başlar. Eğer bir serbest radikal, radikal olmayan bir molekülle reaksiyona girerse, binlerce reaksiyondan oluşan reaksiyon zincirlerini başlatır. Serbest oksijen radikalleri paylaşılmamış elektronlarından dolayı lipid, protein, karbonhidrat, nükleik asit gibi çeşitli makromoleküllerin oksidatif hasarına neden olabilirler (74). Bu hasarlanma özetle şu mekanizmalarla olur.

a-)Membran lipidlerine etkileri (Lipid peroksidasyonu): Biyomoleküllerin tüm büyük sınıfları serbest radikaller tarafından etkilenirler, fakat lipidler en hassas olanıdır. Membrandaki kolesterol ve yağ asitlerinin doymamış bağları, serbest radikallerle kolayca reaksiyona girerek peroksidasyon ürünleri oluştururlar. Poliansatüre (çoklu doymamış) yağ asitlerinin (PUFA) oksidatif yıkımı, lipid peroksidasyonu olarak bilinir ve oldukça zararlıdır. Lipid peroksidasyonu ile meydana gelen membran hasarı geri dönüşümsüzdür (60).

Lipid peroksidasyonu sonucu oluşan lipid hidroperoksitlerinin yıkımı, geçiş metalleri iyon katalizini gerektirir. Lipid hidroperoksitleri yıkıldığında çoğu biyolojik olarak aktif olan aldehidler oluşurlar. Metal iyonlarının katkısı ile bazı enzimatik tepkimelere katılan bu peroksit ürünlerinden etan, pentan, MDA gibi yıkım ürünleri oluşmaktadır. Bu bileşikler ya hücre düzeyinde metabolize edilirler ya da başlangıçtaki etki alanlarından diffüze olup hücrenin diğer bölümlerine hasarı yayarlar. Üç veya daha fazla çift bağ içeren yağ asitlerinin peroksidasyonunda tiobarbitürik asitle ölçülebilen malondialdehit (MDA) meydana gelir. Bu metod lipid peroksit seviyelerinin ölçülmesinde sıklıkla kullanılır. MDA, yağ asidi oksidasyonunun spesifik ya da kantitatif bir indikatörü değildir fakat lipid peroksidasyonunun derecesiyle iyi korelasyon gösterir (60). Lipit peroksidasyonu ve kükürt içeren proteinlerin oksidasyonu sonucu membran geçirgenliği ve

kırılganlığının artması ile membran enzimlerinin aktivitesi azalmakta ve hücreye Ca^{+2} girişi artmaktadır (75).

b-)Protein oksidasyonu: Proteinlerin serbest radikal harabiyetinden etkilenme dereceleri amino asid kompozisyonlarına bağlıdır. Doymamış bağ ve sülfür ihtiva eden moleküllerin serbest radikallerle reaktivitesi yüksek olduğundan triptofan, tirozin, fenil alanin, histidin, metionin, sistein gibi amino asidlere sahip proteinler serbest radikallerden kolaylıkla etkilenirler. Hem proteinleri de serbest radikallerden önemli oranda zarar görürler. Özellikle oksihemoglobinin oksijen(O_2) veya hidrojen peroksit (H_2O_2) ile reaksiyonu methemoglobin oluşumuna sebep olur. (58,76)

Serbest radikaller ile oluşan protein oksidasyonunun kimyasal sonucu olarak metionin sülfokside, histidin oksihistidine veya asparagine, tirozin ditirozine ve sistein disülfütlere dönüşür. Bu değişiklikler proteinlerin bağlanma özelliklerinde ve enzim aktivitelerinde farklılaşmaya neden olarak hücre fonksiyonlarında bozulmalara yol açabilir (74,77).

Protein Karbonil: Protein karbonillerinin (PCO) oluşumu, oksidatif protein hasarının erken bir belirtisi olduğu bilinmektedir (78). PCO türevlerinin oluşumuna yol açan primer modifikasyon reaksiyonları; amino asitlerin alfa-karbon atomlarının veya R yan zincirinin oksidatif modifikasyonları ve bunun sonucu meydana gelen reaktif oksijen aracılı peptit ayrılması reaksiyonlarından oluşur (Şekil 7) (79,80,81). Reaktif oksijen türevlerinin proteinlerle etkileşimi sonucunda histidin, prolin, arginin ve lizin gibi çok sayıda amino asit bakiyesinde ve/veya proteinlerin peptid omurgasında oluşan oksidatif hasar sonucunda protein karbonil ürünleri meydana gelir (79,81).

PCO oluşumuna yol açan sekonder modifikasyon reaksiyonları, proteinlerin karbonhidrat ve lipit oksidasyon ürünleri ile reaksiyonlarını içermektedir (79,80). Lipit peroksidasyonu sırasında oluşan aldehitler (malondialdehit, 4-hidroksi-2- nonenal), indirgen şekerler veya bu şekerlerin oksidasyon ürünlerinin proteinlerdeki lizin bakiyeleri ile reaksiyonu sonucu oluşan reaktif karbonil türevleri protein yapısına karbonil gruplarının katılmasına yol açar (82).

Okside olmuş proteinlerin birikimi sadece protein oksidasyonunun değil, aynı zamanda proteinlerin yıkım hızının da bir sonucudur (80). Günümüzde PCO düzeyinin saptanması protein oksidasyonunu belirlemede duyarlı ve genel olarak kabul görmüş bir yöntemdir (79,80).

f-)Kalsiyum: Hücre yaralanması ile ilgili olduğu düşünülen bir elementtir. Kalsiyumun transportunu engelleyen herhangi bir durum hücre fonksiyonlarını olumsuz etkiler. Kalsiyum ATPaz enzimleri önemli sülfidril gruplarına sahiptir ve serbest oksijen radikalleri (SOR) tarafından inaktive edilebilir. (85).

2.3.İskemi: Hipoksi aerobik oksidatif solunumu etkileyen, son derece önemli ve genel bir hücre zedelenme ve ölüm nedenidir. Hipoksinin en önemli nedeni, arteriyel ya da venöz kan akımı bozukluğuna bağlı organ ve dokunun yetersiz perfüzyonuna yol açan iskemidir (86).

Oksijen homeostazı insan fizyolojisinde hayati önem taşır. Oksidatif fosforilasyon sırasında ATP sentezi için kullanılan oksijen aynı zamanda hücresel lipid, nükleik asit ve proteinlerdeki oksidatif hasar mekanizmalarında da rol oynar. Dolayısıyla, protein sentezi ve aktivitesini kontrol eden kısa ve uzun dönem mekanizmalarla hücresel ve sistemik oksijen konsantrasyonlarının dengelenmesi oksijen biyoyararlanımı açısından önemlidir (87). İskemide hücre zedelenmesinin patogenezinde oksijen yetersizliğinin önemi belirtilmekle birlikte kısmen azalmış reaktif oksijen türevleri de hücre ölümünün önemli araçlarındandır.

Sonuç olarak, uzun süreli iskemilerde; hücresel şişme, asidoz, hücre içi kalsiyum /sodyum oranında artış, ATP/fosfokreatin seviyesi azalması, hipoksantin seviye artması, membran potansiyel değişiklikleri, iskelet bütünlüğü kaybı, nükleotid hidrolizi gibi hücre metabolizması ve iskelet yapısını ilgilendiren birçok değişim meydana gelir (88).

İskemik dokunun reperfüzyonu sırasında dokuya sağlanan oksijen ve metabolitler, hasarı geriletebileceği gibi hasarın ilerlemesine de neden olabilir. Bu ince çizgi, iskemik hasarın geri dönüşümlü olup olmadığına bağlıdır.

İskeminin süresine ve şiddetine bağlı olarak iki türlü hücresel hasar ortaya çıkar:

- Reversibl (Geri Dönüşümlü) İskemik Hasar
- İrreversibl (Geri Dönüşümsüz) İskemik Hasar

2.3.1. Reversibl (Geri Dönüşümlü) İskemik Hasar: Normal koşullarda 3-4 dakikalık iskemi, yüksek enerjili fosfat olan fosfokreatinin ile adenosin trifosfat (ATP) depolarının boşalmasına ve enerji bağımlı membran iyon pompalarının normal iyon gradiyentini gerçekleştirememelerine yol açar. Özellikle potasyumun difüzyonla dışarı atılımı ve sodyumun hücre içi birikimine yol açan sodyum pompası yetersizliğine sebep olacak şekilde oubain duyarlı ATPaz aktivitesinin azalmasına neden olur (88).

Sodyum-Hidrojen Değiştiricisinin Aktivasyonu: İskeminin başlaması ile birlikte normalde var olan aerobik metabolizma derhal anaerobik forma dönüşerek doku biyoenerjisi ve iyon homeostasisi, moleküler regülasyon ve organ performansında

bozulmaya yol açmaktadır. İskemi ve hipokside aerobik metabolizma devam edemediğinden dokuda var olan adenosin trifosfatlar (ATP) tüketilir. Yeni ATP üretimi yetersiz kaldığından enerji ihtiyacı için gerekli olan olayların sürekliliği sağlanamaz. ATP düzeyinin azalması ile birlikte iyon gradientinin sürdürülmesi için hücrelerdeki Na-K ATPaz enzimi fonksiyon göremez. Bunun sonucu hücre içinde Na^+ konsantrasyonu artar. Hücre içindeki artmış Na^+ 'u dışarıya çıkarmak için Na-Ca antiport sistemini devreye sokar. Bu sistem hücre içindeki artmış olan Na^+ 'dan bir adet dışarıya çıkarırken bunun yerine bir adet Ca^{+2} içeriye taşır. Bunun sonucu olarak hücre içi Ca^{+2} miktarı artar. Artmış olan Ca^{+2} ortamda ATP olmadığından hücrenin kasılabilirliğini artırmaz. Buna karşılık mitokondrielerde şişme ve matrikste hidroksiapatit kristallerinin birikmesine yol açmaktadır (89,90).

Serbest radikallerin oluşumundan sonra ribozomların granüllü endoplazmik retikulumdan (GER) ayrılması ve polizomlardan monozomların oluşumu ile protein sentezinde azalma bunu takip eder. Hipoksinin devam etmesi ile mitokondrial fonksiyonun daha da kötüleşmesi ve membran geçirgenliğinin artışı sonucunda morfolojik hasar artar. Hücrenin ana hatları, mikrovillus gibi ultrastrüktürel özelliklerin kaybı ve hücre yüzeyinde kabarcıkların oluşumu ile bozulur. Mitokondri, endoplazmik retikulum ve tüm hücreler ozmotik regülasyonun bozulmasından dolayı şişmişlerdir. İskemi düzeltilir ve O_2 düzeyleri normale dönerse tüm bu bozulmalar geri dönebilir, ancak iskemi ve hipoksi devam ederse ATP'deki azalma şiddetlenir geri dönüşümsüz hasar meydana gelir (91).

2.3.2. İrreversibl (Geri Dönüşümsüz) İskemik Hasar: Morfolojik olarak mitokondrielerin ileri derecede vakuolizasyonu, plazma zarlarının aşırı yıkımı, lizozomların şişmesi görülür. Mitokondri matriksinde şekilsiz yoğunlaşmalar gelişir. Mitokondride iskemiden sonra bu erken geri dönüşsüz zedelenme bulguları 30-40 dakikada gözlenebilir (6).

Kritik iskemi zamanı, doku canlılığının sürdürülebildiği maksimum iskemi süresi olarak tarif edilir. Ortalama kritik iskemi süresi ise %50 doku kaybına neden olan iskemik zaman dönemidir. Hücrenin metabolik aktivitesi ve adaptasyon mekanizmalarına göre kritik iskemi süresi farklılık göstermekle birlikte uzun süreli iskemide geri dönüşümsüz hasar ve nekroz kaçınılmazdır (88).

Sürekli olarak aşırı geçirgen membranlardan protein, temel koenzimler ve ribonükleik asitler kaybolur. Hücre aynı zamanda yaşamını sürdürmek için gerekli olan ATP'nin yeniden oluşumunda kullanacağı hücre içi yüksek enerjili fosfatlarını yitirir (94).

pH düşmesi lizozom membranlarında zedelenmeye yol açar. Enzimler sitoplazmaya geçerek asit hidrolazların aktivasyonu ile hücre bileşenlerinin enzimatik sindirimine bu da ribonüleoprotein, deoksiribonüleoprotein ve glikojen yitimine sebep olur. Tüm bu olaylar sonucunda ölü hücre myelin şekiller biçiminde büyük fosfolipid kitlelerine dönüşebilir. Bu ya

diğer hücrelerce fagosite edilir ya da yağ asitlerine parçalanır. Yağ asitlerinin artıklarının kalsifikasyonu kalsiyum sabunlarının oluşmasına neden olur. Hücrede meydana gelen iki olay geri dönüşsüzlüğü karakterize eder. Önce mitokondriyum işlev bozukluğunun yeniden kanlanma ve oksijenlenmeye karşı düzelmeyişi (oksidatif fosforilasyon ve ATP rejenerasyon yokluğu) ve daha sonra membran işlevlerinde belirgin bozuklukların gelişimi(6).

Geri dönüşsüz hücre zedelenmesinde mekanizmalar ne olursa olsun sonuç aşırı miktarda Ca^{+2} un hücre içine girmesidir. Membran zedelenmesi sonucunda kalsiyum yüksek yoğunlukta bulunduğu hücre dışından hücre içine geçer. Reperfüzyon sağlansa dahi kalsiyum akümülyasyonu devam eder. Kalsiyum mitokondriyer tarafından alınır; hücreyel enzimleri inhibe eder, proteinleri denatüre eder ve koagülyasyon nekrozu için karakteristik değışikliklere neden olur. Kalsiyum iyonları hücreyi ölüme götüren biyokimyasal değışikliklerde önemli bir mediatördür. Membran bütünlüğünün bozulması ayrıca hücre içinde bulunan süperoksit dismutaz, katalaz ve glutatyon peroksidaz gibi antioksidan enzimlerin kaybını da hızlandırmaktadır. Bu durumdaki hücre reperfüzyon sırasında oluşumu artan oksijen radikallerinin etkisine daha duyarlı hale gelecektir. Bu nedenle iskemi ne kadar uzarsa meydana gelen reperfüzyon hasarı da o derece ciddi olmaktadır (6).

Hücreyel fonksiyonlar hücre ölümünden önce kaybolur. Hasarın morfolojik görünümü, kritik biyokimyasal sistemlerde bozukluklar oluşup geri dönüşsüz hasar oturduktan çok sonra belirgin hale gelir. Hücre şişmesi dakikalar içinde görülebilen geri dönüşümlü bir hasardır. Geri dönüşsüz hasar 20-60 dakika içinde ışık mikroskobunda görülebilirken, hücre ölümü ancak 10-12 saatte belirgin hale gelir (6).

Geri dönüşsüz hasarın temelinde iki olay vardır; birincisi belirgin enerji azalmasının neden olduğu olaylar geri döndürmede yetersizlik, ikincisi membran fonksiyonlarının ileri düzeyde kaybıdır (6).

2.4. Reperfüzyon: Reperfüzyon, iskemide kalan dokuya kan akımının ve bununla birlikte O_2 nin tekrar gelmesidir, yani dolaşımın düzeltilmesidir. Reperfüzyon, iskemiyeye maruz kalan doku ya da organların yeniden kanlanması ve oksijenlenmesi olayıdır. Reperfüzyon hasarı ise, iskemi periyodunu izleyen yeniden kanlanma döneminde doku ya da organlarda meydana gelen hasar olarak tanımlanır (86)

İskemiyeye maruz kalmış bir dokunun reperfüze edilmesiyle iskemik hasarın azalacağı beklenir; ancak belli durumlarda bu mümkün olmaz ve aksine hasarın arttığı tespit edilir. Bu fenomeni açıklamaya yönelik bir takım hipotezler geliştirilmiştir. İskemi sırasında bazı hücrelerin hasara karşı duyarlı hale gelebileceği ve reperfüzyon sırasında ortaya çıkan bazı zararlı etkenler karşısında bütünlüklerini kaybedebilecekleri ileri sürülmüştür. Duyarlı hale gelmiş bu hücreleri öldürebilen en olası zararlı etkenin serbest oksijen radikalleri olduğu ileri

sürülmüştür. Bunlar endotel ve parankimal hücrelerden ve inflamasyon nedeniyle dokuya nüfuz etmiş nötrofillerden kaynaklanabilir. Serbest oksijen radikalleri lipid peroksidasyonu ile membranlara zarar verebildikleri gibi, protein, DNA ve mitokondrilere de zarar verebilirler. Bunun dışında reperfüzyon esnasında hücre içine kalsiyum akümülyasyonunun masif bir hal aldığı ve ardından kalsiyumun özellikle mitokondrilere alınmasının reperfüzyon hasarının belkemiğini oluşturduğu yönünde kanıtlar mevcuttur. İskemi sırasında dokuda oluşan metabolitler sirkülasyon olmadığından dokuda birikir (93).

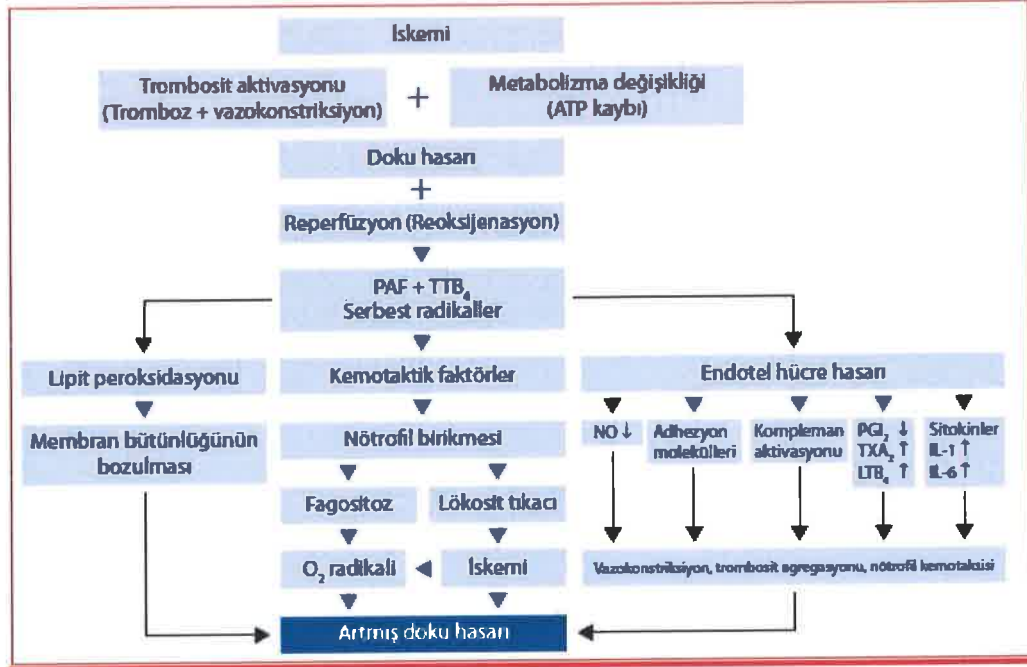
İskemik dokuya kan akımının yeniden sağlanması ile enerji temin edilir, hasarlı hücre onarılır ve toksik metabolitler ortamdan temizlenir. Reperfüzyon, iskemik hasarın geri dönebilmesi için gerekli olmakla birlikte, tehlikeli metabolik sonuçlara yol açabilir. Daha şiddetli bölgesel doku hasarını başlatabilir ve toksik metabolitler sistemik dolaşıma geçerek sistemik hasara yol açabilir. İ/R'un neden olduğu doku hasarının büyük ölçüde reperfüzyon aşamasında gerçekleştiği birçok çalışma ile kanıtlanmıştır (96,97). Hasarlanmaya neden olan doku perfüzyonundaki bozulma, damar permeabilitesinin artışı ve buna sekonder gelişen doku ödemiyle ilişkilidir. Damar endotelini koruyan ve endotel fonksiyonlarını bozacak patolojik süreçleri hafifleten ajanlar ve yaklaşımlar hasarlanmaya karşı profilaktik etkinlik göstermişlerdir (93,95).

Reperfüzyon, iskemi sonrası iskeminin bıraktığı hasarı artıran bir potansiyele sahiptir. Reperfüzyon hasarı endotelial ve mikrovasküler disfonksiyon, sellüler nekroz ve apoptozisle karakterizedir. Reperfüzyon hasarına yol açan mekanizmalar, etkileyici bir düzen içindedir (98).

2.5. İskemi-Reperfüzyon Hasarını Oluşturan Mekanizmalar

İskemi reperfüzyon hasarının patofizyolojik süreçleri oldukça karmaşıktır. Yapılan çalışmalarda birçok molekül ve savunma sisteminin hasar üzerinde etkileri gösterilmiştir (99).

Hücre içine moleküler oksijenin sunumuyla hızla oluşan serbest oksijen radikal (SOR) türevleri en çok suçlanan faktör olmakla birlikte, reperfüzyon hasarından birçok mekanizma sorumlu tutulmuştur (86).



Şekil 8. İ/R hasarında yer alan olaylar dizisi (100)

İskemi reperfüzyon hasarında fizyopatolojik değişikliklere sebep olan faktörler:

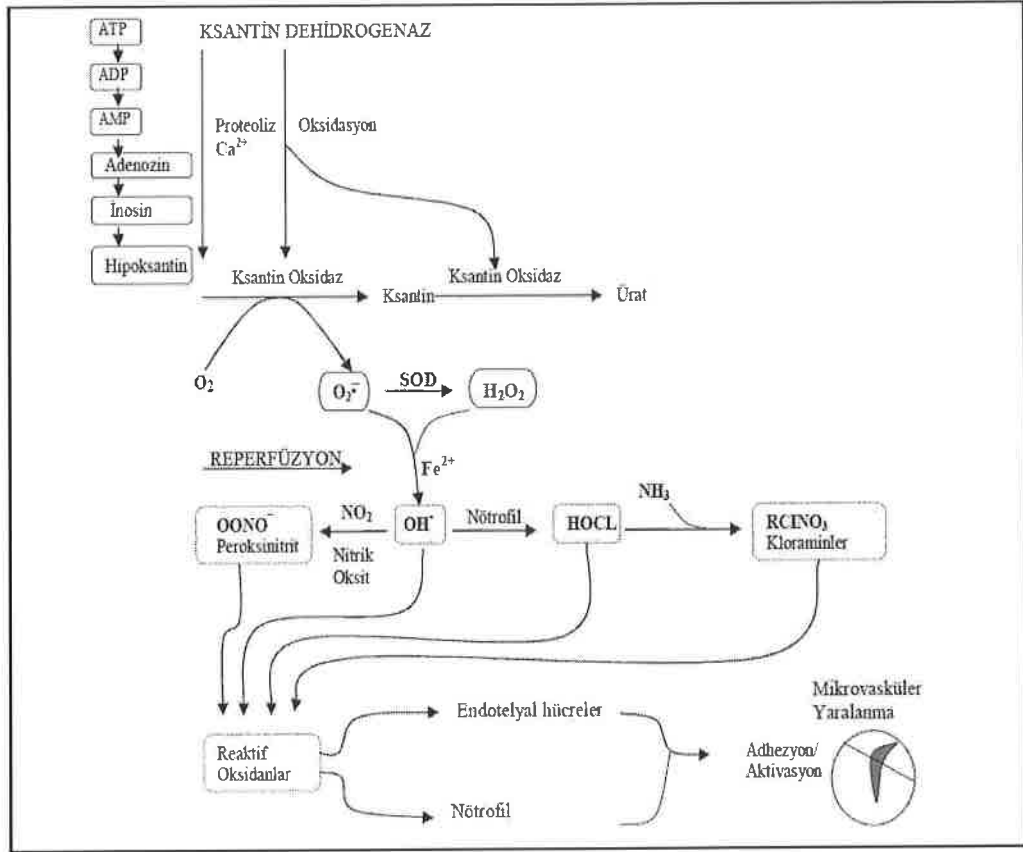
- Serbest radikaller,
- Komplemanlar,
- Sitokinler,
- Endotel hücrelerinin rolü (101).

2.5.1. İskemi-reperfüzyon hasarında serbest radikaller

Postiskemik dokuda serbest oksijen radikallerinin oluşumuna yol açan iki kaynak vardır. Birincisi, hipoksantin ve moleküler oksijen ile ksantin oksidaz enziminin reaksiyon zinciridir. İkincisi ise iskemik doku içine nötrofillerin infiltrasyonudur (105-107). Serbest radikaller hücrelerin protein, DNA, karbonhidrat, lipidler, enzimler ve diğer molekül grupları ile reaksiyona girerek onların metabolizmalarını etkilerler (102-104) Ekstrasellüler matrikste hyaluronik asit ve kollajen yapısında değişiklik meydana getirerek dokularda hasara neden olurlar. Membran yapısında yer alan fosfolipidlerdeki poliansature yağ asitlerinin peroksidasyonu ile doğrudan hücrelere zarar vermektedirler. Ayrıca lizozom ve mitokondrileri çevreleyen zarların permeabilitesini artırarak parçalamaktadırlar (60,108, 109). Vücutta her şey düzenli çalışırsa düşük düzeyde ortaya çıkan bu etkiler temizleyici enzimler ve antioksidan maddelerle etkisiz kılınırlar. Bunların üretimleri organizmanın temizleme olanaklarını aştığında dokuda yıkım başlar (102, 104,110).

Anaerobik glikoliz ile aerobik glikolizle oluşan ATP nin ancak % 7 si elde edilebilmektedir. Hücresel ATP de azalma ile birlikte adenozin monofosfat (AMP) artışı fosfofruktokinazı uyarır, bu da anaerobik glikoliz ile glikojenden ATP sentezini artırarak hücreye enerji sağlar. Glikolizis laktik asit ve fosfat türevlerinin hidrolizi ile inorganik fosfatların birikimine yol açar, bu da hücre içi pH'ı düşürür (24). Yine iskemi sırasında devam eden başka bir olay ATP seviyesinin azalmasına karşın ADP düzeyinin artmasıdır. Artan ADP'ler önce AMP'ye daha sonra adenezine dönüşür. (111). Adenezin hızla hücre dışına difüze olur ve inozin ve hipoksantine parçalanır. Normal şartlarda hipoksantin ksantin dehidrogenaz aracılığıyla ksantine parçalanır. İskemik durumda kalsiyum ile aktive edilen ve "kalpein" olarak tanımlanan sitozolik proteaz enzimi ile ksantin dehidrogenaz, ksantin oksidaza dönüşür (95, 111, 112). Substrat olarak nikotinamid adenin dinükleotid kullanan ksantin dehidrogenazın aksine ksantin oksidaz oksijeni kullanır. Bundan dolayı hipoksantin ksantine dönüşümünü katalize edemez, sonuçta dokuda hipoksantin düzeyi aşırı seviyelere çıkar. Hipoksantin reaktif oksijen radikallerinin prekürsörü olarak hücre içinde miktarı artar. Reperfüzyonla oksijen tekrar dokuya sunulduğunda fazla miktardaki hipoksantin ksantin oksidaz ile reaksiyona girmesi sonucunda toksik serbest oksijen radikalleri oluşur (6)

Patolojik süreçlerde ise serbest radikaller XO metabolizmasından, aktive olmuş nötrofillerden, katekolamin oksidasyonundan endotel hücrelerinden ve prostaglandinlerden üretilmektedir(113). Postiskemik dokudaki serbest radikallerin esas kaynağı XO enzimidir. İskemi esnasında ilgili dokuya demir iyonu girişi olur. Reperfüzyon gerçekleştiği takdirde süperoksit ve hidrojen peroksit üretilir. Süperoksit serbest ferröz demirin (Fe^{+2}) ferritinden salınımını arttırır (114). Böylece fenton reaksiyonu ile hidrojen peroksitten bol miktarda hidroksil radikali oluşur.



Şekil 9. Ksantin-hipoksantin metabolizması ve serbest oksijen radikal oluşum şeması (115)

Organizma sürekli olarak serbest radikal ataklarıyla karşı karşıyadır. Atmosferin %21'ini teşkil eden oksijenin aerobik organizmanın yaşamı için gerekliliği kaçınılmazdır. Serbest radikaller fizyolojik şartlarda ve dış etkenlere karşı organizmanın savunmasında da belirli oranda oluşur ve içsel mekanizmalarla organizmaya olabilecek zararlı etkileri önlenir. Biyolojik sistemlerde oluşan serbest radikallerin endojen kaynakları oksijen, nitrik oksit (NO), uyarılmış nötrofil, mitokondriyal elektron transport sistemi, endoplazmik retikulum, peroksizom ve plazma membranı olarak sayılabilir. Solunan oksijenin %95'inden fazlası mitokondrilerde ATP şeklinde enerji oluşumunda kullanılırken, yaklaşık %5'i de son yörüngelerinde ortaklanmamış elektron içeren ve bu özellikleri nedeniyle de toksik serbest radikallere dönüşmektedir (112).

Moleküler oksijenin elektron transport zincirinde indirgenmesi biyolojik sistemlerde enerji üretimi için gereklidir. İndirgenme mitokondride bulunan dört adet kompleks tarafından sağlanır. Bu indirgenme %100 başarılı değildir, oksijenin yaklaşık %1-4'ü indirgenmeyi tamamlayamaz ve O₂ olarak elektron transport zincirinden sızar. O₂, kompleks I (Nikotinamid adenin dinüleotid koenzim Q redüktaz) ve kompleks III (ubiquinol sitokrom redüktaz) tarafından üretilir. Yüksek miktarda oksijen varlığında ve mitokondrial hasar sonucu kompleks

I ve kompleks III'te oksijenden O₂ oluşumu hızlanır ve İR sırasında oluşan SOR'un kaynağının bu olduğu belirtilmiştir. Hücrenel hipoksi sırasında kompleks IV (sitokrom oksidaz)'ün aktivitesi azalır ve hücrenin tekrar oksijenlenmesi ile proksimal komplekslerden SOR kaçağı artar. Oluşan O₂ çoğu mitokondriyal matrikste manganez süperoksit dismutaz enzimi ile H₂O₂'ye dönüşür ve mitokondrial membranları kolayca geçerek sitoplazmaya ulaşır. Az bir miktar O₂ ise anyon kanallarından sitoplazmaya geçerek sitoplazmada ya spontan olarak ya da bakır süperoksit dismutaz enzimiyle H₂O₂'ye dönüşür. H₂O₂ sitoplazmada katalaz ve glutatyon peroksidaz ile su ve oksijene dönüşür. Alternatif olarak H₂O₂ geçiş metalleri özellikle de ferril demir ile reaksiyona (Fenton reaksiyonu) girerek hidroksil radikali oluşturur (116).

Karaciğer iskemisini takip eden hem akut hem de subakut reperfüzyon fazında ROS üretilebilir. Reperfüzyonun akut fazında ROS; protein oksidasyonu ve yıkılımı, lipid peroksidasyonu ve DNA hasarı üzerinden direkt hücrenel hasar oluşturur (117). Bütün bu akut redoks hasar çeşitleri daha sonra sinyal iletim yollarını aktive ederek subakut hasarın başlamasına yol açabilir (118). Hasarın subakut fazı esnasında proenflamatuar sinyal iletim kaskadının akut-faz aktivasyonu ile üretilen sitokinler nötrofillerin alıkonmasına ve hasarlı dokunun hasarının daha da artmasına sebep olur. Ayrıca subakut faz esnasında nötrofillerden sekrete edilen proenflamatuar sitokinler reseptör aracılı yollar ile hasarlı dokuda hücre içi ROS üretimini arttırarak organ hasarını derinleştirirler (119).

SOR'un nasıl etki ettiği ile ilgili iki temel görüş vardır. Bunlardan birine göre SOR hücrelerdeki yapısal ve fonksiyonel rolleri olan kontraktıl ve transport proteinlere, enzimlere, reseptörlere, nükleik asit ve membran lipidleri gibi birçok farklı moleküle etki ederek bunların işlevlerini bozar. Özellikle membran lipidlerinin peroksidasyonu sonucu oluşan membran hasarı neticesinde hücre içine kalsiyum girişi artabilir ve sonuçta hücre hasarı meydana gelebilir. Ayrıca SOR proteolitik reaksiyonları hızlandırarak da doku yıkımına yol açabilirler (120). İkinci durumda ise SOR'un lökosit migrasyonuna yol açarak doku hasarına sebep olduğu düşünülmektedir. SOR'un bu etkisini nasıl yaptığı ile ilgili bir dizi hipotez vardır.

Reperfüzyon sırasında, hücre içine Ca⁺⁺ akışının artması ya da endojen fosfolipaz A2 inhibitörlerinin inaktivasyonu, fosfolipaz A2 aktivasyonuna neden olur. Fosfolipaz A2, membrandaki fosfolipitlerden yağ asitlerini ayırarak, lesitinden lisesitin, sefalinden lizosefalin ve fosfatidilkolinden lizofosfatidilkolin oluşturan hidrolitik bir enzimdir. Bu ürünlerin çoğu iskemi ile hasarlanmış doku için toksiktir, özellikle lizofosfatidilkolin konsantrasyonu reperfüzyon sonrası fosfolipaz aktivasyonundaki artışla paralellik gösterir, yüksek konsantrasyonlarda oldukça sitotoksiktir ve iskemi sonrası oluşan aşırı geçirgenliği artırır (121).

Ca^{++} iyonları XD'ın XO'a dönüşümünde gereklidir ve reperfüzyon sırasında serbest Ca^{++} belirgin bir şekilde yükselmektedir, bu da fosfolipaz A2'nin aktivasyonunda önemli bir basamaktır. Fosfolipaz A2 aktivasyonu ile siklooksijenaz yolu prostoglandinler, lipooksijenaz yolu ile lökotrien B4 ve diğer araşidonik asit metaboliti olan tromboksan A2 oluşur. Tromboksan A2, lökotrien B4 gibi güçlü bir kemotaktik ajanlardır ve elastaz gibi proteolitik enzimleri artırarak, O_2 radikallerinin artışına neden olurlar. Membran fosfolipitlerinin, aktive olan fosfolipaz tarafından parçalanması sonucu ise hücre bütünlüğü bozular. Ayrıca reperfüze olan dokuda nötrofil aktivasyonu ve birikimine neden olur (122).

İskemi sonrasında damar endotelinin hasar görmesi ile nötrofil ve trombosit aktivasyonu meydana gelmektedir. Bunun yanısıra iskemik alanda ortaya çıkan kemotaktik faktörlerden kompleman 3a ve kompleman 5a nötrofillerin bölgeye göç etmesine neden olur. İ/R alanına gelen nötrofiller, bu bölgede SOR üretirler. Ortaya çıkan SOR antiproteazları inaktive eder. Sonuçta, lizozomlardan proteolitik enzimler salınarak membran hasarı oluşur. Ayrıca nötrofiller de uyarılmaları sonucunda esnek yapılarını kaybederek mikrosirkülasyonda kalır ve embolizasyona neden olurlar (123).

2.5.2. İskemi-reperfüzyon hasarında komplemanlar

İR'a bağlı kompleman aktivasyonu, damarsal hemostazı etkileyen inflamatuvar aracı maddelerin oluşumuyla sonuçlanır. Bu aracı maddelerden en önemlileri; Kompleman 3a ve Kompleman 5a gibi anafilotoksinler ile inaktif kompleman3b ve kompleman 5b-9 gibi kompleman sistem unsurlarıdır (88). Kompleman 5a; kompleman 3a'ya oranla 20 kat daha güçlü olup, hem lökosit aktivasyon ve kemotaksisini hem de IL-1, IL-6 ve $TNF\alpha$ gibi inflamatuvar araçların sentezini artırır. Kompleman 5b-9 ve inaktif Kompleman 3b, endotel fonksiyon değişikliklerine neden olurlar. İR'a bağlı kompleman sistem aktivasyonu, vasküler hemostaz değişiklikleri ve lökosit-endotel adhezyon eğilimi oluşturarak, doku iskemisini derinleştirir (124).

İR, kompleman sistemini aktive eder. Kompleman sisteminin aktivasyonu ile da sitokin salınımının düzenlendiği düşünülmeyle birlikte bu konu halen tam olarak açıklığa kavuşmamıştır. Kompleman aktivasyonu sonucu oluşan proinflamatuvar komponentler bir yandan lökositleri aktive ederken, diğer yandan $TNF-\alpha$, IL-1 ve IL-6 oluşumunu uyararak inflamatuvar cevabı güçlendirir (125).

Nötrofillerin dokuya gelebilmeleri için gerekli kemotaktik maddeler arasında C3a ve interlökin-1 (IL-1), lökotrien-B4 (LT-B4), trombosit aktive edici faktör ve prostaglandin türleri vardır. Aktif lökositler nükleer transkripsiyon faktörlerinin aktivasyonuna ve tümör nekrozis faktör (TNF) sentezine yol açar. Lökositlerin ürettiği serbest radikallerle etkileşen bu

maddeler, mast hücrelerinden selektin ve ICAM gibi adezyon moleküllerini mobilize eden inflamatuvar mediatörlerin salınımını uyarırlar. (112).

