

T.C.  
İSTANBUL ÜNİVERSİTESİ  
CERRAHPAŞA TIP FAKÜLTESİ  
KALP VE DAMAR CERRAHİSİ ANABİLİMDALI  
Tez Yöneticisi: Doç. Dr. A. Kürşat Bozkurt

**ALT EKSTREMİTENİN DENEYSEL İSKEMİ-REPERFÜZYON  
MODELİNDE N-ASETİL SİSTEİN'İN REPERFÜZYON  
HASARININ ÖNLENMESİNDE KULLANIMI**

**UZMANLIK TEZİ  
DR. UĞUR CANGEL**



91062

**İSTANBUL-2000**

T.C. YÜKSEKÖĞRETİM KURULU  
DOKÜMANTASYON MERKEZİ

## ÖNSÖZ

Uzmanlık eğitimim süresince yetişmemde büyük emekleri olan, Prof. Dr. Ayla Gürel Sayın başta olmak üzere; Prof. Dr. Erkan Ahat, Prof. Dr. Hasan Tüzün, Doç. Dr. Kamil Kaynak ve Uz. Dr. Kazım Beşirli'ye ve eski kürsü başkanlarımız Prof. Dr. Kenan Aktan, Prof. Dr. Mehmet Özer ve Prof. Dr. Aytekin Erdağ'a, ayrıca merhum Prof. Dr. Yılmaz Karaözbek'e teşekkür ederim.

Bilgi ve deneyimlerinin yanında, her zaman bana destek olan tez hocam Doç. Dr. A. Kürşat Bozkurt'a ayrıca teşekkür ederim.

Bu çalışmanın oluşturulması sırasında tanıma mutluluğuna eriştiğim, tüm aşamalarında sağladığı destek ve yardımları ile tezin tamamlanmasını sağlayan Doç. Dr. Dildar Konukoğlu'na teşekkür ederim.

Hayvanların temini ve teze sağladığı yardımlar için Prof. Dr. Tuncay Altuğ'a ve özverili çalışmalarından dolayı İbrahim Bayrak'a teşekkür ederim.

Asistanlık yaşantım boyunca birlikte çalışmaktan mutluluk duyduğum tüm doktor arkadaşlarıma ve diğer klinik çalışanlarına teşekkür ederim.

**Dr. Uğur Cangel**

## İÇİNDEKİLER

<b>GENEL KONULAR VE GİRİŞ.....</b>	<b>1</b>
<b>AMAÇ.....</b>	<b>30</b>
<b>YÖNTEM VE GEREÇ.....</b>	<b>31</b>
<b>BULGULAR.....</b>	<b>34</b>
<b>TARTIŞMA.....</b>	<b>41</b>
<b>SONUÇ.....</b>	<b>45</b>
<b>ÖZET.....</b>	<b>46</b>
<b>SUMMARY.....</b>	<b>47</b>
<b>KAYNAKLAR.....</b>	<b>48</b>

## **GENEL KONULAR VE GİRİŞ**

Fizyopatolojik olarak oldukça karmaşık ve multifaktöryel olan iskemi-reperfüzyon sendromunun yol açtığı lokal doku hasarı ve sistemik etkileri, rekonstrüktif vasküler cerrahide önemli bir sorun olarak karşımıza çıkmaktadır. 1960 yılından beri akut ekstremitte arter tıkanıklıkları sonrası revaskülarizasyonu takiben myoglobini, hiperkalemi ve metabolik asidoz oluşacağı, bunların da şiddetli ve çoğunlukla öldürücü metabolik komplikasyonlara yol açacağı bilinmektedir. Bu olumsuz etkiler son zamanlarda reperfüzyon sırasında üretilen toksik serbest oksijen radikallerine bağlanmaktadır (1,2).

Serbest oksijen radikallerinin etkisini önlemede bugüne kadar birçok farmakolojik ajan deneysel ve klinik olarak araştırılmıştır. Bu çalışmada; oldukça yaygın bir şekilde mukolitik ajan olarak kullanılan, L-Sistein'in N-asetil türevi olan N-Asetilsistein (NAS)'in, serbest oksijen radikali temizleyici etkisi, oluşturulan alt ekstremitte deneysel iskemi-reperfüzyon modelinde araştırılmıştır.

### **a- GENEL BİLGİLER**

Canlı organizma bir hücreler kümesidir ve varlığını devam ettirmek için yaşamı boyunca çeşitli dış ve iç etkenlerle savaşım verir. Canlının en küçük işlevsel ünitesi olan hücre, aktif olarak bu savaşımın içindedir. Gerek dışarıdan dolaşım yoluyla gelen, gerek içerisindeki metabolik süreçler anında ortaya çıkan zararlı etkenler, hücrenin savunma mekanizmaları ile zararsız hale getirilebilir. Eğer bu başarılmaz ise geriye dönüşebilir hücre hasarı veya geri dönüşümsüz hücre ölümü olur.

Hücre yaralanmasına neden olan etkenleri aşağıdaki gibi sınıflandırabiliriz (1):

- 1- Hipoksi,
- 2- Fizik ajanlar,
- 3- Kimyasal ajan ve droglar,
- 4- İnfeksiyöz ajanlar,

- 5- İmmünolojik reaksiyonlar,
- 6- Genetik bozukluklar,
- 7- Beslenme bozuklukları.

Hücre hasarına yol açan ajanların biyokimyasal etki yerini her zaman saptamak mümkün olmasa da hücre içi 4 sistem özellikle yaralanmaya hassastır ve bunların devamlılığını sürdürmek gereklidir (1):

- 1- Hücre zarlarının bütünlüğünü devam ettirmek,
- 2- Oksidatif fosforilasyon ve adenzin trifosfat üretimini içeren aerobik solunum,
- 3- Enzim ve yapı proteinlerinin sentezinin sağlanması,
- 4- Hücrenin genetik yapısının bütünlüğünü korumak.

Hücre hasarının morfolojik belirtileri hücre içinde bazı kritik biyokimyasal mekanizmaların değişmesinden sonra görünür olur. Önceleri ışık mikroskobu kullanımıyla bu değişimlerin örneğin kalp kasında total iskemiden 10-12 saat sonra oluştuğu düşünülürken şimdi geriye dönüşsüz hücre hasarı için 20-60 dakikanın yeterli olduğunu biliyoruz (1).

Oksijen yokluğu, iskemik hücre hasarı patogeneğinde altta yatan nedendir. Kısmen indirgenmiş aktive oksijen türlerinin çoğu patolojik durumda hücre hasarının önemli sebebi olduğu açıktır. Bu serbest radikaller lipid peroksidasyonuna sebep olup , hücre yapısında pek çok hasar yapıcı özelliğe sahiptir (1,2).

Hipoksinin başlattığı olaylar dizisi ayrıntılı olarak tanımlanmıştır. Ancak hangi aşamada hücrenin gerçekten öldüğü, bu olayları durdurabilmenin mümkün olup olmadığı ve geri dönüşsüz noktanın ne olduğu sorularının yanıtı halen araştırılmaktadır.

Geri dönüşsüz hücre hasarını oluşturmak için gerekli hipoksi süresi hücre tipine ve hayvanın beslenme ve hormonal durumuna göre değişmektedir (3).

Öldürücü hipoksik yaralanmada iki bulgu geri dönüşümsüz hasarın devamlı elemanıdır. Birincisi mitokondriyal işlev bozukluğunun geriye döndürülmesinde yetersizlik olup ATP'de düşmeye yol açar. İkincisi hücre zarı işlevlerinde belirgin bozukluğun gelişmesidir. İkinci olay, yani hücre zarı hasarı, geriye dönüşümsüz hasarın merkezi noktasıdır. Hücre zarı hasarına birçok biyokimyasal mekanizma katılabilir (1):

- 1- Fosfolipidlerin ilerleyici kaybı,
- 2- Hücre iskeleti anormallikleri,
- 3- Reaktif oksijen türleri,
- 4- Lipid parçalanma ürünleri,
- 5- Hücre içi aminoasitlerin kaybı.

Tüm bu karmaşık olayları özetlersek, hipoksinin oksidatif fosforilasyonu ve böylece ATP yapımını etkilediğini, öldürücü hücre hasarının gelişiminde hücre zarı hasarının kritik nokta olduğunu ve kalsiyumun hücre ölümüne giden süreçte biyokimyasal ve morfolojik değişimlerin önemli elemanı olduğunu söyleyebiliriz.

#### **b- Serbest Radikalın Tanımı:**

Moleküllerdeki atomların yapısına baktığımızda, atomların uzayda bir yer kapladıklarını ve bu yere orbital adı verildiğini görüyoruz. Her orbitalde ise biri saat yönünde diğeri de tersi yönde hareket eden iki elektron bulunur. Eğer bir orbitalde yalnızca elektron bulunuyorsa buna eş olmayan (unpaired) elektron denir. Serbest radikal ise dış orbitalinde tek sayıda ortaklanmamış elektron taşıyan, elektrik yüklü veya yüksüz olabilen atom veya moleküllerdir (3,4). Kimyasal formüllerde bu elektron bir nokta ile ( $\text{OH}\cdot$ ) gösterilir. Bu bileşikler organizmada normal metabolik yolların işleyişi sırasında oluştuğu gibi, çeşitli dış etkenlerin etkisiyle de oluşmaktadır. Çok kısa yaşam süreli, ancak yapılarındaki dengesizlik nedeniyle çok aktif yapılı olan serbest radikaller tüm hücre bileşenleri ile etkileşebilme özelliği göstermektedir (1,4,5).

Doğal oksijen molekülü ( $\text{O}_2$ ), iki tane eş olmayan elektrona sahiptir ve kimyasal açıdan bir diradikaldir. Oksijen molekülündeki iki eşsiz elektron ayrı orbitallerde bulunurlar, ancak hareket

yönleri aynıdır. Oksijen molekülü, elektron alıcısı olarak davranır ve oksidasyon yapar, ancak orbital yapısındaki özellik nedeniyle oksijen diradikali termodinamik olarak elektron almaya eğilimli iken kinetik olarak elektron vermek istemez. Eğer bir oksijen diradikali bir molekül veya atomu okside edecekse (2 elektron alacaksa), bu elektronların her biri mevcut elektronların hareket yönünün tersinde hareket eden elektronlar olmaları gerekir. Başka bir molekülün aynı orbitalindeki bir çift elektron bu gerekliliğe uymaz ve bu nedenle oksijen non-radikallerle çok yavaş reaksiyona girer. Ancak birçok oksidaz ve oksijenaz enzimleri ile mitokondriyal elektron transport zincirinde bulunan başta demir olmak üzere metal iyonları, bir elektron alma (veya verme) kapasiteleri sayesinde bu yörünge kısıtlanmasının üstesinden gelebilirler (1,6,7,8).

Genel kimya açısından tarif ettiğimiz bu serbest radikaller ve özellikle aktive oksijen türleri, kimyasal ve radyasyon yaralanması, oksijen ve diğer gaz yaralanmaları, hücre yaşlanması, fagositik hücrelerle mikrobiyal öldürme, inflamatuvar hasar ve makrofajlarla tümör destrüksiyonu gibi pek çok olayın ortak sonucudur (1).

### **c- Serbest Radikallerin Oluş Mekanizması ve Kimyasal Reaksiyonlar**

Serbest radikaller;

- 1- Radyant enerjinin emilmesiyle (ultraviyole ışıkları, x-ışınları),
- 2- Endojen yolla, normal metabolik süreçler süresince oluşan genellikle oksidatif reaksiyonlarla, veya
- 3- Ekzojen kimyasallar veya ilaçların enzimatik metabolizması yoluyla (örn:  $CCl_4$ 'ün bir ürünü olan  $CCl_3$ ) hücre içinde başlatılabilirler (1).

Aerobik metabolizması olan memelilerde serbest radikaller başlıca oksijenden türemektedir (9,10). Ancak organizmada oksijen türevi serbest radikaller dışında karbon ve kükürt merkezli radikaller de oluşmaktadır (Tablo 1).

Bilindiği gibi , oksijen normal olarak sitokrom oksidaz tarafından katalize edilerek H<sub>2</sub>O 'nun 4 elektron indirgenmesine neden olur. Hücre içi oksijenin varlığı kısmen indirgenmiş toksik ara oksijen türlerinin uygunsuz üretimine yol açar. Bu türlerden en önemli üçü süperoksit, hidrojen peroksit ve hidroksil iyonlarıdır. En önemli üç serbest radikali oluşturan bu toksik bileşikler sitozol, mitokondri, lizozom, peroksizom ve plazma membranları gibi hücrenin çeşitli yerlerinde çeşitli oksidatif enzimlerin aktivitesi ile üretilebilirler (1,7).

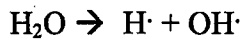
Süperoksit hem mitokondride oto-oksidasyon süresince direkt olarak hem de ksantin oksidaz, sitokrom P-450 ve diğerleri gibi sitoplazmik enzimler yoluyla enzimatik olarak oluşturulur (1).

Süperoksit bir kez oluştuğunda hızla süperoksit dismutaz sayesinde H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> oluşturularak inaktive edilir (1).

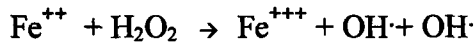
Süperoksit radikali asıl toksisitesini hidroksil radikali oluşturarak gösterir ve O<sub>2</sub>'nin ferritin ve transferrinden iyonik demiri çözme yeteneğine de sahip olduğu gösterilmiştir. Ortama süperoksit dismutaz eklenmesi demir çözülmesini %95-97 oranında önleyebilmekte, ortam hipoksik oldukça O<sub>2</sub>'nin demir çözme yeteneği artmaktadır (2).

Hidroksil radikalleri şu durumlarda oluşur;

1- İyonizan radyasyonun neden olduğu su hidrolizi



2- Fenton reaksiyonunda geçiş metallerinin (örn: demir, bakır) etkileşimiyle



3- Haber- Weiss reaksiyonu ile oluşur:





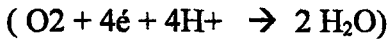
Demir toksik oksijen yaralanmasında özellikle önemlidir. Süperoksit, demirin Fenton reaksiyonu için gerekli ferric ( $\text{Fe}^{+++}$ ) şekliinden ferröz ( $\text{Fe}^{++}$ ) şekle dönüşünü artırır (1).