2.5.3. İskemi-reperfüzyon hasarında sitokinler

Sitokinler, doğal ve spesifik immunüenin bir protein mediyatör grubudur. Genelde sitokinler bir inflamatuvar veya antijenik etkileşime yanıt olarak sentezlenir. Dokuya zarar verebilirler, hatta dokuyu ölüme kadar götürebilirler.

Sitokinler, inflamatuvar cevabı indükleyerek ve IR hasarı ciddiyetini modüle ederek, İR hasarında hayati bir rol oynamaktadır. Tümör nekroz faktör- α ve interlökin-1 (IL-6) İR hasarında yaygın olarak bulunan iki sitokindir.

Deneysel veriler ROS'un, endotel hücrelerinden ve monositlerden platelet aktivasyon faktör (PAF) (131), interlökinler ve TNF- α (132) salınımını uyardığını göstermiştir. ROS, endotel hücre ve hepatositlerde yükseltgenme ve indirgenmeye duyarlı transkripsiyon faktörleri NF- $\kappa\beta$ 'yi aktive etmektedir(133,134). Ayrıca ROS, soğukta saklanmış fare karaciğerlerinde reperfüzyondan sonra NF- $\kappa\beta$ üzerinden TNF- α 'nın ve IL-10'un salınımını uyarılmaktadır (132).

TNF- α (Tümör nekroz faktör- α): İnsan TNF 1985'de klonlanmıştır (127). Tümör nekroz faktör- α , nötrofiller, makrofajlar ve T hücreleri tarafından üretilirler (127;). Aktive makrofajlardan ve T hücrelerinden transmembran prekürsör proteini olarak sentezlenir. Tümör nekroz faktör- α , akut faz reaksiyonunu uyaran proinflamatuvar bir sitokindir (128). Akut travmaya cevap olarak TNF- α salınımı hızlı ve kısa sürelidir. Yarı ömrü 15-18 dakika olmasına rağmen, TNF- α 'nın kısa süreli ortamda bulunması bile önemli metabolik ve hemodinamik değişikliklerin gelişmesine ve döngünün ileri kısmındaki sitokinlerin aktive olmasına neden olur (126).

Tümör nekroz faktör- α , inflamatuvar sitokinlerin (IL-1 β , IL-6, IL-8) salınımını uyarır, bir seri kritik kemokinin artışına yol açar (MCP-1, MIP-2, RANTES, MIP-1 α) ve ayrıca endotel adezyon moleküllerinin (ICAM-1, VCAM-1, E-selektin) güçlü bir aktivatörüdür. Tümör nekroz faktör- α , lökosit kemotaksisini ve aktivasyonunu modüle eder ve Kupffer hücrelerinde ROT üretimini indükler. Tümör nekroz faktör- α 'nın bu fonksiyonları, inflamatuvar reaksiyonlarla ilgili olayların başlamasını ve sürdürülmesini düzenler (128).

IL-6: İnterlökin-6, Kupffer hücreleri, monosit, lenfosit, fibroblastlar ve sinüzoidal endotel hücreleri tarafından sentezlenir (129;130). İnterlökin-6, T-hücre aktivasyonu, büyümesi ve farklılaşmasını düzenler. Lenfosit aktivasyonuna ek olarak, IL-6 akut faz proteinlerinin üretiminin hepatosit sentezinin en önemli indükleyicisi olarak bilinir. Bu proinflamatuvar etkilerin aksine, IL-6 çeşitli antiinflamatuvar etkileri yönetir. İnterlökin-1 ve

TNF- α birbirlerinin ve IL-6'nın sentezini indüklerken, IL-6 IL-1 ve TNF- α sentezini inhibe eder (130).

Sitokinlerin lökosit aracılı zararı: Çizgili kasta, interlökin-1 ve tümör nekroz faktör-alfa (TNF- α) iskemi reperfüzyonundan sonra salıverilirler ve lökosit aracılı zararı şu mekanizmalarla arttırırlar: 1) Lizozom salıverilmesinin fazlaşması, 2) O₂⁻ üretiminin artması, 3) Nötrofil kemotaksisinin belirginleşmesi ve 4) Endotele adezyonunu kolaylaştırılması (135,136).

Reperfüzyonla birlikte ortam oksijenlenirken hızla artan reaktif oksijen radikalleri hücredeki oksidatif stresi artırır. Basta makrofajlar olmak üzere dolasım ve parankimdeki diğer inflamatuvar hücrelerden reaktif oksijen radikallerinin yanında TNF- α , IL-6, IL-1 β ve IL-12 gibi proinflamatuvar sitokinler ortama salınır. Sitokinlerin de etkisi ile vasküler yatağı döşeyen endotel hücrelerinde adezyon moleküllerinin (ICAM-1 ve VCAM-1 ve E-selektin) ekspresyonu ve buna bağlı olarak nötrofillerin endotel yüzeyine karşı ilgisi artar. Endotele yapışan nötrofiller daha sonra hücre aralıklarından parankime doğru ilerleyerek fagositoz ve lizozomal enzimlerin de yardımı ile hasarın ilerlemesine neden olurlar (137).

2.5.4. İskemi-reperfüzyon hasarında endotel hücresinin rolü

Endotel tüm vücut dokuları ile kan bileşenleri ve kan hücreleri arasında antiinflamatuvar, anti-trombotik ve anti-adeziv bariyerdir. Endotel su, besinler ve plazma proteinlerinin seçici olarak değişimine izin veren düzenli bir yapıdır. Endotel ve endotel ile bağlantılı yapılar (bazal membran, glikokaliks ve perisitler) plazma proteinleri ve su değişiminde önemli rol alırlar. Venöz dönüş ve plazma hacminin sürdürülmesinde bu bariyer yeterlidir. Dokuların ihtiyacı olan metabolik ve hemostatik ihtiyaçların damar dışına geçişi sırasında dokuyu ödeme karşı korur. Fizyolojik şartlar altında dokuların besin ihtiyacının alanını, mikrovasküler basıncı ve konsantrasyon farkını arttırır. Buna rağmen mikrovasküler değişimde sadece endotel bariyeri rol almaz, lokal kan akımı da mikrovasküler değişimde etkilidir (138).

Lökositlerin adezyon ve migrasyonu sırasında ortaya çıkan serbest radikaller de endotel hücre zedelenmesine neden olup geçirgenliği arttırır (138).

Endotel hücre membranı kapiller lümene doğru parmaksı çıkıntılar ve sitoplazmaya doğru boşluklar oluşturur. İskeminin uzaması ile birlikte endotelial veziküllerde artış meydana gelir. Bitişik endotel hücrelerindeki ayrılma ile birlikte kapiller endotel yüzeyinde geniş boşluklar meydana gelir. Bu noktadan sonra ilerleyici endotelial ödem gelişir, ödem

tüm hücrelerde aynı değildir, şişmiş hücreler arasında şişmemiş hücreler serpiştirilmiş şekilde görülür (139).

Endotel hücreleri İR'yi takiben aktive olarak inflamatuvar bir görev üstlenirler. Endotel hücrelerinde serbest radikal üretiminde, transkripsiyon faktörü olan nükleer faktör kappa beta aktivasyonuna bağlı olarak lökositlerin ve trombositlerin bağlanacağı adezyon moleküllerinin üretiminde ve inflamatuvar sitokin salınımında artış olur. Endotel hücrelerinde oksidatif strese yanıt olarak SOR etkisiyle platelet aktive edici faktör (PAF), interlökin-1 (IL-1), prostaglandinler (PGI₂, PGE₂), endotelin, NO, büyüme faktörleri, tromboksan A₂, granülosit-makrofaj koloni uyarıcı faktör, lökotrien C₄ ve D₄, histamin, bradikinin, H₂O₂, IL-8, IL-1 α ve tümör nekroz faktör alfa (TNF- α) salgılanır (140). Aktive olan endotel hücreleri kendi bazal membranlarını sindiren kollajenazları da salgılayarak yeteneğindedir (141).

2.5.5. İskemi-reperfüzyon hasarında polimorf nüveli lökositler (PMNL)

Lökositler inflamatuvar yanıtla ilgili ana hücreler olduğu halde plateletler ve eritrositler de inflamatuvar yanıtta katılan hücrelerdir. Lökositler; nötrofiller (%40-75), lenfositler (%20-50), monositler (%2-10), eozinofiller (%1-6) ve bazofiller (<%1) olarak sınıflandırılır. Nötrofiller inflamasyon patogeneğinde rol alan en önemli hücrelerdir. Akut inflamasyonda ilk 6-24 saatte baskın hücreler nötrofillerdir. Akut inflamasyonda meydana gelen temel değişiklikler: 1) Kan akımı artışına yol açan vasküler yatakta vazodilatasyon (eski ve geçici vazokonstriksiyon olup olmadığına bakılmaksızın), 2) Plazma proteinlerinin interstisyel alana geçişine izin veren, inflamatuvar ödem oluşmasına neden olan mikrodolaşımdaki yapısal değişiklikler, 3) Mikrodolaşımdaki lökositlerin mevcut hasar bölgesine göç etmesi ve hasar bölgesinde birikmesi olarak sınıflanabilir (142).

Zedelenmeden sonra endotelde geçirgenlik artışı ve vazodilatasyona bağlı olarak artmış hidrostatik basınç ve plazma onkotik basıncındaki azalmayla birlikte proteinden zengin sıvı interstisyel alana geçer. Sıvı kaybının sonucu eritrosit konsantrasyonunda yükselmeye birlikte kan viskozitesi de artarak kan akımını yavaşlatır. Kan akımının yavaşlaması lökositlerin özellikle de nötrofillerin kan akımının daha dış tabakalarına doğru hareket etmesini sağlayarak, endotel yüzeyinde lökositlerin birikmesine neden olur. Buna marginasyon denir (101,143).

İnflamasyona bağlı olarak lökosit marginasyonundan sonra endotel hücreleri ve lökositler dolaşımdaki inflamatuvar maddeler tarafından aktive edilir. Lökositler endotel yüzeyde yol boyunca geçici ve gevşek olarak yapışıp yuvarlanırlar. Yuvarlanma selektin

ailesine bağı moleküllerce sağlanır. Bunlar lökositlerin yüzeyinde bulunan L-selektin, endotele sınırlı E-selektin ve endotel ve trombositlerde bulunan P-selektindir. P-selektin sadece lökositlerin yuvarlanmasında, E-selektin ise hem yuvarlanma hem de adezyonda görev alır (143).

Lökositlerin endotel yüzeyine sıkıca bağlanmasına adezyon denir. Lökositlerin yüzeyindeki integrinler ile endotel hücrelerinin yüzeyindeki immünglobulinlerin etkileşmesi ile kuvvetli adezyon gerçekleşir. Integrinler transmembran hücre yüzey proteinleri olup, immünglobulinler ve ekstrasellüler matrikse bağlanmayı sağlar. Integrinler lökosit plazma membranında bulunmasına karşın, kemotaktik ajanlarla uyarılıncaya kadar reseptörlerine bağlanmazlar.

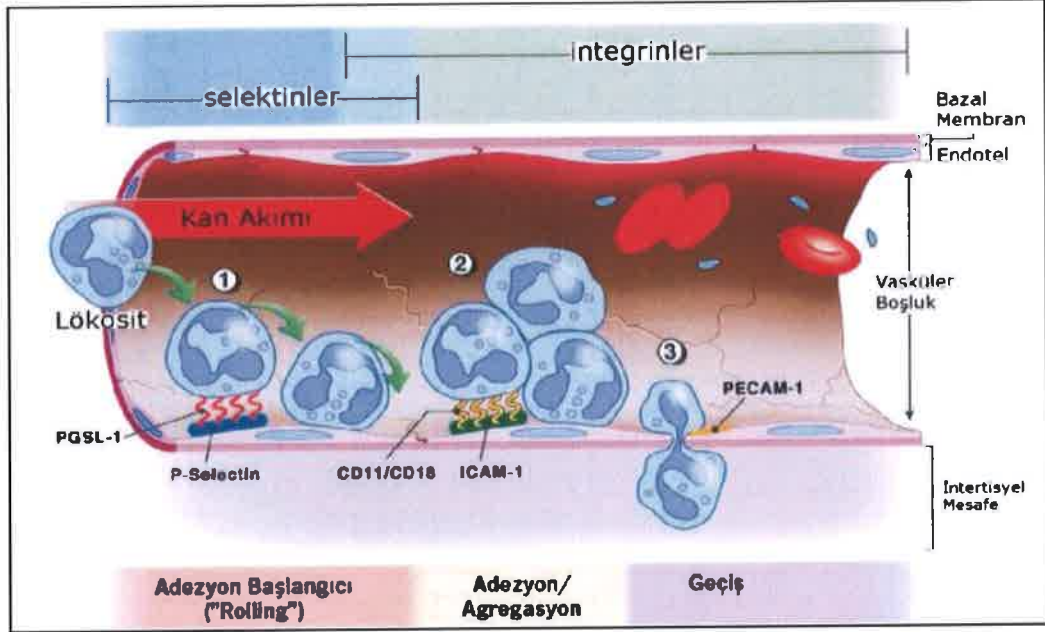
Endotel yüzeyinden dışa vurulan immünglobulinlerden vasküler hücre adezyon molekülü-1 ve intersellüler adezyon molekülü-1 sırasıyla lökosit fonksiyonuyla ilişkili antijen-1 ve makrofaj antijen-1'e bağlanarak lökositlerin endotel yüzeyine sıkıca bağlanmalarını sağlar (144).

Endotel yüzeyine sıkıca bağlanan lökositler salgıladıkları kollajenazlar ile endotel hücreleri arasındaki bağlantıları eriterek ekstravasküler alana geçerler (diapedez) (101).

Ekstravazasyondan sonra, lökositlerin kimyasal bir uyarıyı izleyerek zedelenme bölgesine doğru göç etmesine kemotaksis denir. İnflamasyonun kimyasal mediatörleri, lökositlerin adezyon ve diapedezini etkilemenin yanısıra diğer stimulan faktörlerin de salınımını artırır. Kemotaktik ajanlar lökositlerin hareketini uyarmanın yanında lökositleri aktive ederler. Aktivasyon sonucu lökositlerde araşidonik asit metabolitlerinin üretimi, lizozomal enzimlerin salgılanması ve degranülasyonu, sitokinlerin salgılanması, adezyon moleküllerinin ve integrinlerin dışa vurumu artar (Şekil 10) (142).

Araşidonik asit metabolitleri inflamasyon ve kemotaksis için önemli mediyatörlerdir. İskemi sırasında hücre içinde serbest kalsiyum miktarının hızla artması, plazma membranındaki fosfolipaz A2'yi aktive ederek reperfüzyon sırasında ortamda fazla miktarda araşidonik asit birikimine neden olur. Araşidonik asit siklooksigenaz veya lipooksigenazlarla metabolize edilir. Araşidonik asidin 5-lipooksigenaz ile oksidasyonu sonucu 5- hidroperoksitetraenoik asit oluşur. Reaksiyon sırasında O_2^- radikalleri oluşur. 5- hidroperoksitetraenoik asit daha sonra lökotrienlere çevrilir. Lökotrien B4'ün lökosit yüzeyindeki spesifik reseptörlerine bağlanması, lökositlerin endotele yapışmasını sağlayan β_2 integrinlerin aktive olmasıyla sonuçlanır. Lökotrien C4 ve D4 ise mikrodolaşımdaki kan akımı ve perfüzyon üzerine doğrudan etkili olup, vazokonstriksiyon ve vasküler geçirgenlik artışına neden olurlar.

Siklooksijenaz aktivitesi araşidonik asidi PGG₂'ye çevirir. PGH₂ hücre tipine spesifik farklı PG'ler için prokürsördür. PGG₂'den PGH₂'ye dönüşüm sırasında süperoksit radikal oluşumu gösterilmiştir. Araşidonik asitten özellikle PGI₂ ve tromboksan A₂ oluşur (145).



Şekil 10. Lökositlerin damar endoteli ile etkileşim mekanizması (26)

PGSL-1: P-selektin glikoprotein 1

CD11b/ CD18 : Lökosit fonksiyon antijeni 1

ICAM-1: "Endothelial intercellular adhesion molecule 1" Endotelyal hücre içi adezyon molekülü 1

PECAM: "Platelet-endothelial cell adhesion molecule 1" Trombosit-endotel adezyon molekülü-1

2.6. Antioksidan savunma sistemleri

Organizmada devamlı olarak serbest oksijen radikalleri oluşmasına rağmen antioksidan savunma sistemleri ile oksidasyon arasındaki dinamik dengeden dolayı zararlı etkiler ortaya çıkmaz. Fizyolojik veya patolojik olaylar sonucu bu dengenin oksidasyon lehine değişmesi durumunda oksidatif hasar gelişebilmektedir

Antioksidanlar çoğu diette mevcut olan normal fizyolojik şartlarda insan vücudunda reaktif oksijen veya reaktif nitrojen türlerinin zararlı etkilerini anlamlı derecede azaltan maddelerdir. Reaktif oksijen ve azot türleri enerji ve metabolit üreten reaksiyonlarda bulunur veya mikroorganizmalara karşı savunma oluşturur. Antioksidan sistemin etkinliğinin azalması ve oksidan durumun artması ile oluşan oksidatif stresin artışı dokuya zararlı etkilerden sorumludur(146).

Serbest radikallerin zararlı etkilerine karşı organizmada koruyucu mekanizmalar vardır. Bu mekanizmaların bir kısmı serbest radikal oluşumunu, bir kısmı ise oluşmuş serbest radikallerin zararlı etkilerini önlemektedir. Bu işlevi yapan maddelerin tümüne birden genel olarak antioksidanlar denir (60,147-149).

İskemik dokuların reperfüzyonu toksik/reaktif oksijen türleri oluşumuna yol açar. Bunlar süperoksit anyonlar, hidroksil radikalleri, hipoklorik asit, hidrojen peroksit ve nitrik oksitten derive peroksinitrittir. Serbest radikal temizleyicileri, reaktif oksijen parçaları ile reaksiyona girerek, bunları zararsız maddeler haline dönüştüren ajanlardır. Bu ajanlar SOD, KAT, GSH, GR, GSH-Px olarak sıralanabilir.

Hücrenin oksidanlara karşı savunmasında şu mekanizmalar rol oynar; Metal iyonlarının bağlanması ile toksik radikal oluşumunun önlenmesi, oluşan radikallerin toplanması ve bastırılması, radikal zincir reaksiyonlarının kırılması, hedef moleküllerin hasar sonrası tamiri, tamir edilemeyecek moleküllerin uzaklaştırılması, antioksidan kapasitenin artırılması. Antioksidan bileşiklerin bir kısmı birkaç mekanizmayı birden kullanarak etkilerini göstermektedir. Toksik oksidanların oluşumunun önlenmesi için; organizmada oksidatif stres yapıcı nedenlerin ve risk faktörlerinin iyi belirlenmesi, bunlardan uzak durulması ve etkileriyle mücadele edilmesi ilk yapılması gerekenler olarak sıralanabilir (150-153).

Tablo 1. Antioksidanlar

Antioksidanlar		
Endojen		Eksojen
Enzim olanlar	Enzim olmayanlar	
1) Süperoksit dismutaz 2) Glutasyon peroksidaz (GSH-Px) 3) Glutasyon S-Transferazlar (GST) 4) Katalaz (CAT) 5) Mitocondriyal sitokrom oksidaz sistemi 6) Hidroperoksidaz	1) Melatonin 2) Seruloplazmin 3) Transferrin 2) 4) Myoglobin 5) Hemoglobin 6) Ferritin – 7) Bilirubin 8) Glutasyon 9) Sistein 10) Metiyonin 11) Ürat 12) Laktoferrin 13) Albümin	1) Vitaminler * α -tokoferol (Vit E) * β -karoten(Pro-vit A) * Askorbik asit (Vit C) * Folik asit (folat) 2) İlaçlar * Ksantin oksidaz inhibitörleri -Allopürinol -Oksipürinol NADPH oksidaz inhibitörleri -Adenozin -Lokal anestezipler -Kalsiyum kanal blokerleri -NSAİD * Mannitol * Albümin * Demir selatörleri * Desferroksamin * Barbituratlar

Oluşan oksidanları inaktive etmek amacı ile kullanılan antioksidanlar, endojen ve ekzojen kaynaklı antioksidanlar olmak üzere başlıca iki ana gruba ayrılabilirler.

Süperoksit Dismutaz (SOD): Süperoksit radikali temizleyicisi olarak görev yapar. SOD, in vivo olarak dokuları SR' lere, özellikle $O_2^{\cdot -}$ ye karşı koruyan endojen bir enzimdir (64). İnsanlarda SOD' un Cu-Zn ve Mn kapsayan iki izoenzimi vardır. Cu-Zn içeren tipi sitozolde, Mn içeren tipi mitokondride yerleşmiştir (154). Bu izoenzimlerin her ikisi de $O_2^{\cdot -}$ nin H_2O_2 ' ye ve moleküler oksijene dönüşümünü katalizler $O_2^{\cdot -}$ i metabolize etme yeteneğine sahip sirkulatuar proteinler, seruloplazmin ve ekstrasellüler SOD'dir. Bununla birlikte bu sirkulatuar ajanların temizleyici etkisi aşırı değildir. Çünkü bu proteinlerin plazmadaki aktiviteleri oldukça azdır (153).

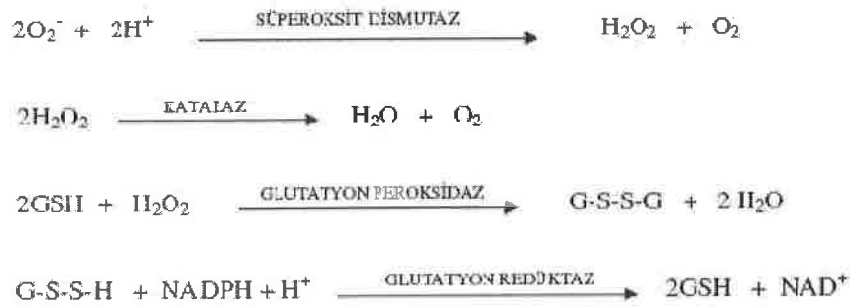
Katalaz (CAT): 1901 yılında tabiatта yaygın bir şekilde yer aldığını Leew ve arkadaşları belirlemiştir(155). İlk defa 1937'de Sumner ve Dounce (156) tarafından karaciğerden kristal formda elde edilmiştir. Molekül kütlesi 240.000 daltondur. CAT, glikoprotein yapısında bir hemoproteindir. Dört alt üniteden oluşmuştur. Bu alt üniteler ferriprotoporfirin grubu şeklindedir. Yani prostetik grubunda Fe^{+3} bulunan protoporfirin IX bulunmaktadır. Saniyede alt ünite başına 200.000 katalitik olayı gerçekleştirebildiği saptanmıştır. Doku katalaz aktiviteleri büyük farklılıklar gösterir. En yüksek aktivite karaciğer ve böbrekte saptanmıştır. En az aktivite ise destek dokusunda gözlenir. Dokularda esas olarak mitokondri ve peroksizom partiküllerine bağlı olarak bulunur. Ayrıca sitoplazma ve endoplazmik retikulumda da aktivitesi vardır. . SOD tarafından oluşturulan hidrojen peroksiti peroksizomlarda su ve oksijene çevirir. Oksidazların aktivitesi ile oluşan H_2O_2 'i direkt olarak suya çevirir. H_2O_2 'nin konsantrasyonunun aşırı arttığı ortamlarda aktivite gösterir. Düşük H_2O_2 konsantrasyonlarında diğer enzimler (glutatyon peroksidaz gibi) devreye girer (157).

GSH-Px ile aynı etkiyi gösterir. Fakat hücre içi dağılımı açısından farklılık söz konusu olup, GSH-Px esas olarak mitokondri ve sitozolde aktif iken katalaz peroksizomlarda aktiftir.

Glutatyon peroksidaz (GSH-Px): Glutatyon peroksidaz (GSH-Px) hidrojen peroksit ve lipid hidroperoksitleri metabolize etmektedir. GSH-Px'in selenyuma bağımlı ve selenyumdan bağımsız iki farklı türü vardır. Selenyuma bağımlı olan formu hem hidrojen peroksidin hem de LOOH'ların metabolizmasında görev alırken, selenyuma bağımlı olmayan türü sadece LOOH'ları metabolize etmektedir. Glutatyon (GSH), bu reaksiyonlarda hidrojen verici olarak görev yapmakta, hidrojen peroksit ve LOOH'lar indirgenirken, GSH oksitlenmiş şekline (GSSG) dönüşmektedir. NADPH'a bağımlı glutatyon redüktaz (GSH-R) ise oksitlenmiş glutatyonu tekrar GSH'a indirgemektedir (158-160). GSH-Px, H_2O_2 'yi mitokondride suya (H_2O) çevirir (161).

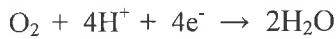
Glutasyon Redüktaz (GR): Okside glutasyonun, redükte glutatyona dönüşümünü sağlayarak dolaylı antioksidan etki göstermektedirler.

Glutasyon redüktaz, bir flavin enzimidir ve koenzimi NADPH, prostetik grubu FAD' dır. Hem sitozol hem de mitokondride bulunmaktadır. Okside glutasyon hücreyi oksidanlara karşı koruyamaz. Hücre, elektron kaynağı olarak NADPH kullanan redüktazın katalizlediği bir reaksiyon ile indirgenmiş glutasyonu tekrar oluşturur. NADPH, hidrojen peroksidin indirgenmesinde endirekt olarak elektronları sağlar. Oluşan NAD^+ ise Glikoz 6-fosfat dehidrogenaz enzimi yardımıyla NADPH' a dönüştürülür (162).



Glutasyon-S-transferaz: Ksenobiyotiklerin biyotransformasyonunda önemli rol oynarlar. Lipid peroksitlerine karşı (Se bağımsız GSH-Px aktivitesi göstererek) bir savunma mekanizması oluştururlar (60).

Mitokondriyal sitokrom oksidaz: Süperoksit radikalinin in vivo olarak oluştuğu major yollar mitokondri ve mikrozomal elektron transport sistemleridir. Mitokondriyal elektron transportunda normal şartlar altında bir moleküler oksijene 4 elektron aktarılarak 2 molekül su oluşturulur:



Sitokrom oksidaz, kısmen elektronlanmış oksijenleri aktif merkezinde sıkıca tutar, böylece elektron sızıntısını minimize etmiş olur. Dolayısıyla buradaki konumu bir antioksidan özellik arz etmektedir. Eğer kısmi olarak elektronlanmamış oksijen atomlarını (serbest radikal) yapısında tutmamış olsa, ortamda oksidatif stres artacaktır.

2.6.1.2. Enzim olmayan antioksidanlar

Melatonin: Pineal bezden salınan indolamin yapısında bir hormon olup OH^\cdot radikalini ortadan kaldıran etkin bir antioksidandır (60).

Güçlü bir radikal süpürücü etkinliği olan melatonin, glutatyon peroksidaz enzimini aktive etme, süperoksit dismutaz enzim aktivitesini artırarak ve oksidatif stres durumundaki katalaz aktivitesindeki azalmayı engelleme gibi çeşitli dolaylı etkilere de sahiptir (60).

Seruloplazmin: SOD benzeri bir etki gösterdiği düşünülmektedir. Ferröz demiri (Fe^{+2}), ferrik demire (Fe^{+3})'e yükseltgeyerek fenton reaksiyonu oluşmasını ve H_2O_2 'den hidroksil radikali oluşumunu engeller (60).

Transferrin: Dolaşımdaki serbest demiri bağlar.

Ferritin : Ferritin dokulardaki serbest demiri bağlar (60).

Albümin: Geçiş metalleri bağlar, lipid hidroperoksit (LOOH) ve hipoklorit (HOCl) toplayıcısıdır (60)

Bilirubin: Serbest radikal tutucusudur, süperoksit ve hidroksil radikal toplayıcısıdır (60).

Glutatyon: Oksidasyon-redüksiyon olaylarındaki önemli rolü ve yüksek konsantrasyonu nedeniyle glutatyon en önemli antioksidanlardan biridir (60).

Karaciğerde, genetik bilgiye gerek olmadan glutamat, sistein ve glisinden sentezlenebilen bir tripeptiddir. Çok önemli bir antioksidan olan glutatyon, serbest radikaller ve peroksitlerle reaksiyona girerek hücreleri oksidatif hasara karşı korur. Ayrıca proteinlerdeki -SH gruplarını da redükte halde tutarak oksidasyondan korur (60)

Sistein: Serbest radikal ve hipoklorit toplayıcısıdır (60)

Taurin: Ksenobiyotiklere bağlanır. Hipoklorit ile reaksiyona girer(60)

Glukoz: Hidroksil radikal tutucusudur (60)

2.6.2. Ekzojen antioksidanlar: Vitamin ekzojen antioksidanlar ve antioksidan etkinliği olan ilaçlar olarak ikiye ayrılırlar.

2.6.2.1. Vitamin ekzojen antioksidanlar:

Vitamin E (α -tokoferol): Lipofilik yapıdaki güçlü bir antioksidandır. Membranların lipid kısmında ve ekstrasellüler sıvılarda bulunur. Hücre zarı fosfolipitlerinde bulunan poliansature yağ asitlerini serbest radikal etkisinden koruyarak ilk savuma hattını oluşturur, süperoksit ve hidroksil radikallerini ve diğer radikalleri indirger, lipid peroksidasyonunun zincir reaksiyonunu zincir kırıcı etkisiyle sonlandırır (163).

β -karoten (Vitamin A prekürsörü): Singlet oksijenini etkisizleştirmek suretiyle, süperoksit radikalini temizler. Hidroksil, alkoksil, peroksil radikalleri ile doğrudan etkileşerek antioksidan görev görür. Lipit peroksidasyon zincir reaksiyonunu önleyebilir (60).

Vitamin C (Askorbik asit): Hücre dışı sıvılarda bulunur. Süperoksit ve hidroksil radikalinin doğrudan temizleyicisidir. Hidrofilik özelliğe sahip en kuvvetli antioksidan

askorbik asittir. Kolaylıkla dehidroaskorbik asite oksitlenebilir. Askorbik asit hem oksidan hem de antioksidan olarak etki edebilir. Ferrik demiri, ferröz demire dönüştürerek, hidrojen peroksitin Fenton reaksiyonuyla kuvvetli bir oksidan olan hidroksil radikaline (OH[•]) dönüşümüne sebep olabilmektedir (60).



2.6.2.2. İlaç olarak kullanılan antioksidanlar

- Ksantin oksidaz inhibitörleri (Allopurinol, oksipurinol)
- Rekombinant süperoksit dismutaz
- NADPH oksidaz inhibitörleri (adenozin, kalsiyum kanal blokörleri, lokal anestezikler)
- Trolox-C (Vitamin E analogu)
- Endojen antioksidan aktiviteyi artıranlar (asetilsistein)
- Non-enzimatik serbest radikal toplayanlar (albumin, mannitol)
- Demir redoks döngüsü inhibitörleri (desferoksamin)
- Nötrofil adhezyon inhibitörleri
- Barbituratlar
- Demir şelatörleri
- Statin bileşikleri (Rosuvastatin)

2.7. İskemi reperfüzyon hasarını önlemek için tedavi stratejileri: Kontrollü deneysel modellerde İ-R hasarını başarıyla önleyen veya sınırlayan birçok tedavi stratejileri klinik pratik kullanımda süpheli sonuçlar vermektedir veya insan klinik araştırmalarında kullanılmamaktadır. İ-R hasarını azaltmada kombine stratejilerin etkinliğini bulan az sayıda çalışma vardır (95).

1. Kontrollü, dereceli reperfüzyon (controlled, graded reperfusion)
2. İskemik önkoşullama (preconditioning)
3. Aspirin-triggered Lipoxin Analogları
4. Antioksidan tedavi
 - a. Süperoksit dismutaz
 - b. N-asetilsistein
 - c. Allopurinol
 - d. Demir şelatörleri
 - e. Vitamin E
 - f. Katalaz
 - g. Mannitol

h. Tioller

5. Kalsiyum antagonistleri
6. Anjiotensin konverting enzim inhibitörleri
7. Anti-kompleman tedavi
8. Lökosit deplesyonu / filtrasyonu
9. Anti-sitokin veya lökosit adezyon molekülü mAb
10. Endotelin reseptör antagonistleri
11. Platelet aktivasyon faktör antagonistleri
12. LTB4 antagonistleri

2.7.1. İskemik önkoşullama (preconditioning)

İskemik önkoşullama (İÖK), tek veya tekrarlayan kısa süreli iskemik periyotların daha uzun süreli iskemik periyotlarda gelişebilecek hücre, doku veya organ hasarına karşı belirgin bir direnç oluşturması ile gerçekleşen koruyucu bir mekanizmadır. İÖK ilk kez 1986 yılında Murry ve arkadaşları tarafından tanımlanmıştır (164). Daha sonraki yıllarda yapılan çalışmalarda İÖ'nün miyokardiyal nekroza karşı koruyucu etkisinin yanında aritmi, koroner endotelial hasar ve mikrovasküler fonksiyon bozukluğuna karşıda koruyucu etkileri olduğu gösterilmiştir.

Miyokarda kısa süreli ve periyodik olarak uygulanan iskemik streslerin daha uzun süreli benzer iskemik strese karşı miyokarda belirgin bir direnç oluşturması ile gerçekleşen miyokardı koruyucu, adaptif bir mekanizmadır. Önkoşullama ile koruma bilinen en güçlü koruma mekanizmasıdır ve araştırılan tüm hayvan türlerinde gösterilmiştir (166). İskemik önkoşullama tarif edildiği 1986'dan beri büyük çoğunlukla iskemik epizodlar oluşturarak kalbin mekanik ve metabolik disfonksiyonunu özlümeye yöneliktir. İnsan kardiyomiyositlerinde iskemik önkoşullama saf tek tabakalı insan ventriküler kardiyomiyositleri kullanılarak iskemi ve reperfüzyon modelleri yapılmıştır. Bu modelde iskemi ve reperfüzyon epizodlarının sellüler hasarı azalttığı ve sellüler yaşamı artırdığı gösterilmiştir. Önkoşullama sonrası miyositlerin daha az hidrojen iyonu ürettiği, LDH salgılanmasının azaldığı ve ATP depolarının kontrol gruplarına göre daha iyi korunduğu gösterilmiştir (165)

Bugün için İÖK hemen tüm cerrahi disiplinleri ilgilendirmektedir. Örneğin; koroner revaskülarizasyonun morbiditesini azaltmak yanında, transplantasyonda greft ve hasta sağkalımını iyileştirmek, majör rezeksiyonlar sonrası karaciğeri, damar cerrahisi sırasında da barsak ve böbreği korumak, deri ve kas fleplerinde sağkalımı iyileştirmek gibi hedefler önkoşullandırmanın gelecek için umut verdiği alanlardır. İÖK, erken ve geç dönem koruyucu

etkilere sahiptir. İlki kısa iskemi sonrası 2-3 saat kadar devam ederken, ikincisi 12-24 saat sonra baslar ve 3-4 güne kadar devam eder (167).

2.7.1.1. Erken dönem koruma mekanizmaları: Kısa süreli iskemi neticesi dokuda adenzin, nitrik oksit (NO), reaktif oksijen türleri noradrenalin ve bradikinin gibi her biri önkoşullandırmayı tetikleyebilen mediyatörler oluşmaktadır. Bunlar içinde adenzin ve nitrik oksit İÖK'da öne çıkmakta ve parakrin yolla etki göstermektedirler (168).

İskemi ile beraber, ATP tüketimi hızla artar ve saniyeler içinde ekstrasellüler alanda yüksek miktarda adenzin birikir. Artan adenzin hücre membranındaki spesifik reseptörlere (A1, A2a, A2b, A3) bağlanarak bir dizi hücre içi sinyal ileti yolunu hareketlendirir. (168-171).

Adenzin reseptörünün aktivasyonu ile başlayan süreç sonunda, nitrik oksid sentetaz (NOS), protein kinaz C (PKC), adenzin monofosfat ile aktive edilen protein kinaz (AMPK) ve p38 mitojen ile aktive edilen protein kinaz (p38 MAPK) aktif hale geçer. Bu hücre içi sinyal yollarının harekete geçirilmesi yalnızca hücrelerin iskemiye karşı olan toleransını artırmakla kalmaz, rejenerasyonu da başlatır (172).

Organ ve hücre farklılıkları nedeni ile ileti yollarında bazı farklılıklar görölse de genel hatları ile bakıldığında İÖK'nın ilk ortak hedefi adenzin ve nitrik oksidin PKC'yi aktif hale geçirmesidir. Çalışmalardan elde edilen bulgular aktive olan adenzin reseptörlerinin G proteinleri ile birleşmesinin önkoşullandırmayı başlatan yol olduğunu göstermektedir (173).

Aktive olan G proteini, ayrılarak fosfolipaz C'yi (PLC) aktive etmekte ve bu lipaz da, fosfotidilinozitol bifosfatı iki hücre içi iletiyi taşıyan moleküle; inozitol trifosfat ve diacilgliserole (DAG) ayırmaktadır. DAG daha sonra, PKC'yi aktive eder. Aktif hale geçen PKC, mitokondrilerdeki ATP'ye duyarlı potasyum kanallarını (K^+ -ATP) açarak ön koşullandırmanın koruyucu etkilerini başlatır (174).

Adenzin mitokondriyal K^+ -ATP kanallarını aktive ederek içeriye Ca^{++} girişini ve birikimini azaltabilmenin yanı sıra farklı mekanizmalarla da reperfüzyon hasarını sınırlandırabilmektedir. Bunlar arasında, nötrofillerin oksidatif metabolizmasını ve endotel hücrelerine yapışmasını engelleme, membran stabilizasyonunu sağlama ve glukoz transportunu kolaylaştırarak enerji üretimini artırabilme gibi yollar bulunmaktadır (175).

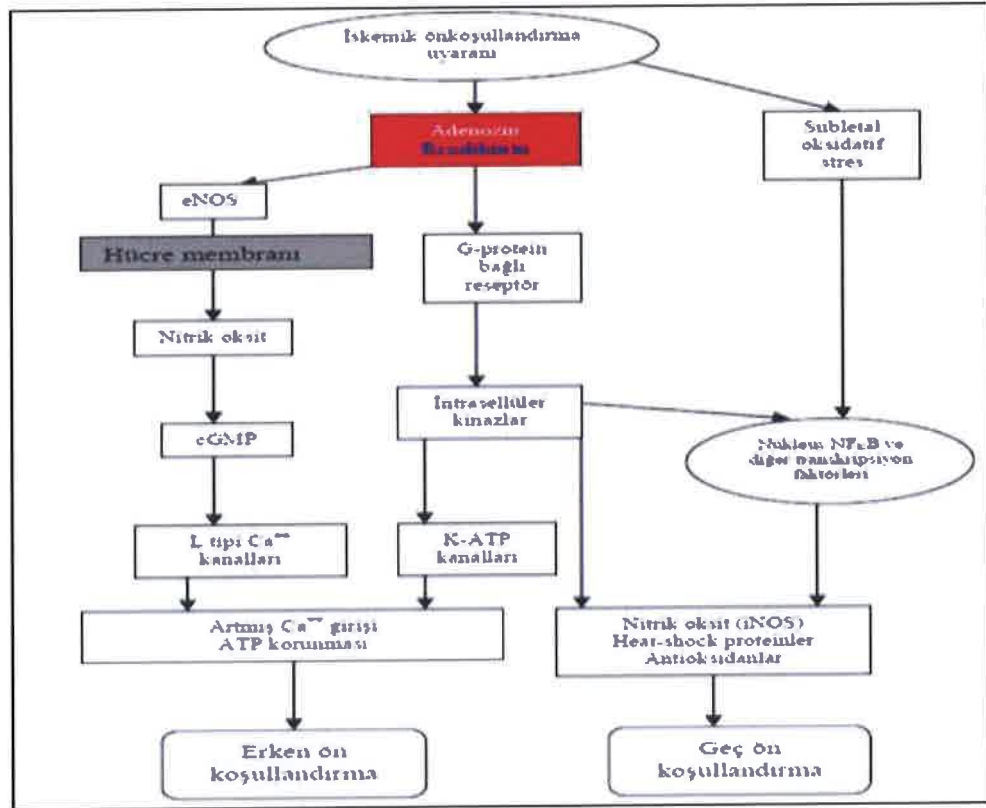
Adenzin, İÖK'nın diğer önemli bir mediyatörü olan NO seviyesini, endotelial nitrik oksid sentetazı aktive ederek artırır. NO, potent bir vazodilatatör olmasının yanında nötrofil ve trombosit agregasyonunu da engelleyerek mikrosirkülasyonu düzenleyebilmektedir (176). Bu bağlamda, nitrik oksid sentetazı kompetatif olarak bloke eden N-nitro-L-arjinin metilester (L-NAME) kullanılarak nitrik oksid sentezinin engellenmesi İÖK'nın koruyuculuk etkisini ortadan kaldırmaktadır. Aksine, nitrik oksid prekürsörü (L-arjinin) uygulandığında İÖK'ya benzer korunma sağladığı gösterilmiştir (177). DAG analogları ile stimüle edilen PKC

hücrelerin hipoksik hasara karşı direncini artırırken, “chelerythrine” ile PKC’ nin bloke edilmesi önkoşullandırma etkisinin ortadan kalkması ile sonuçlanmaktadır (178).

İÖK’nın erken korunma mekanizmalarından bir diğeri de, iskemi ile beraber sitoplazmada gelişen ve hücre içinde Na^+ akümülyasyonu neticesi hacim regülyasyon bozukluğu ve Ca^{++} artışı yaratarak hücre ölümüne neden olan hipoksik asiditenin protein kinaz C ve p38 MAPK tarafından düşürülmesidir (179).

2.7.1.2. Geç dönem korunma mekanizmaları

Geç dönem etkilerin açılma ve kapanma zamanlarına bakıldığında (12–24 saat ve 3–4 gün), bu süreler koruyucu proteinlerin yapım ve yıkım sürelerine de uygun düşmektedir. PKC_E izoenziminin aktive olduğu önkoşullama sonrası nükleusa yönelerek nükleer transkripsiyon faktörlerini indüklediği gösterilmiştir. Ayrıca siklooksijenaz-2, aldolaz redüktaz, antioksidan enzimler (özellikle Mn-süperoksid dismutaz) ve ısı sok proteinleri bu aşamanın olası etkin proteinleri olarak gösterilmiştir (180).

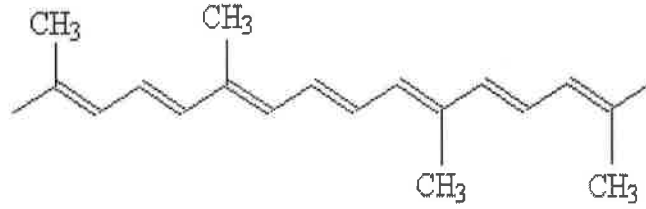


Şekil 12. Erken ve geç önkoşullamada sinyal ve iletim yolları (181).

2.8. Krill Yağı

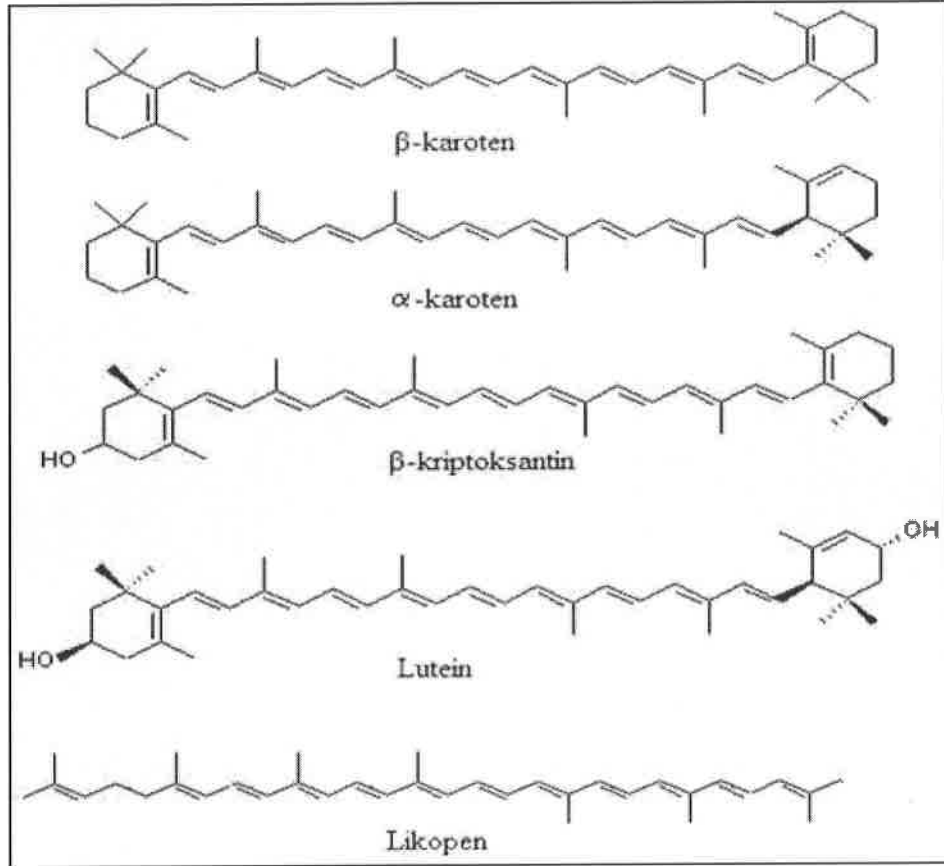
Karotenoidlerin yapısı ve özellikleri: Bitkiler, bazı bakteri, alg ve funguslar tarafından sentezlenen, meyve ve sebzelere sarıdan kırmızıya kadar değişen renkleri veren karotenoidler; geniş dağılımları, yapısal farklılıkları, çok çeşitli etki ve fonksiyonlarıyla doğada bulunan en önemli pigment gruplarından birini oluşturmaktadır (182). Hayvanlar karotenoid sentezleyemedikleri için diyet aracılığıyla aldıkları karotenoidleri modifiye ederek dokularında depolamaktadır (183). Doğal kaynaklardan tanımlanmış olan yaklaşık 600 karotenoid bulunmaktadır (184). Karotenoidler kırmızı, sarı ve turuncu renkli meyve ve sebzelerin yanı sıra tüm yeşil yapraklı sebzelerde de bulunmaktadır. Ancak, yeşil yapraklı sebzelerde bulunan karotenoidlerin rengi klorofil tarafından maskelenmiş durumdadır (185).

Karotenoid pigmentler; metil grupları bağlanmış alifatik bir zincir ve karotenoidlere renklerini veren konjuge çift bağ sisteminden oluşmaktadır. Karotenoidlerde yapı, birbirine kovalent olarak bağlanmış izopren ünitelerinden oluşmaktadır (Şekil13) (186).



Şekil 13. Karotenoidlerin poliizoprenoid yapısı

Karotenoidler kimyasal yapılarına göre oksijenden bağımsız olan “hidrokarbon karotenoidler” ve oksijenle türevlerini içeren “ksantofiller” olmak üzere iki sınıfa ayrılmaktadır. “Karotenler” olarak da adlandırılan apolar özellikteki hidrokarbon karotenoidlerin başlıcaları; α -karoten, β -karoten ve likopendir. Ksantofiller ise, daha polar özellikte olup yapısında metoksi, hidroksi, keto, karboksi ve epoksi formunda oksijen içermektedir. Ksantofillere örnek olarak β -kriptoksantin, zeaksantin, lutein, kantaksantin crocetin ve astaksantin verilebilir. Karotenoidler ayrıca zincir uçlarında halka grubu içerip içermemesine göre de siklik (halkalı) ve asiklik (halkasız) karotenoidler olarak da gruplandırılmaktadır.



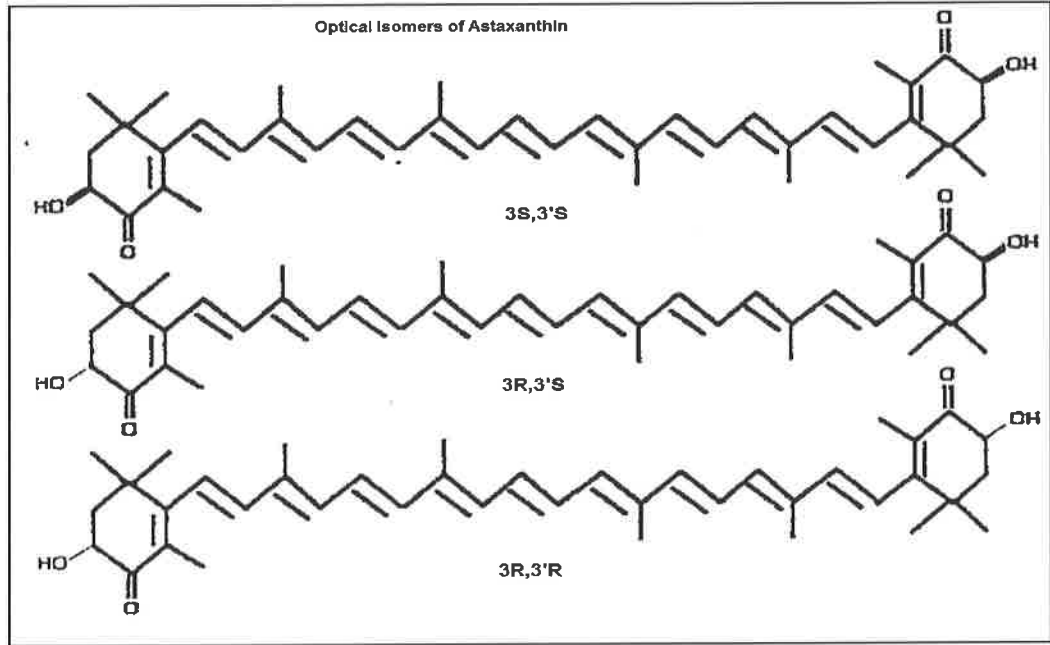
Şekil 14. Gıdalarda bulunan bazı karotenoidler

Karotenoidlerin, peroksil (ROO') radikali ile reaksiyona girerek antioksidan aktivite gösterdikleri bilinmektedir. Bu reaksiyon sonucunda β -karoten radikali (β -karoten $'$) oluşmaktadır. Peroksil radikalleri, β -karotenin konjuge çift bağ sisteminde çiftlenmemiş elektronun bulunduğu C7 pozisyonunda stabil bir radikal oluşturmaktadır. Karotenoid radikalının oksijenle birleşmesi sonucu, karotenoid-peroksil radikali (β -karoten- OO') meydana gelmektedir. Ancak, bu reaksiyonun oluşumu sistemdeki oksijen basıncına bağlıdır. Oksijen basıncının düşük olduğu durumlarda reaksiyonun dengesi peroksil radikallerini azaltma yönünde sola kaymaktadır. Oksijen basıncının yüksek olması durumunda ise β -karoten otooksidasyon nedeniyle prooksidan olarak görev yapabilme özelliğinde olan peroksil radikallerini üretmekte ve reaksiyon sağa kaymaktadır. Buna ilaveten, β -karoten-peroksil kompleksi bir diğer peroksil radikali ile reaksiyona girebilmekte ve bu reaksiyonun sonunda da aktif olmayan ürünler meydana gelmektedir (187).

Karotenoidlerin antioksidan aktivitesi, tekli oksijen yakalama ve peroksil radikallerini tutma özelliklerine dayanmaktadır. Bu aktivite esas olarak, molekülün içerdiği çok sayıdaki konjuge çift bağlar ve bir ölçüde de halkalı uç gruplarla ilişkilidir (188,189). Karotenoidlerdeki çift bağ sayısı arttıkça antioksidan aktivite de artmaktadır. Karotenoidler içerisinde en etkili

antioksidanın likopen olduğu ve bunu sırasıyla β -kriptoksantin ve β -karotenin izlediği, ksantofillerin ise minimum aktiviteye sahip olduğu aktarılmaktadır (190).

Astaksantin: Doğada astaksantinin aynı kimyasal yapıda üç molekülü mevcuttur. Bunlar; 3S,3'S - 3R,3'S - 3R,3'R olarak tanınır. Astaksantinin yapısal formülü şekil 1.1'de verilmektedir.



Şekil 15. Astaksantin yapısal formülü

Astaksantin (3R,3'R dihidroxy- β,β -carotene-4,4'-dione) insanlar tarafından doğal destek gıda olarak ve kanser hastalarında (192), deri hastalıklarında ve kalp rahatsızlığı gibi hastalıklarda kullanılmıştır (193). Astaksantince zengin mikroalgin kullanıldığı farelerle yapılan denemelerde başarılı olunmuş ve insanlardaki *Helicobacter pylori* enfeksiyonunda uygulanmak üzere yeni bir tedavi stratejisi olarak önerilmiştir (194).

Astaksantin pigmentinin kullanım amaçları antioksidan, hormon, bağışıklık sistemini uyarması, provitamin A kaynağı olması, üreme ve büyüme de olumlu etkileri ve zararlı UV ışınlarına karşı koruma etkisi olarak sıralanmaktadır. Yapılan çalışmalarla astaksantin deride DNA zararını ve ayrıca insanlarda güneş yanıklarını zamana bağlı olarak azalttığı saptanmıştır (191).

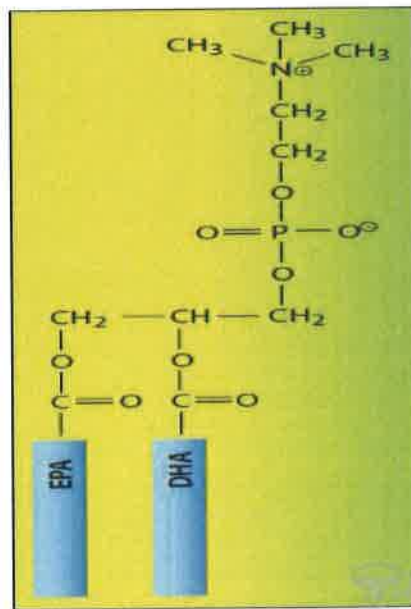
Astaksantin β -karotenden 10 kat daha fazla hüresel antioksidan özelliğinin olduğunu bildirmiştir. Astaksantin antioksidan özelliğinin olduğunu bildirmiştir. Astaksantin antioksidan özelliğinin, balığı fotodinamik zarar ve lipid peroksidasyonuna karşı korumada kullanılması önerilmektedir. Yapılan araştırmalar, salmonid etindeki astaksantin seviyesini, vücut lipidlerinin oksidasyonuna karşı korumada kullanılmasını önermektedir. Aynı zamanda

astaksantin, yumurtlama kalitesinde embriyonun yaşama şansını artırmada ve davranışta da önemli rol oynadığı bildirilmektedir (195).

Astaksantin E vitamininden 200 kere (molar bazında) daha fazla etkili olduğu, gıdalardaki, kozmetik ve eczacılık ürünlerindeki lipidin hidroperoksidasyonunu önlemede etkili olduğu bildirilmiştir (196).

Krill yağı ve etkileri: Krill soğuk denizlerde yaşayan bir deniz canlısıdır. Krill genellikle soğuk okyanus sularında yaşayan kabuklu bir deniz canlısıdır. Denizin 100-200 metre derinliğinde yaşıyor. Önemli bir Omega-3 kaynağıdır. O da tıpkı balıklar gibi denizdeki yosun benzeri maddelerle (planktonlar ve algler) beslenir ve bunlardaki bitkisel kökenli Omega-3 yağ asitlerinden EPA(Eikosapentaenoik asit) ve DHA(Dokosaheksaenoik asit) üretir. Hücre zarının sağlığında önemli bir yağ asidi olan fosfolipidler içerir. Krilde bulunan uzun zincirli yağ asitlerinden Omega 3 yağ asidinin çoğu fosfatidilkolin, fosfatidiletanolamin gibi fosfolipid formda bulunmaktadır (şekil 16). (197-198). Krill canlısından elde edilen krill yağında Omega-3 yağ asitleri fosfolipid formdadır. Bu özelliği nedeniyle suda çözünme özelliğine sahiptir ve balık yağına oranla çok daha fazla miktarlarda kana geçerler (199).

Yani insan hücresindeki yağın formuyla aynı formdadır. Bu da Omega-3'ün herhangi bir dönüşüme gereksinim duymadığı anlamına gelmektedir. Balık yağında ise trigliserid formundadır. Kril yağında bulunan DHA ve EPA'dan yararlanma oranı %98'dir. Balık yağında ise bu oran %61- 64 düzeyindedir.(197-198). Krill yağı balık yapının aksine güçlü bir antioksidan olan 'Astaksantin' içerir ve uzun zincirli çoklu doymamış yağ asidi (LCPUFA) oksidasyonunu önlemeye yardımcı olur (200). Astaksantin mükemmel bir antioksidandır, çünkü çok yüksek bir ORAC (Oxygen Radical Absorbance Capacity: Oksijen Radikali Emme Kapasitesi) kapasitesine sahiptir. Bu sayede etkin bir antioksidan koruma sağlar (191).



Şekil 16. EPA ve DHA içeren fosfatidilkolinin yapısı (lesitin) (201)

Krill yağı biyoyararlanım çalışmalarının yeniden incelendiği bir makalede, krill yağının çeşitli özellikleri nedeniyle krill yağı ile genel balık yağının biyoyararlanımını karşılaştırmanın zor olduğu kanıtlanmıştır. Bunlar daha düşük konsantrasyonlarda aktif madde içerir (202). Krill yağı %30 EPA ve DHA, % 40 fosfolipid (öncelikle fosfotidilkolin) ve astaksantin, vitamin A, vitamin E gibi antioksidanlar ve diğer yağ asitlerini içerir (200,203). Baska bir çalışmada da; Ulven ve ark.(204), krill yağı ve diğer balık yağı takviyelerinin biyoyararlanımları üzerinde çalışmışlardır. Krill yağındaki omega-3'lerin diğerlerinden daha iyi absorbe edildiğini bulmuşlardır. Krill yağının serbest formunda, diğerlerinde olmayan EPA ve DHA yüzdeleri bulunduğunu göstermişlerdir. Soğuk Antartika denizlerinden çıkarılmış yüksek kalite krill yağı, saflık açısından, diğer kirliliğe maruz kalmış denizlerden çıkarılmış balıkların yağlarından çok daha saf olduğunu ve kirli sulardan yakalanmış krill'in, Antartika'nın doğal ortamı ile karşılaştırıldığında ağır metal taşıma riski oldukça fazla olduğunu bildirmişlerdir.

Krill yağının kronik inflamasyon ve artrit semptomları üzerine olumlu etkileri vardır. 300 mg/gün krill yağı tüketen ve tüketmeyen iki grubu kapsayan kireçlenme ve inflamasyon etkilerindeki değişiklikleri ölçmek için yapılan klinik çalışmaya kardiyovasküler hastalıklar, romatoid artrit/ osteoartrit gibi enflamatuar hastalıklar teşhisi taşıyan 90 kişi katılmıştır. Bulgular, krill yağının ağrıyı % 28.9, sertliği 20.3 ve fonksiyon bozukluğunu % 22.8 oranında azalttığı yönündeydi. CRP (C-reaktif protein) düzeylerini düşürerek anti-inflamatuar etkiler göstermiştir. Dahası krill yağı inflamasyonu ve artrit semptomlarını büyük ölçüde azaltmayı 7-14 gün gibi kısa bir sürede gerçekleştirmiştir. (205)

Bunea ve arkadaşları tarafından krill yağının balık yağına göre aterojenik etkisinin farkları da ortaya konulmuştur. Trigliserit, HDL ve LDL kolesterol değerlerindeki değişimleri incelemek için çok sayıda hasta üzerinde çalışılmıştır. Kontrol grubu (plasebo), balık yağı tüketen ve çeşitli dozlarda krill yağı tüketen 4 grup üzerinde yapılan bu çalışmada LDL ve trigliserit düzeylerini düşürdüğü, HDL düzeylerini ise yükselttiği bulgularına ulaşılmıştır (200).

3. GEREÇ VE YÖNTEMLER

Bu çalışma Gaziosmanpaşa Üniversitesi (GOPÜ) Tıp Fakültesi Tıbbi Biyokimya Anabilim Dalı, GOPÜ Tıp Fakültesi Biyokimya Araştırma Laboratuvarında yapılmıştır.

3.1. Gereçler

3.1.1. Deney hayvanlar

Tüm işlemler, 1986 Uluslararası Strazburg Hayvan Hakları Evrensel Beyannamesi şartlarına uygun olarak, Gaziosmanpaşa Üniversitesi Deneysel Tıp Araştırma Birimi, Uygulama Merkezi'nde, Etik Kurulu ve Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi onayı ve proje desteği (2014 HADYEK, BAP proje no: 2014-96) alınarak gerçekleştirildi.

Çalışmamızda ağırlıkları 200 gr ile 250 gr arasında değişen (ortalama 220 gr) toplam 50 adet, erkek Wistar Albino türü sıçan kullanıldı. Gruplara ayrılan sıçanlar yeni ortamlarına uyum sağlamaları açısından 1 hafta deney öncesi bekletildi. Deneklere özel kafeslerde, havalandırması olan, mevsimsel gün ışığı ritminde, standart sıçan pellet yem ve çeşme suyu verildi. Gün aşırı suları değiştirildi ve kafes temizliği yapıldı.

3.1.2. Deneylerde kullanılan sarf malzemeler

Kloroform, etil alkol, EDTA (Na tuzu), Na_2CO_3 , $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, NaH_2PO_4 , % 30 H_2O_2 , NaN_3 , KH_2PO_4 , HCl, n-butanol, kadmiyum granülleri, NaOH, CuSO_4 , H_2SO_4 , NaNO_2 , $\text{Na}_2\text{B}_4\text{O}_7$, ZnSO_4 , Na_3Sitr at, trikloroasetikasit (TCA), Nitro-blue tetrazolium (NBT), bovine serum albumin (BSA), ksantin oksidaz (XO), glutatyon-redükte formu (GSH), NADPH-redükte formu, tiyobarbitürik asit (TBA), N-1-naftiletilediamin dihidroklorür, glisin, sülfonil amid, sodyum sitrat, 2,4-dinitrofenilhidrazin, etil asetat, folin-ciocalteu, 10 – 1000 μL hacim aralıklı pipet uçları, 2,5 – 50 mL hacim aralıklı pipetör uçları, cam kalemi, 1 ml, 10 ml steril enjektör, dimetilsülfoksit (DMSO), eppendorf tüp (1.5 ml), kurutma kağıdı (40x40 cm), serum fizyolojik, krill oil, TNF- α Elisa Kit, IL-6 Elisa Kit, anti-beta aktin antikor, hematoksilen, eozin, ksilen, polilizin lam, rodajlı lam, lamel (24-60), eldiven (Non-steril ameliyat eldiveni).

Kimyasal malzemeler MERCK veya SIGMA firmalarının üretimleri olup Biyokimya Anabilim Dalı laboratuvarlarından ve araştırma 'Bilimsel Araştırma Projelerini (BAP) Destekleme Fonu' katkılarıyla temin edilmiştir.

3.1.3. Deneylerde kullanılan alet ve cihazlar

Spektrofotometre, homojenizatör, hassas terazi (Sartorius), buzdolabı, distile su cihazı, etüv, santrifüj, soğutmalı santrifüj (Jouan MR22), shaker (WiseMax), su banyosu, derin dondurucu, -80°C (Thermo, ULT 1386-5-V40), etüv, pH metre, mikroyapı okuyucu.

3.2. Yöntemler

3.2.1. Deney gruplarının oluşturulması

Tablo 2. Deney gruplarının dağılımı

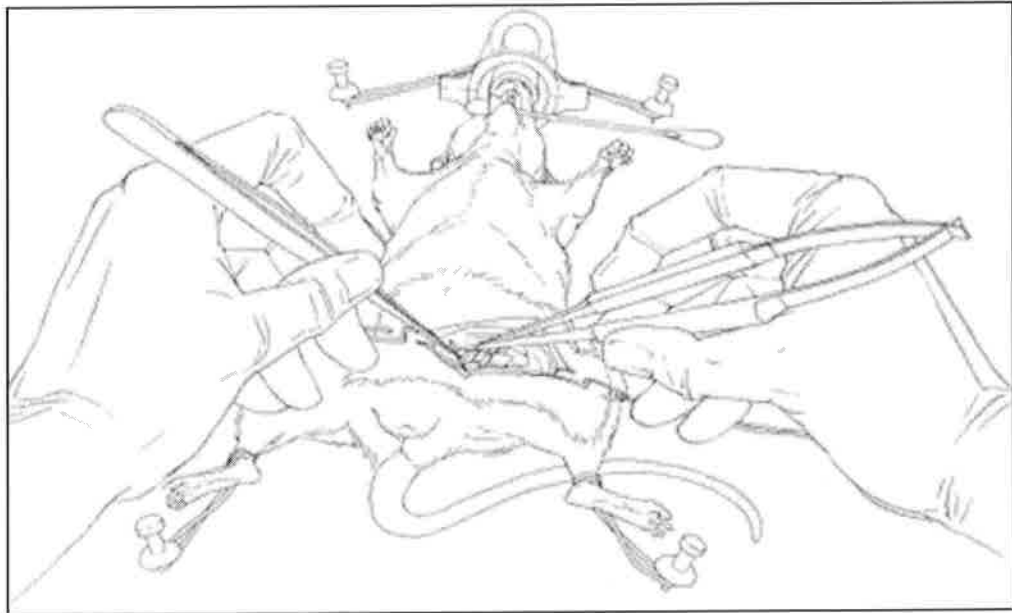
Deney ve kontrol grupları	Grup başına hayvan adedi	Tekrar sayısı
GRUP 1. Sham-operated kontrol grubu (SHAM)	10	1
GRUP 2. İskemi-Reperfüzyon grubu (İ/R)	10	1
GRUP 3. İskemik önkoşullama grubu (İÖK)	10	1
GRUP 4. İ/R uygulama + Krill yağı (İ/R + KO)	10	1
GRUP 5. İÖK uygulama + Krill yağı (İÖK + KO)	10	1

Sıçanlar basit randomizasyon ile 10'arlı 5 gruba ayrıldı. Sıçanlar ketamin (60 mg/kg) ve ksilazin (10 mg/kg) ile uyutulduktan sonra grup 1 kontrol grubu olarak değerlendirildi. Sham-operated kontrol grubu denilen grup 1'e sıçanların çalışılacak bölgesi insizyonla açılıp oklüzyon uygulanmaksızın sham operasyonu yapıldı. Grup 2'ye ilaç verilmeksizin sadece iskemi ve reperfüzyon oluşturuldu. Ekstremitte iskemisi femoral artere klemp konarak sağlandı ve 2 saatlik iskemiye 1 saat reperfüzyon izledi. İskemi-reperfüzyon hasarı oluşturuldu. İskemik ön koşullama grubu olan grup 3'e ise uzun süreli iskemiden önce bir kez olacak şekilde 10 dk'lık iskemiye takip eden 10 dk süreli reperfüzyon oluşturulduktan sonra 120 dk iskemi / 60 dk reperfüzyon meydana getirildi. Grup 4, iskemi-reperfüzyonla birlikte koruyucu etkisinin araştırıldığı maddemiz olan krill yağının verilmesini içermektedir. Yine 2 saat iskemi oluşturuldu, klemp kaldırılmadan 1 saat önce krill yağı intraperitoneal olarak verildi. Bu 1 saat'lik zaman geçtikten sonra ise klemp

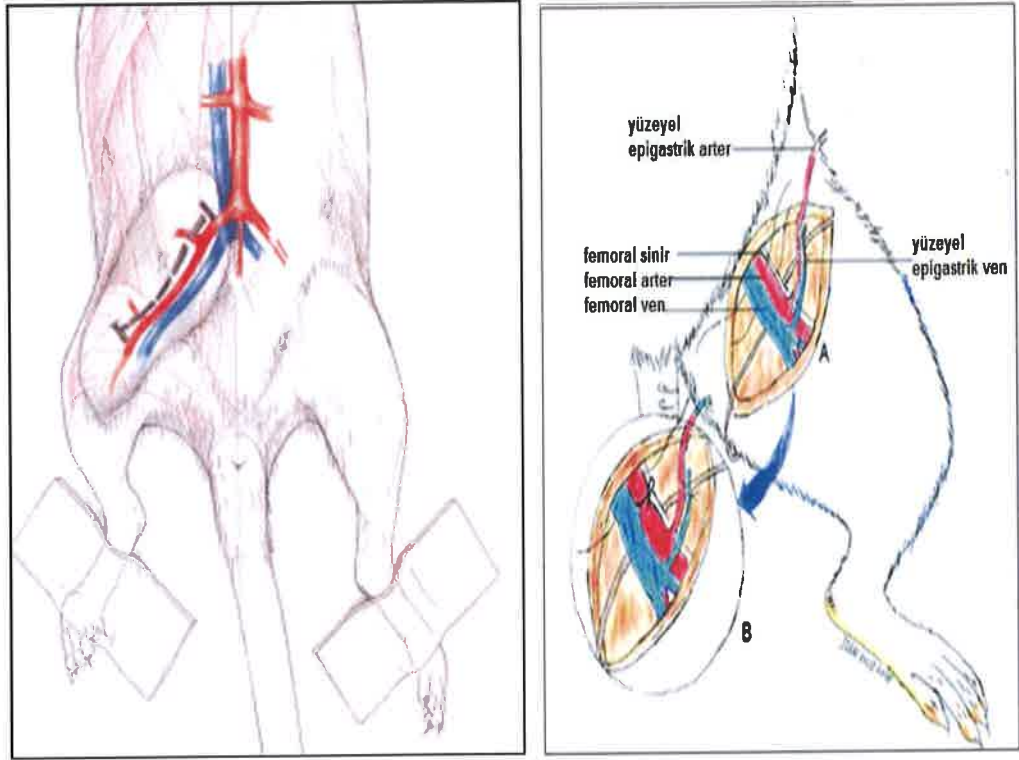
kaldırıldı, 1 saat reperfüzyonda beklendi. Grup 5, preconditioning İ/R uygulaması ile birlikte krill yağının verilmesini içermektedir. Yine bu grupta da iskemi ve reperfüzyon öncesinde 10'ar dakikalık 1 defa kısa iskemi ve reperfüzyon periyodu ile preconditioning (ön koşullama) sağlandı. Sonrasında uzun süreli iskemi olan 120 dk iskemi / 60 dk reperfüzyon meydana getirildi. Krill yağı reperfüzyondan 1 saat önce intraperitoneal olarak verildi. Tedavi grubundaki sıçanlara krill yağı operasyonu takiben yedi gün süreyle günlük 200 mg/kg, tek doz halinde intraperitoneal olarak verildi. Krill yağı dozu önceki çalışmalar göz önüne alınarak karar verilmiştir.

3.2.2. İskemi-reperfüzyonun oluşturulması, kan ve dokuların alınması

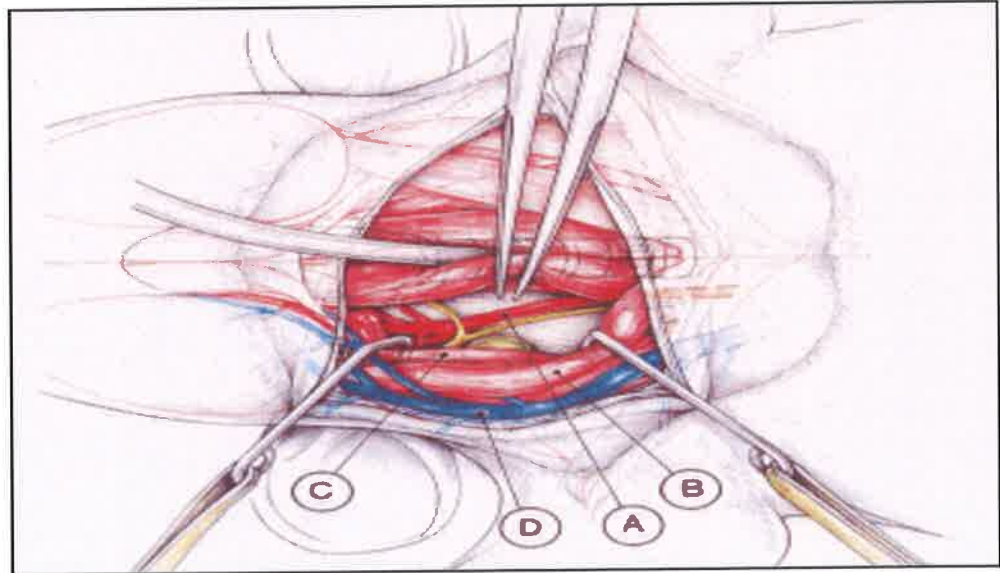
Wistar-Albino türü erkek sıçanların bir gün önceden standart yemleri kesildi. Sıçanlara 60 mg/kg dozunda ketamin ile 10 mg/kg ksilazinin intraperitoneal (periton içi) olarak verilmesiyle genel anestezi yapıldı. İnguinal bölge cildinin tüyleri traşlanmış ve % 10'luk povidon iyod çözeltisi ile cilt temizliği uygulanmıştır. İnguinal bölgeden yapılan kesiyle (şekil 17) femoral arter ve ven ortaya konmuştur (şekil 18). Femoral arter, femoral ven ve femoral sinir askıya alındıktan sonra alt ekstremitede olası kollateral akımı önlemek amacıyla femoral arter, femoral ven ve femoral sinir dışındaki tüm dokular disseke edilmiştir (şekil 19). Femoral arter kan akımı klemp ile engellenmiştir. Yaklaşık 1-2 dakika sonra distaldeki nabzın kaybolması ve oluşan solukluk izlendikten sonra iskemik olduğuna karar verildi. 2 saatlik iskemi süresi sonunda klemp kaldırıldı ve reperfüzyonun gerçekleştiği dokunun pembeleşmesiyle anlaşıldı.