Demir hücre içinde ve dışında proteinlere bağlı olarak bulunur. Bu proteinlerden birincisi, bir transport proteini olan transferrindir. Transferrin, fizyolojik pH'ta her molü başına iki mol  $\text{Fe}^{+++}$  bağlar. Normal plazmada bağlanacak  $\text{Fe}^{+++}$ 'ten çok fazla transferrin bulunur ve bu yüzden transferrin saturasyonu % 20-30 arasındadır. Ayrıca, plazmada serbest iyonik demir bulunmaz. Sindirim sisteminden emilen demirin derhal transferrine bağlanması ve plazmada serbest iyonik demir bulunmamasının çok özelleşmiş transport mekanizmaları ile izlenmesi, hücre dışı sıvılarda serbest oksijen radikali oluşumunu engelleyecek birincil sistemdir. Kaçınılmaz olarak hücre içinde de bir miktar demir bulunduğundan antioksidan savunma için hücre içi enzim sistemlerinin varlığı önemlidir. Transferrinin demir bağlaması dışında albümin, haptoglobin, hemopeksin, ve laktoferrin de benzer işlev yaparlar. Serüloplazmin de  $\text{Fe}^{++}$  i  $\text{Fe}^{+++}$  e okside ederek hızla transferrine bağlanmasını sağlar. Fizyolojik pH'da transferrine bağlı demirin ne lipid peroksidasyonunu ne de  $\text{OH}\cdot$  oluşumu yapamadığı gösterilmiştir. Ancak pH'nın 6'nın altına inmesiyle demir transferrinden ayrılır ve bu demirin hücre içinde serbest kalmasının mekanizmasıdır. Haber-Weiss reaksiyonu, metal iyonlarının katalizörlüğü olmadan çok yavaş ilerler. Ancak özellikle demirin bu reaksiyonu hızlandırdığının bulunmasından sonra  $\text{OH}\cdot$  radikalinin önemi anlaşılmış ve serbest oksijen radikallerinin akciğer, beyin, kalp, deri flepleri ve karaciğer gibi dokularda yaptıkları hasar belirlenmiştir (3).

Haber-Weiss reaksiyonunu serbest demir iyonunun katalize edebileceği, bağlı demirin böyle bir etkisinin olamayacağı pek çok araştırmacı tarafından belirtilmiştir. İskemik dokularda demirin transferrinden çözülerek serbest kaldığı ve  $\text{OH}\cdot$  radikali oluşturduğu da yine deneysel olarak kanıtlanmıştır. Bu durumda serbest oksijen radikalleri açısından postiskemik dokularda oluşan olaylar özetlenirse ; iskemi sırasında  $\text{Ca}^{++}$  iyonu tarafından aktive edilen proteaz ksantin dehidrogenazı ksantin oksidaza dönüştürmekte, iskemi sonucu AMP metabolizması ile oluşan hipoksantin artmakta, düşen pH nedeniyle transferrinden bir miktar demir iyonu ayrılmakta,

ksantin oksidazın oluşturduğu  $O_2\cdot$  radikali hem direkt hasar yapmakta hem de transferrinden daha fazla demir iyonu ayrılmasını sağlamaktadır. Ortamda bulunan süperoksit radikallerinin bir kısmı süperoksit dismutaz ile giderilmekte, ancak ani ve fazla miktarda oluşan  $O_2\cdot$  radikallerinin tümü için süperoksit dismutaz aktivitesi yetersiz kalmakta, sonuçta postiskemik dokuda  $O_2\cdot$ , demir iyonu ve süperoksit radikalının dismutasyonu ile oluşan  $H_2O_2$  birarada bulunmaktadır (2).

İnsanda oksijen indirgenmesi ile ilgili reaksiyonların %98'i, mitokondrilerde bulunan sitokrom oksidaz enzim sistemi tarafından katalize edilir ve bu 4 elektronlu indirgenme sonucunda su oluşur.



Sitokrom oksidaz karmaşık bir enzimdir, oksijen molekülüne elektronları birer birer ekler ve radikali bağlayarak ortama salınmasını engeller. Ancak oksidatif fosforilasyonda kullanılan oksijen moleküllerinin tümü çok özelleşmiş olan sitokrom oksidaz sisteminden geçerek indirgenmez. Oksijen moleküllerinin %1-2'si daha az özelleşmiş enzim sistemlerinden geçer, bu şekilde univalan indirgenme ve oksijen radikalleri oluşur. Örneğin oksijen molekülüne bir elektron eklenmesi süperoksit radikalini ( $O_2\cdot$ ), iki elektron eklenmesi ise çok reaktif olan hidroksil ( $OH\cdot$ ) radikalini ortaya çıkarır. Hidrojen peroksit ( $H_2O_2$ ) eşsiz elektronu olmadığından radikal sayılmaz ancak  $OH\cdot$  oluşturabildiğinden ve direkt doku hasarı yapabileceğinden radikal sayılmaktadır (3).

Sitokrom oksidaz sisteminden sızan % 1-2 oksijen dışında iki enzim sistemi daha in vivo serbest oksijen radikali oluşumunda rol oynar. Bu enzimler;

#### 1- NADPH dehidrogenaz

Nötrofiller ve diğer inflamatuvar hücreler plazmada membrana bağlı NADPH oksidaz sistemini harekete geçirebilirler. Sonuçta NADPH,  $NADP^+$  ye yükseltgenir ve serbest oksijen radikalleri çıkar;



Bu, organizma tarafından istemli olarak serbest oksijen radikali oluşturulan tek durumdur ve oluşan süperoksit radikali, inflamatuvar yanıtta intrasellüler öldürme yeteneğinin bir parçasıdır. Fizyolojik pH'larda, oluşan  $O_2\cdot$  radikali  $H_2O_2$  ve  $O_2$ 'e dismutate olur. Bu dismutasyon reaksiyonunu organizmada bulunan fizyolojik bir serbest oksijen radikali giderici, süperoksit dismutaz (SOD) enzimi sağlar (2,11).

Dismutasyon ürünü olan  $H_2O_2$ 'nin uzaklaştırılması için iki enzim sistemi mevcuttur. Birincisi hücre içinde peroksizomlarda bulunan katalaz, ikinci ve daha önemlisi glutatyon peroksidaz enzimleridir. Bunlardan sonra, savunmanın son basamağında sınıflandırılmayan antioksidanlar bulunur; hücrenin hidrofilik bölgelerinde askorbik asit, sistein, seruloplazmin ve transferrin; hidrofobik bölgelerinde ise bir çok yağ asidi ve E vitamini (4,12,13).

## 2- Ksantin oksidaz.

İn vivo serbest oksijen radikali oluşturan diğer enzim ise ksantin oksidazdır. Bu enzim, purin metabolizmasının son oksidasyonu olan hipoksantinin ksantine oksidasyonunu gerçekleştirir; ksantin oksidaz  $O_2$  varlığında hipoksantini ksantine, ksantini de ürik aside okside ederek ortama  $O_2\cdot$  ile  $H_2O_2$  salınmasını sağlar. Normal dokularda ksantin oksidaz, ksantin dehidrogenaz olarak bulunur, elektron alıcısı olarak  $O_2$  yerine  $NAD^+$ 'yi kullanır ve bu reaksiyonlar sonucunda hiçbir serbest oksijen radikali oluşmaz (2).

Postiskemik dokuda süperoksit radikalının büyük kısmının kaynağı ksantin oksidaz sistemidir. Bu enzim ksantin dehidrogenaz olarak sentezlenir ve elektron alıcısı olarak  $NAD^+$ 'yi kullandığından normal dokularda ne  $O_2\cdot$  ne de  $H_2O_2$  oluşmaz. Dokuya kan sağlanması belli bir düzey altına indiğinde ATP üretimi için gerekli  $O_2$  miktarı da düşer. Enerji deposu azaldığında hücre, membranından gerekli iyon transportunu yapamaz hale gelir ve sonuçta hücre sitozolünde kalsiyum iyonu konsantrasyonu oranı artar. Artan  $Ca^{+2}$  konsantrasyonu da ksantin dehidrogenazı ksantin oksidaza dönüştürecek proteazları harekete geçirir. Proteaz aktivitesinin  $Ca^{+2}$  iyonu ile arttığı değişik deney hayvanlarının değişik dokularında gösterilmiştir. Bu da tıpkı serbest oksijen radikallerinin yaptığı hasar gibi türe özgü değildir (2,7).

Hücrenin ATP miktarının azalması ile eş zamanlı olarak AMP miktarı artar, AMP de adenozin, inozin ve hipoksantine metabolize olur. Hipoksantin miktarının iskemik dokularda arttığı bilinmektedir ve hemorajik şokta görülen tüm beden hipoksisi ve kısmi iskemisinde de dolaşımda bulunan miktarı artar. Artmış hipoksantin, aktivitesi yükselmiş ksantin dehidrogenaz tarafından metabolize olur ve şekil 1'de görüldüğü gibi toksik serbest radikaller ortama salınır. Özetle iskemik dokularda iki önemli değişiklik olur; yeni bir enzim aktivitesi , ksantin oksidaz belirir ve bu enzimin gerekli iki substratından biri, hipoksantin oluşur. Diğer bir substrat olan moleküler oksijenin de reperfüzyonla sağlanmasıyla dokuda ani ve çok miktarda süperoksit radikali ve hidrojen peroksit oluşur.

#### **d- Serbest Radikallerin Sınıflandırılması:**

Aerobik metabolizması olan memelilerde serbest radikaller başlıca oksijenden türemektedir (Tablo 1). Ancak organizmada oksijen türevi serbest radikaller dışında karbon ve kükürt merkezli radikaller de oluşmaktadır (7).

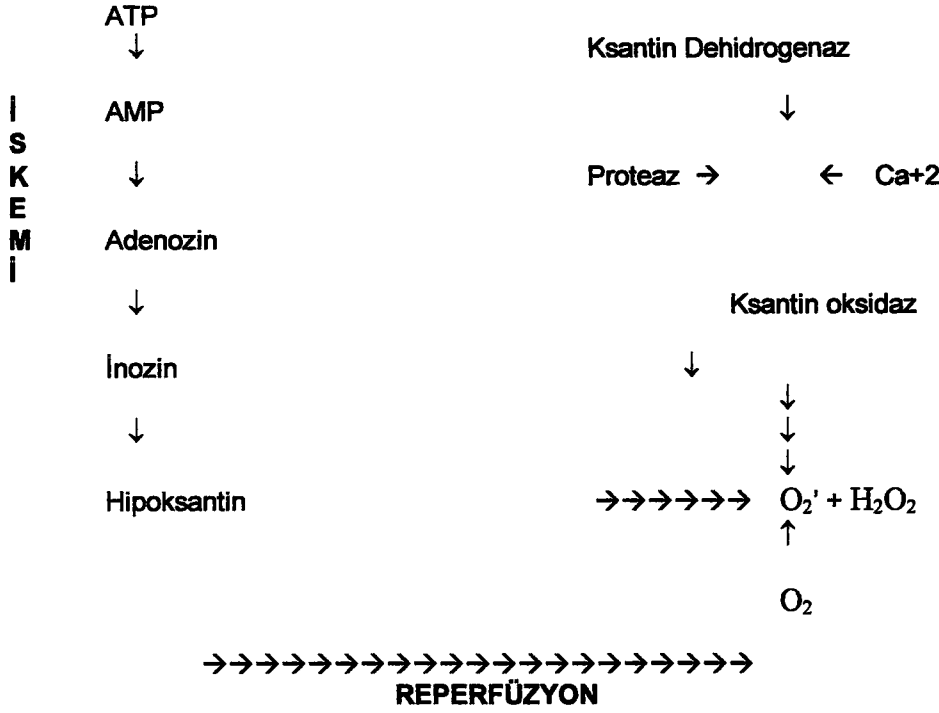
Tablo 1: Oksijen türevi bileşikler

#### **Radikaller:**

Hidroksil  
Alkoksil  
Peroksil  
Süperoksit  
Nitrik oksit  
Azot dioksit

#### **Radikal olmayanlar**

Hidrojen peroksit  
Singlet oksijen  
Ozon  
Hipoklorid asit  
Lipid hiperoksit  
Peroksinitrit.



**Şekil 1.** İskemik dokularda ksantin oksidaz yolu ile serbest oksijen radikali üretimi (5,8).

Serbest radikaller hücrenin tüm bölümlerinde oluşabilme özelliğindedir. Hücrede zara bağlı veya serbest olarak bulunan değişik enzimlerin etkisi ile serbest radikaller oluşmaktadır. Bu radikal oluşumu hücre tiplerine göre değişiklik göstermesine rağmen, tüm aerobik hücrelerde belirli düzeylerde radikal oluşmaktadır. Bu oluşum mitokondrideki elektron transport zinciri reaksiyonlarını, endoplazmik retikulumdaki karma fonksiyonlu oksidaz sistemini, sitoplazmada ksantin oksidaz, dopamin B- hidroksilaz, D- amino asit oksidaz, urat oksidaz gibi enzimlerin etkinliğini, hücre zarına bağlı NADPH oksidaz, prostaglandin sentetaz ve lipoksijenazların faaliyetini, peroksizomlarda ve lizozomlardaki metabolik olayları kapsamaktadır (2,6,7,8,9).

Serbest radikaller, hücre ve dokularda birçok zarara yol açmaktadır. Bu zararlar şöyle sıralanabilir (7):

- a- DNA'nın tahrip olması,
- b- Nükleotit yapılı koenzimlerin yıkımı,
- c- Tiollere bağımlı enzimlerin yapı ve fonksiyonlarının bozulması, hücre ortamında tiol/disülfit oranının değişmesi,

- d- Protein ve lipidlerle kovalan bağlantılar yapması,
- e- Enzim aktivitelerinde ve lipid metabolizmasındaki değişiklikler,
- f- Mukopolisakkaritlerin yıkımı,
- g- Proteinlerin tahrip olması ve protein " turnover"nin artması,
- h- Hücre ve organellerin zarlarında bulunan lipidlerin peroksidasyonu, hücre zarı yapısı ve fonksiyonunun değişmesi,
- i- Hücre zarı proteinlerinin tahribi, taşıma sistemlerinin bozulması,
- j- Seroid ve yaş pigmenti denilen bazı maddelerin birikimi,
- k- Kollagen ve elastin gibi uzun ömürlü proteinlerdeki oksido-redüksiyon olaylarının bozularak kapillerlerde aterosklerotik değişikliklerin oluşması.

Süperoksit radikali moleküller düzeyde hasar yaparak hücre ölümüne neden olur. Ayrıca  $O_2^-$ , hidroksil radikali gibi daha toksik radikaller oluşturarak indirekt hasara da yol açar. Dokularda karşılaşılan serbest oksijen radikali hasarının büyük kısmını  $OH\cdot$  radikali oluşturur; bu radikal bütün biyolojik moleküllerle çok çabuk ( $10^{-9}$  sn. ) reaksiyona girerek hasara yol açar (1,10).