Şekil 17. Supin pozisyonda yapılan inguinal insizyon

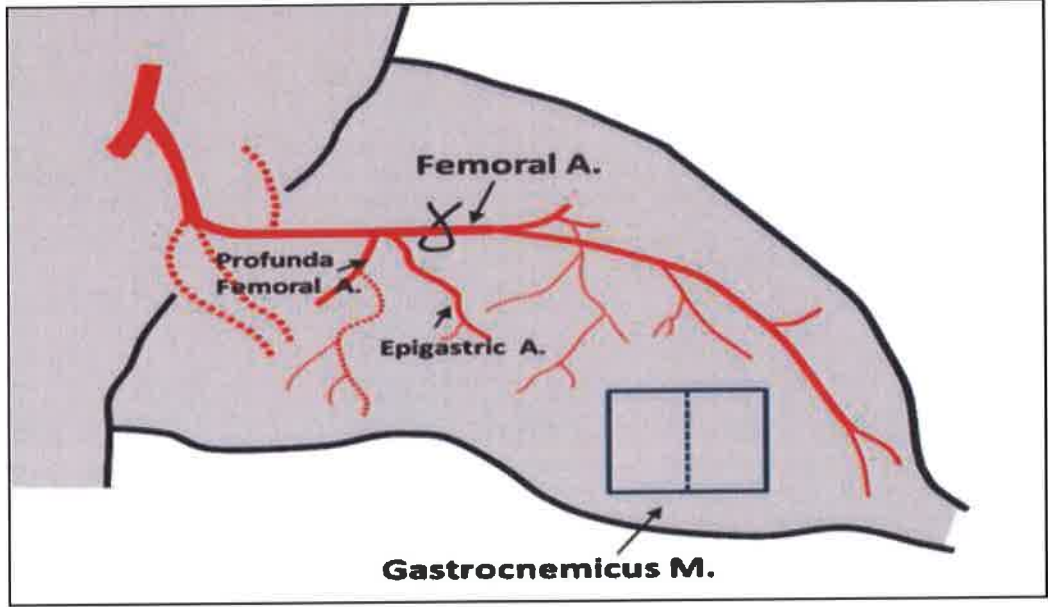


Şekil 18. Femoral arter, femoral ven ve femoral sinirin ortaya konması



Şekil 19. Femoral arter, femoral ven ve femoral sinir askıya alındıktan sonra tüm dokuların disseke edilmesi (A: Arter, B: Komşu sinir, C: Kas, D: Ven)

Sıçanlar anestezi altında sakrifiye edilerek sağ gastroknemius kas doku örnekleri alındı (şekil 20). Histopatolojik inceleme için alınan kas örnekleri % 10'luk formaldehit çözeltisine konularak histoloji bölümünde sıradaki işlemlere geçildi. Biyokimyasal analizler için alınan kas dokuları soğuk izotonik su ile yıkandı. Alüminyum folyo içine sarılarak numaralandırıldı. -80°C derin dondurucuda testlerin yapılacağı zamana kadar saklandı.



Şekil 20. Sağ gastroknemius kasının alınması

Anestezi altında tüm deneklerden uygun separatör jelli tüplere, intrakardiyak kan alımı gerçekleştirildi. Alınan kanlar 1500xg'de 15 dakika santrifüj edilerek serumları ayrıldı ve ependorf tüplerine aktarıldı. Parametrelerin analizi yapılamayana kadar derin dondurucuda (-80°C) muhafaza edildi.

3.2.3. Biyokimyasal İnceleme

3.2.3.1. Kas doku örneklerinin homojenize edilmesi

Derin dondurucudan çıkarılan dokuların buzla çözüldükten sonra buzla soğutulmuş distile su ile yıkandı. Bu işlem 3 defa tekrarlandı. Sonrasında soğukluğu muhafaza edilerek temiz cerrahi makasla küçük parçalara ayrıldı. Erlene aktarılan doku üzerine Tris-HCl tamponu eklendi. Son hacim doku ağırlığının 10 katı olacak şekilde tampon ilave edildi. Buz doldurulmuş plastik kap içerisine yerleştirilen erlendeki doku 16000 devir/dakika hızda homojenize edildi.

Kas doku örnekleri 1/10 oranında 50 mM Tris-HCl (pH=7.4) tamponunda, buz içinde, soğukta homojenize edilmiş oldu (60). 50 mM olarak hazırlanan Tris solüsyonu ve HCl solüsyonu 50/39.9 (v/v) oranında karıştırılarak hazırlandı (238). Tüm çalışmalarda bu tampon kullanıldı.

Hazırlanan homojenatların bir kısmından malondialdehit (MDA) ve nitrik oksit (NO) düzeyleri tayin edilmiştir. Homojenatların geri kalan kısmı, soğutmalı santrifüjde +4°C'de 3.500 rpm'de 30 dakika santrifüj edilerek süpernatantlar elde edildi. Ayrılan süpernatantlardan katalaz (CAT), glutatyon peroksidaz (GSH-PX) ve doku protein düzeyi tayini yapılmıştır.

Süperoksit dismutaz (SOD) aktivitesini tayin etmek için kalan süpernatant, kloroform/etanol karışımı ile 1/1 (v/v) oranında muamele edilip, 3500 rpm'de +4°C'de 40 dakika santrifüj edilmiştir. Üstte oluşan etanol fazından alınarak protein ve SOD enzim aktivite tayini yapıldı (239)

3.2.3.2. SOD enziminin (total SOD) aktivite tayini

Süperoksit dismutaz (SOD) aktivitesi Sun ve arkadaşlarının metoduna (239) ve Durak ve arkadaşlarının tariflediği modifikasyona (240) göre tayin edildi. Bu metoda SOD aktivitesi, ksantin / ksantin oksidaz sistemi ile üretilen süperoksitin nitroblue tetrazoliumu (NBT) indirgemesi esasına dayanır. Oluşan süperoksit radikalleri NBT'yi indirgeyerek renkli formazon oluşturur. Bu kompleks 560 nm'de maksimum absorpsiyon verir. Enzimin olmadığı ortamda bu indirgeme meydana gelip mavi-mor renk oluşmaktadır. Ortamda SOD olduğunda ise NBT indirgenmesi olmayıp mavi-mor renk meydana gelmemekte ve enzim miktar ve aktivitesine bağlı olarak açık renk oluşmaktadır.

$$\text{Enzimin \% inhibisyonu} = (\text{Abs}_{\text{kor}} - \text{Abs}_{\text{num}}) / \text{Abs}_{\text{kor}} \times 100$$

Bir SOD ünitesi; NBT redüksiyonunu % 50 oranında inhibe eden enzim aktivitesidir. Sonuçlar U/mg protein olarak ifade edildi.

Kullanılan reaktifler

SOD reaktifi [0.3 mmol/L ksantin, 0.6 mmol/L EDTA (2 Na tuzu), 150 µmol/L NBT, 400 mmol/L Na₂CO₃, 1 g/L bovine serum albumin (BSA)], 167 Ü/L ksantin oksidaz (XO), 0.8 mmol/L CuCl₂

Deneyin yapılışı

	Kör (mL)	Numune (mL)
SOD Reaktifi	2.85	2.85
Ekstrakt	-	0.10
Bidistile su	0.10	-
XO	0.05	0.05

25 °C'de 20 dakika inkübasyon

CuCl ₂	1	1
-------------------	---	---

Distile suya karşı kördan başlanarak numuneler 560 nm'de okunur.

Süperoksit dismutaz aktivitesinin hesaplanması

$$\% \text{ İnhibisyon} = ([\text{Absorbans kör (K)} - \text{Absorbans numune (N)}]) / K \times 10$$

% 50'lik inhibisyona 1 Ü denildiği için

$$\text{Aktivite (Ü/ml)} = [(\% \text{ inhibisyon}/50) \times (1/0.1)] \text{ ml}$$

$$\text{Ü/ml} = [(K-N) / K] \times 20 \times 5 \text{ (sulandırma faktörü)}$$

$$\text{Spesifik aktivite (U/mg protein)} = [U/\text{ml}/\text{mg/ml protein}]$$

3.2.3.3. CAT enziminin aktivite tayini

Metodun prensibi: Katalaz (CAT) aktivitesi Aebi'nin metoduna göre çalışıldı (Efkan-37). Hidrojen peroksit (H₂O₂) 240 nm'de maksimum absorbandans verir. Deney ortamına ilave edilen H₂O₂ katalaz tarafından su ve oksijene parçalanmakta, bu ise kendini ultraviyole spektrumda absorbandans azalması şeklinde göstermektedir. Absorbandandaki bu azalma CAT enziminin aktivitesi ile doğru orantılıdır. Reaksiyon şu şekildedir:

**Kullanılan Reaktifler**

Fosfat tamponu (pH 7,50 mM), absorbandansı 0.500 nm'ye tampon ile ayarlanmış olan H₂O₂'li fosfat tamponu (H₂O₂ çözeltisi)

Deneyin Yapılışı

Fosfat tamponuna göre 240 nm dalga boyunda sıfırlanan köre karşı H₂O₂ çözeltisinin absorbandansı 0.500'e ayarlandı.

	Kör (mL)	Numune (mL)
Fosfat tamponu	2.99	-
H ₂ O ₂ çözeltisi	0.01	2.99
Süpernatan	-	0.01

Numune ilavesi ile absorbans azalması her 15 sn'de bir defa olmak üzere 5 dakika süre ile kaydedildi. Hesaplama 1 dakikalık lineer absorbans azalmasının değerleri esas alındı.

Hesaplama

$$k = \{[2.3 \times \log (OD1/OD2)] / \Delta t (sn)\}$$

$$k/mg \text{ protein} = k / [(mg/ml \text{ protein}) \times 1000]$$

3.2.3.4. GSH-Px enziminin aktivite tayini

Prensip: GSH-Px aktivitesi Paglia ve arkadaşlarının metoduna göre çalışıldı (162). GSH-Px hidrojen peroksit varlığında redükte glutatyonun (GSH) okside glutatyon (GSSG)'a yükseltgenmesini katalizler. Hidrojen peroksidin bulunduğu ortamda GSH-Px'in oluşturduğu GSSG, glutatyon redüktaz ve NADPH yardımı ile GSH'a indirgenir. GSH-Px aktivitesi NADPH'ın NADP⁺'ya yükseltgenmesi sırasındaki absorbans azalmasının 340 nm'de okunmasıyla hesaplanır.

Reaktifler

150 Mm redükte GSH, 8 Mm NADPH, 1 M NaN₃, enzim [1.5 ml, 3.2 M (NH₄)₂SO₄ + 50 µL GSH redüktaz], 2 mM H₂O₂, fosfat tamponu (pH= 7.50).

Deneyin yapılışı

Fosfat tamponu 5 Mm EDTA'lı	2.65 mL
Redükte GSH	0.10 mL
NADPH	0.10 mL
Enzim	0.01 mL
NaN ₃	0.01 mL
Numune	0.02 mL

30 dakika oda ısısında inkübasyon

H ₂ O ₂	2.65 mL
-------------------------------	---------

Dalga boyu 340 nm'ye ayarlanmış spektrofotometrede numunelerin absorbans değerleri 5 dakika boyunca kaydedildi. Lineer aktivite azalışının olduğu absorbans aralığının 1 dakikalık süresi esas alınarak hesap yapıldı.

Enzim Ünitesi: Birim zamanda okside olan NADPH'ın mikromol miktarıdır.

GSH-Px aktivitesinin hesaplanması

$$\text{Hesap : IU/L} = [(\Delta A/t) / 6.22 \times 10^{-6}] \times (1 / 0.02)$$

$$\text{Spesifik aktivite IU/mg protein} = (\text{IU/L}) / (1000 \times W)$$

3.2.3.5. MDA miktarının tayini

Deneyin prensibi: Wasowicz ve arkadaşlarının (241) metodu ile çalışıldı. Bu metoda, asidik ortamdaki tiyobarbitürik asit ile 95°C'de reaksiyona giren malondialdehid (MDA), pembe renkli bir kromojen oluşturur. Bu kromojenin n-butanol ekstraktı floresans spektrofotometrede ekstinksiyon 525 nm, emisyon 547 nm dalga boylarında ölçülür. Hazırlanan MDA standart grafiği eğimi kullanılarak numune MDA miktarları tayin edilir. Bu rengin şiddeti ortamdaki MDA ile orantılıdır.

Kullanılan reaktifler

29 mmol/L tiyobarbitürik asit (TBA) çözeltisi (pH' sı 2.8), 6 M HCl ve n-Butanol kullanıldı.

Deneyin yapılışı

	Numune	Numune Körü	Standart	Standart Körü
Deiyonize su	1 mL	1 mL	1 mL	1 mL
Homojenat	50 µL	50 µL	-	-
Standart	-	-	50 µL	50 µL
TBA çözeltisi	1 mL	1 mL	1 mL	1 mL
1 saat inkübasyon	96 °C	25 °C	96 °C	25 °C
HCl	25 µL	25 µL	25 µL	25 µL

Vortekslenip 1500 x g'de 10 dakika santrifüj yapıldı. Üstteki bütanol fazı alınarak spektrofotometrede okundu.

3.2.3.6. NO miktarının tayini

Vücutta endojen olarak üretilen nitrik oksitin doku ve vücut sıvılarındaki konsantrasyonu, pek çok çalışmada nitrit ve nitrat olarak ifade edilmiştir (242). Çünkü nitrik oksit, üretildiği bölgede saniyeler içinde okside olarak önce nitrite (NO₂⁻) daha sonra da nitrata (NO₃⁻) dönüşür. Bununla beraber proteinden zengin homojenat, serum ve plazma gibi solüsyonlarda spesifik olmayan reaksiyonlar meydana gelebileceğinden, Griess reaksiyonu ile ölçümlerde belli bazı sıkıntılar yaşanmaktadır. Bu açıdan biz nonspesifik reaksiyonların önüne geçebilmek için homojenatları önce deproteinize edip daha sonra nitrit ve nitrat konsantrasyonlarını ölçtük. Zor olmakla birlikte in vivo olarak direkt NO ölçümü de mümkündür. Bu amaçla NO propları geliştirilmiştir ama bunların in vitro/ex vivo şartlarda çalışılması mümkün değildir (243).

Dokuda nitrit ve nitrat miktarı deproteinizasyondan sonra Griess reaksiyonu ile belirlendi (244). Total nitrit (nitrit + nitrat) konsantrasyonu modifiye kadmiyum redüksiyon metodu ile değerlendirildi. PH 9.7 glisin tamponunda bakır (Cu) kaplı kadmiyum granülleri deproteinize numune süpernatantı ile 90 dakikalık inkübasyon sonunda nitrat redüksiyonu sağlandı. Üretilen nitrit; sülfanilamid ve buna bağlı N-naftiletillen diamin (NNDA) diazotizasyonu ile reaksiyon sonu oluşan pembe rengin 545 nm dalga boyunda spektrofotometrede okunması ile belirlendi. Sonuçta elde edilen nitrit konsantrasyonu ilk konsantrasyondan çıkarılarak nitrat miktarı belirlendi.

Kullanılan reaktifler

Kadmiyum granülleri (Cd), pH 9.7 glisin-NaOH tamponu, sülfanilamid, N-naftiletillen diamin (NNDA), 5 mmol/L CuSO₄, 0.1 mol/L H₂SO₄, 75 mmol/L ZnSO₄, 55 mmol/L NaOH.

Kadmiyumların aktifleştirilmesi

Kadmiyumlar 2.5-3 gr olarak 20 cc kapaklı plastik tüplere dağıtılır. Granüller deiyonize su ile yıkanır. 1-2 dakika CuSO₄ solüsyonu içinde bekletilir ve solüsyon dökülür. Granüller glisin tamponu ile yıkanarak deneyde kullanılır.

Deneyin Yapılışı

Deproteinizasyon işlemi: 500 µL numune + 2 mL ZnSO₄ vortekslenir. 1.250 mL NaOH ilave edilip tekrar tekrar vortekslenir ve 3500xg'de 10 dakika santrifüj edilir. Süpernatan numune olarak kullanılır.

En son glisin tamponu ile yıkanmış aktif kadmiyum granüllü tüplerinin üzerine 1 Ml glisin tamponu ilave edilir. 1 mL deproteinize numune konur. Üzerine 2 mL deiyonize su ilave edilir. 90 dakika oda ısında inkübe edilir. İnkübasyon sonunda 2 mL alınıp üzerine 2.5 mL deiyonize su, 1 mL NNDA ilave edilip 1 saat inkübe edilir. 545 nm'de köre karşı okunur.

3.2.3.7. Lowry metodu ile protein tayini

Deneyin prensibi: (245) Alkali çözeltide bakır-protein kompleksi oluşarak fosfomolibdat-fosfotungstat reaktifini (Folin-Ciocalteu-Phenol reaktifi) redükler ve koyu mavi bir renk oluşur. Burada rengin koyuluğu ortamdaki protein konsantrasyonu ile doğru orantılıdır. Folin reaktifinin ilavesinde şunlara dikkat edilmesi gerekmektedir. Bu reaktif sadece asit ortamda dayanıklıdır. Fakat ifade edilen bu redükleme ise pH 10'da oluşmaktadır. Bu yüzden folin reaktifi süratle alkali bakır-protein çözeltisine ilave edilmeli

ve vortekslenmelidir. Bu uygulama ile fosfomolibdat-fosfotungstat (folin) reaktifi parçalanmadan önce redüklenme olayı gerçekleşir.

Kullanılan reaktifler

CuSO₄, Na₃Sitrat, Na₂CO₃, NaOH, Folin-Ciocalteu reaktifi

Deneyin yapılışı

A reaktifi: 0.50 gr CuSO₄.5H₂O, 1 gr sodyum sitrat (Na₃Sitrat susuz) 100 ml distile suda çözülür.

B reaktifi: 20 gr Na₂CO₃ ve 4 gr NaOH, 1 L distile suda çözülür.

C reaktifi: 50,0 mL B çözeltisine 1,0 mL A çözeltisi eklenir.

D reaktifi: 10,0 mL Folin-Ciocalteu reaktifine 10,0 mL distile su ilave edilir.

	Kör	Numune
Numune (µL)	-	10
Distile su (µL)	500	490
C Reaktifi (mL)	2,5	2,5

Karıştır, 5-10 dk bekle

D Reaktifi (mL)	0,25	0,25
-----------------	------	------

Ağız kapalı olarak karıştır, 20-30 dk bekle (25 °C) ve köre karşı 700 nm'de numuneler okunur.

3.2.3.8. Tümör Nekroz faktörü – α (TNF- α) Düzeylerinin Ölçümü

Serum TNF-α düzeyleri Invitrogen Rat TNF-α (BMS622; Bender MedSystems, Vienna, Austria) kantitatif ELISA test kiti kullanılarak ölçüldü. Kitin ölçüm içi kesinlik değeri (intra-assay % CV) < 5% ve ölçümler arası kesinlik değeri (inter-assay % CV) < 10 % 'dur.

TNF - α Düzeyleri Ölçüm Metodu Prensibi

Invitrogen TNF-α kiti solid faz sandviç Enzim Bağlı İmmün Ölçüm (ELISA) prensibine dayanır. Rat TNF-α molekülüne spesifik poliklonal antikorlar strip halindeki 8'li kuyucuklara kaplanmıştır.

Bilinen konsantrasyondaki TNF-α standartları ve bilinmeyen örnekler kuyucuklara pipetlenir. Biotin ile konjuge edilmiş ikincil antikorlar eklenir. İnkübasyondan sonra

streptavidin ile konjuge peroksidaz enzimi eklenir. İkinci inkübasyondan sonra bağlanmayan enzimler yıkama işlemiyle ekarte edilir. Substrat solüsyonu ilave edilerek bağlı enzimlerin reaksiyonuyla renk değişimi gözlenir. Renk şiddeti TNF- α konsantrasyonuyla orantılı olarak değişim gösterir.

TNF - α Düzeyleri Ölçüm Materyalleri

1. Rat TNF- α Standartları

- ❖ Kit içeriğinde 2 adet liyofilize şişe halinde bulunmaktadır.

2. Konsantre Deney Tamponu

- ❖ 5 ml'lik 1 adet şişe içerisinde kit içeriğinde mevcuttur.

3. Rat TNF- α Biotin Konjugatı

- ❖ 100 μ l'lik 1 adet şişede kit içeriğinde mevcuttur.

4. Streptavidin – HRP

- ❖ 150 μ l'lik 1 adet şişede kit içeriğinde mevcuttur.

5. Örnek Dilüenti

- ❖ 12 ml'lik 1 adet şişede kit içeriğinde mevcuttur

6. Konsantre Deney Tamponu (20X)

- ❖ 5 ml'lik 1 adet şişe içerisinde kit içeriğinde mevcuttur.

7. Konsantre Yıkama Tamponu (20X)

- ❖ 50 ml'lik 1 adet şişede kit içeriğinde mevcuttur.

8. Substrat Solüsyonu (Tetrametil benzidin)

- ❖ 15 ml'lik 1 adet şişede kit içeriğinde mevcuttur.

9. Stop Solüsyonu

- ❖ 15 ml'lik 1 adet şişede kit içeriğinde mevcuttur.

10. Mavi, kırmızı ve yeşil boya

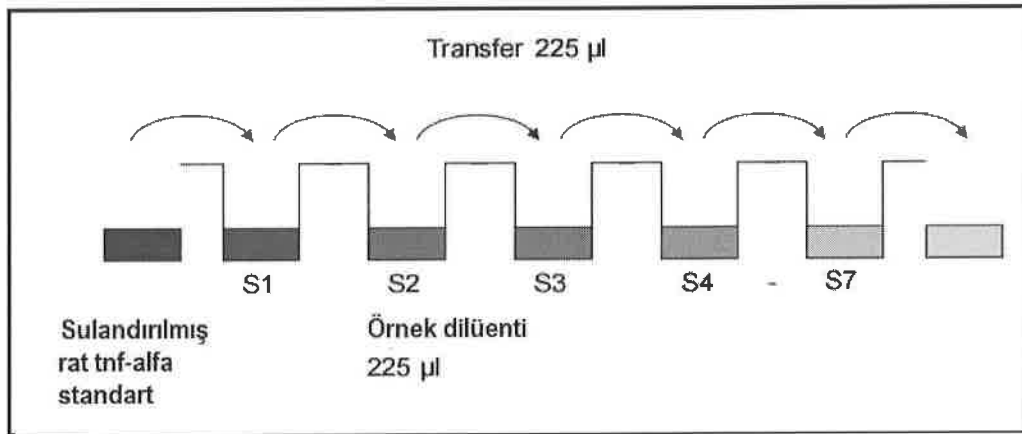
- ❖ 0.4 ml'lik 3 adet liyofilize şişe halinde bulunmaktadır.

TNF - α Düzeyleri Ölçüm Metodu

1. Standartların Dilüsyonu

- Liyofilize haldeki standart şişesi etiketi üzerinde belirtilen miktar distile su eklenerek çözünmesi sağlandı. Bu şekilde hazırlanan çözülmüş standart konsantrasyonu 5000 pg/ml'dir. En az 10 dakika oda ısısında bekletilerek tüm liyofilize partiküllerin çözünmesi sağlandı.

- Sulandırılmış standarttan 225 µL alınarak içerisinde 225 µL örnek dilüenti bulunan tüpe aktarıldı. Bu şişe içerisindeki standart konsantrasyonu 2500 pg/ml olarak belirtildi.
- Altı adet boş tüp üzerine sırasıyla 1250 – 625.0 – 312.5 – 156.3 – 78.1 – 39.1 -0 pg/ml konsantrasyon değerleri yazıldı ve her birine 225 µL standart dilüent tamponu pipetlendi.
- 2500 ml'lik standart tüpünden 225 µL alınarak 1250 pg/ml etiketli tüpe aktarıldı ve böylece 1:2 oranında seyreltme işlemi gerçekleştirildi. Diğer tüpler içinde aynı oranda seyreltme yapıldı.



2. Yıkama Tamponunun Seyreltilmesi

- Kit içeriğindeki mevcut yıkama tamponu 20 kat konsantre olup çalışma anında 1 hacim yıkama tamponu 19 hacim distile suyla 20 kat seyreltildi. Kuyucuk başına harcanan miktar hesaplanarak gerekli miktarda tampon hazırlandı.

3. Deney Tamponunun Seyreltilmesi

- Kit içeriğindeki mevcut deney tamponu 20 kat konsantre olup çalışma anında 1 hacim yıkama tamponu 19 hacim distile suyla 20 kat seyreltildi. Kuyucuk başına harcanan miktar hesaplanarak gerekli miktarda tampon hazırlandı.

3. Mavi, kırmızı ve yeşil boyanın ilave edilmesi

- Biotin-konjugat ve streptavidin-HRP hazırlanırken kullanılan deney tamponu (1x) içerisine belirtilen miktarlarda boyalardan ilave edildi.

3. Streptavidin – HRP Hazırlanması

- 60 µL stok şişeden alınıp içerisinde 5.94 mL deney tamponu (1x) bulunan şişeye aktarıldı. Böylece 1:100 oranında konsantre

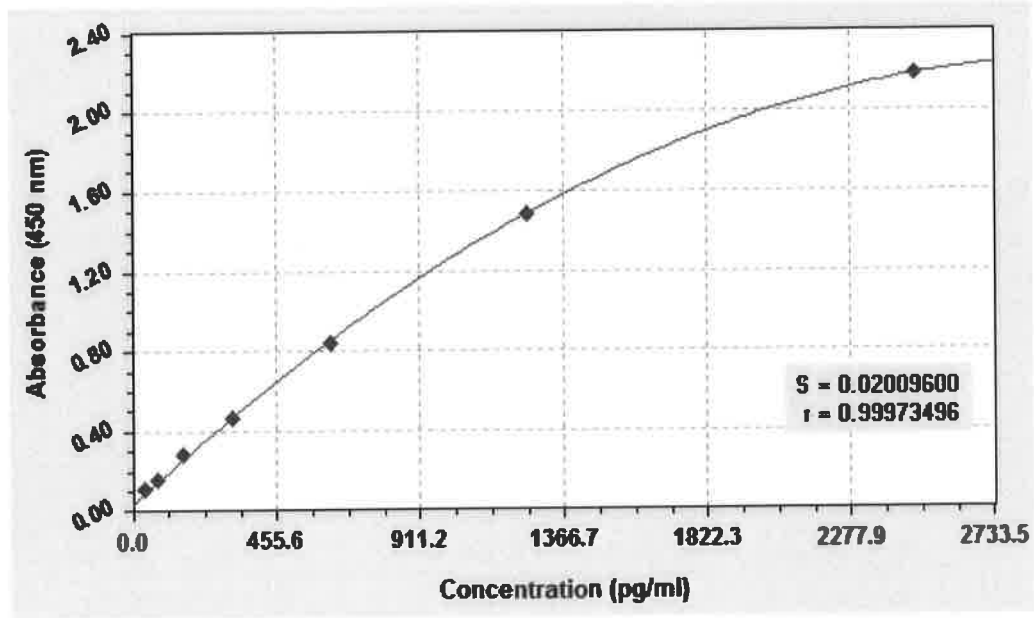
çözeltiden seyreltme yapılmış oldu. Bu çözelti kullanılacağı an taze olarak hazırlanmalıdır.

3. Biotin-Konjugat Hazırlanması

- 60 µL stok şişeden alınıp içerisinde 2.97 mL deney tamponu (1x) bulunan şişeye aktarıldı. Böylece 1:100 oranında konsantre çözeltiden seyreltme yapılmış oldu. Bu çözelti kullanılacağı an taze olarak hazırlanmalıdır

Ölçüm Prosedürü

1. Çalışmada örnek sayısı kadar kuyucuklu strip plate çerçevesinde hazırlanarak kullanılmayacak fazla stripler tekrar orijinal kabına yerleştirildi.
2. Yerleri belirli tüm kuyucuklara 100 µL standart serileri, 50 µL örnek dilüenti ve örnekler pipetlendi.
3. Tüm kuyucuklara 50 µL hazırlanan biyotin konjugatı eklendi.
4. Plate'in üzeri özel yapışkan bandı ile kapatıldıktan sonra 2 saat oda ısısında inkübe edildi. Bu aşamada örnek ve standart içindeki mevcut TNF- α molekülleri kuyucukların iç duvarına kaplanmış TNF- α antikorları tarafından tutulur. Birinci inkübasyon süresi sonunda tüm kuyucuklar 400 µL yıkama tamponu ile 4 kez yıkandı. .
5. Tüm kuyucuklara 100 µL hazırlanan streptavidin-HRP konjugatı eklendi.
6. İkinci inkübasyon işlemi sonrası yıkama işlemi 5. basamakta olduğu gibi tekrarlandı.
7. Tüm kuyucuklara 100 µL Streptavidin – HRP konjugatı eklendikten sonra 30 dakika oda ısısında inkübe edildi ve beşinci basamaktaki yıkama işlemi tekrarlandı.
8. Tüm kuyucuklara 100 µL Substrat (tetrametilbenzidin - TMB) eklendi ve karanlık bir ortamda 10 dakika inkübasyona bırakıldı.
9. İnkübasyon işlemi bitiminde tüm kuyucuklara 100 µL stop solüsyonu eklendi ve stop öncesi mavi rengin sarı renge değiştiği gözlemlendi. Renk değişimi örnekteki TNF- α konsantrasyonuyla orantılı olarak 450 nm'de absorbans düzeyleriyle belirlendi.
10. Tüm sonuçlar standart seri dilüsyonlarına karşılık çizilen absorbans eğrisi üzerinden hesaplandı (Şekil 24). Örnek sonuçları dilüsyon faktörüyle çarpılarak verildi.



Şekil 21. Standart TNF- α Grafiği

3.2.3.9. İnterlökin – 6 (IL-6) Düzeylerinin Ölçümü

Serum IL-6 düzeyleri Invitrogen Rat TNF- α (BMS625; Bender MedSystems, Vienna, Austria) kantitatif ELISA test kiti kullanılarak ölçüldü. Kitin ölçüm içi kesinlik değeri (intra-assay % CV) < % 5 ve ölçümler arası kesinlik değeri (inter-assay % CV) < % 10 'dur.

İnterlökin – 6 Düzeyleri Ölçüm Metodu Prensibi

Invitrogen IL-6 kiti solid faz sandviç Enzim Bağlı İmmün Ölçüm (ELISA) prensibine dayanır. Rat IL-6 molekülüne spesifik poliklonal antikorlar strip halindeki 8'li kuyucuklara kaplanmıştır.

Bilinen konsantrasyondaki IL-6 standartları ve bilinmeyen örnekler kuyucuklara pipetlenir. Biotin ile konjuge edilmiş ikincil antikorlar eklenir. İnkübasyondan sonra streptavidin ile konjuge peroksidaz enzimi eklenir. İkinci inkübasyondan sonra bağlanmayan enzimler yıkama işlemiyle ekarte edilir. Substrat solüsyonu ilave edilerek bağlı enzimlerin reaksiyonuyla renk değişimi gözlenir. Renk şiddeti TNF- α konsantrasyonu ile orantılı olarak değişim gösterir.

İnterlökin – 6 Düzeyleri Ölçüm Materyalleri

1. Rat IL-6 Standartları

❖ Kit içeriğinde 2 adet liofilize şişe halinde bulunmaktadır.

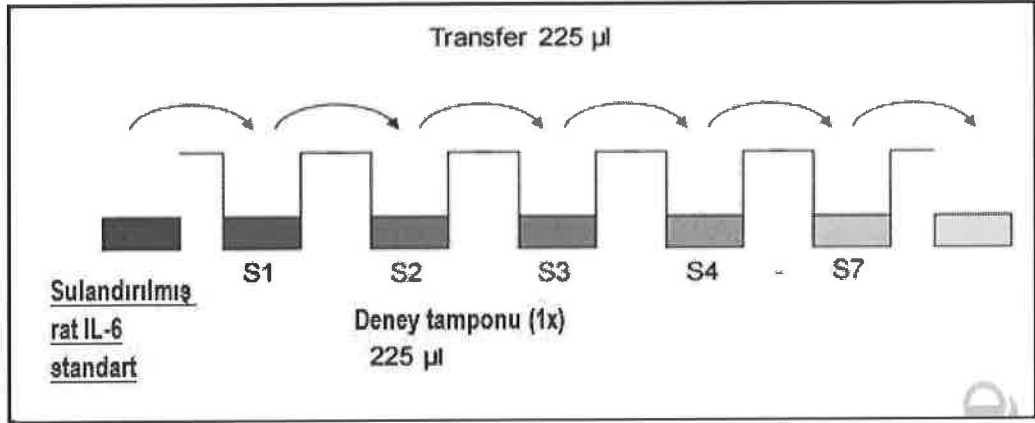
2. Konsantre Deney Tamponu

- ❖ 5 ml'lik 1 adet şişe içerisinde kit içeriğinde mevcuttur.
- 3. Rat IL-6 Biotin Konjugatı
 - ❖ 100 µl'lik 1 adet şişede kit içeriğinde mevcuttur.
- 4. Streptavidin – HRP
 - ❖ 150 µl'lik 1 adet şişede kit içeriğinde mevcuttur.
- 5. Konsantre Deney Tamponu (20X)
 - ❖ 5 ml'lik 1 adet şişe içerisinde kit içeriğinde mevcuttur.
- 6. Konsantre Yıkama Tamponu (20X)
 - ❖ 50 ml'lik 1 adet şişede kit içeriğinde mevcuttur.
- 7. Substrat Solüsyonu (Tetrametil benzidin)
 - ❖ 15 ml'lik 1 adet şişede kit içeriğinde mevcuttur.
- 8. Stop Solüsyonu
 - ❖ 15 ml'lik 1 adet şişede kit içeriğinde mevcuttur.
- 9. Mavi, kırmızı ve yeşil boya
 - ❖ 0.4 ml'lik 3 adet liyofilize şişe halinde bulunmaktadır.

İnterlökin – 6 Düzeyleri Ölçüm Metodu

1. Standartların Dilüsyonu

- Liyofilize haldeki standart şişesi etiketi üzerinde belirtilen miktar distile su eklenerek çözünmesi sağlandı. Bu şekilde hazırlanan çözünmüş standart konsantrasyonu 4000 pg/ml'dir. En az 10 dakika oda ısısında bekletilerek tüm liyofilize partiküllerin çözünmesi sağlandı.
- Sulandırılmış standarttan 225 µL alınarak içerisinde 225 µL deney tamponu bulunan tüpe aktarıldı. Bu şişe içerisindeki standart konsantrasyonu 2000 pg/ml olarak belirtildi.
- Altı adet boş tüp üzerine sırasıyla 1000 – 500.0 – 250.0 – 125.0 – 62.5 – 31.3 -0 pg/ml konsantrasyon değerleri yazıldı ve her birine 225 µL deney tamponu(1x) pipetlendi.
- 2000 ml'lik standart tüpünden 225 µL alınarak 1000 pg/ml etiketli tüpe aktarıldı ve böylece 1:2 oranında seyreltme işlemi gerçekleştirildi. Diğer tüpler içinde aynı oranda seyreltme yapıldı.



2. Yıkama Tamponunun Seyreltilmesi

- Kit içeriğindeki mevcut yıkama tamponu 20 kat konsantre olup çalışma anında 1 hacim yıkama tamponu 19 hacim distile suyla 20 kat seyreltildi. Kuyucuk başına harcanan miktar hesaplanarak gerekli miktarda tampon hazırlandı.

3. Deney Tamponunun Seyreltilmesi

- Kit içeriğindeki mevcut deney tamponu 20 kat konsantre olup çalışma anında 1 hacim yıkama tamponu 19 hacim distile suyla 20 kat seyreltildi. Kuyucuk başına harcanan miktar hesaplanarak gerekli miktarda tampon hazırlandı.

3. Mavi, kırmızı ve yeşil boyanın ilave edilmesi

- Biotin-konjugat ve streptavidin-HRP hazırlanırken kullanılan deney tamponu (1x) içerisine belirtilen miktarlarda boyalardan ilave edildi.