#### e- Antioksidanlar

Serbest oksijen radikallerinin hasar yapıcı özelliklerine karşın hücreler doğal olarak oksidatif hasarı azaltmaya veya sınırlamaya yeteneklidirler. Bu hücre koruyucu mekanizmalar oksijen radikallerini gidermek ve detoksifiye etmek üzere düzenlenmiş birkaç enzim sistemini içerirler. Başlıca doğal antioksidan etki çeşitleri şunlardır (7,11,12):

- 1- Reaktif oksijen türlerinin enzim reaksiyonları aracılığıyla veya doğrudan temizlenmesi,
- 2- Reaktif oksijen türlerinin oluşmasının baskılama yoluyla engellenmesi,
- 3- Metal iyonlarının bağlanması ve böylece radikal oluşum reaksiyonlarının engellenmesi,
- 4- Hedef moleküllerin hasar sonrası tamiri veya temizlenmesi.

**Tablo 2:** Doğal savunma mekanizmaları ve işlevleri (7,13,14).

<u>Savunma mekanizması</u>	<u>İşlev</u>
Sitokrom oksidaz sistemi -----	Dört değerli O <sub>2</sub> indirgenmesi
Süperoksit dismutaz -----	O <sub>2</sub> <sup>-</sup> dismutasyonu
Katalaz ve glutatyon preoksidaz -----	H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> 'i uzaklaştırır
Transferrin, Askorbik asit, Sistein ve Seruloplazmin -----	Hidrofilik bölgelerde serbest radikalleri süpürür.
Vitamin E ve birçok yağ asidi -----	Hidrofobik bölgelerde serbest radikalleri süpürür.

Doğadaki antioksidanların topluca listesini tablo 3'de görüyorsunuz.

**Tablo 3:** Antioksidan sistemin başlıca elemanları

#### ENZİMLER

Süperoksit dismutaz (SOD)

Katalaz

Glutatyon Peroksidaz (GSH-Px)

Glutatyon redüktaz (GSH-R)

Glutatyon transferaz (GST)

#### SUDA ÇÖZÜNEN RADİKAL TUTUCULARI

Glutatyon

Vitamin C

Ürik asit

Glukoz

Sistein

## YAĞDA ÇÖZÜNEN RADİKAL TUTUCULARI

Vitamin E

B- karoten

Bilirubin

Ubikinol

Flavanoidler

## METAL İYONLARINI BAĞLAYAN PROTEİNLER

Ferritin

Transferrin

Haptoglobin

Hemopeksin

Seruloplazmin

Albümin

## DİĞER ANTİOKSİDANLAR

## DİĞER ANTİOKSİDANLAR

Yukarıda sözü edilen antioksidanların dışında, çok sayıda endojen ve ekzojen molekülün antioksidan etkisi olduğu ileri sürülmüştür (Tablo 4).(1,12).

### Tablo 4 : Antioksidan etkili endojen ve ekzojen moleküller

#### 1- Endojen moleküller:

- Sistein, histidin gibi amino asitler
- Safra asitleri
- Sitokinler

#### 2- Ekzojen moleküller

- Ksantin oksidaz, NADPH oksidaz gibi radikal kaynağı enzimlerin inhibitörleri



- Lokal anestezipler,
- Kalsiyum kanal blokerleri: Verapamil,  
Nifedipin,  
Nitrendipin,
- Steroid yapıda olmayan antiinflatuarlar: İbuprofen,
- Rekombinant antioksidan enzimler (r-SOD),
- GSH\_Px aktivitesini arttıran veya benzer etki gösteren moleküller: Asetil, Ebselen.
- Serbest radikal toplayıcıları: DMSO, Mannitol.
- Demir tutucuları: Deferroksamin, EDTA.
- Besinlere eklenen koruyucular: BHA, BHT, Sodyum Benzoat, Propil gallat.
- Nötrofil inhibitörleri: Siklosporin A, FK 506, İbuprofen, Steroidler.
- Nötrofile karşı monoklonal antikor: RP3
- Endotel reseptörlerine ( ICAM-1, ICAM-2) karşı monoklonal antikor.

Doğadaki antioksidanları çeşitli kriterlere göre gruplandırmak olasıdır:

#### 1- Yapılarına göre

- a- Enzimler (Sitokrom oksidaz, süperoksit dismutaz, katalaz, glutatyon peroksidaz ve glutatyon transferaz)
- b- Enzim olmayan proteinler, küçük moleküller (askorbik asit, glutatyon, E vitamini, keratonoidler ve retinoidler, ubikinonlar, flavanoidlar, melatonin, ürik asit ve albümin)

#### 2- Kaynaklarına göre

- a- Organizmaya ait olanlar (endojen antioksidanlar: SOD, katalaz, glutatyon peroksidaz, bilirubin, ürik asit, sistein, histidin, albümin, safra asitleri, sitokinler)
- b- Dışarıdan alınanlar (eksojen antioksidanlar: alfa-tokoferol, beta-karoten, askorbik asit, enzim inhibitörleri, lokal anestezipler, kalsiyum kanal blokerleri, non-steroid antiinflatuar ilaçlar, DMSO, mannitol, deferroksamin, sodyum benzoat, propil gallat)

gibi besin koruyucuları, Siklosporin A ve FK 506 gibi n6trofil inhibit6rleri, antin6trofil antikorlar, endotel resept6rlerine karşı monoklonal antikorlar)

3- 6z6n6rl6klerine g6re

- a- Suda 6z6nenler
- b- Lipidlerde 6z6nenler

4- Yerleřimlerine g6re

- a- H6cre içinde bulunanlar
- b- Plazma ve diğer ekstrasell6ler sıvılarda bulunanlar.

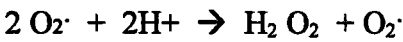
### **Doğal Endojen antioksidanlar**

İnsanda da doğal olarak bulunan antioksidanlar vardır. Bunlar,

- 1- S6peroksit dismutaz
- 2- Katalaz
- 3- Glutasyon peroksidaz
- 4- Bilirubin
- 5- 6rik asittir.

1- S6peroksit dismutaz:

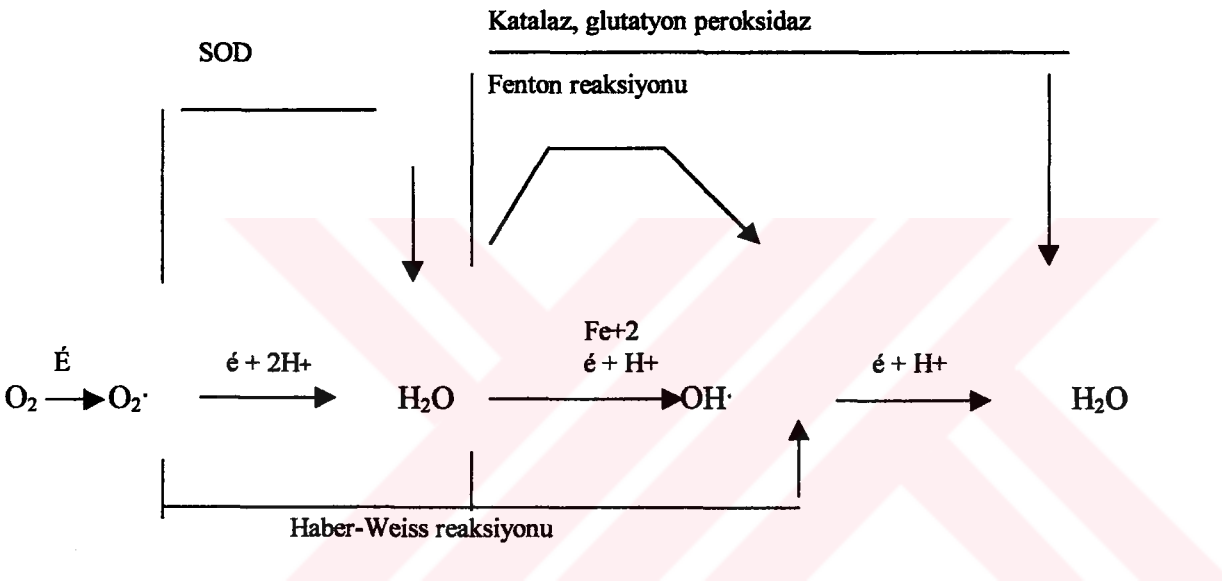
Bir metalloprotein olan s6peroksit dismutaz, dismutasyon olarak bilinen reaksiyonu katalize eder;



H6crelerdeki s6peroksit dismutaz miktarı normal koşullarda oluşan  $O_2$  üretimini karşılayacak kadardır. Y6ksek oksijen konsantrasyonlarında s6peroksit dismutaz sentezi artmakla birlikte detoksifikasyonda yetersiz kalmakta, ayrıca ekstrasell6ler ortamda bu enzim bulunmamaktadır.

Dismutasyon ile oluşan  $H_2O_2$  ise katalaz veya glutatyon peroksidaz enzimleri tarafından  $O_2$  ve  $H_2O$ 'ya indirgenmektedir (2,15).

Serbest radikallere karşı organizmadaki ilk savunma SOD enzimiyle gerçekleşir (Şekil 2). SOD, katalaz ve glutatyon peroksidazdan farklı olarak serbest radikali substrat olarak kullanır. SOD enziminin aerobik hücrelerin tümünde bulunup anaerob hücrelerin çoğunda bulunmadığı bilinmektedir. Fridovich ve arkadaşları SOD enziminin aerobik hücrelerin yaşamı için gerekli olduğunu göstermişlerdir (16).



Şekil 2: Antioksidan enzim sistemi ( 7,16).

Organizmada oksidan stresin arttığı klinik durumlarda SOD enzimi aktivitesini arttırarak koruyucu etkinliğini devam ettirir. Özellikle antioksidan etkili diğer enzimlerin aktivitesinde azalmanın söz konusu olduğu klinik durumlarda SOD enziminin aktivitesinin arttığı çeşitli araştırmalarda gösterilmiştir (17).

## 2- Katalaz

Katalaz, tüm hücre tiplerinde değişik konsantrasyonlarda bulunan bir hem-enzimdir. %20 oranında sitoplazmada ve %80 oranında peroksizomlarda lokalizedir.  $H_2O_2$  ile reaksiyona girer (17).

### 3- Glutatyon Peroksidaz

Normal koşullarda hücrede bulunan  $H_2O_2$ 'in detoksifikasyonundan esas olarak glutatyon peroksidaz sorumludur. GSH- Px lipid peroksidasyonunun başlamasını ve gelişmesini önleyici özellikte bir enzimdir (17).

Süperoksit radikalinin detoksifikasyonu için enzim sistemleri bulunmasına karşın  $OH\cdot$  için benzer sistemler yoktur. Hidroksil radikali düzeyi, ancak  $H_2O_2$  ve  $O_2\cdot$  düzeylerinin kontrolü yardımıyla denetlenebilir. Süperoksit dismutaz etkili bir biçimde  $O_2\cdot$  detoksifikasyonu yapmasına karşın sonuçta  $H_2O_2$  olduğundan serbest radikaller tam olarak giderilmiş sayılmaz. Çünkü  $O_2\cdot$  ve  $H_2O_2$ , demir katalizörlüğünde reaksiyona girerek  $OH\cdot$  oluştururlar ve bu bilinen en toksik serbest oksijen radikalidir. Hidroksil radikali, suyun yüksek enerjili iyonizan radyasyona maruz bırakılmasıyla da oluşur ve canlı dokularda iyonizan radyasyonun yaptığı hasarın büyük kısmından sorumludur (2).

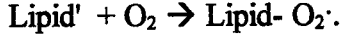
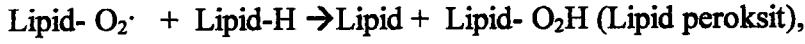
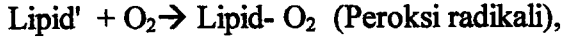
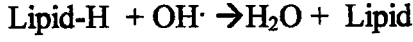
### 4- Bilirubin

### 5- Ürik asit.

### f- Lipid Peroksidasyonu

Lipid peroksidasyonu, serbest radikaller tarafından başlatılan ve zar yapısındaki çoklu doymamış yağ asitlerinin oksidasyonunu içeren kimyasal bir olay olarak tanımlanmaktadır (7).

Hidroksil radikali DNA, protein ve karbohidratlar dahil olmak üzere her canlı moleküllü ile reaksiyona girerek hasar yapar, membran lipidlerinden  $H^+$  çıkararak lipid peroksidasyonunu başlatır;



Hidroksil radikalinin başlattığı peroksidasyon, zincirleme bir reaksiyondur ve lipid zinciri bitene ya da reaksiyon bir antioksidan tarafından durdurulana kadar devam eder (7).

Lipid peroksidasyonu, lipid hiperoksitlerinin aldehit ve diğer karbonil bileşiklere dönüşmesiyle sona ermektedir. Bu bileşiklerden sonuncusu olan malondialdehit (MDA) miktarı, tiyobarbitürik asit testi ile ölçülmekte ve bu yöntem lipid peroksit düzeylerinin saptanmasında sıklıkla kullanılmaktadır. Lipid hiperoksitlerinin parçalanması ile oluşan etan, bütan ve pentan gibi gazların tayini de son yıllarda lipid peroksidasyon göstergesi olarak değerlendirilmektedir (7).

Klinikte fizyopatogenezinde lipid peroksidasyonunun etkili olduğu durumlar olarak şunları sayabiliriz:

- 1- Yaşlanma,
- 2- Ateroskleroz,
- 3- Kanser,
- 4- Radyasyon hasarı,
- 5- İskemi-reperfüzyon hasarı,
- 6- İnflamasyon (yara iyileşmesi / yaralanma),
- 7- Romatoid artrit ve diğer otoimmün hastalıklar,
- 8- Diabetes mellitus,
- 9- Akciğer hastalıkları (sigara, amfizem, oksijen toksisitesi, asbestoz, bronkopulmoner displazi),
- 10- Beyin bozuklukları (hiperbarik oksijen, alüminyum toksisitesi, nörotoksinler, Alzheimer hastalığı, Parkinson hastalığı),
- 11- Böbrek bozuklukları (otoimmün nefroz, aminoglikozid nefrotoksitesisi, ağır metal nefrotoksitesisi),

- 12- Kardiak myopati (Keshan hastalığı),
- 13- Kas hastalıkları (kas distrofisi, multipl skleroz, egzersiz),
- 14- Göz bozuklukları (maküler dejenerasyon, katarakt)
- 15- Cilt bozuklukları (solar radyasyon, kontakt dermatit)
- 16- Karaciğer bozuklukları (endotoksin, alkol, halojenli hidrokarbonlar, asetaminofen, demir)
- 17- Kan hastalıkları (fenil hidrazin, primaquin, sülfonamid gibi kimyasal bileşikler, protoporfirin fotooksidasyonu, malarya, orak hücre anemisi, favizm),
- 18- Gastrointestinal bozukluklar (ülseratif kolit, steroid olmayan antiinflamatuvar ilaçlara bağlı hasar),
- 19- Beslenme yetersizlikleri (Kwashiorokor, vitamin E eksikliği)
- 20- Yanık (sistemik hasar ve lokal ilerleyici hasar),
- 21- Şok.

#### **g- İskelet Kası İskemi-Reperfüzyon Hasarının Patofizyolojisi**

Arteriyel oklüzyonu takiben ekstremitenin revaskülarizasyonu ile hastaların çoğunda metabolik bulgularda geçici veya uzamış değişiklikler oluşur (18).

Metabolik asidoz her zaman, ancak çeşitli derecelerde görülür ve asit metabolitlerin birikimi ile ilgili olduğu yapılan çalışmalarla gösterilmiştir. Dokunun hipoksik kalması veya tam bir anoksi, krebs siklusu ile gerçekleştirilen aerobik solunumda belirgin bir azalmaya sebep olacaktır. Krebs siklusunda bu azalma anaerobik solunumu arttıracak böylece devreye Embden-Meyerhoff yolu girecektir. Bu da kanda ve dokuda oldukça yüksek laktik ve pirüvik asitin oluşmasına neden olacaktır. Başlangıçta laktat ve pirüvat değerleri eşit derecede yükselirken bir süre sonra laktat düzeyinde pirüvat düzeyine göre belirgin bir artış görülür bu da laktat/pirüvat oranında artışa sebep olur (19).

Kan pH ve CO<sub>2</sub> düzeyi belirgin bir şekilde düşer. Bikarbonat düzeylerinde düşme gözlenirken katyon ve anyonlarda artış dikkat çeker. İskemik kalan ekstremitenin revaskülarizasyonundan önce ilgili ekstremitenin pH ve venöz dönüşü metabolik asidozun şiddetine göre değişir. Eğer başlangıç

pH 7.2'den düşük ise prognoz oldukça kötüdür. Tedavide revaskülarizasyon sonrası hidrojen iyonunun nötralizasyonu için yeterli tampon bileşiklerin verilmesi gerekir (18,20).

İskemik ekstremitedeki venöz pO<sub>2</sub> konsantrasyonu sistemik venöz kandakinden daha düşük, venöz pCO<sub>2</sub> düzeyi ise sistemik kandakine göre anlamlı olarak daha yüksektir. Arteriyel dolaşımın restorasyonundan sonra venöz pO<sub>2</sub> ve pCO<sub>2</sub> düzeyleri iskeminin şiddetine ve süresine bağımlı olarak çeşitli sürelerde normal düzeylere ulaşır (21).

Olguların çoğunda serum sodyum düzeyleri normal sınırlardadır. Potasyum düzeyi ise başlangıçta iskemik bacadan gelen venöz kanda ve serumda aynı ve normal düzeylerde bulunurken revaskülarizasyon sonrası artış gözlenir. Hafif olgularda, örneğin iskemik süre 6 saatten az olanlarda, potasyum düzeyini normale getirmek kolay iken uzun süreli iskemik kalan olgularda bu hiç de kolay değildir. Şiddetli olgularda potasyum düzeyi kalp kasının kasılmasını etkileyecek kadar şiddetlidir. Uzun süre iskemik kalan dokunun revaskülarizasyonu ile artmış potasyum düzeyi kaslarda sitolize sebep olacak ve ani deklampajla ekstrasellüler ortamda aşırı potasyum artışı sonucu kardiyak arreste yol açabilecektir (22).

Enzimatik Değişiklikler: Serum kreatinin fosfokinaz düzeyi (CPK) revaskülarizasyondan önce sistemik kanda hafifçe artarken iskemik bacadaki venöz kanda oldukça yüksek olduğu gözlenir. Arteriyel klemptin kaldırılması ile oluşan revaskülarizasyonla CPK düzeylerinde artış görülür. Bu enzimin artışı çizgili kaslardaki hasarın kesin kanıtıdır (23,24). Bu enzimin yüksek düzeylerde olması kas nekrozunu gösterir. Böyle olgularda cildin korunmuş veya intakt görünüşü altındaki kasın nekroza uğramadığını göstermemektedir ve çoğu zaman yanıltıcıdır. Hafif olgularda serum CPK düzeyleri birkaç saat veya bir iki gün içinde düşer. Deneysel çalışmalarda CPK'nın diğer metabolitlere, örneğin myoglobuline göre daha yavaş yükseldiği gösterilmiştir. Orta derecede şiddetli bir iskemi-reperfüzyon sendromunda CPK düzeyi 1000-2000 Ünite düzeyine ulaşır ve 10-12 gün içerisinde normal düzeyine düşer. Şiddetli ve fatal olgularda CPK progressif olarak yükselir ve 20 000 düzeyine ulaşır (25,26).

Laktat Dehidrogenaz (LDH) ve serum glutamik-oxaloasetik transaminaz (SGOT) düzeylerinin iskemi-reperfüzyon sendromunda oldukça yüksek olduğu gösterilmiştir. Serum glutamik-pirüvik transaminaz (SGPT) SGOT kadar yükselmese de yine de normalin üzerindedir. Her ikisi de iskeminin düzeyine göre artış gösterir. Şiddetli kas yıkımı olan iskemi-reperfüzyon sendromunda transaminazların kalıcı yüksekliği dokularda geri dönüşümsüz değişikliklerin olduğunu gösterir.

Aslında LDH ve CPK'nın yüksekliğini yalnızca iskemi-reperfüzyondan değil myokard infarktüsü gibi daha geniş spektrumda birçok hastalıkta da olabileceği gözönünde bulundurulmalıdır. Myokard infarktüsünde LDH ve CPK yüksekliğinin gösterilmesi iskemi-reperfüzyon sendromunda gösterilmesinden çok daha öncedir. Şiddetli tıkaçıcı arter hastalığı olan hastalarda myokardial hasarın olabileceği de düşünülmesi ve ileri tetkikler yapılmalıdır. Bu nedenle LDH ve CPK'nın alt grupları önem taşır. LDH'nın iki alt grubu LDH1 ve LDH2 myokardial infarktüste artarken, LDH4 ve LDH5 çizgili kas yıkımında arttığı gösterilmiştir. Aynı zamanda CPK'nın da ikinci fraksiyonu veya MB fraksiyonu olarak tanımlanan alt grubu myokard infarktüsünde artarken MM fraksiyonu çizgili kas yıkımında artar. Enzim düzeylerinin kanda azalmasının görülmesi kas yıkımının gerilediğini gösterir. Enzim düzeylerinin düzenli olarak izlenmesi hastalığın seyri hakkında klinisyene fikir verir (27).

İskemi-reperfüzyon hasarında oluşan metabolik bozuklukların temelini, dokuya ulaşan oksijenin azalması ve sonucunda dokuda anaerobik metabolizmanın öne geçmesi oluşturur. Hücredeki ATP deposu olayın başlangıcından itibaren 3 saat içinde tükeneceği ve bunun sonucunda da kreatinin fosfatın kreatin ve inorganik fosfata dönüşeceği bildirilmiştir (28). Daha fazla uzamış bir iskemi ile ATP düzeyinde progressif bir düşme, glikojenin laktata metabolize olması ve ATP yıkımının yapımından fazla olması görülecektir.

Mikrovasküler yapılar iskemide oluşan hasarın ilk belirlendiği yerdir. Henüz iskeminin ilk 30 dakikasında membran permeabilitesinde artış ve hücrede progressif ödem gösterilmiştir (29,30). İskelet kasında geri dönüşümsüz hasar 4-6 saat içinde görülür.



Akut arteriyel tıkanıklık sonrası oluşan hasarlar yalnızca iskemik fazda değil reperfüzyon fazında serbest radikallerle de oluşacaktır (31,32). Serbest radikallerin oluşumu ve etkileri yukarıda ayrıntılarıyla anlatılmıştır.

İskelet kasının iskemi-reperfüzyon hasarının oluşumunun mikrovasküler patofizyolojisi endotel, lökositler ve bunların mikrovasküler düzeyde birbirleriyle ilişkileri ile ilgilidir. Bunların patofizyolojisinin ayınlatılması iskemi-reperfüzyon sendromunun tedavisinde çığır açmıştır (33).

Endotelin Rolü:

Endotelin vasküler homeostazisin sağlanmasında önemli rolleri vardır. Bunlar; (33)

- 1- Mikrovasküler permeabilitenin sağlanması,
- 2- Damar kontraktilesi,
- 3- Anjiogenezis,
- 4- Koagülasyon,
- 5- Lökosit trafiği,
- 6- İmmünite.

Bu endotelial fonksiyonlar eksojen ve endojen bazı faktörler tarafından regüle edilir. Kan akımı regülasyonu büyük oranda intakt bir endotelial yapının varlığıyla sağlanır. Endotelial hücrelerin NO ürettiği ve bunun da endotelial-derived relaxing factor (EDRF) ile aynı olduğu gösterilmiştir (34). NO veya EDRF siklik guanilat siklazı stimüle ederek vasküler düz kaslarda relaksasyona, dolayısıyla vazodilatasyona yol açar (35). Endotelial hücreler endotelin denen güçlü bir vazokonstriktör maddeyi de üretirler. Endotelial hasar bu vazoaaktif maddelerin salınımının azalmasına sebep olacaktır.

Mikrovasküler permeabilite birçok kimyasal mediatörler tarafından kontrol edilir. İskemi-reperfüzyon hasarında bu mediatörler aktive olur. Bu maddelerin başında Platelet Agregating Factor (PAF), bradikinin ve histamin gelir. Bunlar intrasellüler kalsiyumun hem hücre içine hem de

dışına olmak üzere iki yönlü mobilizasyonuna sebep olurlar. Endotelial sitozolik kalsiyum miktarında bu anormal artışla NO ve endotelin gibi güçlü vazodilatör ajanlar salgılanır. Endotelial yüzey normal kan akımının sağlanması için pürüzsüz ve böylece nonkoagülanıdır. Bu durum antitrombin III'ün oluşumunun katalizasyonu ve yüzeyel trombomodülinin varlığı ile sağlanır (36,37). Endotelial hücrelerin koagülasyondaki rolü prostasiklinin üretilmesi ile sağlanır. Prostaglandin tromboxan A<sub>2</sub>'nin aktivitesini antagonize ederek trombosit agregasyonunu inhibe eder.

Endotelial hücrelerin immün yanıtındaki rolü yine sitokinleri aracılığı ile oluşur. Interleukin-1(IL-1), tümör nekrozis faktör (TNF) ve interferonlar endotelial hücrelerin yüzeyinde immün yanıtı modüle ederler. Pober ve Cotran, sitokinler ve endotelial hücre biyolojisi arasındaki ilişkiyi araştırmışlar ve lökosit bağımlı adezyonla, endotel bağımlı adhezyonun immün yanıtta temel rolü olduklarını göstermişlerdir (34). Thrombin, lökotrien B<sub>4</sub>, lökotrien C<sub>4</sub> beş dakika gibi kısa bir sürede endotelial hücrelerin adezyonunu artırır.

#### Nötrofillerin Rolü:

İskemi-reperfüzyon sonrası endotel düzeyindeki patolojik değişiklikler membran permeabilitesinde artışa sebep olacak bu da nötrofil infiltrasyonuna yol açacaktır. Nötrofil infiltrasyonu iskemi-reperfüzyon hasarının patofizyolojisinde önemli bir rol oynar. Nötrofiller yapılarında bulunan nikotin amid adenin dinükleotid fosfat (NADPH) oksidazın aktive olmasıyla NADPH NADP<sup>+</sup>'ye , H<sup>+</sup>'ne ve 2O<sub>2</sub><sup>-</sup>'e dönüşerek süperoksit anyonları üretir.

Rees ve arkadaşları ksantin oksidaz aktivitesindeki hızlı artışın, nötrofil kemotaktik aktivitesini arttıran serbest radikal oluşumunu sağlayabileceğini ve hücre zarı hasarını başlatabileceğini savunmuşlardır (12). Nötrofil post iskemik dokularda serbest oksijen radikali doğuran potansiyel bir kaynaktır (38).

Postiskemik iskelet kası hasarında granülositlerin varlığının kanıtı artmış myeloperoksidaz aktivitesidir. Myeloperoksidaz nötrofiller tarafından üretilen H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>'den dönüştürülen ve

süperoksidden daha toksik olan hipoklorik asiti nötralize eder. Myeloperoksidaz iskemi sırasında orta derecede artarken reperfüzyonun 15-60. dakikalarında anormal bir artış gösterir (39).

İskemi-reperfüzyon hasarının patofizyolojisinde lökositlerin rolü yapılan birçok deneysel çalışmalarla gösterilmiştir. Lökosit filtreleri (40), çeşitli hayvan modellerinde farmakolojik ajanlar (41), radyasyon (42) ve monoklonal antikorlar (43,44) bu deneysel çalışmalarda kullanılan yöntemlerin birkaçıdır. Bütün araştırmacılar uyguladıkları modellerde beyaz hücre oranlarında azalmanın iskemi reperfüzyon hasarının azalması ile paralel olduğunu göstermişlerdir. Ancak sebep-sonuç ilişkisi halen araştırılmaktadır. Lökosit miktarında azalmanın lökosit filtreleri gibi yöntemlerle sağlanması sonucu lipid peroksidasyonunda ve kas nekrozunda azalma tesbit edilmiştir (44).

Endotel hücreleri ve lökositler arasındaki İlişki:

İskemi-reperfüzyon patofizyolojisinde endotel hücreleri ve lökositler arasındaki ilişki bir dizi olayı içerir (33).

- 1- Parenkim hücrelerinde enerji depoları boşalır,
- 2- Makrofajlar veya mast hücreleri IL-1 gibi sitokinleri salgılar,
- 3- İskemi sırasında endotelde ksantin dehidrogenaz ksantin oksidaza dönüşür ve serbest oksijen radikalleri oluşur.
- 4- Endotelden PAF salınımı olur. PAF'ın stimülasyonu ile CD11/CD18 kompleksinin endotelyal ICAM-1 ile etkileşmesi sonucu da adhezyon oluşur.
- 5- Adhezyon yapan lökositlerde serbest oksijen radikalleri oluşur,
- 6- Lökositlerde myeloperoksidaz aracılığı ile hipoklorik asit oluşur,
- 7- Endotelden salınan P-selektin ve lökositlerden salınan L-selektin'in birbirleriyle ilişkileri sonucu "Rolling" de denen bir tür adhezyon oluşur.

Hücrel enerji depolarında azalma ve serbest oksijen radikallerininin ortama salınması ile lökositler hasarlı bölgeye doğru göç ederler. Bu da başka kemoatraktan moleküllerin endotelden salınımına neden olur. En belirgin örnekleri PAF ve lokotrien B4'dür. Serbest oksijen radikalleri

endotelial yüzeyde adhesiviteyi değiştirir ve endotelden intersellüler adhezyon molekülleri (ICAM) salgılanır. ICAM'lar endotel yüzeyinde, inflamasyon olan bölgelerde nötrofil adezyonunu sağlar. CD11/CD18 kompleksi, ya da diğer ismi ile "B-2 integrin" lökosit ve endotel arasındaki adhezyonu düzenler.