3. Streptavidin – HRP Hazırlanması

- 60 µL stok şişeden alınıp içerisinde 5.94 mL deney tamponu (1x) bulunan şişeye aktarıldı. Böylece 1:100 oranında konsantre çözeltilerden seyreltme yapılmış oldu. Bu çözelti kullanılacağı an taze olarak hazırlanmalıdır.

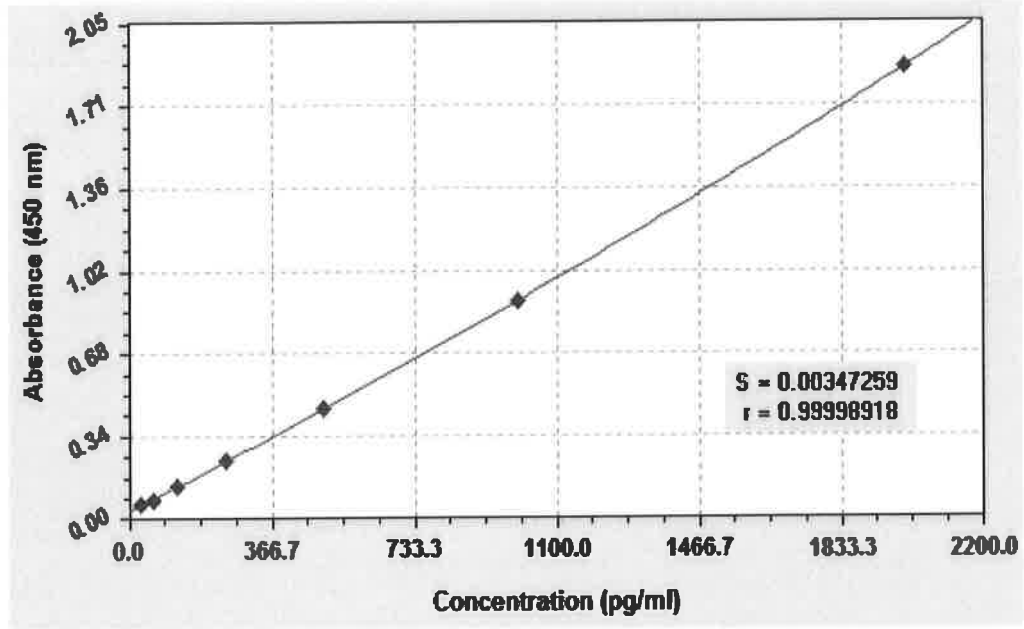
3. Biotin-Konjugat Hazırlanması

- 60 µL stok şişeden alınıp içerisinde 2.97 mL deney tamponu (1x) bulunan şişeye aktarıldı. Böylece 1:100 oranında konsantre çözeltilerden seyreltme yapılmış oldu. Bu çözelti kullanılacağı an taze olarak hazırlanmalıdır.

Ölçüm Prosedürü

11. Çalışmada örnek sayısı kadar kuyucuklu strip plate çerçevesinde hazırlanarak kullanılmayacak fazla stripler tekrar orijinal kabına yerleştirildi.

12. Yerleri belirli tüm kuyucuklara 100 µL standart serileri, 50 µL deney tamponu ve örnekler pipetlendi.
13. Tüm kuyucuklara 50 µL hazırlanan biyotin konjugatı eklendi.
14. Plate'in üzeri özel yapışkan bandı ile kapatıldıktan sonra 2 saat oda ısısında inkübe edildi. Bu aşamada örnek ve standart içindeki mevcut IL-6 molekülleri kuyucukların iç duvarına kaplanmış IL-6 antikorları tarafından tutulur. Birinci inkübasyon süresi sonunda tüm kuyucuklar 400 µL yıkama tamponu ile 4 kez yıkandı. .
15. Tüm kuyucuklara 100 µL hazırlanan streptavidin-HRP konjugatı eklendi.
16. İkinci inkübasyon işlemi sonrası yıkama işlemi 5. basamakta olduğu gibi tekrarlandı.
17. Tüm kuyucuklara 100 µL Streptavidin – HRP konjugatı eklendikten sonra 30 dakika oda ısısında inkübe edildi ve beşinci basamaktaki yıkama işlemi tekrarlandı.
18. Tüm kuyucuklara 100 µL Substrat (tetrametilbenzidin - TMB) eklendi ve karanlık bir ortamda 10 dakika inkübasyona bırakıldı.
19. Inkübasyon işlemi bitiminde tüm kuyucuklara 100 µL stop solüsyonu eklendi ve stop öncesi mavi rengin sarı renge değiştiği gözlemlendi. Renk değişimi örnekteki IL-6 konsantrasyonu ile orantılı olarak 450 nm'de absorbans düzeyleriyle belirlendi.
20. Tüm sonuçlar standart seri dilüsyonlarına karşılık çizilen absorbans eğrisi üzerinden hesaplandı (Şekil 24). Örnek sonuçları dilüsyon faktörüyle çarpılarak verildi.



Şekil 22. Standart IL-6 Grafiği

3.2.4. Histopatolojik İnceleme

Histopatolojik inceleme için ayrılan kas örnekleri, ışık mikroskopik düzeyde histolojik incelemelerinin yapılabilmesi için %10'luk formalin fiksatifine alınarak 48 saat süre ile fiksasyonları sağlandı. Fiksasyonları sağlanan örnekler fiksatifin çökmesini engellemek amacıyla 24 saat çeşme suyunda yıkandı. Daha küçük parçalara bölündü. Küçük parçalara ayrılan doku parçaları daha sonra sırasıyla kademeli olarak %70'lik alkolde 1 gece, %80'lik, %90'lık, %96, %99,5'lük alkol serilerinde 1'er saat bekletilerek dehidratasyonları sağlandı. Dehidratasyonlarının ardından örnekler şeffaflandırılmak üzere 2 kez 30'ar dakika ksilende bekletildi. Etüv içinde 58°C'de eritilmiş parafinlere alınarak 12 saat bekletildi. Parafinize edilen dokular ayrı ayrı parafin içeren kasetlere gömülerek bloklandı, buzdolabında soğutuldu ve kesit alınmaya hazır duruma getirildi. Parafin bloklar içerisindeki dokular rotarimikrotom (LEICA RM2125RT, China) aracılığı ile her bir örnekten 5'er mikrometre kalınlığında doku kesitleri alındı. Kesitlerin 45°C'de su banyosunda açılmaları sağlanarak temiz lamalar üzerine alınmasından sonra etüv içinde 1 gece bekletildi. Böylece kesitler hem hemotoksilen eozin boyama için hem de immünohistokimyasal analiz için hazır duruma getirildi. Her bir grupta 7 hayvan ve her bir hayvana ait 10 kesit ve her bir kesitte ortalama 20-25 alan üzerinde histolojik analizler gerçekleştirildi.

3.2.4.1. Hematoksilen-Eozin Boyama Metodu: Preparatlar 15 dakika süre ile üç ayrı ksilolde tutulup deparafinizasyonları sağlandıktan sonra boyama aşamasına geçildi. Kesitlerin boyanmasında Hematoksilen-Eosin ikili boyası kullanıldı. Deparafinizasyonu yapılmış olan doku kesitleri 5'er dakika süreyle %100, %90, %80, %70'lik alkollerde ve distile suda bekletildi. Kesitler Hematoksilen ile 10 dakika ve eosin ile 2 dakika boyandı. Çeşme suyu ile fazla boyası alınan kesitler hızla %70, %80'lik %90 ve %100'lük alkol serilerinden geçirilip dehidratasyonları sağlandı. Dokular üç ayrı ksilolde 5'er dakika tutularak şeffaflaştırıldı. Şeffaflanan dokular daha sonra entellan damlatılarak kapatıldı.

Histolojik hasar analizi: Parafini erimiş olan kesitlerden histolojik hasar skoru yapılacak olanlara HematoksilenEozin boyama protokolü uygulanarak dokular histolojik olarak boyandılar. Her bir grupta 7 hayvan ve her bir hayvana ait 10 kesit ve her bir kesitte ortalama 20-25 alan üzerinde histolojik analizler gerçekleştirildi. Histolojik analizler Nis Element programı yüklü bilgisayar destekli ışık mikroskobundaki (NikonEclipse 200 Serial No:T11a1 944909, Japan) görüntünün mikroskabaentegre edilmiş olan kamara (Nikon Ds-Fil, Japan) vasıtası ile bilgisayar monitörüne aktarılması suretiyle gerçekleştirildi. Mikroskobik analizler iki araştırmacı tarafından kodlama sistemine dayalı olarak kör bir çalışma şeklinde gerçekleştirildi. Histolojik hasarın derecesini sayısal olarak ifade edebilmek için kas liflerinin organizasyon bozukluğu ve dejenerasyonu değerlendirildi

3.2.4.2. İmmünohistokimyasal Metod: İmmünohistokimyasal boyama için polilizinli lamlara alınarak etüvde parafini eritilen kesitlere indirektimmünohistokimyasal boyama protokolü uygulanarak doku kesitlerinde beta aktin proteinleri immünolojik olarak işaretlenerek boyandı. Bunun için kesitler 5'er dakika 3 değişim ksilende bekletilerek tamamen deparafinize edildikten sonra sırası ile 5'er dakika %100, 96, 90, 80 ve 70'lik etil alkol serilerinden geçirilerek distile suda 5 dakika bekletilip rehidrate edildiler. Antijen retrieval işlemi için dokular sitrik asit solüsyonu içerisinde 5 dakika iki değişim 360 watt ayarlı mikrodalgada fırında (nitellowave MD 554 arçelik) tutuldu. Mikro dalgadan dışarı alınan kesitler üzerinde 80 ml kadar soğuk distile su ilave edilerek ani bir şekilde soğumaları sağlandı. Oda ısısına gelmesi için dışarıda yaklaşık 10 dakika kesitlerdistile suiçerisinde bekletildiler. Doku kesitlerindeki muhtemel endojenperoksidaz aktivitesini bloke etmek için kesitler %3'lük H₂O₂ (hidrojen peroksit) solüsyonunda 10 dakika bekletildikten sonra 3 değişim 5 dakika FTS (fosfat tampon solüsyonu) ile yıkandılar. FTS' de 3x5 dakika Lamlar üzerindeki kesitlerin çevresi hidrofobikpappen kalem (Liquid Blocker, Japan) ile çevrelendikten sonra blocking serum (nonimmun serum) damlatılarak nemli ortamda 15 dakika kadar bekletildiler. Bloking serum yıkmadan uzaklaştırıldıktan sonra kesitler üzerine dokuları kapatacak miktarda primer antikör olan Anti-beta

Actinantibody (mAbcam 8226)1/500dilüsyon oranında damlatılıp nemli kapalı bir kutu içerisinde $\pm 40C$ buzdolabında (04 nt 465v/03 Regal) bir gece inkübasyona bırakıldı. İnkübasyondan sonra lamalar FTS' de 3 kez 5 dakika yıkandılar. Sonra kesitler üzerine aynı şekilde biyotinlenmişsekonder antikor damlatılarak kapalı nemli kutu içerisinde oda ısısında 30 dakika bekletildiler. Kesitler FTS' de 3 kez 5 dakika yıkandıktan sonra dokuların üzerine streptavidin işaretli sekonder antikor damlatılarak kapalı nemli kutu içerisinde 30 dakika oda ısısında bekletildiler. FTS ile 3 kez 5'er dakika yıkama işleminden sonra kesitler üzerine AEC damlatılıp 5-10 dakika içerisinde reaksiyon oluştuktan sonra kesitler FTS alınarak reaksiyon sonlandırıldı ve 3 kez 5 dakika yıkandıktan sonra distile suya alınarak yıkandı. Sonrasında Hematoksilen ile zıt boyama yapıldı. Boyanan preparatlardaki fazla boyanın uzaklaştırılması için akarsu ile tekrar yıkandılar. Sonra distile su ile yıkandıktan sonra kesitler üzerindeki fazla su uzaklaştırıldı ve su bazlı (Aqueous-Mount, İnvitrogen) kapatma solüsyonu damlatılarak lamel ile kesitlerin üzeri kapatıldı. Kontrol amacıyla birkaç tane kesitte, primer antikor damlatma aşamasında beta aktinantikoru yerine FTS damlatıldı, diğer basamaklarda aynı protokoller uygulandı. Bu preparatlardaki dokuların immünohistokimyasal olarak boyanmadıkları gözlemlenmesi ile çalışmamızın sağlıklı olarak gerçekleşmiş olduğu görüldü.

İmmünohistokimyasal boyama yapılan doku kesitlerinde beta aktin proteininin tanımlanmasını saptamak amacıyla semikantitatif değerlendirme sistemi kullanıldı. İmmün boyanmanın şiddetine göre hücrelerin sayımları yapılarak sonuçlar semikantitatif olarak değerlendirildiler.

Semikantitatif HSCORE analizi: Herbir kesit için ışık mikroskobu altında 40X büyütmede birbirinden habersiz iki araştırmacı tarafından rastgele beş alan seçildi. Bu alanlar içinde hücrelerin immün boyanma yoğunluklarına göre Nis Element programı desteği ile boyanma şiddeti skorlarına göre kategorik olarak sayımları yapıldı. Bu sayımlar yapılırken hem pozitif immunreaktivite gösteren hücrelerin sayısı, hem immunreaktivitenin yoğunluk dereceleri hem de boyanan boyanmayan tüm hücreler göz önünde tutuldu. Elde edilen sayım sonuçlarının hesaplama için HSCORE formülü $[\sum Pi(i+ 1)]$ kullanıldı. Bu formülde; i: boyanma yoğunluğu skorunu, Pi: boyanan hücrelerin yüzdesini göstermektedir. Gözlemler sonunda hesaplanan skorların bireydeki ifadelerinin ortalaması alındı ve HSCORE değerleri grafikte gösterildi.

3.2.5. İstatistiksel Analizler

Kategorik değişkenler sayı ve yüzde ile ifade edildi. Sürekli değişkenlerin, gruplar arasındaki karşılaştırmalarında Tek Yönlü varyans analizi ve Kruskal Wallis varyans analizi kullanıldı. Tek Yönlü varyans analizinde, post hoc çoklu karşılaştırma için, Tukey HSD testi kullanıldı. Tek yönlü varyans analizi testinde sürekli değişkenler, ortalama (Ort) ve standart sapma (SS) olarak ifade edildi. p değerleri 0.05'in altında hesaplandığında istatistiksel olarak önemli kabul edildi. Hesaplamalar hazır istatistik yazılımı ile yapıldı. (IBM SPSS Statistics 19, SPSS inc., an IBM Co., Somers, NY).

4. BULGULAR

4.1. Biyokimyasal Bulgular

DeneySEL prosedür uygulanan gruplar; sham operasyonu yapılan grup (SHAM, n=10), iskemi reperfüzyon yapılan grup (İ/R, n=10), iskemik önkoşullama yapılan grup (İÖK, n=10), iskemi reperfüzyon sırasında 200 mg/kg dozunda krill oil karvakrol verilen grup (İ/R+KO, n=10), iskemik önkoşullama ve krill oil ile birlikte iskemi reperfüzyon uygulanan grup (İÖK+KO, n=10) olarak ifade edildi.

Tablo 3. Gruplarda kas dokusunda enzim sonuçları

Gruplar	GSH-Px U/gr protein	CAT k/gr protein	SOD U/mg protein
I Sham	0,73±0,57	0,04±0,02	0,02±0,01
II İ/R	0,66±0,34	0,02±0,01	0,01±0,01
III İÖK	0,73±0,21	0,03±0,02	0,02±0,01
IV İ/R+KO	0,78±0,22	0,09±0,06	0,02±0,01
V İÖK+KO	0,82±0,17	0,06±0,05	0,02±0,01

Tablo 4. Gruplarda serumda enzim sonuçları

Gruplar	GSH-Px U/L	SOD U/mL
I Sham	110,44±47,92	14,70±0,64
II İ/R	82,77±51,72	14,54±0,28
III İÖK	93,43±51,36	14,9±0,74
IV İ/R+KO	120,56±39,46	13,9±0,38
V İÖK+KO	138,83±129,99	14,16±0,42

Tablo 5. Kas dokusunda gruplararası MDA ve NO miktarları

Gruplar	MDA nmol/gr yaş doku	NO µmol/gr yaş doku
I Sham	5,97±0,69	0,94±0,1
II İ/R	9,88±0,68	1,14±0,22
III İÖK	9,62±0,53	0,95±0,16
IV İ/R+KO	8,22±0,51	0,9±0,09
V İÖK+KO	7,94±0,96	0,78±0,1

Tablo 6. Serumda gruplararası MDA ve NO miktarları

Gruplar	MDA μmol/L	NO μmol/L
I Sham	1,99±1,56	84,62±10,08
II İ/R	1,91±2,96	76,71±8,56
III İÖK	1,88±1,09	75,71±11,17
IV İ/R+KO	2,31±1,85	79,73±13,68
V İÖK+KO	3,20±2,19	79,61±15,89

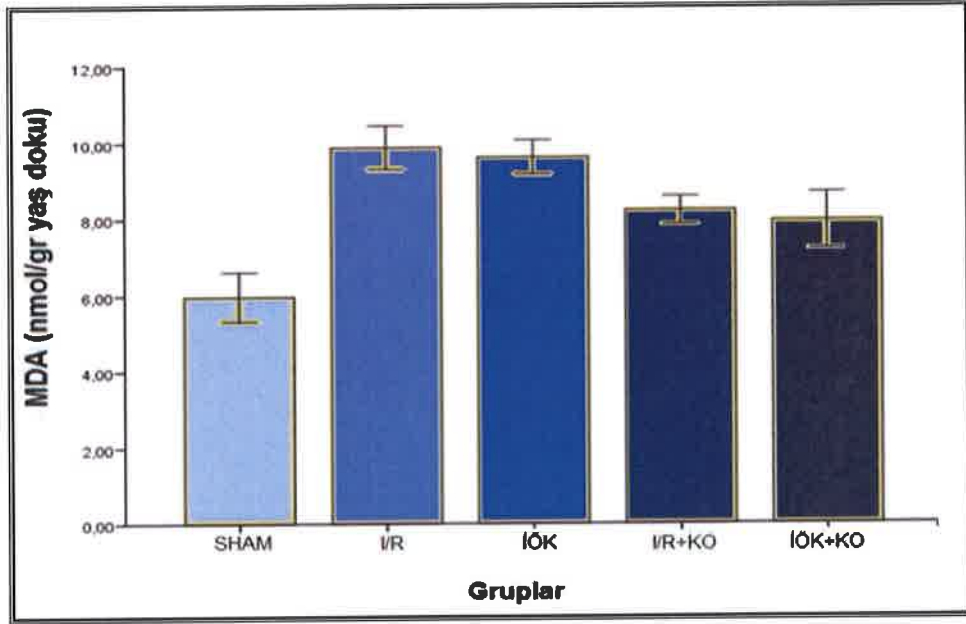
Tablo 7. Gruplararası TNF-α ve IL-6 düzeyleri

Gruplar	TNF-α ng/ml	IL-6 ng/ml
I Sham	0,17±0,12	0,26±0,13
II İ/R	0,23±0,08	0,27±0,19
III İÖK	0,2±0,12	0,27±0,15
IV İ/R+KO	0,17±0,13	0,27±0,19
V İÖK+KO	0,18±0,11	0,27±0,20

Çalışmada ölçümü yapılan parametrelerin ortalama ± standart sapma değerleri yukarıda verilmiştir.

4.1.1. Gruplarda MDA miktarları

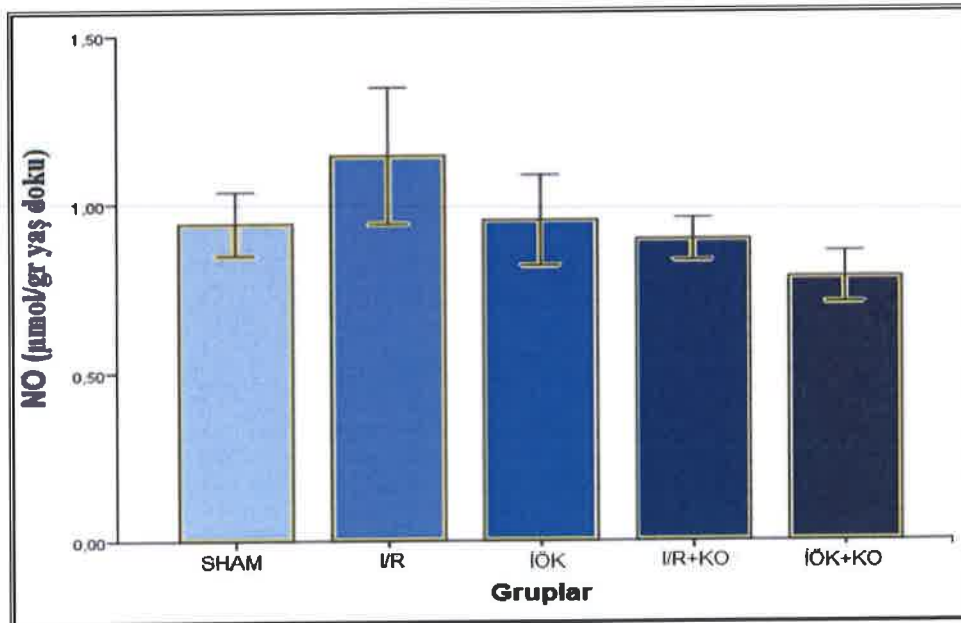
Sonuçlar şekil 23’de gösterilmiştir. Bu grafiğe göre İ/R ve İÖK+İ/R yönüne doğru MDA miktarları gittikçe artan bir değişim izlemiştir. Tek başına İ/R uygulanan grup ile birlikte artış en üst seviyeye ulaşmıştır. Gruplar arasında elde edilen istatistiksel p değerleri şöyle bulunmuştur: Sham-İ/R arasında $p<0,001$, sham-İÖK+İ/R arasında $p<0,001$. Bununla beraber İÖK+İ/R grubunda İ/R grubuna göre minimal bir düşüş olmasına rağmen istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık bulunmamıştır. Krill yağı uygulanması ile MDA düzeyi İ/R’da olduğundan daha düşük düzeylere inmiştir. Krill yağı uygulanması İ/R ve İÖK ile karşılaştırıldığında hem İ/R ile İ/R+KO arasında ($p<0,001$) hem de İÖK ile İÖK+KO ($p<0,001$) arasında istatistiksel olarak anlamlı fark bulunmuştur. Krill yağı lipid peroksidasyonunu başarılı şekilde azaltarak MDA düzeyini düşürmüştür.



Şekil 23. Doku MDA düzeylerinin gruplara göre dağılımını gösteren grafik

4.1.2. Gruplarda NO miktarları

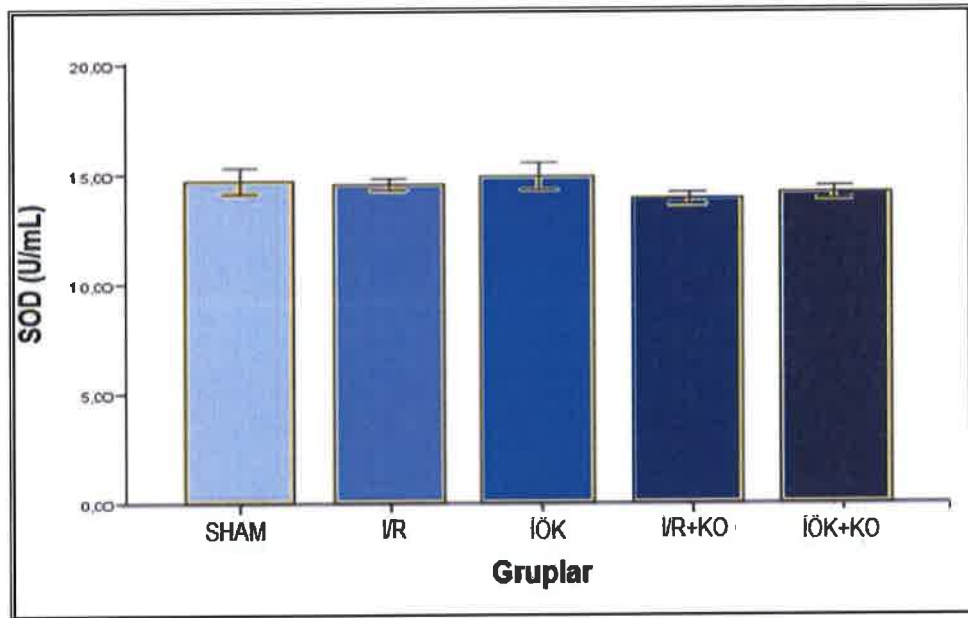
Sonuçlar şekil 24’de gösterilmiştir. İskemi reperfüzyonla birlikte NO düzeyi sham grubuna göre oldukça yükselmiştir. NO düzeyleri krill yağından etkilenerek İ/R ve İ/R+KO grupları arasında istatistiksel olarak anlamlı fark tespit edilmiştir ($p=0,007$). Ayrıca İ/R ve İÖK+KO arasında da istatistiksel olarak anlamlı fark bulunmuştur ($p<0,001$). Krill yağı NO miktarını sham grubundan daha düşük bir düzeye indirmiştir.



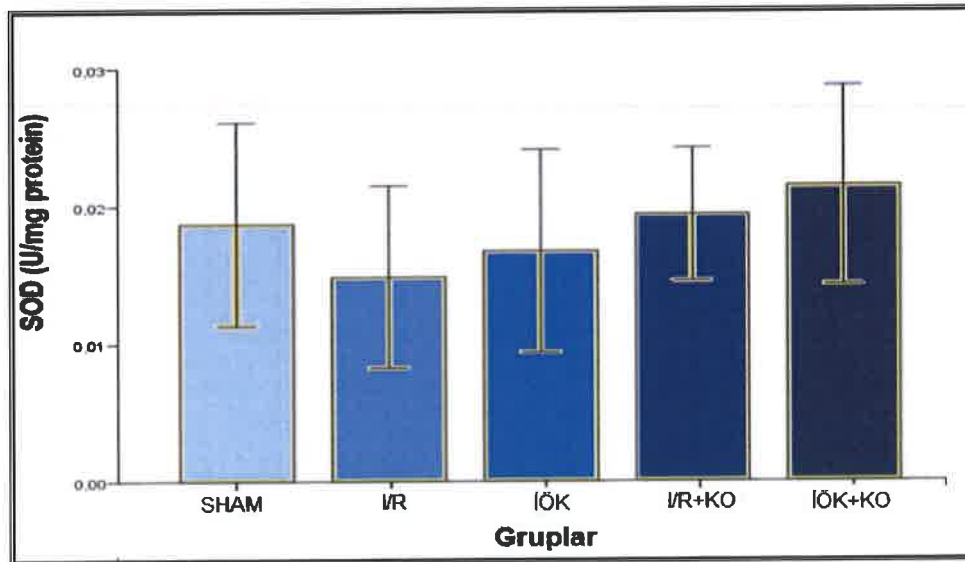
Şekil 24. Doku NO düzeylerinin gruplara göre dağılımını gösteren grafik

4.1.3. Gruplarda SOD aktivitesi

Aşağıdaki grafikte gösterilmiştir. Bu grafiğe göre krill yağı verilen sıçanlarda SOD aktivitesi sham, İ/R ve İÖK grupları ile karşılaştırıldığında belirgin bir artış veya azalma tespit edilmezken sham grubu ile İ/R+KO grubu arasında ($p=0,024$), İÖK ile İ/R+KO arasında ($p=0,002$) ve İÖK ile İÖK+KO arasında ($p=0,032$) istatistiksel olarak anlamlı farklılık bulunmuştur. Net bir fikir elde etmek için dokuda baktığımız SOD aktivitesi grafik 5’de ifade edilmiştir. Buna göre krill yağı uygulanması ile SOD aktivitesi hem İ/R hem de İÖK grubu ile karşılaştırıldığında önemli oranda artış göstermiştir. Ancak bu artış istatistiksel olarak anlamlı değildir.



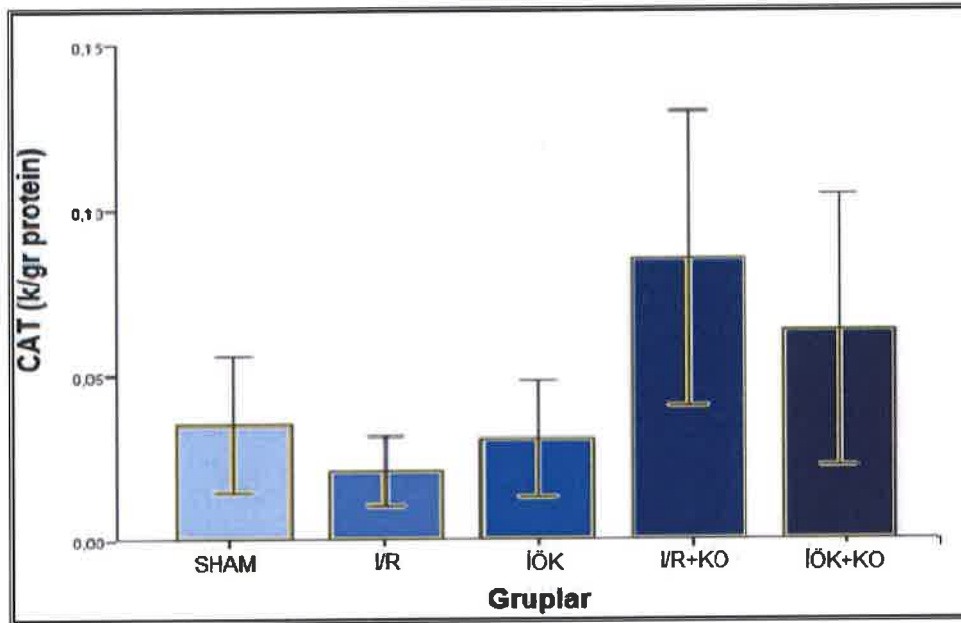
Şekil 25. Serum SOD aktivitelerinin gruplara göre dağılımını gösteren grafik



Şekil 26. Doku SOD aktivitelerinin gruplara göre dağılımını gösteren grafik

4.1.4. Gruplarda CAT aktivitesi

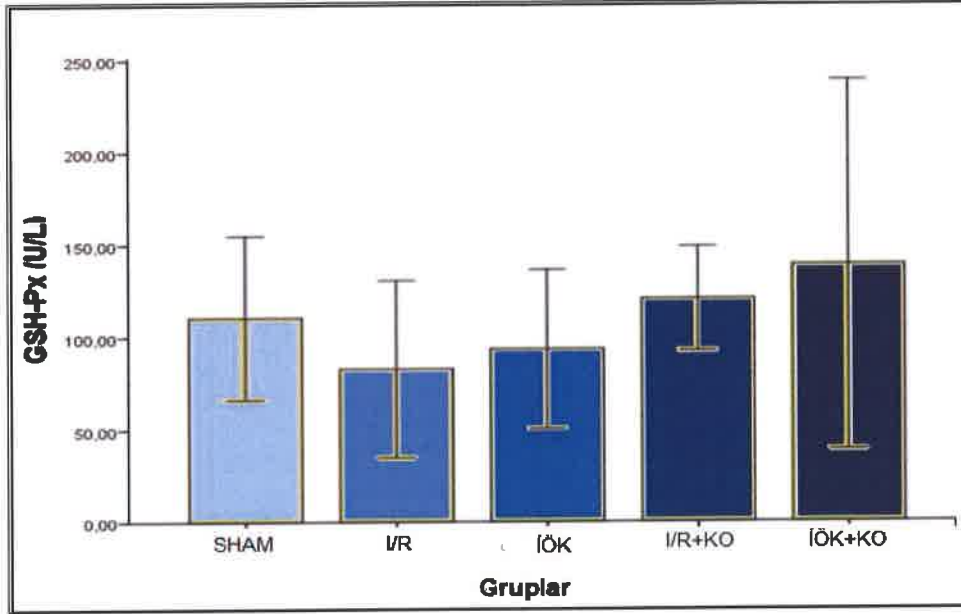
CAT aktivitelerinin gruplara göre durumu grafikte ifade edilmiştir. Bu grafiğe göre krill yağı verilen her iki grupta da CAT aktivitesi yarı yarıya artmıştır. İÖK ile İÖK+KO arasında istatistiksel olarak anlamlı fark bulunmazken İ/R ve İ/R+KO grupları arasında istatistiksel olarak anlamlı bu farklılık ($p=0.020$) grafikteki artışa da paralellik göstermektedir. İ/R ile İÖK grubu karşılaştırıldığında ise uzun süreli iskemi ve reperfüzyondan önce uygulanan kısa süreli iskemi ve reperfüzyonun CAT aktivitesi üzerinde bir artışa sebep olduğu görülmektedir. CAT düzeyini sham grubunda olana çok yakın bir düzeye çıkardığı grafikte görülmektedir.



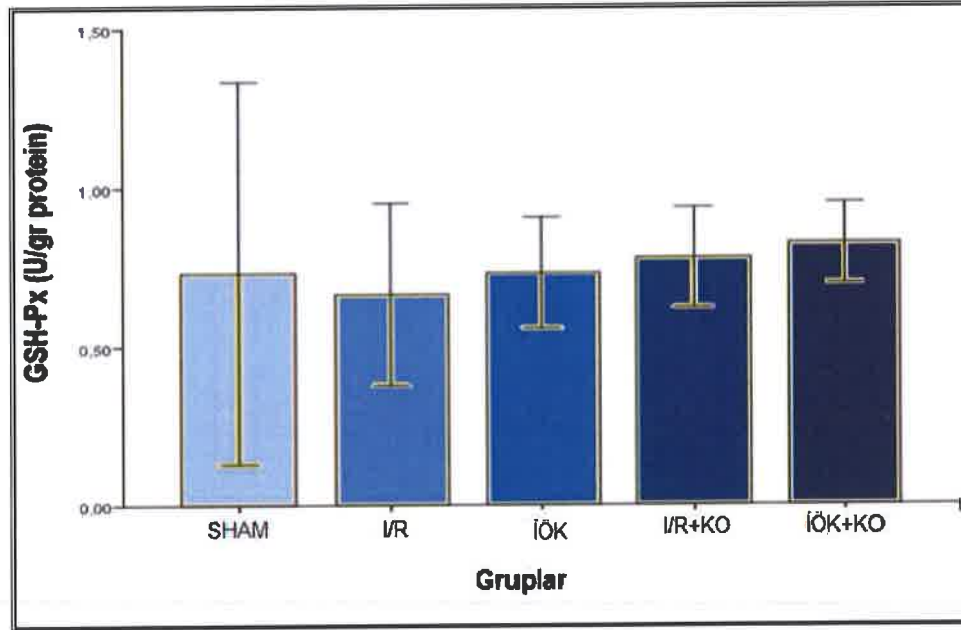
Şekil 27. Doku CAT aktivitelerinin gruplara göre dağılımını gösteren grafik

4.1.5. Gruplarda GSH-Px aktivitesi

Sonuçlar aşağıdaki grafikte gösterilmiştir. Bu grafiklerin her ikisinde de benzer seyreden artışlar ve azalmalar söz konusudur. İskemi reperfüzyon ile birlikte azalan GSH-Px aktivitesi, krill yağının verilmesi ve iskemik önkoşullamanın uygulanması ile istatistiksel olarak anlamlı olmayan ($p>0,05$) bir artış göstermiştir.