İskemi-reperfüzyon sendromunda görülen rolling şeklindeki endotel-lökosit adhezyonu intravital mikroskopiyle görülebilir. Bu tür adhezyon göreceli olarak yüksek çevresel basınç oranında oluşan reolojik bir süreçtir. Lökositler venüllerin duvarları boyunca lokal kan akımına göre 100 kat daha yavaş olarak hareket ederler. Rolling mekanizmasında L-selectin'in rolü gösterilmiştir (45).

Endotelde in-vitro çalışmalar P-selektin'in venüler çevresel basıncın değişimiyle rolling mekanizmasını düzenlediğini göstermiştir (45). P-selektin'in endotelial membrana translokasyonu histamin, trombin gibi kimyasal mediatörler aracılığıyla sağlanır. Güçlü adhezyon için integrinler, ICAM-1 ve E-selektin gibi mediatörlerin varlığı gereklidir. E-selectin'in lökosit migrasyonu için gerekli olmadığını gösteren çalışmalar vardır (45,46).

İskemi-reperfüzyon hasarının şiddeti lökosit infiltrasyonunda hücre sayısı ile doğru orantılıdır (47,48). Normalde venül duvarında her 100 µm'de yalnızca 2-4 lökosit vardır. İskemi-reperfüzyonda bu oran 100 kat artabilir. Monoklonal antikor 60.3 CD18'deki B-zincirini etkiler ve böylece intestinal mukozada nötrofil yapışmasını ve proteinlerin ekstrasvazasyonunu önler. Bir başka monoklonal antikor olan IB4, direkt olarak CD11/CD18'i etkileyerek barsak venüler endoteliumundaki PAF aracılı adhezyonu engeller (49). Köpeklerde yapılan alt ekstremite iskemi-reperfüzyon modelinde IB4'ün uygulaması ile nötrofil infiltrasyonunun engellendiği gösterilmiştir (50).

PAF'ın iskemi-reperfüzyondaki rolü son yıllarda aydınlatılmaya çalışılmıştır (43,51). Köpeklerde alt ekstremite iskemi-reperfüzyon modelinde reperfüzyon sonrası ilk 5 dakikada PAF konsantrasyonunun dramatik olarak arttığı ve nötrofil infiltrasyonunu artırarak postiskemik venüllerde adhezyona sebep oldukları görülmüştür (52). PAF reseptör antagonistlerinin lökosit adhezyonunu engellediği gösterilmiştir. Kısa ömürlü bir fosfolipid olan PAF vasokonstriktör

etkisiyle mikrovasküler permeabilite artışını önlerken aynı zamanda lökositler için de bir kemoatraktandır.

Phan ve arkadaşları tarafından yapılan çalışmada endotelial hücrelerin ksantin oksidazı ürettiği ve aktive nötrofillerle ksantin oksidaz aktivitesinin arttığı gösterilmiştir (33).

#### **h- N-Asetil Sistein:**

L- sistenin N-asetil türevidir. İlk defa 1960'lı yıllarda nükleer radyasyona karşı koruyucu etkilerinin gösterilmesi üzerine bir çok araştırmacı sülfür içeren droglara yönelmişlerdir. Detoksifikasyonda rol oynadıkları gibi oksidatif strese karşı hücreyi ve komponentlerini korurlar. Bugün NAS glutatyonun kendisinden çok daha önemli bir antioksidandır. NAS canlı organizmalardan üretildiğinden ve doğal sülfür içeren amino asid ürevi olduğundan güçlü bir antioksidan olarak kabul edilmektedir (53,54).

NAS barsaklardan yüksek oranda absorbe edilebilir (55,56). Hızla metabolize olur ve yalnızca yaklaşık %10'luk bir kısmı metabolize edilmeden atılır (57). NAS'ın büyük bir kısmı intrasellüler ortamda glutatyon üretimi için kullanılır. NAS hücre içinde güçlü bir antioksidan olan tiol metabolitlerine dönüşür (57).

NAS'ın başlıca kullanıldığı durumlar:

Egzersiz: NAS'ın güçlü bir antioksidan besin olduğu görüldüğünden beri atletler şiddetli egzersiz sırasında NAS kullanmaktadırlar (58,59). Oksidatif stres kas yorgunluğu oluşumunda önemli olduğu ve NAS ile tedavide bu yorgunluğun oluşumunun anlamlı olarak azaldığı gösterilmiştir (60).

NAS ve AIDS: Son yıllarda NAS'ın Human Immundeficiency Virus (HIV) enfeksiyonundan korunmadaki rolü araştırılmaya başlanmıştır. NAS HIV ile infekte olsa da hücre membranlarını

glutatyona göre kolayca geçer (61,62). NAS intrasellüler glutasyon üretimindeki rolüyle immüniteyi etkiler. HIV infeksiyonuyla hücrede glutasyon üretimi bozulur. Eck ve ark. retroviral infeksiyonun direkt ve erken sonuçlarını incelemiş ve intrasellüler glutatyondaki düşmeyi göstermişlerdir (62). İntrasellüler glutasyonun B ve T hücreleri üzerine pozitif yönde güçlü bir etkisi vardır (62,63). NAS serbest oksijen radikallerinin immün sistem üzerine olan negatif etkisini engeller (64,65,66). NAS AIDS virüsünü enfekte hücrelerdeki glutasyon düzeyini arttırarak bloke eder (67,68).

**Detoksifikasyon:** Sülfür içeren besinlerin detoksifikasyon etkilerinin olduğunun bilinmesi çok eskilere dayanır. NAS'ın detoksifiye edebildiği başlıca ajanları şöyle sıralayabiliriz:

- a- Ağır metaller (cıva, kurşun ve kadmiyum) (69,70).
- b- Asetaminofen içeren droglar (57,71,72),
- c- herbisitler (73),
- d- çevresel temizleyiciler (CCl<sub>4</sub>, ürethane) (74,75,76),
- e- aflatoksin içeren organizmalar ve escherischia coli (77,78,79).

NAS'ın yapısında bulunan sülfidril grubu doğrudan ağır metallerle reaksiyona girer. Dolaylı olarak da sitokrom P-450 sistemini etkiler. Asetaminofen toksikasyonunda karaciğer hasarının oluşumunu engeller. NAS'ın doxorubicin, ifosfamide, valproik asit ve alkol gibi drogların yan etkilerini azalttığını bildiren yayınlar vardır (57).

**Kanser:** NAS hem antioksidan hem de detoksifikasyon etkisiyle kanser tedavisinde rol oynar (80,81). Ayrıca cisplatin ve oxazophosporine temelli ajanların toksik etkilerini azaltır (82,83). NAS ile tedavide plazma albümin düzeyi artar; böylelikle bu da kanser hastalarında ve sağlıklı bireylerde hücre kütlelerinin azalmasını önleyecektir (84).

**Akciğerlere etkisi:** NAS 40 yıldan fazla bir zamandır kronik broşit, kistik fibrozis, asthma, sinüzit ve pnömoni gibi bronkopulmoner hastalıkların tedavisinde kullanılmaktadır (85). 1963 yılından beri NAS'ın mukusun viskozitesini düşürdüğü ve daha kolay öksürükle atılmasını sağladığı bilinmektedir (86). NAS bu etkisini mukoproteinlerin disülfid bağlarını sülfidril bağlarına çevirerek

mukoproteinleri küçük parçalara ayırmasıyla gösterir. Bazı yerlerde nebulizer ajan olarak kullanılırken İtalya'da tablet şeklinde alımı tavsiye edilmektedir (85).

NAS'ın diafragma yorgunluğunu önleyerek solunuma pozitif yönde etki ettiğini gösteren çalışmalar da vardır (87,88,89).

**Kardiovasküler etki:** Kalp hastalığı indikatörü olarak son yıllarda iki güçlü ajan gösterilmiştir. Biri lipoprotein (a) diğeri ise vitamin E düzeyleridir. Lipoprotein (a) kolesterol, LDL, HDL düzeylerine göre daha güçlü bir indikatördür. Kardiyak diet ya da lipid düşürücü droglar lipoprotein (a)'ya etki edememektedirler. Son yıllarda yapılan çalışmalar NAS'ın lipoprotein (a)'yı hemen hemen %70 oranında düşürdüğünü göstermişlerdir (90,91,92,93).

Lp (a) LDL partiküllerinin oldukça büyük bir glikoprotein olan Apo(a)'ya birden çok disülfid bağlarıyla bağlanması ile oluşur. NAS bu disülfid bağlarını kırarak etkisini gösterir.

Vasküler düz kas hücrelerinde oleik asidin regüle ettiği mitojenik sinyal yollarında oleik aside yanıt olarak artmış H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> NAS'la inhibe edilir (94). Sıçan kardiyak fibroblastlarda yapılan bir çalışmada NAS'ın Angiotensin II aracılığıyla mitojen aktive protein kinazı inhibe ettiği gösterilmiştir (95).

İskelet kasının iskemi-reperfüzyon hasarından korunmasında NAS'ın önemi rol oynadığını gösteren çalışmalar vardır. Chen ve ark. reperfüzyonun erken fazında doza bağımlı olarak NAS'ın hasar oluşmasını büyük ölçüde önlediğini göstermişlerdir (96). Van der Laan ve ark. antioksidan NAS'ın yumuşak doku hasarını anlamlı olarak düşürdüğü ve onarım zamanını kısalttığını göstermişlerdir (97).

## **i- İskemi Modelleri**

Total iskemiye dokuların dayanma süreleri araştırılırken fizyopatoloji daha iyi anlaşıldıkça çeşitli hayvan türlerinde klinikte rastlanılan durumlara uygun modeller geliştirilmiştir.

İskeminin hangi komponentinin daha çok hasar oluşturduğu üzerine yapılan çalışmalar, venöz çıkıştaki azalmanın daha kısa sürede daha büyük hasar yaptığı ortak sonucunu getirmiştir.

Deneysel modeller içinde sıçan kremaster kasının hazırlanıp mikrodolaşımın mikroskopla doğrudan izlenmesi ve video kaydının yapılması olayın dinamik açıdan izlenmesini olanaklı kılar. Mikrodolaşımdaki dinamik değişimler ve histopatolojisi iskemi süresince arterlerin konstrüksiyonu, endotel ve lökosit şişmesi ve eritrositlerde rulo formasyonunu içerir. İskemi süresi uzarken bu değişimlerin derecesi de artar. Reperfüzyondaki değişimler kan akımı yapısının bozulması, girdap formasyonu, bölgesel staz, lökositlerin adhezyon ve migrasyonu, fokal hemoraji, ödem, vazospazm ve trombosit kümelenmesidir (98).

İskemi modelleri; (98)

- 1- Total arteryel: Arteryel kan akımının tam olarak durması,
- 2- Total Venöz: Ven akımının dışarıdan (bası, bükülme, v.s.) veya içeriden (tromboemboli) kaynaklanan bir nedenle kesilmesidir. Arteryel iskemiden daha hızlı hasar oluşturduğu genel kabul görmüştür.
- 3- Total global: Dokuya gelen kan akımının tam kesilmesini ifade eder.
- 4- Kısmi arteryel: Arteryel kan akımının azlığı genelde planlama hatası nedeniyle anjiozomun besleyebileceği alanın dışında kalınması ile ilgilidir.
- 5- Kısmi venöz: ven duvarının arter duvarına göre son derece ince ve zayıf olması dışarıdan olacak bası ve bükülmelerden daha fazla kolay etkilenme sebebidir.



## AMAÇ

Klinikte iskelet kasının geçici iskemiye maruz kaldığı birçok durumlar vardır. Bunlara örnek olarak arteriyel tromboz, vasküler travma, serbest doku transferi ve ekstremitte cerrahisinde geçici pnömatik turnike uygulanması verilebilir. Bu durumlarda doku hasarını minime indirmek önemlidir. Kan akımının azalması doku hasarına ve çok geçmeden iskemik alanın nekrozuna sebep olur. Kan akımının yeniden sağlanması ise iskemi-reperfüzyon hasarı dediğimiz hücre membran yıkımı ve sıvı ekstravazasyonu ile ilgili lokal doku kayıplarına ve böbrek, akciğer gibi uzak organların hasarına sebep olacaktır. Bu sistemik etkiler reperfüzyon sırasında üretilen toksik serbest oksijen radikallerine bağlanmaktadır. Serbest oksijen radikalleri organizma tarafından bazı temizleyici sistemlerle yok edilmeye çalışılır.

Serbest oksijen radikallerinin etkisini önlemede ksantin oksidaz inhibitörleri ve birçok serbest oksijen radikali temizleyicilerinin deneysel olarak iskemi-reperfüzyon hasarını önlemede etkinliği gösterilmiştir. N-asetil sistein'in antioksidan etkisi çok eskiden beri bilinmektedir. Ancak iskemi-reperfüzyon hasarında lipid peroksidasyonunun önlenmesinde NAS uygulanımı ile ilgili çalışmalar son derece azdır.

Bu çalışmada amaç, alt ekstremitenin iskemi-reperfüzyon modelinde NAS'in iskemi-reperfüzyon hasarını önlemedeki rolünü araştırmaktır. İskemi-reperfüzyon hasarının laboratuvar göstergesi olarak lipid peroksidasyonu, metabolik asidoz , kas ve akciğer dokusunun patolojik incelemesi alınmıştır.

## YÖNTEM VE GEREÇLER

Deney süresince fare yemi ve su ile beslenen, ağırlıkları 300-400 gram arasında değişen erkek Wistar-Albino sıçanları kullanıldı. Ameliyattan önce intraperitoneal yolla ketamin hidroklorid (Ketalar 50 mg/ml flakon, Parke-Davis, USA) 50 mg/kg verilerek uyutulan sıçanların abdomen bölgeleri bistüri ile traş edildi.

### a- Cerrahi Yöntem:

Göbek üstü altı median insizyonla batına girildi. Barsaklar eksplore edilecek iliak arterin tersi yönünde devie edilerek batın içinde kalacak şekilde ekarte edildi. Sağ veya sol iliak arter disseke edilerek serbestleştirildi ve 2/0 polyglactin 910 ile dönülerek kontrol altına alındı. Karşı iliak ven kan örneği almak ve ilaç uygulamak için disseke edilerek 26 numara kantül ile kantüle edildi. Barsaklar kurumaması için zaman zaman serum izotonik ile ıslatıldı.

Sıçanın kuyruğu sıcak su ile ısıtılıp uç bölümü kesilerek başlangıç MDA ölçümü için kan alındı.

Mikrovasküler klemp ile iliak arter klempe edildi. Kollateral dolaşımı engellemek için yalnızca sakro-iliak kemikler kalacak şekilde gluteal kaslar kesildi. İskemi boyunca sürecek NAS perfüzyonuna başlandı.

Dört saatlik iskemi sonunda mikrovasküler klemp kaldırılarak bir saat reperfüzyon yapıldı. Reperfüzyon sonunda laboratuvar tetkikleri için kan alındıktan sonra sıçan sakrifiye edilerek patolojik inceleme için gastroknemius kasından ve akciğerinden biyopsi yapıldı.

### b- Deney Protokolü:

Hayvanlar her grupta 6 denek olan iki gruba ayrıldı;

Kontrol grubu: Mikrovasküler klemp kaldırılmadan bir dakika önce karşı iliak venden 0,1-0,2 cc serum fizyolojik verildi.

Deney Grubu: Anestezinin başlaması ile NAS 5 ug/kg/dak infüzyon şeklinde uygulandı.

### c- Değerlendirme Yöntemleri:

Biyokimyasal Analizler:

#### - Tiobarbitirik Asit reaktif Substans (TBARS) (MDA) Analizi

Sıçandan alınan kanlar oda sıcaklığında yarım saat bekletildikten sonra, 4000 rpm'de 10 dakika çevrilerek eritrositlerden ayrılan plazma MDA analizi için -70 C derecede saklandı.

Prencip: Malondialdehit, çoklu doymamış yağ asitlerinin yıkımı ile oluşur ve peroksidasyon reaksiyonunun derecesinin belirlenmesinde uygun bir indeks olduğu düşünülmektedir (34,98). MDA, 535 nm'de absorbe edilen sarı-kırmızı renkli bir bileşik olmak üzere TBA ile reaksiyona giren lipid peroksidasyon ürünü olarak da tanımlanabilir (98).

Lipid peroksidasyonu, lipid peroksidasyonunun son ürünü olan TBARS (Malondialdehid)'in ölçümü ile değerlendirildi. Dokular % 0.001 butile hidroksitoluen, %0.07 sodyum dodesil sülfat içeren, kullanım öncesinde 10 dakika süreyle azot gazı ile muamele edilmiş olan soğuk %0.9 NaCl içinde Potter tipi homojenizatör kullanılarak homojenize edildi ( 20 mg doku/ 1.5 ml %0.9 NaCl). Homojenata hemoglobini uzaklaştırmak için etanol-kloroform (3:2) katıldıktan sonra TBARS (MDA) Shin ve arkadaşları tarafından önerilen tiobarbitirik asit ile reaksiyona dayanan kolorimetrik yöntemle ölçüldü (54). Homojenattaki protein konsantrasyonu Lowry yöntemiyle tayin edildi. TBARS (MDA) miktarı nmol/gr x protein olarak ifade edildi.

Patolojik İnceleme:

Kas ve akciğer doku biyopsileri ayrı ayrı parafine yatırılarak 5µ'luk kesitler yapılarak Hematoxilen Eosin boyasıyla boyandı. Işık mikroskopu ile incelemeler yapıldı.

## İSTATİSTİKSEL DEĞERLENDİRME

Verilerin istatistiksel değerlendirilmesinde, elde edilen verilerin dağılım özelliklerine göre; ortalamalar arasındaki farkın belirlenmesinde non-parametrik (Mann-Whitney –U) test uygulandı. İşlemler, pentium III işlemci PC aracılığı ile Microsoft Excel yazılımı ile gerçekleştirildi.  $U_{tablo}$  değeri 29 (6-6) idi. 29'un üzeri U değerleri anlamlı kabul edildi.



## BULGULAR

PO<sub>2</sub>, PCO<sub>2</sub>, pH, HCO<sub>3</sub><sup>-</sup>, Na<sup>+</sup>, K<sup>+</sup> değerleri ve kan, doku MDA düzeyleri tablolarda verilmiştir.

### KONTROL

	pH	pO <sub>2</sub>	pCO <sub>2</sub>	HCO <sub>3</sub>	Na	K
K1	7.250	156.5	40.0	17.1	152.7	3.18
K2	7.181	63.3	46.7	17.1	158.7	2.69
K3	7.266	115.6	41.2	18.3	156.1	3.22
K4	7.166	131.0	49.5	17.5	158.9	2.24
K5	7.122	60.5	77.0	24.6	148.9	3.43
K6	7.127	120.6	55.4	17.9	153.8	2.02

Tablo 5: Kontrol grubu kan gazı ve elektrolit değerleri:

### N-ASETİLSİSTEİN

	pH	pO <sub>2</sub>	pCO <sub>2</sub>	HCO <sub>3</sub>	Na	K
NAS1	7.269	126.3	46.2	16.7	148.9	3.06
NAS2	7.372	94.6	48.5	12.5	136.5	4.60
NAS3	7.153	46.3	65.3	7.3	168.3	6.9
NAS4	7.241	64.6	49.3	14.8	163.7	3.95
NAS5	7.293	84.2	34.9	21.5	146.7	4.57
NAS6	7.259	147.3	26.9	13.6	157.4	4.65

Tablo 6: Deney grubu kan gazı ve elektrolit değerleri.

	pH	pO <sub>2</sub>	pCO <sub>2</sub>	HCO <sub>3</sub>	Na	K
NAS	7.267+1.7	93.88+23.2	45.18+16.4	14.4+4.3	153.58+13.6	4.62+1.2
Kontrol	7.168+0.49	67.3+23.2	54.5+24.4	9.5+3.2	158.3+24.2	3.43+1.2

Tablo 7: Kan gazı değerlerinin ortalama ve standart sapma değerleri

	pH	pO <sub>2</sub>	pCO <sub>2</sub>	HCO <sub>3</sub>	Na	K
U değerleri	28*	41*	19	70*	12	14.5

Tablo 8: NAS'da kan gazı ve elektrolit değerlerinin kontrol grubu ile karşılaştırılması:

\* p<0.05.

#### 1-KONTROL

	CPK(U/L)	LDH(U/L)	MDA(kan) (nmol/ml)	MDA(KAS) (nmol/g doku)	MDA(AKC)
K1	590	214	15.42	255.3	269.8
K2	729	608	18.4	273.8	270.5
K3	1860	840	24.3	304.6	254.8
K4	1547	734	21.7	317.2	295.4
K5	>2000	1782	28.3	298.5	348.4
K6	1905	448	27.9	372.5	213.4

Tablo 9: Kontrol grubunda kan CPK, LDH, MDA ve Doku MDA Düzeyleri

#### 2- N-ASETİLSİSTEİN

	CPK(U/L)	LDH(U/L)	MDA(kan) (nmol/ml)	MDA(KAS) (nmol/g doku)	MDA(AKC)
NAS1	824	572	16.3	170.8	185.3
NAS2	476	294	14.3	183.3	180.1
NAS3	642	473	23.2	184.2	193.4
NAS4	1440	635	24.1	215.2	193.2
NAS5	735	462	17.4	183.6	182.7
NAS6	448	273	9.6	173.45	184.5

Tablo 10: Deney grubu Kan CPK, LDH, MDA ve Doku MDA Düzeyleri

	CPK(U/L)	LDH(U/L)	MDA(kan)	MDA(KAS)	MDA(AKC)
NAS	760.8+140	451.5+95	17.48+3.6	185.1+12	186.5+4.2
Kontrol	1705+228	638+125	22.67+4.6	303.65+82.3	275.38+67.4

Tablo 11: Kan CPK, LDH, MDA ve Doku MDA Düzeylerinin ortalama ve standart sapma değerleri

	CPK(U/L)	LDH(U/L)	MDA(kan)	MDA(KAS)	MDA(AKC)
U değerleri	70.5*	16.5	38*	48.5*	39.5*

Tablo 12: Kan CPK, LDH, MDA ve Doku MDA Düzeylerinin NAS ve Kontrol grubunda karşılaştırılması

\* p<0.05.

### Histopatolojik İnceleme:

Histopatolojik incelemede preparatlar hematoksinen eozin boyasıyla boyanarak 20 büyütmede hücre infiltrasyonları yoğunluğuna göre 1+'den 3+'e kadar semikantitatif olarak değerlendirildi. Kas dokusu kesitlerinde, kontrol grubunda 4 olguda hafif düzeyde hücre infiltrasyonu görüldü. Bunların %3-5 arasında nötrofiller oluşturmaktaydı. Deney grubunda ise sadece bir olguda hafif düzeyde hücre infiltrasyonu varken diğer 5 olguda infiltrasyon görülmedi (Tablo 13,14).

#### KAS KONTROL GRUBU

Hücre infiltrasyonu	Nötrofil
+	%5
+	%3
-	-
+	%5
+	%4
-	-

Tablo 13: Kontrol grubu kas hücre infiltrasyonu:

## KAS N-ASETİL SİSTEİN GRUBU

Hücre infiltrasyonu	Nötrofil sayısı
-	-
-	-
-	-
-	-
+	%4
-	-

Tablo 14: Deney grubu kas hücre infiltrasyonu.

Ayrıca kontrol grubunda, myofibrillerin düzensiz bir görünüm aldıkları, myofibriller arasındaki kapillerlerin eritrositlerle dolu olduğu ve endomyozomal aralığın daraldığı görüldü (Resim 1). Deney grubunda ise myofibrillerin normale yakın görünümde oldukları, kapillerlerin açık olduğu ve endomyosal aralığın korunduğu görüldü (Resim 2).





Resim 1: Myofibriller düzensiz bir görünüm almış, endomyozal aralık genişlemiştir (x200, Hematoksilen (H) + Eosin(E), Olgu K2).



Resim 2: Endomyozal aralığın korunduğu görülmektedir (x400, H+E, Olgu NAS3).

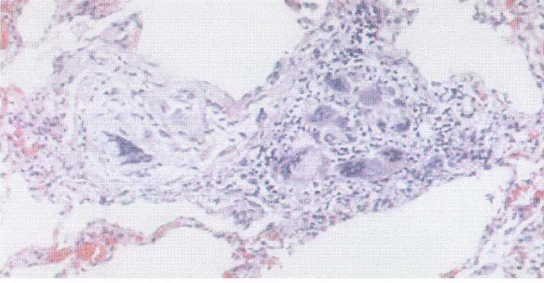
Akciğer dokusu kesitlerinde, kontrol grubunda üç olguda ağır üç olguda da orta düzeyde hücre infiltrasyonu görüldü. Bunların %30-40'ını nötrofiller oluşturmaktaydı. Akciğer ödemi üç olguda varken peribronşial hücre infiltrasyonu üç olguda ağır derecedeydi (Tablo 15) (Resim 3)

#### AKCİĞER KONTROL GRUBU

Hücre infiltrasyonu	+++ / ++ / +++ / ++ / ++ / +++
Nötrofil infiltrasyonu	%40 / %35 / %45 / %30 / %35 / %40
Akciğer ödemi	+ / - / + / - / - / +
Peribronşial iltihabi	+++ / ++ / +++ / ++ / ++ / +++

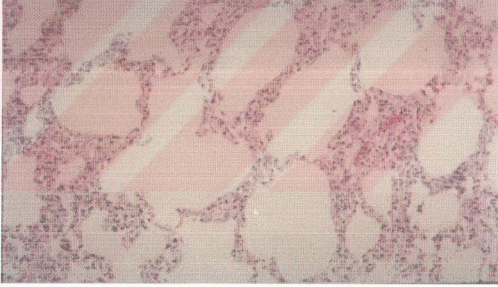
hücre infiltrasyonu

Tablo 15: Kontrol grubu akciğer histopatolojik inceleme sonuçları:



Resim 3: Kontrol grubunda hücre infiltrasyonu. (x400, Toluidin mavisi, Olgu K2)

NAS grubunun akciğer kesitleri incelendiğinde tüm olgularda hücre infiltrasyonu hafif düzeyde olurken akciğer ödemi ve peribronşial hücre infiltrasyonu yalnızca bir olguda görüldü (Tablo 16). (Resim 4)



Resim 4: Kontrol grubuna göre daha az hücre infiltrasyonu ve nisbeten daha iyi korunmuş alveoller görülmektedir (x200, H+E, Olgu NAS3).

## AKCİĞER NAS GRUBU

Hücre infiltrasyonu	+ / + / + / + / + / +
Nötrofil infiltrasyonu	%4 / %3 / %5 / %5 / %4 / %5
Akciğer ödemi	- / - / - / + / - / -
Peribronşial iltihabi hücre infiltrasyonu	- / - / - / + / - / -

Tablo 16: Deney grubu akciğer histopatolojik inceleme sonuçları.

## TARTIŞMA

Akut ekstremite iskemisini takiben, ekstremitenin yeniden kanlandırılması ve normal dolaşımın sağlanması doku hasarı ve sistemik komplikasyonları birlikte getirmektedir. Değişik kaynaklarda ölüm oranı %15-52, amputasyon oranı ise %12-22 olarak belirtilmiştir. En iyi cerrahi girişim sonrasında bile ancak %60-70 ölçüde tam düzelme sağlanabilmektedir (99). Bu yüksek mortalite ve morbiditenin sebebi, reperfüzyon hasarının etkisiyle ortaya çıkan myonefropatik-metabolik sendromdur. Uzun süre iskemik kalmış ekstremitenin tekrar kanlandırılmasıyla ortaya çıkan serbest oksijen radikallerinin endotel ve nötrofillerle etkileşerek lipid peroksidasyonunu hızla arttırması, lokal ve sistemik birçok etkinin ortaya çıkmasına neden olur. Hücre şişmesi, ödem, toksin ve myoglobulin salınımı ile beraber serbest oksijen radikallerinin etkisi ile, akut böbrek yetersizliği, akciğer ödemi, erişkin solunum yetersizliği, şok karaciğeri gibi sistemik hasarlar gelişebilir (100).

Reperfüzyon hasarı dokunun yeniden oksijenlenme sürecinde üretilen toksik serbest oksijen radikallerine bağlı gelişmektedir (101,102). Serbest oksijen radikalleri organizma tarafından bazı temizleyici sistemlerle yok edilmeye çalışılır. Serbest oksijen radikallerinin etkisini önlemede mannitol, allopürinol, askorbik asit, süperoksit dismutaz, pentoksifilin, alfa tokoferol gibi bazı maddeler denenmiştir ve deneysel olarak İR hasarını önlemede etkili oldukları gösterilmiştir (103, 104, 105, 106).

Bu çalışmada antioksidan özelliği bir çok çalışmada gösterilmiş hücrede tiol metabolizmasında glutatyon sağlayıcı olan N-asetil sistein (NAS) kullanıldı. NAS barsaklardan yüksek oranda absorbe edilir (55). Hızla metabolize olur ve yalnızca %10'luk bir kısmı metabolize edilmeden atılır (57). NAS'ın büyük bir kısmı intrasellüler ortamda glutatyon üretimi için hızla kullanılır. NAS hücre içinde güçlü bir antioksidan olan tiol metabolitlerine dönüşür (57). Glutatyonun kendisinden çok daha önemli bir antioksidan kabul edilen NAS, canlı organizmalardan türetildiğinden ve doğal sülfür içeren amino asit türevi olduğundan güçlü bir antioksidan olarak kabul edilmektedir (53,54).