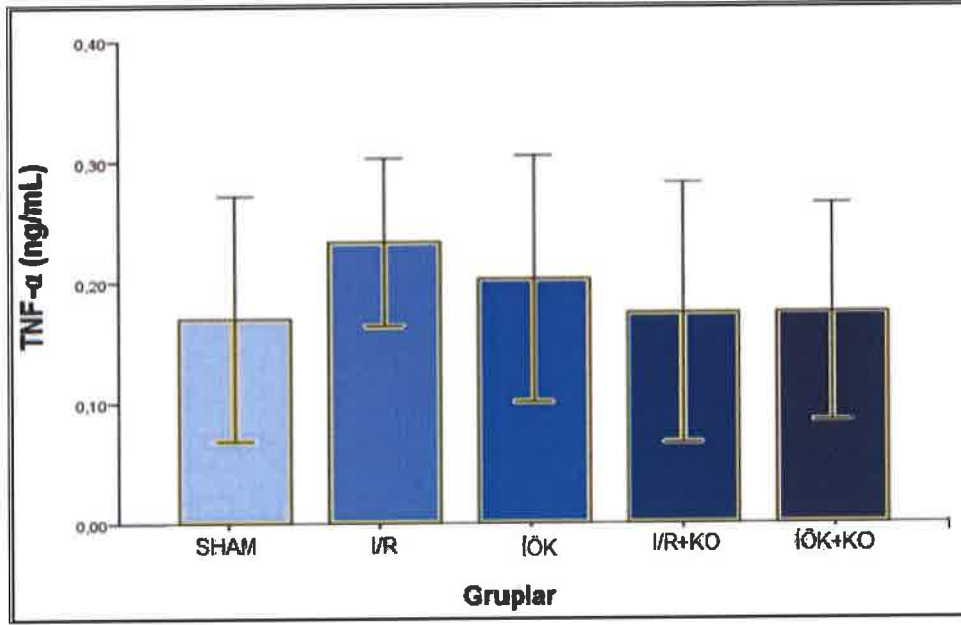
Şekil 29. Serum GSH-Px düzeylerinin gruplara göre dağılımını gösteren grafik



Şekil 30. Doku GSH-Px düzeylerinin gruplara göre dağılımını gösteren grafik

4.1.6. Gruplarda TNF- α düzeyleri

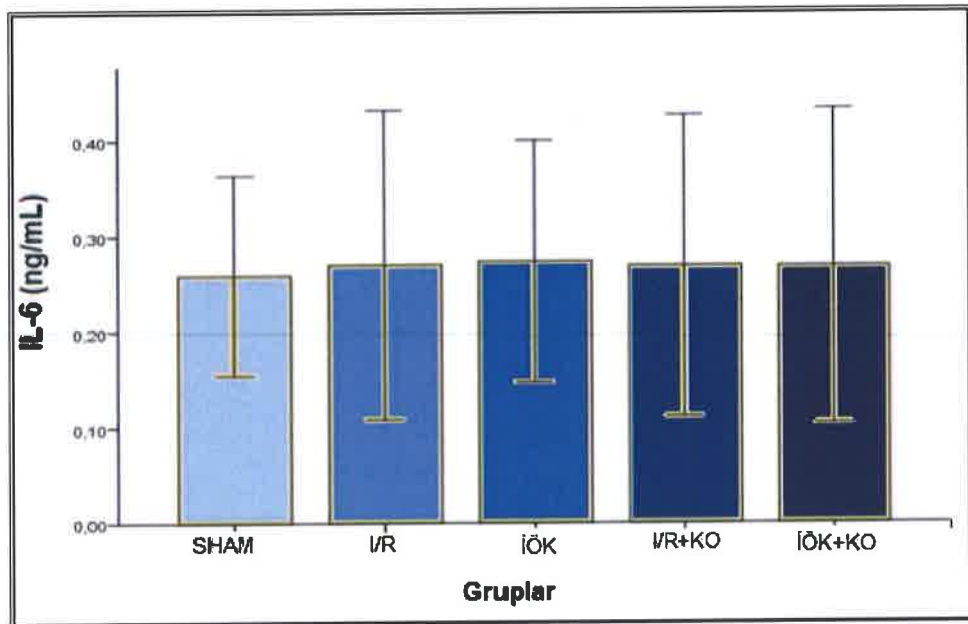
Sonuçlar şekil 31'de gösterilmiştir. Sham grubunda TNF- α düzeyleri düşüktür. İskemik önkoşullama ve özellikle tek başına uygulanan uzun süreli iskemi ve reperfüzyonla birlikte TNF- α düzeylerinin yükseldiği görülmektedir. Bu grafiklerin her ikisinde de benzer seyreden artışlar ve azalmalar söz konusudur. İskemi reperfüzyon ile birlikte artan TNF- α düzeyi, krill yağının verilmesi ve iskemik önkoşullamanın uygulanması ile istatistiksel olarak anlamı olmayan ($p>0,05$) bir azalma göstermiştir.



Şekil 31. TNF-α düzeylerinin gruplara göre dağılımını gösteren grafik

4.1.7. Gruplarda IL-6 düzeyleri

Aşağıda grafikte görüleceği gibi İ/R, İÖK ve KO gruplarında IL-6 düzeyleri değişim göstermemiştir. Sham grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı olmasa da minimal bir artış söz konusudur ($p>0,05$).



Şekil 32. IL-6 düzeylerinin gruplara göre dağılımını gösteren grafik

4.2. Histopatolojik bulgular

4.2.1.Hematoksilen-eozin boyama bulguları: Çalışmamızdaki iskelet kas doku örnekleri klasik bir metod olan Hematoksilen-Eozin boyama yöntemiyle incelendi. Tüm gruplar, kas lifi organizasyon ve inflamatuvar hücre infiltrasyonu açısından değerlendirildi.

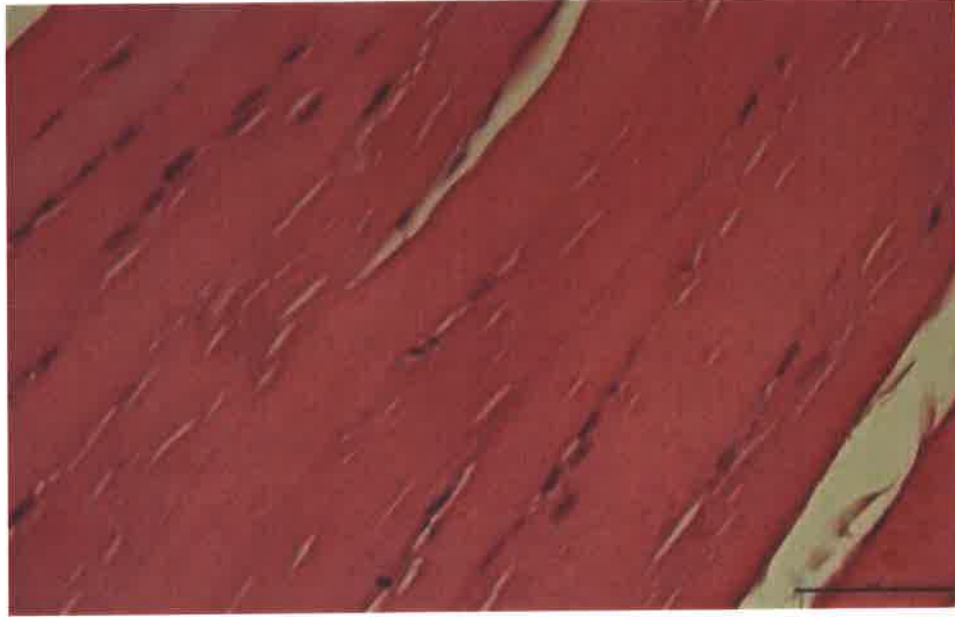
Histolojik skor analizi: Bu amaçla 0'dan başlayıp 4'e kadar gittikçe hasar şiddetinin artışı gösteren toplam 4 skorlama sistemi baz alındı. Bu skorlama sisteminde 0: normal bir dokuyu, 1: hafif şekilde hasar olduğunu, 2: orta düzeyde doku hasarını, 3: şiddetli hasar ve dejenerasyon sonucu kas lifi organizasyonunun ağır bir şekilde bozulmuş olduğuna karşılık gelmektedir. Kas dokusundaki enflamatuvar hücre infiltrasyonunun değerlendirmesinde de yine benzer bir skorlama sistemi kullanılarak analiz yapıldı (0: normal, 1: hafif, 2: orta, 3: ağır) bakıldı (224). Bu hasar derecelendirme kriterlerine göre mikroskopik doku analizi sonucunda elde edilen skorlar herbir bireyin skor katsayı ortalaması bulunarak grubun ortalama hasar skorları hesaplandı.

Tablo 29. Gruplararası histolojik hasar skorlarının sonuçları

SIÇANLAR	KAS LİFİ ORGANİZASYON SKORU						İNFLAMATUAR HÜCRE İNFİLT SKORU					
	G0 (N)	G1(H)	G2(O)	G3(Ş)	BİREY SK	GRUP SK	G0 (N)	G1 (H)	G2 (O)	G3 (Ş)	BİREY SK	GRUP SK
G1-1	30	7	1	0	0,24	0,50	14	21	3	0	0,71	0,70
G1-2	31	4	0	0	0,11		23	13	1	0	0,41	
G1-3	15	27	6	1	0,86		21	18	2	0	0,54	
G1-4	18	15	3	0	0,58		24	32	0	0	0,57	
G1-5	39	25	11	0	0,63		14	56	7	0	0,91	
G1-6	18	16	1	1	0,58		16	26	19	1	1,08	
G2-1	3	18	24	15	1,85	2,35	2	14	24	4	1,68	1,98
G2-2	3	7	24	36	2,33		4	2	14	10	2,00	
G2-3	1	5	13	70	2,71		1	6	15	14	2,17	
G2-4	3	2	28	45	2,47		3	3	16	7	1,93	
G2-5	0	3	45	39	2,41		1	8	8	13	2,10	
G2-6	3	2	13	44	2,58		1	4	14	14	2,24	
G2-7	0	18	36	24	2,08		0	18	26	6	1,76	
G3-1	0	10	14	20	2,23	2,13	3	3	9	10	2,04	2,00
G3-2	0	11	22	8	1,93		0	6	21	14	2,20	
G3-3	0	2	38	16	2,25		0	7	13	7	2,00	
G3-4	3	6	30	14	2,04		7	6	6	9	1,61	
G3-5	1	9	24	11	2,00		2	14	17	13	1,89	
G3-6	0	9	30	22	2,21		4	9	12	13	1,89	
G3-7	0	4	22	16	2,29		1	1	10	12	2,38	
G4-1	20	14	7	2	0,63	1,37	2	19	11	3	1,43	1,44
G4-2	4	37	13	6	1,35		4	13	7	4	1,39	
G4-3	6	32	19	2	1,29		5	8	8	5	1,50	
G4-4	7	15	25	5	1,35		2	22	29	0	1,45	
G4-5	5	28	17	4	1,37		9	13	9	3	1,48	
G4-6	0	19	25	3	1,65		1	26	15	3	1,44	
G4-7	4	20	22	14	1,77		0	11	17	2	1,70	
G5-1	7	36	10	0	1,15	1,37	0	11	9	6	1,41	1,49
G5-2	8	64	11	0	1,04		1	14	8	5	1,45	
G5-3	7	15	18	1	1,31		2	29	9	2	1,29	
G5-4	7	55	23	0	1,17		4	12	6	5	1,40	
G5-5	10	19	20	3	1,34		6	35	15	7	1,39	
G5-6	6	10	41	16	1,75		1	30	32	23	1,89	
G5-7	1	15	20	0	1,48		0	20	10	1	1,54	

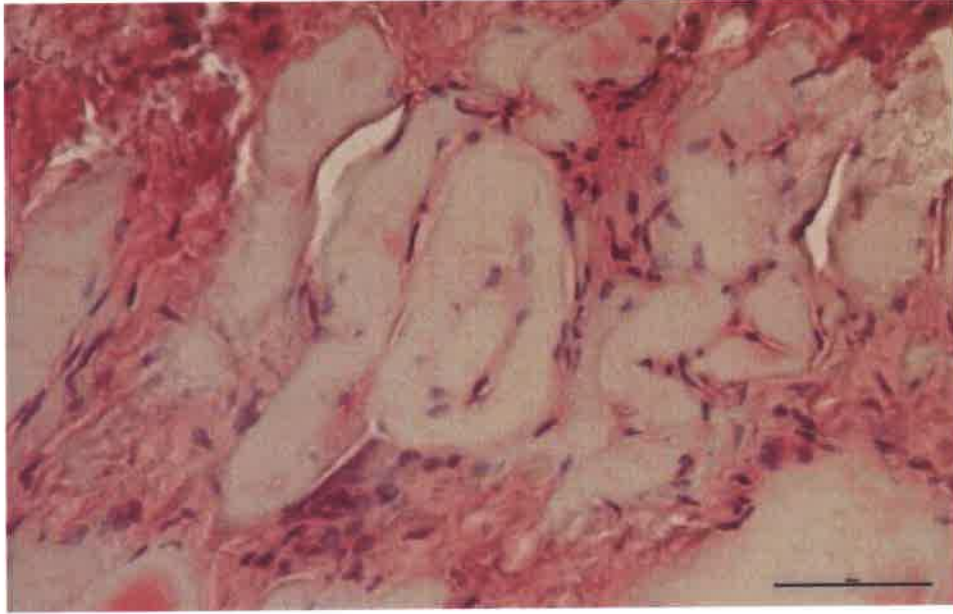
Sham grubu: Siçanların gastrokinemius kas dokularının histolojik analizleri sonucunda preperasyon artefaktları dışında dikkati çekecek herhangi bir yapısal ve inflamatuvar hücreler bakımından histolojik olarak değişikliğin gözlenmediği normal iskelet

kas dokusu görünümündeydiler (Şekil 33). Kas lifi organizasyon skorları ve inflamatuvar hücre infiltrasyonu skoru değerleri sırası ile grade 0,5 ve grade 0,7 değerlerinde bulundu.



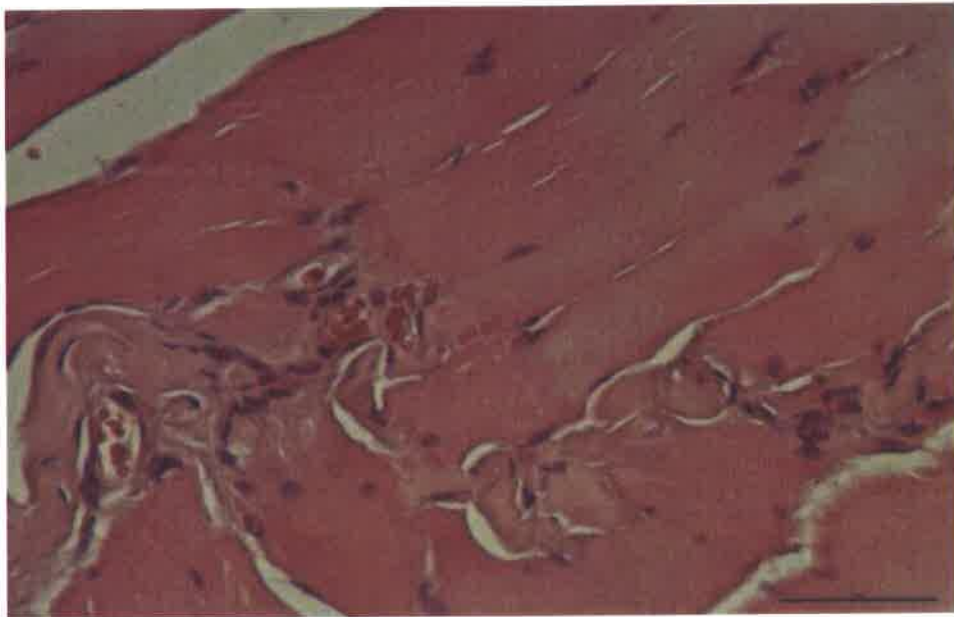
Resim 3. Sham grubu histolojik inceleme görüntüsü
(bar: 50.0µm, H&E).

İskemi reperfüzyon grubu: İskemi reperfüzyon gruplarında yapılan histolojik analizler sonucunda preperasyon artefaklarına ilaveten şiddetli hasarların olduğu ve kas lifleri organizasyonunun büyük çoğunluğunun bozulmuş olduğu iskelet kasların tipik histolojik görünümü olan A ve I bantlarının hücrelerin çoğunda kaybolmuş olduğu görüldü. Kas hücrelerinin çaplarının da normalden daha fazla genişlemiş olduğu ve hücre çekirdeklerinin normal konumları olan periferik yerleşimlerinin bozulmuş olduğu tespit edildi. Hücrelerinin soluk boyandıkları görüldü ve bu durumun muhtemelen kasılabilir miyoflamanlarının bozulmuş olmalarından kaynaklanmış olabileceği sonucuna varıldı. Çekirdek pozisyon değişiklikleri ve soluk boyanmalar ve hücre çapının normalden daha fazla artmış olduğu kas liflerinin enine kesit görüntülerinde daha bariz bir şekilde görülmüyordu. Bu hücresel görünümle uyumlu bir şekilde ekstrasellüler alanlarda yoğun bir şekilde kanamaların olduğu yabancı cisim dev hücrelerinin de yer yer görüldüğü inflamatuvar hücre infiltrasyonları belirgin bir şekilde dikkati çekmekteydi (Şekil 34).



Resim 4. İskemi-reperfüzyon grubu histolojik inceleme görüntüsü
(bar: 50.0 μ m, H&E).

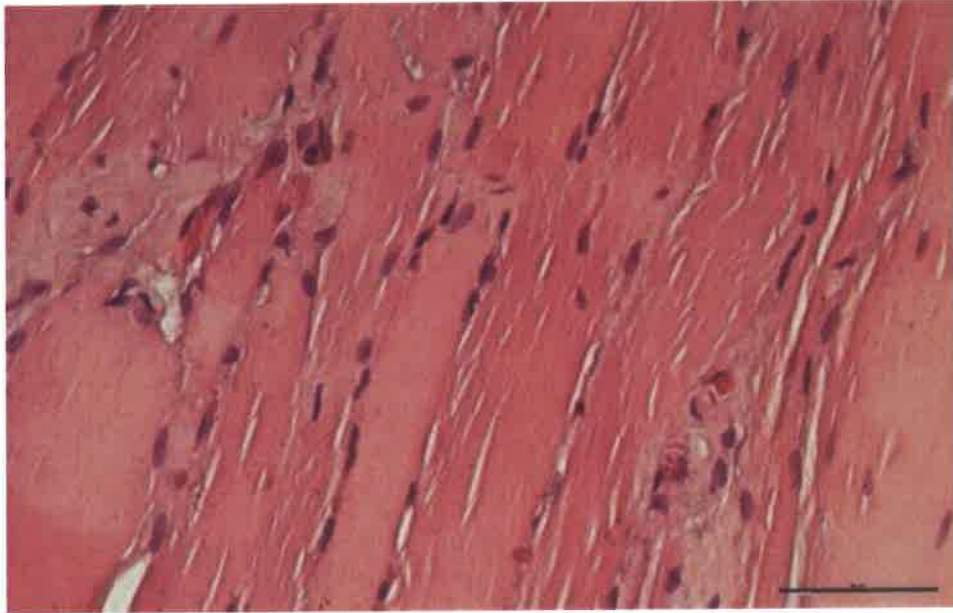
İskemik önkoşullama grubu: Bu grubu oluşturan sıçanlardan alınan kas örneklerinin yapılan ışık mikroskopik incelemelerinde; kas lifi hücresel hasarın pek fazla anlam ifade etmeyecek şekilde bir miktar fazla olduğu ancak her iki iskemi reperfüzyon grubundaki hasar skorlarının birbirlerine yakın olduğu tespit edildi (Şekil 35). Kas lifi organizasyon skorları ve inflamatuvar hücre infiltrasyonu skoru değerlerinin yapılan hesaplamalar neticesinde ortalama olarak 2 ile 2,5 arasında olduğu bulundu.



Resim 5. İskemik önkoşullama grubu histolojik inceleme görüntüsü
(bar: 50.0 μ m, H&E).

Krill yağı grubu I ve II: Tedavi gruplarının histolojik analizleri neticesinde kas lifi organizasyonlarının belirgin olmasa da düzleme eğiliminde oldukları görülmekteydi. Buna paralel olarak kas hücrelerinin A ve I bantları şeklindeki çizgilenmelerinde yer yer bozulmalar ve dejenerasyonlar olmakla birlikte genel olarak kas liflerinin enine çizgilenmelerinin korunduğunu veya korunma eğiliminde olduğunu ve kas dokusu organizasyonunun genel olarak korunduğunu gözlemledik. Kas lifi çekirdek pozisyonları ve hücre morfolojileri kontrol grubunda olduğu gibi normal görünümde olmasa da genel olarak çok ciddi bir deformasyonun olmadığı gözlemlendi. İskemi reperfüzyon grubundaki gibi hücrelerin boyanmalarının çok soluk olmadığı da gözlemlendi (Şekil 36). Preconditioning tedavi grubunun dikkati çekecek şekilde olmasa da kas lifi organizasyon hasarının çok hafif azalmış olduğu inflammatuar hücre infiltrasyonunun ise çok hafif artmış olduğu gözlemlendi (Şekil 37).

Tedavi grubunun mikroskopik analiz sonuçlarının hesaplanması neticesinde hem kas lifi organizasyon hem de inflammatuar hücre infiltrasyonları skorlarının grade 1 ile 1,5 arasında bir değerde olduğu hesap edildi. Böylelikle sonucun iskemi reperfüzyon grubundan ziyade kontrol grubuna yaklaşma eğiliminde olduğu tespit edilmiş oldu.



Resim 6. İ/R+KO grubu histolojik inceleme görüntüsü
(bar: 50.0µm, H&E).



Resim 7. İÖK+KO grubu histolojik inceleme görüntüsü
(bar: 50.0 μ m, H&E).

4.2.2. İmmünohistokimyasal bulgular

Semikantitatif HSCORE analizi: İmmünohistokimyasal boyama yapılan doku kesitlerinde beta aktin proteininin tanımlanmasını saptamak amacıyla semikantitatif değerlendirme sistemi kullanıldı. Bu maksat için antijen antikor reaksiyonu sonucu oluşan boyanmanın şiddetine göre bir skora skalası kullanıldı. Bu skalada boyanma şiddeti negatiften üç pozitif değere kadar toplam dört derecelendirme yapıldı. Skora sisteminde; (-): boyanma yok, (+): tespit edilebilir zayıf boyanma, (++) : orta şiddetli boyanma, (+++) : şiddetli boyanmanın olduğunu göstermektedir. Bu boyanma derecelerini gösteren skala kullanılarak çalışmaya dahil edilen sıçanların gastrokinemius kas dokularındaki beta aktin moleküllerinin immün boyanma şiddetleri değerlendirildi. İmmün boyanmanın şiddetine göre hücrelerin sayımları yapılarak sonuçlar semikantitatif olarak değerlendirildiler. Çalışmanın sonucunda immün boyanmanın kas doku hücrelerinde ve daha ziyade fibroblastlar başta olmak üzere kas dokusu çevresindeki bağ dokusu elamanları ve kan damarı hücrelerinde olduğu görüldü.

Tablo 9. Semikantitatif HSCORE analizlerinin sonuçları

SIÇANLAR	BOYANMA ŞİDDETLERİ				Bry BŞ SK	Grp BŞ SK	% BŞ SK	Pi	Bry HSCOR	Grup HSCOR
	0 (-)	1(+)	2(++)	3(+++)						
G1-1	20	30	43	45	1,82	1,55	45,47	85,51	241,03	205,01
G1-2	10	17	15	20	1,73		43,15	83,87	228,62	
G1-3	35	41	27	10	1,11		27,65	69,03	145,38	
G2-1	59	10	7	1	0,35	0,26	8,77	23,38	31,57	25,68
G2-2	60	12	5	0	0,29		7,14	22,08	28,39	
G2-3	63	11	0	0	0,15		3,72	14,86	17,07	
G3-1	18	7	2	2	0,59	0,41	14,66	37,93	60,17	52,02
G3-2	25	4	5	3	0,62		15,54	32,43	52,59	
G3-3	25	7	4	0	0,42		10,42	30,56	43,29	
G3-4	35	10	1	1	0,32		7,98	25,53	33,68	
G3-5	39	11	1	0	0,25		6,37	23,53	29,53	
G3-6	38	6	3	0	0,26		6,38	19,15	24,04	
G4-1	32	10	11	4	0,77	0,64	19,30	43,86	77,72	83,05
G4-2	25	19	11	2	0,82		20,61	56,14	102,43	
G4-3	43	16	9	4	0,64		15,97	40,28	66,01	
G4-4	52	7	8	0	0,34		8,58	22,39	30,07	
G5-1	20	15	4	1	0,76	0,78	19,05	52,38	92,20	99,32
G5-2	24	10	11	7	1,07		25,48	53,85	108,73	
G5-3	18	11	6	2	0,84		21,05	52,65	96,95	
G5-4	25	14	4	0	0,51		12,79	31,86	63,28	

Bry BŞ SK : Birey boyanma şiddeti skoru

Grp BŞ SK : Grup boyanma şiddeti skoru

% BŞ SK : Yüzde boyanma şiddeti skoru

i: boyanma yoğunluğu skorunu

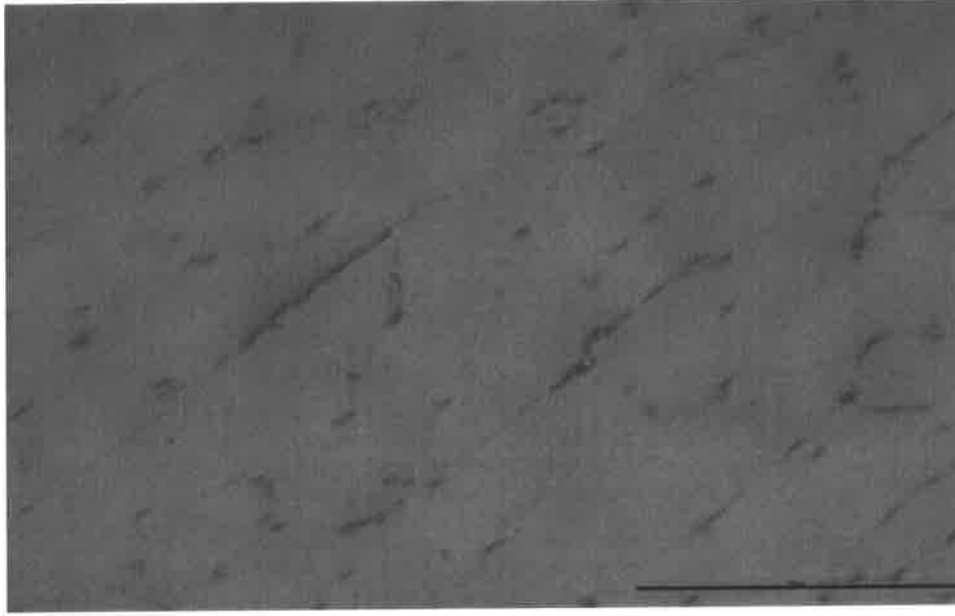
Pi: boyanan hücrelerin yüzdesi

HSCORE: $[\sum Pi(i+ 1)]$ (elde edilen sayım sonuçlarının hesaplanması için).

İmmunohistokimyasal boyama: İndirekt immunohistokimyasal boyama protokolü uygulanarak doku kesitlerinde beta aktin proteinleri immünojenik olarak işaretlenerek boyandı.

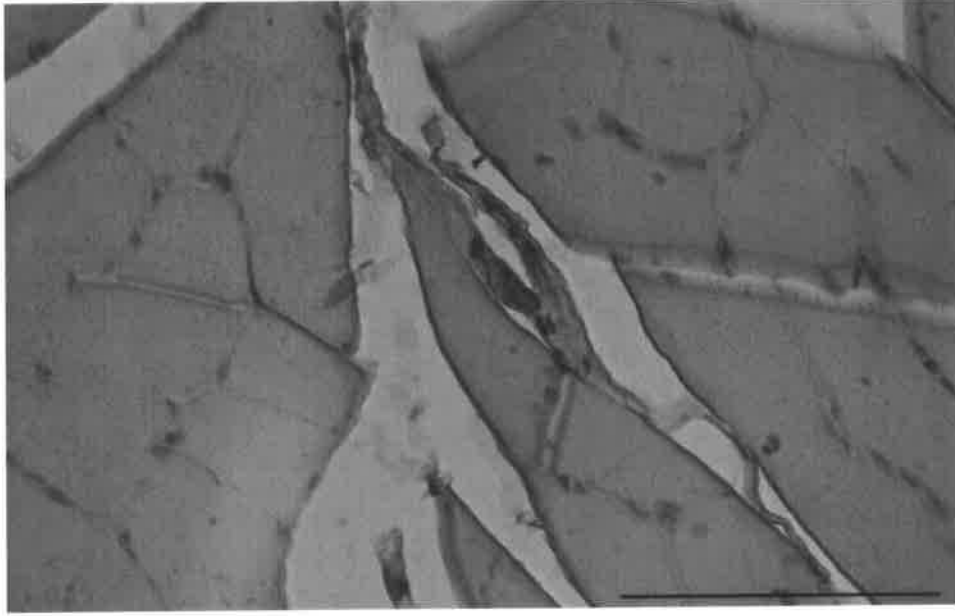
İskemi reperfüzyon hasarının krill yağı ile tedavisinde beta aktin proteinleri bakımından immunohistokimyasal olarak araştırılmasında tüm gruplarda immün boyanmanın az ya da çok kas lifi hücrelerinden ziyade hücrelerin çevresindeki bağ doku elamanlarında ve damarlar çevresindeki hücrelerde daha belirgin olarak boyandığı gözlemlendi. Grupların ayrı ayrı analizlerinde ise şu bulgular elde edildi.

Sham grubu: Sham grubu sıçanların kas dokularının immunohistokimyasal olarak β -Aktin proteini antikoru ile işaretlenmesi sonucunda hem kas lif hücrelerinde hem de kas lifi hücreleri dışındaki bağ dokusu hücreleri ve damar duvarı endotel ve düz kas hücrelerinde şiddetli immun reaksiyon gözlemlendi. Boyama şiddetlerinin hscore analiz yüzdelerinin yüksek olduğu hesap edildi.



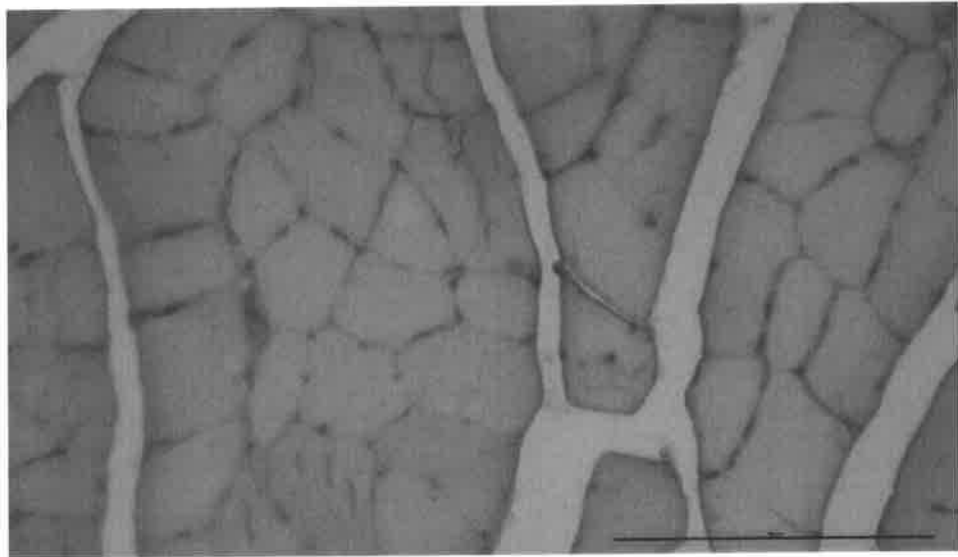
Resim 8. Sham gubu kas dokusu; güçlü İHC boyanma görüntüsü
(bar:100 μ m, x40)

İskemi reperfüzyon grubu: İskemi reperfüzyon gruplarında ise her ikisindeki immunohistokimyasal boyanma şiddetlerinin benzer olduğu ve boyanmanın şiddetinin çok azaldığı görüldü. Genelde boyanmanın olmadığı boyanan hücrelerin de ortalama bir (+) şiddetinde boyandıkları gözlemlendi. Bu grubun boyanma şiddeti hscore analizlerinin çok düşük oldukları tespit edildi.



Resim 9. İ/R grubu kas dokusu; zayıf İHC boyanma görüntüsü
(bar:100 μ m, x40)

İskemik önkoşullama grubu: İskemi reperfüzyon gruplarında ise her ikisindeki immunohistokimyasal boyanma şiddetlerinin benzer olduğu ve boyanmanın şiddetinin çok azaldığı görüldü. Genelde boyanmanın olmadığı boyanan hücrelerin de ortalama bir (+) şiddetinde boyandıkları gözlemlendi. Bu grubun boyanma şiddeti hscore analizlerinin çok düşük oldukları tespit edildi.

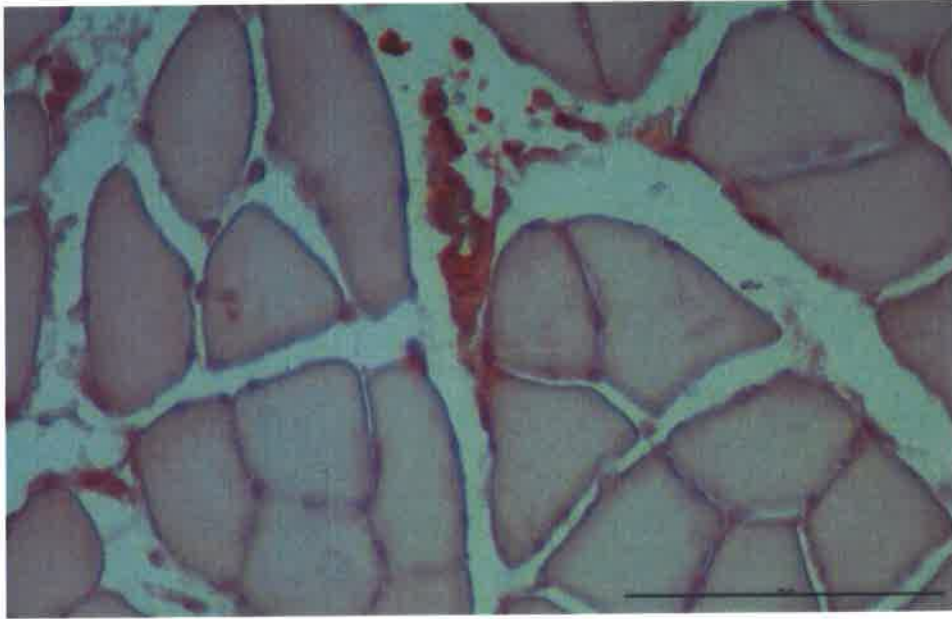


Resim 10. İÖK grubu kas dokusu; zayıf İHC boyanma görüntüsü
(bar:100 μ m, x40)

Krill yağı grubu I ve II: Tedavi gruplarının her ikisinin İHK analizlerinde immun boyanma şiddetlerinin birbirlerine yakın oldukları ve reaksiyon şiddetinin kontrol kadar yüksek olmadıkları iskemi reperfüzyon grubundaki kadar da düşük olmadıkları tespit edildi. Dolayısı ile immun boyanma şiddeti skor derecelerinin de iskemi reperfüzyon grubundakine oranla artmış olduğu hesap edildi.



Resim 11. İ/R+KO grubu kas dokusu; orta İHC boyanma görüntüsü
(bar:100µm, x40)



Resim 12. İÖK+KO grubu kas dokusu; orta şiddette İHC boyanma görüntüsü
(bar:100µm, x40)

5. TARTIŞMA

Organize edilen çalışmalarda yeterli vaka sayısına ulaşmak ve kullanılan tedavi modelinden, klinik neticelere ve kan biyokimyasına dayanan, indirekt parametrelerle sonuç çıkarmak çoğu kez son derece güçtür. Bu nedenle çoğu araştırmacı hayvan modeline yönelmiştir. Domuz, köpek, kedi, tavşan, sıçan gibi pek çok hayvanın kalp, karaciğer, beyin, retina, barsak, böbrek, akciğer, iskelet kası vb. pek çok dokusunda, çok sayıda çalışma yürütülmüştür (206-209). Sıçanda alt ekstremitte dolaşımı insan alt ekstremitesindeki dolaşımına çok benzerdir ve iskemiye direnç süresi de insana yakındır (210-212). Sıçanda abdominal aortaya veya ana femoral artere klemp konularak yapılan çalışmalar vardır. Bir kısım araştırmacılar da turnike yöntemi uygulamışlardır (210, 211, 213, 214). Sıçanda cilt aracılığı ile oluşan kollateraller sadece aorta veya direkt ana femoral artere klemp konularak yapılan çalışmalarda iskemiye direnç süresini artırmaktadır. Öte yandan turnike uygulaması venöz ve lenfatik dolaşımı engellemekte ayrıca 'ezilme hasarı' denilen turnikeye bağlı doku hasarını gündeme getirmektedir (213-216). Bu çalışmalarda sıçan alt ekstremitesinde yaklaşık 2-4 saat arasında iskemi süresini takiben vasküler klemp kaldırıldığında veya turnike uygulamasına son verildiğinde reperfüzyonun gerçekleştiği gösterilmiştir. Reperfüzyon sağlanabilirliği açısından direkt arteriel klemp veya turnike uygulaması arasında bir fark rapor edilmemiştir. Kas, kemik ve ciltten oluşabilecek kollateral akımın engellenmesi ve doğrudan ana femoral arterin klemlenmesini öneren modeller geliştirilmiştir (210-212). Yapmış olduğumuz çalışmamızda da ekstremitenin ana femoral arter ve ven dışında tüm dokuları disseke edildi ve doğrudan ana femoral arter klemlendi. Böylece turnike yönteminin yerine direkt olarak femoral arteri klemlenerek iskemiden ve reperfüzyondan emin olunması planlanmıştır. Bu yöntemle lenfatik dolaşım korunmuş ve ezilme hasarı engellenmiştir. Kollateral dolaşım doku diseksiyonu ile tamamen bloke edilmiştir.