Bu çalışmada NAS, iskemi başladıktan hemen sonra infüzyon halinde deney hayvanlarına uygulanmış, kan ve doku örnekleri alınarak biyokimyasal ve histopatolojik incelemeler yapılmıştır. Kontrol grubunda ise serum izotonik uygulanmıştır.

Sistemik parametreler değerlendirildiğinde, kontrol grubu ile deney grubunda reperfüzyon sonrası alınan  $PO_2$ , pH ve  $HCO_3$  ortalama değerlerinde anlamlı farklılıklar görülmektedir. Kontrol grubunda deney grubuna göre  $PCO_2$  değerinde (54.5+24.4) (U=19) anlamlı fark bulunmamasına karşın  $HCO_3$  değerinde (9.5+3.2) (U=70) anlamlı bir fark bulunması bu grupta metabolik asidozun ön planda olduğunu gösterir. NAS uygulanan deney grubunda da  $pCO_2$  değerleri (45.18+16.4) normalden yüksek ancak kontrol grubuna göre anlamlı bir fark bulunmazken (U=19),  $HCO_3$  değerleri (14.4+4.3) ise normalden düşük, kontrol grubuna göre ise anlamlı olarak yüksek (U=70) bulunmuştur. Deney grubunda  $HCO_3$  değerindeki düşüşün kontrol grubuna göre daha az olması majör etyolojinin respiratuar asidoz olduğunu düşündürmektedir.

Kan Kreatin fosfokinaz (CPK) ve Laktat Dehidrogenaz (LDH) enzim düzeylerinin, iskemi-reperfüzyonda kas yıkımını gösterdikleri bilinmektedir (1, 7, 8 ). Çalışmamızda yalnızca CPK düzeyinde anlamlı bir fark saptanırken , LDH düzeyinde bir farkın olmamasını reperfüzyonun kısa süreli yapılmasına bağladık.

Serbest oksijen radikallerinin gösterilebilmeleri yaşam sürelerinin çok kısa olmasından dolayı son derece zordur. Özellikle biyolojik serbest oksijen reaksiyonları lipid peroksidasyonunun son ürünü olan malondialdehidin (MDA) gösterilmesine dayanır (107). Bu yüzden bu çalışmada reperfüzyon hasarının ortaya konabilmesi için MDA ölçümü yapılmıştır. Kan, kas ve akciğer doku MDA düzeyi tiobarbitürik asit yöntemi ile analiz edilmiş ve NAS grubunda kontrol grubuna göre her üçünde de anlamlı olarak düşük bulunmuştur. Böylece NAS'ın lipid peroksidasyonunu önlemede etkili olduğu anlaşılmıştır.

Rabl ve ark 'nın bir çalışmasında, böbrek transplantasyonu veya ekstremitte kurtarma amacıyla revaskülarizasyon uygulanan hastaların plazma MDA düzeyleri, transplantasyon uygulanan hastalarda ortalama %10, revaskülarizasyon uygulanan hastalarda ise ortalama %50 arttığını

göstermişlerdir (108). Feng ve ark., tavşanlarda oluşturdukları bir iskemi-reperfüzyon modelinde MDA artışını serbest radikal oluşumuna bağlamışlardır (109).

Ekstremitte iskemisini takiben yapılan reperfüzyon sonrasında görülen akciğer hasarı da lipid peroksidasyonu sonrası gelişen toksik maddelerin akciğere olan etkileri sonucudur. Reperfüzyon süresindeki hasarın büyük bölümü, polimorfonükleer lökositlerin inflamatuvar aktivitesiyle açıklanabilir. Akciğerdeki hasarlanma reperfüzyonun 30-45. dakikalarında başlar. Bu erken etkilerin nötrofil aktivasyonu sonucu olduğunu bildiren çalışmalar vardır (110). Akciğer hasarlanmasının esas nedeni nötrofillerle endotelin etkileşmesi sonucu gelişen daha önce açıkladığımız olaylar zinciridir.

Işık mikroskopi akciğer bulgularımız, Weiss (111), Feller (112) ve Faust (113)'un bulgularıyla uyumludur. Kontrol grubunda akciğer alveollerindeki nötrofil infiltrasyonu deney grubuna göre oldukça fazla olduğu görülmektedir. Seekamp (114) çalışmasında reperfüzyon hasarına bağlı sistemik değişiklikler, özellikle akciğer değişikliklerinin 4 saatlik bir reperfüzyondan sonra nötrofil bağımlı olarak meydana geldiğini göstermiştir. Bilindiği gibi serbest oksijen radikalleri meydana geldikten sonra mikrosaniyeler içinde yok olmaktadır. Ancak bir serbest oksijen radikali, bir atom veya molekül ile karşılaştığında zincirleme çekirdeksel reaksiyonlara benzer etkilerle yeni serbest radikal oluşumuna neden olabilmektedir. Böylece oluştuğu yerde etkili mesafesi son derece kısa (yaklaşık 30 Å) olan serbest oksijen radikali, bu zincirleme reaksiyonlarla daha uzakta ve sistemik etkiler de oluşturabilmektedir. Akciğerle ilgili parametrelerimizdeki bu anlamlı farklılıklar ve histolojik bulgular, belki bu şekilde başka fizyopatolojik etkilerle de açıklanabilir.

Serbest oksijen radikallerinin hasar yapıcı özelliklerine karşı hücreler doğal olarak oksidatif hasarı azaltmaya veya sınırlamaya yeteneklidirler. Bu hücre koruyucu mekanizmalar oksijen radikallerini gidermek ve detoksifiye etmek üzere düzenlenmiş birkaç enzim sistemini içerirler. Ancak bu savunma sistemleri yetersiz kalınca, serbest oksijen radikalleri zararlı etkiler yapabilirler.

Serbest oksijen radikali temizleyicilerinin deneysel ve klinik kullanımının etkinliğini gösteren çalışmalardan özellikle anlaşılan, antioksidanların reperfüzyon başlamadan önce uygulanmasıdır (111, 112, 113, 114).



## SONUÇ

İskemi reperfüzyon (İR) hasarının mekanizmasının tam olarak anlaşılması hasarın çabuk ve en uygun bir şekilde önlenmesini sağlayacaktır. Klinikte uygulanabilecek stratejilerin geliştirilmesi için klinik olarak uygulanan tedavinin etkinliğinin doğru bir şekilde ölçülmesi gerekmektedir. Hayvan laboratuvarında intakt ekstremitede mikrovasküler hasarın ve doku hasarının morfolojik, biyokimyasal olarak ortaya konabilmesi halen sorun yaratmaktadır. Reperfüzyon hasarını önleyebilecek yöntemlerin geliştirilmesi öncelikle hasarın yoğunluğunun ekstremitede tedavi etkinliğinin gösterilmesi ile mümkün olacaktır. Doğal olarak özellikle alt ekstremitede İR hasarının oluşumunun azalması için önemli olan erken tanı ve mümkün olduğunca erken revaskülarizasyonun sağlanmasıdır.

NAS'in deneysel modelimizde iskemi-reperfüzyon hasarının sistemik-lokal etkilerini engellemede etkili olduğu görülmüştür.

Bu çalışmanın sonuçlarına dayanarak, akut arter tıkanıklığına yönelik akımın tekrar oluşturulması sonrası oluşabilecek lokal ve sistemik etkilerin azaltılmasında NAS'ın profilaktik olarak kullanımının faydalı olabileceğini düşünmekteyiz.



## ÖZET

Fizyopatolojik olarak reperfüzyondan sonra serbest oksijen radikallerinin hücre membranında yaptığı lipoperoksidasyon sonucu oluşan doku hasarı, rekonstrüktif vasküler cerrahide önemli bir problem olarak karşımıza çıkmaktadır. Farmakoterapötik olarak antioksidan veya vazodilatatör ajanlar kullanılmaktadır. Çalışmamızda reperfüzyon hasarını önlemede N-asetil sistein'in etkilerinin araştırılması amaçlanmıştır.

Çalışma için 2 grupta (n=6) toplam 12 sıçan (300-400 gr.) kullanıldı. Eter anestezisi ile sıçanlar uyutulduktan sonra anestezi idamesi intraperitoneal ketamine ile sağlandı. Sağ veya sol iliak arter klemp için hazırlanırken aynı zamanda karşı iliak arter kan örneği almak ve ilaç uygulamak için kanüle edildi. Mikrovasküler klemp ile 4 saat iskemi ve sonrasında klemp kaldırılarak 1 saat reperfüzyon uygulandı. Kontrol grubuna deklempajdan 1 dak. önce 0,1-0,2 cc serum fizyolojik, 2. gruba N-asetil sistein anestezinin başlaması ile 5ug/kg/dk. infüzyon şeklinde uygulandı.

İskemi başlangıcında ve reperfüzyon sonunda (1. Ve 5. Saatler) arteryel kan örneği alınarak PCO<sub>2</sub>, PO<sub>2</sub>, HCO<sub>3</sub>, pH ve laktat bakıldı. Aynı saatlerde alınan kan örneğinden MDA(malondialdehid), LDH ve CPK bakıldı. Reperfüzyon sonrası sakrifiye edilen sıçanlardan MDA düzeyi ölçümü ve histopatolojik inceleme için kas ve akciğer biyopsisi yapıldı.

Kontrol grubunda MDA düzeyi 2. gruba göre anlamlı yüksek bulundu. Reperfüzyonda N-asetilsistein tedavisi ile MDA düzeyinin düştüğü ve histopatolojik incelemede nötrofil infiltrasyonunun azaldığı görüldü. Asetilsistein, iskemi-reperfüzyon periyodundan sonra oluşan oksidatif kas yıkımını azaltmaktadır.

**Anahtar Kelimeler:** İskemi reperfüzyon hasarı, N-asetilsistein.

## **SUMMARY**

Management of acute limb ischemia continues to be a formidable challenge for the vascular surgeon. A better understanding of the pathophysiology of limb ischemia-reperfusion also may result in opportunities for further therapeutic intervention. N-acetylcysteine (NAC) is an antioxidant that has a direct effect on radicals, and is also a glutathione precursor, another antioxidant.

At the two groups (n=6) total 12 rats (300-400gm) were anaesthetized with intraperitoneal ketamine. Right or left iliac artery was prepared for clamping and counter iliac vein was cannulated for the blood sample and drug perfusion. After 4 hours ischemia, reperfusion was realized for 1 hour. Prior to reperfusion control group was infused 0,1-0,2 cc isotonic solution, 2<sup>nd</sup> group was infused 5 ug/kg/min NAC. Before and after reperfusion, blood samples were taken for measurement of the Na, K, pO<sub>2</sub>, pCO<sub>2</sub> and MDA(Malondyaldehyd). After the reperfusion rats were sacrificed for the muscle and lung tissue samples.

Blood and tissue MDA levels in the control group were significantly higher than those in the experimental group. In the experimental group histopathological investigation was demonstrated reducing neutrophyl infiltration in the muscle and lung samples.

It was shown that NAC can prevent the reperfusion damage in acute ischemic occlusions.

**Keywords:** Ischemia reperfusion injury, N-acetylcysteine.

## **KAYNAKLAR:**

- 1- Cotran RS, Kumar V, Robbins SL: Cellular injury and cellular death. In: Schoen FJ, ed. Pathologic basis of disease, 5 th ed. London : WB Saunders, p. 1-34, 1994.
- 2- Kehrer JP, Smith CV: Free radicals in biology: Sources, reactivities, and roles in the etiology of human diseases. In: FREI B. Editor. Natural antioxidants in human health and disease. San Diego: Academic Press 1994; 25-62.
- 3- Halliwell B: Oxidative stress, nutrition and health. Experimental strategies for optimization of nutritional antioxidants intake in humans. Free Rad. Res 1996; 25: 57-74.
- 4- Nakazawa H, Genka C, Fujishima M: Pathological aspects of active oxygens/free radicals. Japan J Physiol 1996; 46:15-32.
- 5- Ufuk E: Deferoksaminin iskemik deri fleplerinde serbest oksijen radikali hasarýný önleyici etkisi, vazodilatasyonun rolü. Uzmanlýk tezi, Ýstanbul, 1992
- 6- Freeman BA, Crapo JD: Free radicals and tissue injury. Lab Invest 1982; 47:412-26.
- 7- Uysal M: Serbest radikaller, lipid peroksitleri ve organizmada prooksidan-antioksidan dengeyi etkileyen koþullar. Klinik Geliþim 1998; 11:336-41.
- 8- Champee P, Harvey RA. Biochemistry From Lippincott's Illustrated reviews 1997.
- 9- Angel MF, Ramasastry SS, Swartz WM, Basford RE and Futrell JE: Free radicals: Basic concepts concerning their chemistry, pathophysiology and relevance to plastic surgery. Plast Reconstr Surg 1987; 79: 990-7.
- 10- White, MJ and Heckler, FR: Oxygen free radicals and wound healing. Clin Plast Surg 1990; 17:473-84.
- 11- Yalçýn AS: Antioksidanlar. Klin Geliþ 1998; 11: 342-6.
- 12- Akkuþ Ý.: Serbest radikaller ve fizyopatolojik etkileri. Mimoza Yayýnlarý, Konya, 1995.
- 13- Andersson CM, Hallberg A, Högberg T: Advances in the development of pharmaceutical antioxidants. Adv Drug Res 1996; 28:65-180.
- 14- Biekalski HK, Böhles H, Esterbauer H, Fürst P, Gey F, Hundsdörfer G, Kasper H: Consensus statement: Antioxidant vitamins in prevention. Clin Nutr 1997; 16:151-5.
- 15- Yu BP: Cellular defences against damage from reactive oxygen species. Physiol Rev 1994; 74:139-62
- 16- Fridovich I: Superoxide dismutases. Adv Enzymol 1986; 58: 61-64.