Sıçan iskelet kasında 3,5-4 saate kadar iskemiye direnç olduğu, daha kısa süreli iskemilerde belirgin doku hasarı gelişmediği gösterilmiştir. 4 saatin üzerinde ise özellikle 6 saatten sonra oluşan hasar geri döndürülememektedir. Bundan arteriyel tıkanıklık giderildiği halde doku düzeyinde kan akımının tekrar sağlanamaması sorumlu tutulmaktadır. Reperfüzyon süresinin 1-2 saatten daha uzun olduğu çalışmalarda, dokuda ileri derecede nekroz görülmektedir ve histopatolojik bulgularla ve biyokimyasal sonuçlarla ayırma gitmek güçleşmektedir. 1 saatlik reperfüzyonda ise nekroz oranı son derece düşüktür (% 96) Ancak dokuda belirgin ödem, lökosit infiltrasyonu meydana gelmekte ve vasküler morfoloji bozulmaktadır (209,215). Bizim çalışmamızda hasarın bir göstergesi olan kas

liflerinde organizasyon bozukluğu ve dejenerasyonu ile birlikte inflamatuvar hücre infiltrasyon artışı gözlemlendi.

Yapılan çalışmalarda KO'nun anti-inflamatuvar, anti-aterojenik ve anti-oksidan özellikleri olduğu gösterilmiştir (197-200, 202-205.) KO ile ilgili yukarıda belirtilen konularda oldukça az çalışma bulunmakla birlikte İ/R sistemlerinde yararlılığının araştırıldığı herhangi bir çalışmaya rastlamadık.

Bozkurt ve ark. tarafından yapılan bir çalışmada iloprostun deneysel AİR (Aortik iskemik reperfüzyon) modelinde iskelet kası hasarına olan etkisinin araştırıldığı ve AİR + iloprost grubuna ait MDA değerlerinin, AİR grubundaki değerlere göre anlamlı düzeyde azaldığı bulunmuştur (217) Özyurt ve ark. yaptığı bir çalışmada Kafeik asit fenetil ester (Caffeic acid phenethyl ester, CAPE)'nin deneysel AİR modelinde iskelet kası hasarına olan etkisinin araştırıldığı ve AİR + CAPE grubuna ait MDA değerlerinin, AİR grubundaki değerlere göre anlamlı düzeyde azaldığı bulunmuştur (218). Akbaş ve arkadaşlarının yaptığı bir çalışmada karvedilol'ün deneysel AİR modelinde iskelet kası hasarına olan etkisinin araştırıldığı ve AİR+ karvedilol grubuna ait MDA değerlerinin AİR grubundaki değerlere göre anlamlı düzeyde azaldığı bulunmuştur (219). Erdem ve ark., melatoninin iskelet kası İ/R hasarına etkisini araştırdıkları çalışmalarında, sıçanlara reperfüzyondan 24, 48, 60 dakika önce intraperitoneal olarak verilen melatoninin hem histopatolojik hem de hasarı göstermede yaygın olarak kullanılan biyokimyasal parametrelerden (MDA, NO) yola çıkarak reperfüzyon hasarına karşı koruyucu etkisini vurgulamışlardır (220). Yapmış olduğumuz çalışmada İ/R uygulanan grupta MDA düzeyi 2.627 nmol/gr yaş doku bulunurken, melatonin uygulanan grupta MDA düzeyi 1.763 nmol/gr yaş doku bulunmuştur. Sıçanlara femoral arter oklüzyonundan 60 dakika önce intraperitoneal olarak verdiğimiz KO'nun koruyucu etkisini araştırdığımız bu tez çalışmamızda ise İ/R uygulanan grupta MDA düzeyi 9.88 nmol/gr yaş doku bulunurken, KO ve İÖK uygulanan gruplarda MDA düzeyi 7.94 nmol/gr yaş doku bulunmuştur. KO ve İÖK'nin birlikte uygulanmasının faydalı bir sonuç doğurduğu ve lipid peroksidasyonunu azalttığını söyleyebiliriz. Bunun yanında; Köksel ve ark., rat İR modelinde, serum MDA düzeyleri bakımından İR ve İR+iloprost grupları arasında anlamlı fark saptamamışlardır (221). Yine başka bir araştırmada, AİR sonrası dokudaki ölçülen MDA değerinin anlamlı derecede yükseldiği görülmüştür. (222). Kril yağının içeriğinde bulunan astaksantin de daha çok lipid peroksidasyonuna karşı koruyucu antioksidan özelliği ile bilinmektedir. Bu sonuçlar da bunu doğrulamaktadır.

Kas hasarına duyarlılığı en yüksek olan ve klinik olarak en çok kullanılan enzim kreatin kinaz (CK) veya diğer adıyla kreatin fosfokinaz (CPK)'dir. Tiryakioğlu ve ark.

tarafından yapılan çalışmada (223), iloprost ve N-asetil sistein'in iskelet kası iskemi reperfüzyon hasarına karşı etkisini total antioksidan durum (TAS), total oksidan durum (TOS), kreatin kinaz (CK) ve laktat dehidrojenaz (LDH) gibi biyokimyasal parametrelerle çalışmış ve bu ajanların kas dokusunu koruduğu, hasarı azalttığı sonucuna varmışlardır. Ayrıca çalışma diğer sistematik etkilerin ve yararlı hücresel etkilerinin klinik çalışmalar ile araştırılmasının faydalı olacağı kanaatini taşımaktadır.

Bir çalışmada AİR sonrası dokudaki ölçülen NO değerinin anlamlı derecede yükseldiği görülmüştür. AİR+VEGF ve AİR+ADM grubundaki iskelet kası doku NO değerinin AİR grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı derecede düşük olduğu görülmüştür.(222). Akbaş ve ark. yaptığı çalışmada iskemi sonrası verilen karvedilolün NO seviyesini oldukça düşüğü görülmüştür (219). Bizim yaptığımız çalışmaya çok yakın fikirde çalışılmış iki (218-220) araştırma mevcuttur. Bunlar femoral arterin klemplenmesi ile oluşturulan iskelet kası iskemi reperfüzyonu ve hasarın derecesini ölçen, dokuyu koruyarak hasarı azaltmayı amaçlayan, ancak farklı ajan, farklı tedavi stratejileri üzerinde yoğunlaşmış çalışmalardır. Yapmış olduğumuz çalışma da bunlardan biridir. Bu iki çalışmada da kas dokusunda NO seviyelerinin arttığı gözlenmiştir. Çalışmamızda İ/R uygulanan grupta NO seviyesi 0.95 µmol/gr yaş doku bulunurken, KO uygulanan grupta NO seviyesi 0.90 µmol/gr yaş doku ve KO+İÖK uygulanan grupta 0.78 µmol/gr yaş doku bulunmuştur. Birlikte uygulanan bu tedavi stratejilerinin çok daha pozitif bir sonuç doğurduğu ve yukarıdaki çalışmaların sonuçları ile paralellik içinde olduğu görülmektedir.

Akbaş ve arkadaşlarının karvadilol'ün antioksidan etkisini araştırdığı çalışmasında (219), turnike ile sağlanan 4 saatlik iskemi periyodunun ardından 2 saat reperfüzyona maruz bırakılan sıçanların kan örnekleri alınarak SOD, GSH-Px antioksidan enzim düzeylerine bakılmıştır. İskemi ve iskemi+karvadilol gruplarını karşılaştırdığımızda hem SOD hem de GSH- Px düzeylerinin iskemi grubunda oldukça düşük olduğu ve tedavi grubunda ise enzim düzeylerinin artış göstererek neredeyse kontrol grubuna yakın değerlere ulaştığı görülmüştür. Başka bir çalışmada (224) alt ekstremitte İ/R modelinde, melatonin ile tedavi edilen reperfüze dokularda GSH (glutasyon) seviyelerinde artış tespit ettiklerini bildirmiştir. Uz ve arkadaşları da (226), E vitamini ve CAPE ile tedavi edilen reperfüze dokularda E vit+ İ/R grubunda enzim aktiviteleri sham grubuna çok yakın iken CAPE+İ/R grubunda her üç enzimin aktivitesinin arttığını bildirmişlerdir. Karaciğer iskemi reperfüzyon(227) ve böbrek iskemi reperfüzyon(228) çalışılan iki araştırmada, antioksidan enzim aktiviteleri ile ilgili ortak bir kanıya ulaşılmıştır. Reperfüzyon sonrasında antioksidan enzim aktivitesinin düştüğünü ve bu durumun artan oksidatif stres nedeniyle bu enzimlerin kullanımının artmasından kaynaklanabileceğini ileri sürmüşlerdir. Bu, yukarıdaki paragrafta geçen

çalışmaları doğrular niteliktedir. Ancak yukarıdaki çalışmalardan farklı olarak aydın ve ark., İR sonrası kas dokusunda SOD, CAT, GSH-Px ve serumda GSH-Px antioksidan enzim seviyelerinin anlamlı düzeyde yükseldiğini saptamıştır. Ancak İR+proantosiyanidin ve İR+iloprost grubunda, kas dokusu SOD, GSH-Px ve serum GSH-Px düzeyleri kontrol (İR) grubundaki düzeylere göre düşük olduğu görülmüştür. Bununla birlikte İR+proantosiyanidin grubundaki kas dokusu CAT düzeyleri ise kontrol grubuna benzer sonuçlanmıştır. İR+ proantosiyanidin+iloprost grubunda ise kas dokusu SOD, CAT, GSH-Px değerlerinde kontrol grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı bir azalma görülmüştür. Kas dokusundaki İR hasarında iloprost ve pronantosiyanidin ile antioksidan enzimlerde bir azalma meydana geldiği saptanmıştır. (229) Sonuç olarak iloprost ve proantosiyanidin verilen gruplarda antioksidan enzim düzeyleri daha düşük olduğu saptanmıştır. Bunu ise “antioksidan enzim düzeylerinde azalmanın, iloprost ve proantosiyanidin kas dokusunda oksidan yanıtı ve SOR oluşumunu azaltmasıyla ilişkili olabileceği düşünülmektedir” şeklinde yorumlamışlardır. (229) Başka bir çalışmada, AİR grubunda alt ekstremite iskelet kası dokusunda SOD aktivitesinde istatistiksel olarak anlamlı yükselme saptandı, ancak AİR+VEGF grubunda SOD aktivitesinde istatistiksel olarak anlamlı azalma saptanmadı. AİR+ADM grubunda istatistiksel olarak anlamlı bir azalma olduğu görüldü (222). Bu durumu ise, “AİR +ADM grubunda SOD düzeyinde belirgin azalma olması, ancak AİR+VEGF grubunun kontrol seviyesine inmemesi, oksidatif stresin VEGF uygulanan grupta azaldığını ancak tamamen ortadan kalkmadığını düşündürmektedir. AİR+ADM uygulanan grupta normale yakın bir seviyeye düşmüş olması ilacın etkin olduğunu düşündürmektedir” şeklinde ifade ederek netleştirdiler. Aynı çalışmada AİR grubunda alt ekstremite iskelet kası dokusundaki KAT aktivitelerinde, kontrol grubuna göre rakamsal olarak artma saptanmıştır. AİR + ADM ve AİR+VEGF grubunda da AİR grubuna göre rakamsal azalma saptanmıştır, fakat istatistiksel olarak anlamlı değildir. (222). Özyurt ve arkadaşları da yaptıkları iskelet kası İR çalışmasında reperfüzyon sonrası kas dokusunda SOD ve CAT antioksidan enzim aktivitelerini yüksek bulmuşlardır. Erdem ve ark. yaptıkları iskelet kası İR çalışmasında (220) ise, reperfüzyon sonrası İR grubundaki kas dokularında SOD, CAT ve GSH-Px antioksidan enzimlerin aktivitesinde artış gösterdiğini bildirmiştir. Erdem ve ark. bu durumu çalışmalarında; “İskemi/reperfüzyon grubunda reperfüzyon sonrası antioksidan enzimlerdeki bu artış; İR olayında aşırı üretilen ROR’ların, antioksidan savunma sistemini uyararak ve antioksidan enzimler olarak bilinen CAT, SOD ve GSH-Px enzimlerin ekspresyonunda artışa neden olarak, antioksidan savunma sistemini güçlendirmektedir. Böylece, reperfüzyon sonrası iskelet kasında oluşan yüksek miktardaki serbest radikalleri detoksifiye etmek için vücudun oluşturduğu

kompanse edilebilir bir mekanizma ile daha fazla antioksidan enzim üretimi gerçekleşmektedir ve bu sonuç Özyurt ve arkadaşlarının (218) iskelet kası İ/R çalışmasını desteklemektedir” şeklinde ifade etmişlerdir. O halde Erdem ve arkadaşlarının bu ileri sürdükleri sav ile ilgili şunu vurgulamak gerekir. Organizmada devamlı olarak SOR oluşmasına rağmen antioksidan savunma sistemleri ile oksidasyon arasındaki dinamik dengeden dolayı zararlı etkiler ortaya çıkmaz (222).

Çalışmamızda da reperfüzyon sonrası İ/R grubunda SOD, CAT ve GSH-Px antioksidan enzimlerin aktivitesi azalırken, İ/R+KO grubunda SOD, CAT ve GSH-Px antioksidan enzimlerin aktivitesinde artış tespit edildi (Şekil 25-27, 29, 30). KO'nun hangi mekanizma ile kas antioksidan enzimlerinin aktivitelerini arttırdığı en azından şu anda bilinmemektedir. Bulgulardan yola çıkarak KO'nun antioksidan bir madde olarak görev aldığı söylemek zor değil. KO'nun direkt olarak serbest radikal süpürücü etkisi ile veya dolaylı yoldan antioksidan savunma sistemlerini güçlendirerek etki ettiğini genel bir ifade ile söyleyebiliriz. Ancak KO'nun enzim aktivitelerini artırması tek başına antioksidan savunma sistemini uyararak gen ekspresyonunu artırdığı anlamına gelmeyebilir, çünkü fizyolojik ve patolojik koşullarda aktiviteyi etkileyen pek çok sebep vardır. Hangi mekanizma ile etki ettiğini bilmek son derece önemli. Bunu biliyor olsaydık, antioksidan madde olarak KO'nun hangi yönüyle etki ettiğini de biliyor olurduk. Etkilerini serbest radikal oluşumunu baskılayarak mı, lokal oksijen konsantrasyonunu azaltarak mı, hidroksil radikallerini temizleyip lipid peroksidasyonunun başlamasını önleyerek mi, geçiş metal iyonlarını bağlayıp etkisizleştirerek mi, peroksitlerin alkol gibi nonradikal ürünlere dönüşümünde etkin rol oynayarak mı, zincir reaksiyonlarına neden olan tüm radikallerle reaksiyona girip zinciri kırarak mı gösteriyor? Bu çalışma araştırdığımız maddenin etki mekanizmalarının aydınlatılmasına ve böylece soruların cevaplarının aydınlatılmasına da zemin hazırlayacaktır.

İskemi- reperfüzyon (İR) hasarına karşı koruma amaçlı oluşturulacak koruyucu uyarı şiddetli ve hasara yol açan iskemiden önce (iskemik önkoşullama) veya reperfüzyonun başlangıcı esnasında (iskemik ardkoşullama) ortaya çıkarılabilir (230). Açık kalp cerrahisinde iskemik önkoşullamanın iskemik miyokard hasarına etkisinin araştırıldığı bir çalışmanın sonuçlarına göre, çalışma grubu hastalarının işlem sonrası serum MDA düzeyleri preop değerlerine göre düşük çıkmıştır. Kontrol grubu hastalarının ise serum MDA değerleri preoperatif MDA değerlerine göre yüksek çıkmıştır. Çalışma ve kontrol grubunun preoperatif serum MDA düzeylerinde anlamlı bir fark yoktur. Çalışma grubunun işlem sonrası serum MDA değerleri kontrol grubuna göre belirgin düşük bulunmuş ve istatistiksel olarak anlamlı çıkmıştır (231).

İskemik önkoşullamanın koruyucu etkisi iskelet kasında da gösterilmiştir (232). Önkoşullamanın yalnız infarkt büyüklüğünü azaltmadığı, aynı zamanda da kas fonksiyonu da düzelttiği ortaya konmuştur (233). Mekanizma yine tam olarak belli olmamakla beraber, adenozin ve K_{ATP} kanallarının rolü olduğunu gösteren çalışmalar bulunmaktadır (234). İskelet kasında da iskemik hasar, özellikle revaskülarizasyon ve flap transplantasyon operasyonlarında sorun yaratmaktadır. Yapılan ön çalışmalar, muskulokütanöz flaplarda iskemik önkoşullamanın yarar sağladığını göstermektedir (235). Rat alt ekstremitte İ/R modelinde iskemik önkoşullamanın erken dönem etkilerinin araştırıldığı çalışmada, MDA ve NO parametreleri ölçülmüştür. Doku MDA seviyesinin kontrol grubunda en yüksek olduğu tespit edilmiştir. Doku NO seviyeleri incelendiğinde gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı farklılık tespit edilmemekle birlikte değerlerin sham grubunda en düşük olduğu görülmüştür. Diğer parametrelerin de ışığında iskemik koşullama modellerinde kontrol grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı olmamasına rağmen erken dönemde doku hasarının daha az olduğunu bildirmişlerdir. İskelet kası İ/R hasarına karşı iskemik önkoşullamanın etkisinin incelendiği çalışmada MDA, NO ve CAT parametrelerinin yanında MPO ve KASPAZ-3 parametreleri de ölçülmüştür. Hemen hemen İÖK gruplarının tamamı İ/R grupları ile karşılaştırıldığında doku biyokimyasal markırlarının arttığını bildirmişlerdir. Sonuçlar istatistiksel olarak da anlamlı çıkmıştır ($p<0.05$). İÖK'nın histolojik hasar skorlarını düşürdüğü ($p<0.05$) görülmüştür. Apoptoz skorlarını karşılaştırdıklarında ise en yüksek skorun İ/R grubunda, en düşük skorun ise İÖK gruplarında olduğunu bildirmişlerdir (236). Önkoşullamanın da iskelet kasında koruyucu bir etkiye sahip olduğunu ve İÖK'nın ve preiskemik adenozin davranışının kas infarktüsünü sırasıyla %40 ve %64 oranında azalttığı ortaya konulmuştur (237). İskelet kasında da iskemik hasar, özellikle revaskülarizasyon ve flap transplantasyon operasyonlarında sorun yaratmaktadır. Yapılan ön çalışmalar, muskulokütanöz flaplarda iskemik önkoşullamanın yarar sağladığını göstermektedir (64). Çalışmamızda iskemik önkoşullamanın koruyucu etkisi iskelet kasında da gözlemlendi. İÖK uygulanan grupta SOD, GSH-Px ve CAT antioksidan enzim aktivitesinde, İ/R grubuna göre artış tespit edildi. MDA ve NO gibi reperfüzyon hasarının göstergesi olan ROÜ seviyelerinin İ/R+İÖK grubunda, İ/R grubundan düşük bulundu.

İskemi aracılı nötrofil aktivasyonu ile buna eşlik eden ROR üretimi ve kompleman sisteminin aktivasyonu IL-1 β , IL-6, TNF- α gibi proinflamatuvar sitokinlerin üretimi ve salınımına neden olarak inflamatuvar yanıt oluşturmaktadır (24).

Çalışmamızda İÖK ve KO'nun, İ/R'daki inflamatuvar yanıtı baskılayarak iskemi reperfüzyon hasarını azaltıp azaltmayacaklarının belirlenmesinden ziyade hasarın çalışma

kaynaklı olup olmadığının belirlenmesi amaçlandı. İ/R grubunda TNF- α değerlerinin tüm çalışma gruplarından yüksek olduğu tespit edildi. İ/R grubunda TNF- α düzeyinin arttığını, İÖK'nın bu düzeyi azalttığını, tedavi gruplarında ise sham seviyesinde olduğunu görmekteyiz (Şekil 31). Buradan, uygulanan koruyucu yöntemlerin ya doğrudan TNF- α üretimini veya salınımını baskıladığı ya da dolaylı olarak ROR üretimini veya kompleman sistemini inaktive ettiği düşünülebilir. Ancak bundan daha da önemlisi; istatistiksel olarak anlamlı olmayan bu bulguların, sadece tedavi gruplarına intraperitoneal olarak verilen bu jelimsi maddenin inflamasyona neden olmadığını göstermesidir. Bu da İ/R hasarının inflamasyon kaynaklı olmadığı, iskemi periyodunu izleyen reperfüzyon kaynaklı olduğunu göstermektedir. Diğer taraftan istatistiksel olarak anlamlı olmayan IL-6 düzeylerinde gruplararası bir değişme görülmedi (Şekil 32). Sıçanda iskelet kası iskemi reperfüzyon modeli oluşturulup İÖK ve N-asetilsistein'in inflamatuvar süreç üzerine olan etkisinin izlendiği bir çalışmada İ/R grubunda TNF- α değerlerinin tüm çalışma gruplarından anlamlı derecede yüksek olduğunu, IL-6 değeri için bu farkın istatistiksel bir anlamlılık göstermediği bildirilmiştir. Her iki çalışma grubunda IL-6 düzeyinin, TNF- α düzeyi kadar belirgin düşmemesinin nedeni kan örneklerinin inflamasyonun erken döneminde alınmasına bağlanmıştır. Sıçan alt ekstremitte iskemi reperfüzyon modelinde İÖK'nın ve İAK'nın etkisinin incelendiği başka bir çalışmada da serum sitokin değerleri (TNF- α , IL-6 ve IL 1- β) belirlenmiştir. IL-6 değerleri incelendiğinde yine İ/R grubunda diğer gruplara kıyasla daha yüksek değerler elde edildiği görülmekle beraber fark istatistiksel olarak anlamlı bulunmamıştır. TNF- α açısından sonuçlar incelendiğinde gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı fark olmadığı ancak en düşük değerlerin İAK grubunda olduğu gözlemlenmiştir. Bu bulguları göz önüne alarak İÖK yöntemlerinin İ/R ile ilişkili inflamatuvar hasarı azaltabileceği sonucuna ulaşılmıştır.

6. SONUÇ VE ÖNERİLER

Sonuç olarak, tedavi gruplarında reperfüzyon hasarının göstergesi olan MDA ve NO⁻ seviyelerinin İ/R gruplarında artması serbest radikallere bağlı lipid peroksidasyonun olduğunu göstermektedir. KO ve İÖK anlamlı şekilde MDA, NO düzeylerini azaltmıştır. KO ve İÖK direkt veya indirekt bir mekanizma ile patolojik dokuda enzim aktivitelerinde anlamlı artışa neden olmuştur. Histolojik incelemede, kas dokusunda inflamatuvar hücre infiltrasyonunun artışı, kas lifinde organizasyon bozukluğu ve dejenerasyon gözlenmesi; immünohistokimyasal incelemede boyanma şiddetinin azalması bu biyokimyasal sonuçları desteklemekte idi. Tedavi uygulamaları histolojik skorlar, immünohistokimyasal skorlar ve biyokimyasal parametrelerde anlamlı düzelme sağladı. Bunlar neticesinde krill yağının antioksidan etkiye sahip olduğunu, iskemik önkoşullamanın iyi bir tedavi stratejisi olduğunu söylemek yanlış olmaz.

İskelet kası reperfüzyon hasarlarında KO ve İÖK'nin ayrı ayrı veya kombine olarak kullanılmasının iskelet kas dokusunda tam veya kısmi faydası olabileceği kanaatindeyiz. İskemik önkoşullamanın klinik ortamda kullanımıyla ilgili deneyimler sınırlıdır. Bu araştırmanın, tedavi stratejilerimizin klinik çalışmalarla desteklenerek hayata geçirilmesi için iyi bir kaynak olacağı, ayrıca krill yağının mekanizmasının aydınlatılarak yeni ilaçların geliştirilmesine zemin hazırlayacağı görüşündeyiz.

7. KAYNAKLAR

1. Opie L.H., Phil D., 1989, Reperfusion injury and its pharmacologic modification: *Circulation*. 80(4) , 1049-1061.
2. Reilly P.M., Schiller H.J., Bulkley G.B., 1991. Pharmacologic approach to tissue injury mediated by free radicals and other reactive oxygen metabolites. *Am.J.Surg.* 161, 488-503.
3. Rubin B.B., Romaschin A., Walker P.M., Guet D.C., Korthuis R.J., 1992. Mechanisms of postischemic injury in skeletal muscle. *Intervention Strategies: J. Appl. Physiol.* 80 (2), 369-387.
4. Ergün Y., arşiv- 2006. Çizgili kas iskemi-reperfüzyon hasarı ve nitrik oksit ile ilişkisi. 15, 133-157.
5. Köksal C., Bozkurt A.K., Cangel U., 2003. Attenuation of ischemia reperfusion injury by N-acetylcysteine in a rat hind limb model. *J Surg Res.* 111(2), 236-9.
6. Cotran R.S., Kumar V., Robbins S.L., 1994. Robbins-Pathologic Basis of Disease, Fifth edition, W.B. Philadelphia Pennsylvania: Saunders Company. 1, 34
7. Kouchoukos N., Blackstone E., Doty D., et al., 2003. *Kirklin/Barratt-Boyes Cardiac Surgery*, Third edition, Philadelphia, Pennsylvania: Churchill Livingstone. 131-153.
8. Lindsay T., Romaschin A., Walker P.M., 1989. Free radical mediated damage in skeletal muscle. *Microcirc Endothelium Lymphatics.* 5, 157-170.
9. Hearse D.J., Humphrey R.M., Chain E.B., 1973. Abrupt reoxygenation of the anoxic potassium arrested rat heart: A study of myocardial enzyme release. *J Mol Cell Cardiol.* 5, 395-407.
10. Wright J.G., Fox D., Kerr J.C., et al, 1988. Rate of reperfusion blood flow modulates reperfusion injury in skeletal muscle. *J Surg Res.* 44, 754-763.
11. Atahan E., Ergün Y., Kurutaş E.B., ve ark, 2007. Ischemia-reperfusion injury in rat skeletal muscle is attenuated by zinc aspartat. *J Surg Res.* 137, 109-116.
12. Gute D.C., Ishida T., Yarimizu K., et al, 1998. Inflammatory responses to ischaemia and reperfusion in skeletal muscle. *Mol Cell Biochem.* 179, 169-187.
13. Sağlam M., Aştı R.N., Özer A., 2001. Genel Histoloji, 6. Baskı, Yorum Matbaacılık, Ankara.
14. Johnson K. E., 1991. *Histology and Cell Biology*. 2 nd. edition, Harwall Publ.
15. Pearson, A. M. and Young, R. B., 1989. *Muscle and Meat Biochemistry*. Food Science and Technology, United Kingdom Edition Published by Academic Press Limite, London.

16. Dukes H.H., 1943. The physiology of domestic animals. 5 th. Ed. Comstock, Ithaca, New York.
17. Moore K.L., Persaud T.V.N., 2002. Klinik Yönleri ile İnsan Embriyolojisi, Çev. Ed.: Yıldırım M., Okar İ., Dalçık H., 1. Baskı, Nobel Tıp Kitabevleri, İstanbul.
18. Maltin, C. A., Delday, M. I., Sinclair, K. D., Steven, J., Sneddon, A. A. 2001. Impact of manipulations of myogenesis in utero on the performance of adult skeletal muscle. *Reproduction*. 122, 359–374.
19. Meyer K.C..2005. Aging. *Proc Am Thorac Soc*. 2, 433-439.
20. Sadler T.W., 2005. Langman's Medikal Embriyoloji, Türkçe çeviri; A. Can Başaklar, 9. Baskı, Palme Yayıncılık, Ankara.
21. Solomon M.B. ve Dunn M.C., 1986. Simultaneous histochemical determination of three fiber types in single sections of ovine, bovine and porcine skeletal muscle. *Journal of Animal Science*. 66, 255–264.
22. Rehfeldt C., Fiedler I., Stickland N. C., 2004. Number and size of muscle fibres in relation to meat production. In: *Muscle Development of Livestock Animals: Physiology, Genetics and Meat Quality*.
23. Ross M.H., Kaye G.I., Pawlina W., 2003. *Histology A Text and Atlas*, 4th ed., Lippincot Williams&Wilkins, Printed in USA.
24. Eltzhig H.K., Collard C.D., 2004. Vascular ischemia and reperfusion injury. *Br Med Bull*. 70, 71-86.
25. Kierszenbaum A.L., 2006. *Histoloji ve Hücre Biyolojisi, Patolojiye Giriş*, Çev. Ed.: Demir R., Palme Yayıncılık, Ankara.
26. Gartner L.P., Hiatt J.L., 2000. *Color Textbook of Histology*, 3rd ed., Lippincot Williams&Wilkins, Printed in USA.
27. Kawada S., Tachi C., Ishii N., 2001. Content and localization of myostatin in mouse skeletal muscles during aging, mechanical unloading and reloading, *Journal of Muscle Research and Cell Motility*. 22, 627-633.
28. Ross M.H., 2011. *Histology: a text and atlas: with correlated cell and molecular biology*. 6 ed. : Lippincott Williams & Wilkins
29. McArdle W.D., Katch F.I, Katch L.V., 2007. *Exercise Physiology, Energy, Nutrition&Human performance.*, Lippincott Williams&Wilkins, Philadelphia.
30. Mescher A.L., 2010. *Junqueira's Basic Histology, Text and Atlas*, Mc Graw Hill, 12th ed., International edition.

31. Gartner L.P., Hiatt J.L., 2009. Renkli Histoloji Atlası, Çev. Ed.: Dağdeviren A., Müftüoğlu F.S., Karabay G., 4. Baskı, Güneş Tıp Kitabevleri, Ankara
32. Kierszenbaum A.L., 2006. Histoloji ve Hücre Biyolojisi, Patolojiye Giriş, Çev. Ed.: Demir R., Palme Yayıncılık, Ankara.
33. Moyer, A.L. and Wagner K.R., 2011. *Regeneration versus fibrosis in skeletal muscle*. Current opinion in rheumatology. 23(6), 568-73.
34. Listrat A., Picard B., Geay Y., 1998. Age-related changes and location of type I, III and IV collagens during skeletal muscle development of double-muscle and normal bovine fetuses., Journal of Muscle Research and Cell Motility. 19, 1-14.
35. Gillies A.R. and Lieber R.L., 2011. *Structure and function of the skeletal muscle extracellular matrix*. Muscle & nerve. 44(3), 318-31.
36. Serrano A.L., et al., 2011. *Cellular and molecular mechanisms regulating fibrosis in skeletal muscle repair and disease*. Current topics in developmental biology. 96, 167-201.
37. Mauro A., 1961. *Satellite cell of skeletal muscle fibers*. The journal of biophysical and biochemical cytology. 9, 493-5.
38. DiMario J.X., 2012. *Myogenesis-Methods and Protocols*, ed. J.M. Walker. Humana Press.
39. Ross M.H., 2011. *Histology: a text and atlas: with correlated cell and molecular biology*. 6 ed . Lippincott Williams & Wilkins.
40. Schiaffino S., 2008. *Skeletal Muscle Repair and Regeneration* Springer.
41. Natarajan A., Lemos D.R., and Rossi F.M., 2010. *Fibro/adipogenic progenitors: a double-edged sword in skeletal muscle regeneration*. Cell cycle. 9(11), 2045-6.
42. Huard J., Li Y., and Fu F.H., 2002. *Muscle injuries and repair: current trends in research*. The Journal of bone and joint surgery. American volume. 84 (5), 822-32.
43. Ovalle W.K., Nahirney P.C., 2009. Netter Temel Histoloji, Çev. Ed.: Müftüoğlu S, Kaymaz F., Atilla P., Güneş Tıp Kitabevleri, Ankara.
44. Chazaud B., et al., 2009. *Dual and beneficial roles of macrophages during skeletal muscle regeneration*. Exercise and sport sciences reviews, 37(1), 18-22.
45. Rantane J., et al., 1995. *Denervated segments of injured skeletal muscle fibers are reinnervated by newly formed neuromuscular junctions*. Journal of neuropathology and experimental neurology. 54(2), 188-94.
46. Mann C.J., et al., 2011. *Aberrant repair and fibrosis development in skeletal muscle*. Skeletal muscle. 1(1), 21.

47. Ciciliot S. and Schiaffino S., 2010. *Regeneration of mammalian skeletal muscle. Basic mechanisms and clinical implications*. Current pharmaceutical design. 16(8), 906-14.
48. Schmalbruch H., 1976. *The morphology of regeneration of skeletal muscles in the rat*. Tissue & cell. 8(4), 673-92.
49. Kääriäinen M., et al., 2000. *Relation between myofibers and connective tissue during muscle injury repair*. Scandinavian journal of medicine & science in sports. 10(6), 332-337.
50. Kääriäinen M., et al., 1998. *Correlation between biomechanical and structural changes during the regeneration of skeletal muscle after laceration injury*. Journal of orthopaedic research. 16(2), 197-206.
51. Jarvinen, T.A., et al., 2005. *Muscle injuries: biology and treatment*. The American journal of sports medicine. 33(5), 745-64.
52. Huijing P., Campagne A., and Koper J., 1989. *Muscle architecture and fibre characteristics of rat gastrocnemius and semimembranosus muscles during isometric contractions*. Cells Tissues Organs. 135(1), 46-52.
53. Zhang F., Sones W.D., and Lineaweaver W.C., 2001. *Microsurgical flap models in the rat*. Journal of reconstructive microsurgery. 17(3), 211-221.
54. Sillman, D. , 2007. *Review of rat muscles*. Available from: <http://www.personal.psu.edu/dys100/anatomy/rat/Show/lateralhindleg2.htm>.
55. Halliwell B., 1989. Free radicals, reactive oxygen species and human disease: a critical evaluation with special reference to atherosclerosis. Br J Exp Pathol. 70, 737-757.
56. Weiss S.J., 1986. Oxygen, ischemia and inflammation. Acta Physiol Scand Suppl. 9(37), 548.
57. Yavaş D., Zengin M., Kaklıkaya İ., Uzun Z., 1994..Serbest oksijen radikal temizleyici olarak Aprotinin'in rolü. GKD Cer. Derg., 2, 208-15.
58. Aktoz T., 2004. Sıçanlarda Böbrek İskemi-Reperfüzyon Hasarına Melatonin ve E Vitaminin Antioksidan Etkileri İle Hücresel Değişiklikler (Tez). Edirne: Trakya Üniversitesi Tıp Fakültesi.
59. Slater T.F., 1984. Free radical mechanisms in tissue injury. J Biochem. 222:1-15.
60. Akkuş İ., 1995. Reaktif oksijen radikalleri. Nizamlıoğlu M, Tiftik MA (Editörler) Serbest radikaller ve fizyopatolojik etkileri. Konya: Mimoza Kitabevi. 93-5.
61. Evans C.A., Diplock A., 1991. Symons M. Introduction to free radicals and Mechanisms of radical production. In: Diplock A. Symons M(Eds.). Techniques in free radical research. 3th. London: Hatchartz co. 41-9.

62. Cornelli U., 2007. Antioxidants In: Textbook of interventional cardiovascular pharmacology. Informa. 211-235.
63. Fleming J., Miguel J., Econimos A., 1982. Is cell aging caused by respiration dependent injury to the mitokondrial genome. *Gerontol.* 28-44
64. Restifo R.J., Thomson J.G., 1998. The preconditioned TRAM flap: Preliminary clinical experience. *Ann Plast Surg.* 41, 343-7.
65. Kılınç K., Kılınç A., 2001. Oksijen toksisitesinin aracı moleküller olarak oksijen radikalleri. *Hacettepe Tıp Dergisi.* 33(2), 110-8.
66. Palmer R.M.J., Ashton D.F., Moncada S., 1988. Vascular endothelial cells synthesize nitric oxide from L-arginine. *Nature.* 333, 664-666.
67. Koltuksuz U, Irmak M.K., Karaman A., Uz E., Var A., Ozyurt H, Akyol O., 2000. Testicular nitric oxide levels after unilateral testicular torsion/detorsion in rats pretreated with caffeic acid phenethyl ester. *Urol Res.* 28, 360-363.
68. Cardillo C., Kilcoyne C.M., Cannon R.O., Quyyumi A.A., Panza J.A., 1997. Xanthine oxidase inhibition with oxypurinol improves endothelial vasodilator function in hypercholesterolemic but not in hypertensive patients. *Hypertension.* 30, 57-63.
69. Totan Y., Cekic O., Borazan M., Uz E., Sogut S., Akyol O., 2001. Plasma malondialdehyde and nitric oxide levels in age related macular degeneration. *Br J Ophthalmol.* 85, 1426-1428.
70. Kirkeboen K.A., Strand Q.A., 1999. The role of nitric oxide in sepsis—an overview. *Acta Anaesthesiol Scand.* 43, 275-288.
71. Beckman J.S., Ischiropoulos H., Zhu L., Van der Woerd M., Smith C., Chen J., Harrison J., Martin J.C., Tsai M., 1992. Kinetics of superoxide dismutase- and iron-catalysed nitration of phenolics by peroxynitrite. *Arch Biochem Biophys.* 298, 438-445.
72. Moellering D., McAndrew J., Patel R.P., Cornwell T., Lincoln T., Cao X., Messina J., Forman H.J., Darley-Usmar V.M., 1998. Nitric oxide-dependent induction of glutathione synthesis through increased expression of gamma-glutamylcysteine synthetase. *Arch Biochem Biophys.* 1;358(1), 74-82.
73. Lin E., Lowry S.F., Calvano S.E., 1999. The systemic response to injury. Schwartz SI (ed), *Principles of Surgery.* Mc Graw-Hill 7th Edition. 1, 13-32.
74. Ertan T., Soran A., Kılıc M., Aşlar A.K., Koc M., Cengiz O., 2001. Kan Malondialdehid ve total antioksidan seviyesinin(TAS) onemi. *Cerrahi Tıp Bulteni.* 2(4), 154-167.
75. Sözmen E.Y., 2002. İnsan Biyokimyası. Yaşlanma Biyokimyası. Palme Yayıncılık Ankara. Editörler: Onat T., Emerk K., Sözmen E.Y.. 666-677.
76. Cheeseman H.K., Slater F.T., 1993. An introduction to free biochemistry. *Br Med Bul.* 49, 481-93.

77. Girotti A.W., 2000. Lipid hydroperoxide generation, turnover, and effector action in biological systems. *J Lipid Res.* 39, 1529-1542.
78. Reznick A.Z., Packer L., 1994. Oxidative damage to proteins: spectrophotometric method for carbonyl assay. *Methods Enzymol.* 233, 357-363.
79. Dalle-Donne I., Rossi R., Giustarini D., Milzani A., Colombo R., 2003. Protein carbonyl groups as biomarkers of oxidative stress. *Clin Chim Acta.* 329, 23-38
80. Kayalı R., Çakatay U., 2004. Protein oksidasyonunun ana mekanizmaları. *Cerrahpasa Tıp Dergisi* . 35(2),83-89.
81. Tirosch O., Reznik A.Z., 2000. Chemical bases and biological relevance of protein oxidaditon. *Handbook of Oxidants and Antioxidants in Exercise.* Elsevier Sceince, 89-114.
82. Berlett B.S., Stadtman E.R., 1997. Protein oxidation in aging, disease, and oxidative stress. *J Biol Chem.* 272(33), 20313-6.
83. Huang H.Y., Helzlsouer K.J., Appel L.J., 2000. The effecys of vitamin C and vitamin E on oxidative DNA damage: Results from a randomized controlled trial. *Cancer Epidemiology, Biomarkers& Prevention.* 9, 647-652.
84. Marnett L.J., 2000. Oxyradicals and DNA damage. *Carcinogenesis.* 21(3), 361-370.
85. Unno N., Fink M.P., 1998. Nutritional, physiologic, and pathophysiologic considerations of the gastrointestinal tract. Intestinal epithelial hyperpermeability. Mechanisms and relevance to disease. *Gastroenterology Clinics.* 27(2), 289-307
86. Damjanov Ā., Linder J., 1996. Cell injury and cellular adaptations. *Anderson's Pathology.* Tenth edition. 1, 357-65
87. Semenza G.L., 1999. Perspective on oxygen sensing. *Cell.* 98(3), 281-4
88. Eltzschig H.K., Collard C.D., 2005. Vascular ischaemia and reperfusion injury. *Br Med Bull.* 139, 73-74.
89. Allen D.G., Xiao X.H., 2003. Role of the cardiac Na/H exchanger during ischemia and reperfusion. *Cardiovasc Res.* 57, 934-941.
90. Springer T.A., 1994. Traffic signals for lymphocyte recirculation and leukocyte emigration: the multistep paradigm. *Cell.* 76, 301-314.
91. Newmeyer D.D., Ferguson-Miller S., 2003. Mitochondria: releasing power for life and unleashing the machineries of death. *Cell.* 21;112(4), 481-90.
92. Siemionow M., Arslan E., 2004. İschemia/reperfusion injury: a rewiew in relation to free tissue transfers. *Microsurgery.* 24(6), 468-75.
93. Hobson R.W., Neville R., Watanabe B., 1989. Role of heparin in reducing muscle infarction in ischemai-reperfusion. *Ann Acad Med Stetin.* 35, 131-143.
94. Rupinski S., 1989. Effect of tourniquet ischemia of the arm on changes in selected parameters of mucle of metabolism. *Ann Acad Med Stetin.* 35, 131-143.

95. Collard C.D., Gelman S., 2001. Pathophysiology, Clinical Manifestations, and Prevention of Ischemia–Reperfusion Injury. *Anesthesiology*. 94, 1133–8.
96. Alizan A., Khalil C., Farah A., John C., 2006. Reperfusion injury. *Plast. Reconstr Surg*. 117, 1024–1033.
97. Blaisdell F.W., 2002. The pathophysiology of skeletal muscle ischemia and the reperfusion syndrome: a review. *Cardiovasc Surg*. 10, 620–630.
98. Zhao Z.Q., Vinten-Johansen J., 2006. Postconditioning: Reduction of reperfusion-induced injury. *J Cardiovasc Res*. 1;70(2), 200-211.
99. Ege T., 2004. Kalp ve damar hastalıklarında iskemi-reperfüzyon hasarı. Duran E (Editör). *Kalp ve damar cerrahisi*. Birinci baskı. İstanbul: Çapa Tıp Kitabevi; 197-215.
100. Sener G., Sakarcan A., Yegen B.C., 2007. Role of garlic in the prevention of ischemia-reperfusion injury. *Mol Nutr Food Res*. 51,1345-1352.
101. Kumar V., Abbas A.K., Fausto N., Aster J.C., 2010. Cellular responses to stress and toxic insults: adaptation, injury, and death. In: Kumar V, Abbas AK, Fausto N, Aster JC (Eds.). *Robbins and cotran pathologic basis of disease*. Eighth ed. Philadelphia: Saunders Elsevier. 3-42.
102. Ferrari R., Ceconi C., Curello S., Cargnoni A., Condorelli E. and Raddino R., 1985. Role of oxygen inmyocardial ischemic and reperfusion damage: Effect of alpha-tocopherol. *Acta Vitaminol. Enzymol*. 7, 61-70.
103. Garrett I.R., Boyce B.F., Oreffo R.O.C., Bonewald L., Poser J. and Mundy G.R., 1990. Oxygen-derived free radicals stimulate osteoclastic bone resorption in rodent bone in vitro and in vivo. *J Clin Invest*. 85,632-639.
104. McCord J.M., 1985. Oxygen-derived free radicals and tissue injury. *N. Engl. J. Med*. 312(3), 159.
105. McCord J.M., 1987. Oxygen-derived radicals: a link between reperfusion injury and inflammation. *Fed. Proc*. 46(7), 2402.
106. Grisham M.B., Hernandez L.A. and Granger D.N., 1986. Xanthine oxidase and neutrophil infiltration in intestinal ischemia. *Am. J. Physiol*. 251, 567-574.
107. Nylander G., Otamiri T., Lewis D.H. and Larsson J., 1989. Lipid peroxidation products in postischemic skeletal muscle and after traetment with hyperbaric oxygen. *Scand. J. Plast. Reconstr. Surg.*, 23(2), 97-103.
108. Bulkley G.B., 1983. The role of oxygen free radicals in human disease processes. *Surgery*, 94(3), 407-411.
109. Freeman B.A. and Crapo J.D., 1982. Biology of disease free radicals and tissue injury. *Lab. Invest.*, 47(5), 412.

110. Wolf S.P., Garner A. and Dean R.T., 1986. Free radicals, lipids and protein degradation. *TIBS*. 11, 27-31.
111. Han J.Y., Fan J.Y., Horie Y., Miura S., Cui D.H., Ishii H. et al., 2008. Ameliorating effects of compounds derived from salvia miltiorrhiza root extract on microcirculatory disturbance and target organ injury by ischemia and reperfusion. *Pharmacol Ther.* 117(2), 280-95.
112. Şener G., Yeğen B.Ç., 2009. İskemi reperfüzyon hasarı. *Klinik Gelişim Derg. Klinik Fizyopatoloji.* 22(3), 5-14.
113. Kukreja R.C., Kontos H.A., Hess M.L., Ellis E.F., 1986. PGH syntase and lipooygenase generate superoxide in the presene of NADH or NADPH. *Circ Res.* 59, 612-19.
114. Thomas C.E., Morehouse L.A., Aust S.D., 1985. Ferritin and superoxide-dependent lipid peroxidation. *J Biol Chem.* 260, 3275-80.
115. Rangan U., Bulkley G., 1993. Prospects for Treatment of Free Radical-Mediated Tissue Injury. *Br Med Bull.* 49(3), 700-18.
116. Kevin L.G., Novalija E., Stowe D.F., 2005. Reactive oxygen species as mediators of cardiac injury and protection: the relevance to anesthesia practice. *Anesth Analg.* 101(5), 1275-87.
117. Pardini R.S., 1995. Toxicity of oxygen from naturally occurring redox-active pro-oxidants. *Arch Insect Biochem Physiol.* 29, 101-118.
118. Losser M.R., Payen D., 1996. Mechanisms of liver damage. *Semin Liver Dis.* 16, 357-67.
119. Kurokawa T., Nonami T., Harada A., N akao A., Takagi H., 1996. Mechanisms and prevention of ischemia-reperfusion injury of the liver. *Semin Surg Oncol.* 12, 179-182.
120. Gute D.C., Ishida T., Yarimizu K., ve ark., 1998. Inflammatory responses to ischaemia and reperfusion in skeletal muscle. *Mol Cell Biochem.* 179, 169-187
121. Schoenberg M.H., Beger H.G., 1990. Oxygen radicals in intestinal ischemia and reperfusion. *Chem Biol Interact.* 76(2), 141-61.
122. Mallick I.H., Yang W., Winslet M.C., Seifalian A.M., 2004. Ischemia-reperfusion injury of the intestine and protective strategies against injury. *Dig Dis S.* 49(9), 1359-77.
123. Türkyılmaz Z., 2003. Karaciğer iskemi-reperfüzyon zedelenmesinde pentoksifilin, dimetilsülfoksit ve eksojen melatoninin koruyucu etkilerinin karşılaştırılması (tez). Edirne: Trakya Üniversitesi Tıp Fak; 2003.
124. Collard C.D., Lekowski R., Jordan J.E., Agah A., Stahl G.L., 1999. Complement activation following oxidative stress. *Mol Immunol.* 36, 941-48.
125. Evans C.A.R., Diplock A.T., Symons M.C.R., 1991. Introduction to free radicals and Mechanisms of radical production .*Techniques in free radical research Elsevier, London, New York, Tokyo.* 22(4), 1-49.

126. Ilmakunnas M., 2008. Ischemia-Reperfusion Injury in Human Liver Transplantation. Helsinki University Central Hospital Faculty of Medicine, University of Helsinki, Helsinki.
127. Bradley J.R., 2008. TNF-mediated inflammatory disease. *Journal of Pathology*. 214, 149-160.
128. Kalfa M., Aksu K., 2011. Anti-tümör nekrozis faktör- α tedavisi ve enfeksiyon. *RAED Dergisi*. 3(3-4), 49-56.
129. Baykara B., Tekmen I., 2005. Karaciğer iskemi reperfüzyon hasarı. *DEÜ Tıp Fakültesi Dergisi*. 5, 185-194.
130. Borish L.C., Steinke J.W., 2003. Cytokines and chemokines. *J allergy Clin Immunol*. 111(2), 460-475.
131. Minor T., Isselhard W., 1993. Platelet-activating factor antagonism enhances the liver's recovery from warm ischemia in situ. *J Hepatology*. 18, 188-194.
132. Le Monie O., Louis H., Stordeur P., Collet J.M., Goldman M., Deviere J., 1997. Role of reactive oxygen intermediates in interleukin 10 release after cold liver ischemia and reperfusion in mice. *Gastroenterology*. 113, 1701-1706.
133. Essani N.A., McGuire G.M., Manning A.M., Jaeschke H., 1996. Endotoxin-induced activation of the nuclear transcription factor kappa B and expression of E-selectin Messenger RNA in hepatocytes, Kupffer cells, and endothelial cells in vivo. *J Immunol*. 156, 2956-63.
134. Essani N.A., Fisher M.A., Jaeschke H., 1997. Inhibition of NF-kappa B activation by dimethyl sulfoxide correlates with suppression of TNF-alpha formation, reduced ICAM-1 gene transcription, and protection against endotoxin-induced liver injury. *Shock*. 7, 90-96.
135. Ascer E.M., Gennaro M., Cupo S., ve ark. 1992. Do cytokines play a role in skeletal muscle Ischemia and reperfusion? *J Cardiovasc Surg*. 33, 588-592.
136. Seekamp A., Mulligan M.S., Till G.O., ve ark., 1993. Requirements for neutrophil products and L-arginine in Ischemia-reperfusion injury. *Am J Pathol*. 142, 1217-1226.
137. Ladipo J.K., Seidel S.A., Bradshaw L.A. et al., 2003. Histopathologic changes during mesenteric ischaemia and reperfusion. *West Afr J Med*. 22, 59-62.
138. Curry F.R., Noll T., 2010. Spotlight on microvascular permeability. *Cardiovasc Res*. 87(2), 195-7.
139. Blaisdell F.W., 2002. The pathophysiology of skeletal muscle ischemia and the reperfusion syndrome. *Cardiovasc Surg*. 10(6), 620-30.
140. Penna C., Bassino E., Alloatti G., 2011. Platelet activating factor: the good and the bad in the ischemic/reperfused heart. *Exp Biol Med*. 236(4), 390-401.
141. Weight S.C., Bell P.R., Nicholson M.L., 1996. Renal ischaemia-reperfusion injury. *Br J Surg*. 83(2), 162-70.

142. Francischetti I., Moreno J.B., Scholz M., Yoshida B.W., 2010. Leukocytes and the inflammatory response in ischemia-reperfusion injury. *Rev Bras Cir Cardiovas.* 25(4), 575-84.
143. Bevilacqua M.P., Nelson R.M., 1993. Selectins. *J Clin Invest.* 91(2),379-87.
144. Lu H., Ballantyne C., Smith C.W., 2000. LFA-1 (CD11a/CD18) triggers hydrogen peroxide production by canine neutrophils. *J Leukoc Biol.* 68(1), 73-80.
145. Gubitosi-Klug R.A., Talahalli R., Du Y., Nadler J.L., Kern T.S., 2008. 5-Lipoxygenase, but not 12/15-lipoxygenase, contributes to degeneration of retinal capillaries in a mouse model of diabetic retinopathy. *Diabetes.* 57(5), 1387-93.
146. Koca N., Karadeniz F., 2003. Serbest radikal oluşum mekanizmaları ve vücuttaki antioksidan savunma sistemleri. *Gıda Mühendisliği Dergisi.* 16, 32-37.
147. Ames B.N., Shigenaga M.K., Hagen T.M., 1993. Oxidants, antioxidants, and the degenerative diseases of aging. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 17, 7915-22.
148. Bilgin Ö., 2007. Lipopolisakkarit ile uyarılmış hepatik iskemi reperfüzyon hasarı oluşturulan deneklerde, melatonin uygulanmasının NfkB ekspresyonu ile kan ve doku lipid peroksidasyonu üzerine etkisi. Mersin Üniversitesi Tıp Fakültesi Genel Cerrahi Anabilim Dalı, Mersin.
149. Halliwell B., Gutteridge J.M., 1990. The antioxidants of human extracellular fluids. *Arch Biochem Biophys.* 280(1), 1-8.
150. Taşkıran A., 2000. Koroner by-pass yapılan olgularda lipid hidroperoksit, antioksidan kapasite ve oksidan stres. *Trakya Üniv. Tıp Fakültesi, Edirne.*
151. Sawada M., Carlson J.C., 1990. Biochemical changes associated with the mechanism controlling superoxide radical formation in the aging rotifer. *J Cell Biochem.* 4,153-165
152. Jomova K., Vondrakova D., Lawson M., Valko M., 2010. Metals, oxidative stress and neurodegenerative disorders. *Mol Cell Biochem.* 345, 91-104.
153. Halliwell B., 1989. Superoxide, iron, vascular endothelium and reperfusion injury. *Free Radic.Res. Common.* 5, 315-18.
154. Cantürk N.Z., Sayek İ., 2005. Cerrahi araştırma kitabı. Nobel tıp kitabevleri.
155. Aebi H., 1974. Catalase In: Bergmeyer U, ed. *Methods of enzymatic analysis.* New York and London: Academic Press. 673-77.
156. Deisseroth A., Dounce A.L., 1969. The purification and crystallization of beef erythrocyte catalase. *Arch Biochem Biophys.* 131,18-29.
157. Agar N.S., Sadrzadeh S.M., Hallaway P.E., Eaton J.W., 1986. Erythrocyte catalase. A somatic oxidant defense? *J Clin Invest.* 77, 319-321.
158. Halliwell B., Gutteridge J.M., 1999. *Free radicals in biology and medicine,* Oxford University Press, Oxford.

159. Nakazawa H., Genka C., Fujishima M., 1996. Pathological aspects of active oxygens/free radicals. *Jpn J Physiol.* 46, 15- 32.
160. Yalçın A.S., 1998. Antioksidanlar. *Klinik Gelişim.* 11, 342 -346.
161. Fujita T., 2003. Formation and removal of reactive oxygen species, lipid peroxides and free radicals, and their biochemical effects. *Yakugaku Zasshi.* 122, 203–218.
162. Paglia D.E., Valentine W.N., 1967. Studies on the quantitative and qualitative characterization of erythrocyte glutathione peroxidase. *J Lab Clin Med.* 70 (1), 158-69.
163. Gonzalez-Perez O., Moy-Lopez N.A., Guzman-Muniz J., 2008. Alpha-tocopherol and alpha-lipoic acid. An antioxidant synergy with potential for preventive medicine. *Rev Invest Clin.* 60, 58-67.
164. Murry C.E., Jennings R.B., Reimer K.A., 1986. Preconditioning with ischemia: a delay of lethal cell injury in ischemic myocardium. *Circulation.* 74, 1124.
165. Ikonomidis J.S., Weisel R.D., Mickle D.A.G., 1994. Ischemic preconditioning: Cardioprotection for cardiac surgery. *J. Card. Surg.* 9, 526-531.
166. Yellon D.M., Alkhulaifi A.M., Pugsley W.B., 1993. Preconditioning the human myocardium. *Lancet.* 342, 276-77.
167. Ishida T., Yarimuzu K., Gute D.C. et al., 1997. Mechanism of ischemic preconditioning. *Shock.* 8, 86-94.
168. Lee H.T., Emala C.W., 2000. Protective effects of renal ischemic preconditioning and adenosine pretreatment: role of A(1) and A(3) receptors. *Am J Physiol Renal Physiol.* 278, 380-387
169. Nakayama H., Yamamoto Y., Kume M. et al., 1999. Pharmacologic stimulation of adenosine A2 receptor supplants ischemic preconditioning in providing ischemic tolerance in rat livers. *Surgery.* 126, 945-954.
170. Liu G.S., Thomson J., Van Winkle D.M. et al., 1991. Protection against infarction afforded by preconditioning is mediated by A1 adenosine receptors in rabbit heart. *Circulation.* 84, 350-356
171. Cohen M.V., Baines C.P., Dovney J.M., 2000. Ischemic preconditioning ; from adenosine receptor of K-ATP Channel *Annu Rev Physiol.* 62, 79-109.
172. Peralta C., Holter G., Closa D. et al., 1999. The protective role of adenosine in inducing nitric oxide synthesis in rat liver ischemia preconditioning is mediated by activation of adenosine A2 receptors. *Hepatology.* 29, 126-132
173. Simkhovich B.Z., Prizykienk K., Kloner R.A., 1998. Role of protein Kinase C as a cellular mediator of ischemic preconditioning: a critical review. *Cardiovasc Res.* 40, 9-22.
174. Sasaki N., Sato T., Ohler A. et al., 2000. Activation of mitochondrial ATP-dependent potassium channels by nitric oxide. *Circulation.* 101, 439-445.

175. Schulz R., Cohen M.V., Behrends M. et al., 2001. Signal transduction of ischemic preconditioning. *Cardiovasc Research*. 52, 181-198.
176. Serracino-Inglott F., Virlos I.T., Habib N.A. et al., 2002. Adenosine preconditioning attenuates hepatic reperfusion injury in the rat by preventing the down-regulation of endothelial nitric oxid synthase. *BMC Gastroenterol*. 20, 2-22
177. Vlasov T.D, Smirnov D.A., Nutfullina G.M., 2002. Preconditioning of the small intestine to ischemia in rats. *Neurosci Behav Physiol*. 32, 449-53
178. Ricciardi R., Meyers W.C., Schaffer B.K. et al., 2001. Protein Kinase C Inhibition Abrogates Hepatic Ischemic Preconditioning Responses. *J Surg Res*. 97, 144-149.
179. Nakano A., Baines C.P., Kim S.O. et al., 2000. Ischemic preconditioning activates MAPKAPK2 in the isolated rabbit heart: evidence for involvement of p38 MAPK. *Circ Res*. 86, 144-151.
180. Ishikawa Y., Yamamoto Y., Kume M., et al., 1999. Heat shock preconditioning on mitochondria during warm ischemia in rat livers. *J Surg Res*. 87, 178-184.
181. Banga N.R., Homer-Vanniasinkam S., Graham A., 2005. Ischaemic preconditioning in transplantation and major resection of the liver. *Br J Sur*. 92, 528-538.
182. Oliver, J. and Palou, A., 2000. Chromatographic determination of carotenoids in foods. *Journal of Chromatography A*. 881, 543-555.
183. Rodriguez-Amaya D.B., 2001. A guide to carotenoid analysis in foods, <http://www.ilsa.org/publications>. Erişim tarihi: 28.02.2005.
184. Olson J.A., 1994. Absorption, transport, and metabolism of carotenoids in humans. *Pure and Applied Chemistry*. 66, 1011-1016.
185. Von Elbe J.H. and Schwartz S.J., 1996. Colorants. In "Food Chemistry", O.R. Fennema (Ed). Marcel Dekker Inc., New York. Chapter 10, 651-722.
186. Anonymous. 1951. Methods of vitamin assay. The Association of Vitamin Chemists Inc. Interscience publishers, 301 p., New York.
187. Palozza P. and Krinsky N.I., 1992. Antioxidant effects of carotenoids in vivo and in vitro: An overview. *Methods in Enzymology*. 38, 403-420.
188. Di Mascio P., Murphy M.E. and Sies H., 1991. Antioxidant defence system: the role of carotenoids, tocopherols and thiols. *American Journal of Clinical Nutrition*. 53, 194-200.
189. Paiva, S.A.R. and Russell, R.M., 1999. β -carotene and other carotenoids as antioxidants. *Journal of the American College of Nutrition*. 18, 426-433.
190. Miller N.J., Sampson J., Candeias L.P., Bramley P.M. and Rice-Evans, C.A., 1996. Antioxidant activities of carotenes and xanthophylls. *FEBS Letters*. 384, 240-242.
191. Naguib Y.M., 2000. Antioxidant Activities of Astaxanthin and Related Carotenoids (*Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 48, 1150-1154.

192. Mayne S.T., 1996. β - Carotene, Carotenoids and Disease Prevention in Humans. *FASEB J.* 10, 690-701.
193. Querin M., Huntley M.E., Olaizola M., 2003. *Haematococcus* astaxanthin: Applications for Human Health and Nutrition. *TRENDS Biotechnol* 21, 210-216
194. Wang B., Zarka A., Tbrese A., Boussiba S., 2003. Astaxanthin accumulation in *Haematococcus pluvialis* (Chlorophyceae) as an active photoprotective process under high irradiance. *J. Phycol.* 39, 1116-1124.
195. Miki W., 1991. Biological functions and activities of animal carotenoids. *Applied Chem.* 63(1),141.
196. Sanderson G.W., Setsuko O.J., 1994. The value of *Phaffia* yeast as a feed ingredient for salmonid fish. *Aquaculture.* 124, 193-200.
197. Wijendran V., Huang M.C., Diao G.Y., 2002. Efficacy of dietary arachidonic acid provided as triglyceride or phospholipid as substrates for brain arachidonic acid accretion in baboon neonates. *Pediatr Res.* 51,265-272.
198. Maki K.C., Reeves M.S., Farmer M., et al., 2009. Krill oil supplementation increases plasma concentrations of eicosapentaenoic and docosahexaenoic acids overweight and obese men and women. *Nutr Res.* 29, 609-615.
199. Tou J.C., Jaczynski J., Chen Y.C., 2007. Krill for human consumption: nutritional value and potential health benefits. *Nutr Rev.* 65, 63–77.
200. Bunea R., El Farrak K., Deutsch L., 2004. Evaluation of the effects of Neptune Krill Oil on the clinical course of hyperlipidemia. *Altern Med Rev.* 9,420-428.
201. Krill oil monography. *Alternative Medicine Review.* 15(1), 84-86.
202. Salem N. and Kuratko C.N., 2014. A reexamination of krill oil bioavailability studies. *Lipids in Health and Disease.* 13 (1), 137
203. Weintraub H., 2013. Update on marine omega-3 fatty acids: management of dyslipidemia and current omega-3 treatment options. *Atherosclerosis.* 230(2), 381-9
204. Ulven S.M., Kirkhus B., Lamglait A., Basu S., Elind E., Haider T., Berge K., Vik H., Pedersen J.I., 2011. Metabolic effects of krill oil are essentially similar to those of fish oil but at lower dose of EPA and DHA, in healthy volunteers. *Lipids.* 46(1), 37-46
205. Deutsch L., 2007. Evaluation of the effect of Neptune Krill Oil on chronic inflammation and arthritic symptoms. *J Am Coll Nutr.* 26(1), 39-48.
206. Bulkley G.B., 1987. Free radical mediated reperfusion injury: A selective review. *Br J. Cancer.* 55(8), 66-73.
207. Dorion D., Zhong A., Chiu C., Forrest C.R., Boyd B., Pang C. Y., 1993. Role of xanthine oxidase in reperfusion injury of ischemic skeletal muscles in the pig and human. *J. Appl. Physiol.* 75(1), 246-55.

208. Farooq M.M., Freischlag J.A., Caslens B.T., Cambria R.A., 1997. Intraarterial adenosine administered during reperfusion preserves endothelium-dependent relaxation in the rabbit hindlimb. *Vasc. Surg.*, 31 (6), 713-719.
209. Rubin B.B., Liauw S., Tittley J., Romaschin A.D., Walker P.M., 1992. Prolonged adenine nucleotide resynthesis and reperfusion injury in postischemic skeletal muscle. *Am. J. Physiol.* 262 (5), 1538-42.
210. Hirose J., Yamaga M., Ide J., Tanoue M., Takagi K., 1997. Reduced ischemia-reperfusion injury in muscle. Experiments in rats with EPC-K1, a new radical scavenger: *Acta Orthop Scand.* 68(4), 369-73.
211. Mc Cutchan H.J., Schwappach J.R., Enquist E.G., Walden D.L., Terada L.S., Reiss O.K., Leff J.A., Repine J.E., 1990. Xanthine oxidase-derived H₂O₂ contributes to reperfusion injury of ischemic skeletal muscle. *Am. J. Physiol* 258 (5), 1415-9.
212. Ohshima T., Yabe Y., Ishiguro N., Iwata H., 1997. Effect of dibutylryl cyclic adenosine monophosphate on skeletal muscle reperfusion injury in the rat. *Eur. Surg. Res.* 29, 438-446.
213. Chen L.E., Seaber A.V., Nasser R.M., Stamler C.S., et al., 1998. Effects of S-nitroso-N-acetylcysteine on contractile function of reperfused skeletal muscle. *Am. J. Physiol.* 274(3), 822-9.
214. Suval W.D., Hobson R.W., Boric M.P., Ritter A.B., Duran W.N., 1987. Assessment of ischemia reperfusion injury in skeletal muscle by macromolecular clearance. *J. Surg Res.* 42(5), 550-9
215. Barie P.S., Mullins R.J., 1988. Experimental methods in the pathogenesis of limb ischemia. *Journal of surgical research.* 44, 284-307.
216. Granger D.N., Rutili G., McCord J.M., 1981. Superoxide radicals in feline intestinal ischemia. *Gastroenterology.* 81, 22-29.
217. Bozkurt A.K., 2002. Alpha-tocopherol (Vitamin E) and iloprost attenuate reperfusion injury in skeletal muscle ischemia/reperfusion injury. *J Cardiovasc Surg (Torino).* 43(5), 693-6.
218. Özyurt H, Özyurt B, Koca K., 2007. Caffeic acid phenethyl ester (CAPE) protects rat skeletal muscle against ischemia-reperfusion-induced oxidative stress. *Vascular Pharmacology.* 47, 108-112.
219. Akbaş H., Özden M., Kanko M. ve ark., 2005. Protective antioxidant effects of carvediol in a rat model of ischemia-reperfusion injury. *J Inter Med Res.* 33, 528-536.
220. Erdem M., Bostan B., Güneş T., Özkan F., Şen C., Özyurt H., Köseoğlu R.D., Erdoğan H., 2010. Protective effects of melatonin on ischemia-reperfusion injury of skeletal muscle. *Joint Diseases and Related Surgery.* 21(3), 166-171.

221. Köksel O., Özdülger A., Aytacıoğlu B., Tamer L., Polat A., Sucu N., Yıldırım C., Değirmenci U., Kanik A., 2005. The influence of iloprost on acute lung injury induced by hind limb ischemia-reperfusion in rats. *Pulm Pharmacol Ther.* 18, 235-41.
222. Kirişçi M., 2012. Vasküler endotelial büyüme faktörü ve adrenomedullinin ratlarda iskelet kası iskemi reperfüzyon hasarına koruyucu etkisi. Gazi Üniversitesi Tıp Fakültesi, Ankara.
223. Tiryakioğlu O., Erkoç K., Tunerir B., Uysal O., Altın H.F., Güneş T., Aydın S., 2015. The Effect of Iloprost and N-Acetylcysteine on Skeletal Muscle Injury in an Acute Aortic Ischemia-Reperfusion Model: An Experimental Study. *BioMed Research.* 453748.
224. Erkanlı K., Kayalar N., Erkanlı G., Ercan F., Şener G., Kıralı K., 2005. Melatonin protects against ischemia/reperfusion injury in skeletal muscle. *J Pineal.* 39, 238-42
225. Grimstadi T., Bjqrndal B., Cacabelos D., Aasprong O.G., Janssen E.A.M., Omdal R., Svardal A., Hausken T., Bohov P., 2012. Dietary supplementation of krill oil attenuates inflammation and oxidative stress in experimental ulcerative colitis in rats. *Scandinavian Journal of Gastroenterology.* 47, 49–58.
226. Uz E., Yılmaz R., Iraz M., Fadilloğlu E., Özyurt H., Söğüt S., Akyol Ö., 2002. Deneysel karaciğer iskemi-reperfüzyonu oluşturulan sıçanlarda doku oksidan-antioksidanlarının durumu: Doku hasarına E vitamini ve Kafeik Asit Fenetil Ester'in (CAPE) etkileri. *41(2), 077-082.*
227. Okatani Y., Wakatsuki A., Reiter R.J., Enzan H., Miyahara Y., 2003. Protective effect of melatonin against mitochondrial injury induced by ischemia and reperfusion of rat liver. *Eur J Pharmacol.* 469, 145-52.
228. Şener G., Şehirli A.O., Keyer-Uysal M., Arbak S., Ersoy Y., Yeğen B., 2002. The protective effect of melatonin on renal ischemia-reperfusion injury in the rat. *J Pineal Res.* 32, 120-6.
229. Aydın C., 2012. İskemi reperfüzyon hasarı iloprost ve proantosiyanidin ile önlenbilir mi? Hayvan modelinde bir alt ekstremitte iskemi çalışması. Ankata Üniversitesi Tıp Fakültesi, Ankara.
230. Hausenloy D.J., Yellon D.M., 2011. The therapeutic potential of ischemic conditioning: an update. *Nat. Rev. Cardiol.* 21;8(11), 619-29.
231. Büyükkateş M., 1999. Açık kalp cerrahisinde iskemik önkoşullamanın iskemik miyokard hasarına etkisi. Gazi Üniversitesi Tıp Fakültesi. Ankara.

232. Attkiss K.J., Suski M., Hunt T.K., Buncke H.J., 1999. Ischemic preconditioning of skeletal muscle improves tissue oxygenation during reperfusion. *J Reconstr Microsurg.* 15, 223-8.
233. Gurke L., Marx A., Sutter P.M., Frentzel A., Salm T., Harder F., et al., 1996. Ischemic preconditioning improves post-ischemic skeletal muscle function. *Am Surg.* 62, 391-4.
234. Schroeder C.A., Lee H.T., Shah P.M., Babu S.C., Thompson C.I., Belloni F.L., 1996. Preconditioning with ischemia or adenosine protects skeletal muscle from ischemic tissue reperfusion injury. *J Surg Res.* 63, 29-34.
235. Restifo R.J., Thomson J.G., 1998. The preconditioned TRAM flap: Preliminary clinical experience. *Ann Plast Surg.* 41, 343-7.
236. Koçman E.A., Özatik O., Şahin A., Güney T., Köse A.A., Dağ I., Alataş Ö., Çetin C., 2015. Effects of ischemic preconditioning protocols on skeletal muscle ischemia-reperfusion injury. *J Surg Res.* 193(2), 942-52.
237. Richard A.H., Forrest C.R., Xu H., Zhong A., He W., Rutka J., Neligan P., Pang A.C.Y., 2000. Role and mechanism of PKC in ischemic preconditioning of pig skeletal muscle against infarction. *Am J Physiol Regulatory Integrative Comp Physiol.* 279, 666-676.
238. Akkuş İ., 1997. Klinik biyokimya laboratuvarı el kitabı. Akkuş İ (Ed) Öz Eğitim Bas. Yay. Dağ. Konya: 314-315.
239. Sun Y., Oberley L.W., Ying L., 1988. A simple method for clinical assay of superoxide dismutase. *Clin Chem.* 34, 497-500.
240. Durak I., Yurtarslanı Z., Canpolat O., Akyol O., 1993. A methodological approach to superoxide dismutase (SOD) activity assay based on inhibition of nitroblue tetrazolium (NBT) reduction. *Clin Chim Acta.* 214, 103-104.
241. Wasowicz W., Neve S., Peretz A., 1993. Optimized steps in fluorometric determination of thiobarbituric acid-reactive substances in serum: Importance of extraction Ph and influence of sample preservation and storage. *Clin Chem.* 39, 2522-2526.
242. Mueller A.R., Platz K.P., Langrehr J.M. Hoffman R.A., Nussler A.K., Nalesnik M., Billiar T.R., Schraut W.H., 1994. The effects of administration of nitric oxide inhibitors during small bowel preservation and reperfusion. *Transplantation.* 58, 1309-1316.
243. Malinski T., Taha Z., 1992. Nitric oxide release from a single cell measured in situ by a porphyrinic-based microsensor. *Nature.* 358, 676-678.

244. Cortas N.K., Wakid N.W., 1990. Determination of inorganic nitrate in serum and urine by a kinetic cadmium-reduction method. 36, 1440-1443.
245. Lowry O.H., Rosenbrough N.J., Farr A.L., Randall R.J., 1951. Protein measurement with the Folin phenol reagent. J Biol Chem. 193, 265-275.

ÖZGEÇMİŞ

Isparta'da doğdu. Liseyi İzmir Konak Karataş Lisesi'nde, lisansını Selçuk Üniversitesi Fen-Edebiyat Fakültesi Kimya Bölümü'nde tamamladı. Yüksek lisansını Afyon Kocatepe Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü'nde bitirdi. Afyon Kocatepe Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü programlarından Kimya bölümünde yüksek lisansını "Elektrokimyasal Biriktirme Yöntemi ile Hidroksiapatit (HAP) Kaplanmış Ti6Al4V İmplantların Korozyon Davranışlarının İncelenmesi ve Dokulardaki Biyouyumluluklarının Tespitinde Yeni Metodların Geliştirilmesi" başlıklı tezi ile ve Gaziosmanpaşa Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Tıbbi Biyokimya programında doktorasını "İskelet Kası İskemi Reperfüzyon Hasarına Karşı Krill yağı ve İskemik Önkoşullamanın (Preconditioning) Koruyucu Etkisi" isimli tezi ile tamamladı.