- 17- Seven A, Candan G: Antioxidant defense systems. *Cerrahpaşa J Med* 1996; 27: 41-50.
- 18- Haimovici H, Ascer E, Hollier LH, Strandness DE, Towne JV: *Vascular Surgery*. Fourth Edition S514, 1996.
- 19- Benichoux R: Metabolic acidosis following regional circulatory arrest: treatment by THAM, hyperventilation and hyperbaric oxygen. *J Cardiovasc Surg* 1973; 15:573.
- 20- Blesdell GS, Steele M, Allen RE: Management of acute lower extremity arterial ischemia due to embolism and thrombosis. *Surgery* 1990; 95:822.
- 21- Haimovici H, Ascer E, Hollier LH, Strandness DE, Towne JV: *Vascular Surgery*. Fourth Edition S516, 1996.
- 22- Rutherford RB: Acute limb ischemia: clinical assessment and standards for reporting. *Semin Vasc Surg* 1992; 5:4-10.
- 23- Harris K, Walker PM: Metabolic response of skeletal muscle to ischemia. *Am J Physiol* 1986; 250:213.
- 24- Haimovici H: Muscular, renal and metabolic complications of acute arterial occlusions: myeloneuropathic-metabolic syndrome. *Surgery* 1979; 85:451.
- 25- Haimovici H: Myoneuropathic-metabolic syndrome. Key address to the XVII. Japanese Cardiovascular Surgery Congress, Tokyo, 1987.
- 26- Haimovici H, Ascer E, Hollier LH, Strandness DE, Towne JV: *Vascular Surgery* Fourth Edition S517, 1996.
- 28- Harris K, Walker P ve ark: Metabolic response of skeletal muscle to ischemia. *Am J Physiol* 1986; 250(19):213-20.
- 29- Suwal WD, Hobson RW II ve ark: Assessment of ischemia reperfusion injury in skeletal muscle by macromolecular clearance. *J Surg Res* 1987; 42: 550-9.
- 30- Suwal WD, Duran WN ve ark: Microvascular transport and endothelial cell alterations precede skeletal muscle damage in ischemia-reperfusion injury. *Am J Surg* 1987; 154:211-8.
- 31- McCord, JM: Oxygen-derived free radicals in postischemic tissue injury. *N Engl J Med* 1985; 312:159.
- 32- Granger DN: Role of xanthine oxidase and granulocytes in ischemia-reperfusion injury. *Am J Physiol* 1988; 255: 1269.

- 33- Heiomvici H: Skeletal Muscle ischemia-reperfusion injury. Fourth Edition 1996; S519.
- 34- Furchgott RF, Vanhoutte PM: Endothelium-derived relaxing and contracting factors. *FASEB J* 1989; 3:2007-18.
- 35- Ignarro LJ, Bryns RE, Wood KS: Endothelium-dependent modulation of cyclic GMP levels and intrinsic smooth muscle tone in isolated bovine intrapulmonary artery and vein. *Circ Res* 1987; 60:82-92.
- 36- Rosenberg RD, Rosenberg JS: Natural anticoagulant mechanisms. *J Clin Invest* 1984; 74:1-5.
- 37- Esmon CT, Owen WG: Identification of an endothelial cofactor for thrombin-catalyzed activation of protein. *Proc Soc Natl Acad Sci* 1981; 78: 2249-52.
- 38- Rees R, Smith D, Lý TD, Cashmer B, Garner W, Punch J, Smith DJ: The role of xanthine oxidase and xanthine dehydrogenase in skin ischemia. *J Surg Res* 56 1994; 162-167..
- 39- Smith JK, Grisham GB ve ark: Free radical defense mechanisms and neutrophil infiltration in postischemic skeletal muscle. *Am J Physiol* 1989; 256:789-793.
- 40- Korthius RJ, Grisham MB, Granger DN: Leucocyte depletion attenuates vascular injury in post-ischemic skeletal muscle. *Am J Physiol* 1989; 254:283-7.
- 41- Breitbard GB, Dillon PK ve ark: Leukopenia reduces microvascular clearance of macromolecules in ischemia-reperfusion injury. *Curr Surg* 1990; 47:8-12.
- 42- Belkin M, LaMorte WL ve ark: The role of leucocytes in the pathophysiology of skeletal muscle ischemic injury. *J Vasc Surg* 1989; 10:14-9.
- 43- Kubes P, Kvievys PR, Granger DN: Ischemia-reperfusion injury In: Mortillaro NA, Taylor AE, eds *The pathophysiology of the microcirculation* Boca Raton, Fla: CRC press, 1994
- 44- Ferrante RJ, Silva MB ve ark: Inhibition of leucocyte adhesion at reperfusion decreases tissue damage in postischemic skeletal muscle. *Surg Forum* 1993; 44: 367-9.
- 45- Ley K, Gaehtgens P: Lectin-like cell adhesion molecule 1 mediates leucocyte rolling in mesenteric venules in vivo. *Blood* 1991; 77:2553.
- 46- Lawrence MB, Springer TA: Leucocytes roll on a selection at physiologic flow rates: distinction from and prerequisite for adhesion through integrins. *Cell* 1991; 65:859.
- 47- Kubes P, Suzuki M, Granger DN: Modulation of PAF-induced leukocyte adherence and increased microvascular permeability. *Am J Physiol* 1990; 259:859.

- 48- Yasuhara H, Hobson RW II ve ark: A new model for studying ischemia-reperfusion injury in the hamster cheek pouch. *Am J Physiol* 1991; 261:1626-9.
- 49- Hernandez LA, Grisham MB ve ark: Role of neutrophils in ischemia-reperfusion-induced microvascular injury. *Am J Physiol* 1987 253:699.
- 50- Kubes P, Suzuki M, Granger DN: Platelet-activating factor-induced microvascular dysfunction: the role of adherent leukocytes. *Am J Physiol* 1990; 258:158.
- 51- Duran WN, Suval WD ve ark: Microcirculatory dysfunction in the pathophysiology of skeletal muscle ischemia In: Veith FJ, Hobson RW *Vascular Surgery:principles and practice* New York:McGraw-Hill, 1993.
- 52- Filep J, Herman F ve ark: Increased levels of platelet activating factor in blood following intestinal ischemia in the dog. *Biochem Biophys Res Commun* 1989; 158:353.
- 53 Knight K et al: Enhancement of ischaemic rabbit skin flap survival with the antioxidant and free-radical scavenger N-acetylcysteine. *Clin Sci* 1991; 81:31-6.
- 54 De Flora H, Silvio T, et al: Antioxidant activity and other mechanisms of thiols involved in chemoprevention of mutation and cancer. *Amer J Med* 1991(Suppl 3C); 122-130 .
- 55- Hagen Z, Torie M, et al: Bioavailability of dietary glutathione: Effect on plasma concentration. *Amer J Physiol* 1990; 259: 524-9.
- 56- Lash WL, Lawrence H, et al: Exogenous glutathione protects intestinal epithelial cells from oxidative injury. *Proceed Natl Acad Sci* 1986; 83:4641-5.
- 57-Acetylcysteine. Editorial *The Lancet* 1991; 337(8749):1069-70.
- 58- Duthie G, et al: Blood antioxidant status and erythrocyte lipid peroxidation following distance running. *Arch Bioch* 1990; 282:78-83.
- 59- Novelli G, et al: Spintrappers and Vitamin E prolong endurance to muscle fatigue in mice. *Free Rad Bio Med* 1990; 8:9-13.
- 60- Reid MB, Stokic DS, Koch SM, Khawli FA, Leis AA: N-acetylcysteine inhibits muscle fatigue in humans. *J Clin Invest* 1994; 6:2468-74.
- 61- Buhl Roland, et al: Systemic glutathione deficiency in symptom-free HIV- seropositive individuals. *The Lancet* 1989; 2(8675):1294-8 .
- 62- Eck HP, et al: Metabolic disorder as early consequence of Simian Immunodeficiency Virus infection in Rhesus macaques. *Lancet* 1991; 338:346-7.

- 63- Wu J, Levy EM and Black PH: Mercaptoethanol and N-acetylcysteine enhance T-cell colony formation in AIDS and ARC. *Clin Exp Immunol* 1989; 77:7-10.
- 64- Carson DA, Seto S and Wasson DBJ: Lymphocyte dysfunction after DNA damage by toxic oxygen species. *Exp Med* 1986; 163:746-51.
- 65- El-Hag A, et al: Immunomodulation by neutrophil myeloperoxidase and hydrogen peroxide: Differential susceptibility of human lymphocyte functions. *J Immunol* 1986; 136:3420-6.
- 66- Stagnaro R, et al Thiol-containing antioxidant drugs and the human immune system. *Bull Eur Physiopathol Respir* 1987; 23:303-7.
- 67- Kinter, AL, et al: Suppression of Cytokine-induced Human Immunodeficiency Virus (HIV) expression by N-acetylcysteine (NAC), glutathione (GSH) and Glutathione monoester (GSE). 75th Annual Meeting of the Federation of American Societies for Experimental Biology 1991; 5:1265.
- 68- Mihm S and Droge W: Intracellular glutathione level controls DNA-binding activity of NF kappa B-like proteins. *Int Conf AIDS* 1990; 6(3):159 .
- 69- Lorber A, et al: Clinical application for heavy metal-complexing potential of N-acetylcysteine. *J Clin Pharmacol* 1973; 13:332-6.
- 70- Ketterer B, Coles B and Meyer DJ: The role of glutathione in detoxification. *Envir Health Perspec* 1983; 49:59-69.
- 71- Lauterburg BH, Corcoran GB and Mitchell JR: Mechanism of action of N-acetylcysteine in the protection against hepatotoxicity of acetaminophen in rats in vivo. *J Clin Invest* 1983; 71:980-991.
- 72- Lopez RA, et al: N-acetylcysteine: Protective agent or promoter of gastric damage? *PSKBM* 1991; 197:273-8.
- 73- Hoffer E, et al: N-acetylcysteine improves the survival rate of paraquat poisoned rats: Elucidation of its mode of action. *Rev Respir Dis* 1991; 143: A731.
- 74- Howard RJMW, et al: Allopurinol/N-acetylcysteine for carbon monoxide poisoning. *Lancet II* 1987; 628-9.
- 75- Ruprah M, Mant TG and Flanagan RJ: Acute carbon tetrachloride poisoning in 19 patients: Implications for diagnosis and treatment. *Lancet I* 1985; 1027-9.
- 76- Mathieson PW, Williams G and MacSweeney JE: Survival after massive ingestion of carbon tetrachloride treated by intravenous infusion of acetylcysteine. *Hum Toxicol* 1985; 4:627-31.

- 77- Du Y, Boczkowski J and Aubier M: N-acetylcysteine prevents diaphragmatic contractile alterations induced by Escherichia-coli endotoxemia in rats. *Rev Respir Dis* 1991; 143: A560.
- 78- Raj HG and Lotlikar PD: Urinary excretion of thiol conjugates of aflatoxin B1 in rats and hamsters. *Cancer Lett* 1984; 22(2):125-33.
- 79- Shetty TK, Francis AR and Bhattacharya RK: Modifying role of dietary factors on the mutagenicity of aflatoxin B1: In vitro effect of sulfur-containing amino acids. *Mutat Res* 1989; 222(4):403-7.
- 80- De Flora S, et al: Antioxidant activity and other mechanisms of thiols involved in chemoprevention of mutation and cancer. *Amer J Med* 1991(Suppl 3C):122-130.
- 81- Shetty T, Francis, AR and Bhattacharya RK: Modifying role of dietary factors on the mutagenicity of aflatoxin B1: In vitro effect of sulfur-containing amino acids. *Mutat Res* 1989; 222(4):403-7.
- 82- Andersen M, Kristjansen PEG and Hansen HH: Second-line chemotherapy in small-cell lung cancer. *Cancer Treat Rev* 1990; 17(4):427-36.
- 83- Martinez E and Domingo M: N-acetylcysteine as chemoprotectant in cancer chemotherapy. *Pere Lancet* 1991; 338:249.
- 84- Droge W: Cysteine and glutathione in catabolic conditions and immunological dysfunction. *Curr Opin Clin Nutr Metab Care* 1999; 2(3):227-33.
- 85- Long-term oral acetylcysteine in chronic bronchitis: A double-blind controlled study Multicenter Study Group. *Eur J Respir Dis* 1980; 61:93.
- 86- Sheffner AL: The reduction in vitro in viscosity of mucoprotein solutions by a new mucolytic agent, N-acetylcysteine. *Ann NY Acad Sci* 1963; 106:288.
- 87- Shindoh C, DiMarco A, Thomas A: Effect of N-acetylcysteine on diaphragm fatigue. *J Appl Physiol* 1990; 68: 2107-13.
- 88- Khawli FA, Reid MB: N-acetylcysteine depresses contractile function and inhibits fatigue of diaphragm in vitro. *J Appl Physiol* 1994; 77: 317-24.
- 89- Hida W, Shindoh C, Satoh J, Sagara M: N-acetylcysteine inhibits loss of diaphragm function in streptozotocin-treated rats. *Am J Respir Crit Care Med* 1996; 153:1875-9.
- 90- Gavish D and Breslow JL: Lipoprotein(a) reduction by N-acetylcysteine. *The Lancet* 1991; 337:203-4.



- 91- Stalenhoef AFH, et al: N-acetylcysteine and lipoprotein. *The Lancet* 1991; 337:491.
- 92- Scanu AM: N-Acetylcysteine and immunoreactivity of lipoprotein(a). *The Lancet* 1991; 337:1159.
- 93- Scanu, Angelo M, et al: Thiols and cysteine-containing compounds attenuate the immunoreactivity of Lp(a). *Arterioscl Thromb* 1991; 11(5):1481.
- 94- Lu G, Greene EL, Nagai T, Egan BM: Reactive oxygen species are critical in the oleic acid-mediated mitogenic signaling pathway in vascular smooth muscle cells. *Hypertension* 1998; 32:1003-10.
- 95- Wang D, Yu X, Brecher P: Nitric Oxide and N-acetylcysteine inhibit the activation of mitogen-activated protein kinases by angiotensin II in rat cardiac fibroblasts Published erratum appears in *J Biol Chem* 1998; 274: 1180.
- 96- Chen LE, Seaber AV, Nasser RM, Stamler JS, Urbaniak JR: Effects of S-nitroso-N-acetylcysteine on contractile function of reperfused skeletal muscle. *Am J Physiol* 1998; 274: 822-9.
- 97- Van der Laan L, Oyen WJ, Verhofstad AA, Tan,EC, Hendriks T: Soft tissue repair capacity after oxygen-derived free radical-induced damage in one hindlimb of the rat. *J Surg Res* 1997; 72:60-9.
- 98- Urbaniak JR, Seaber AV, Chen LE: Assessment of ischemia and reperfusion injury. *Clin Ortho relat Res* 1997; 334: 30-36.
- 99- Homer-Vanniasinkam S, Gough MJ: Role of lipid mediators in the pathogenesis of skeletal muscle infarction and oedema during reperfusion after ischemia. *Br J Surg* 1994; 81:1500-3.
- 100- Groeneveld AB, Raijmakers PG, Rauwerda JA, Hack CE: The inflammatory response to vascular surgery-associated ischemia and reperfusion in man: effect on postoperative pulmonary function. *Eur J Vasc Endovasc Surg* 1997; 14: 351-9.
- 101- Hardy SC, Gough MJ: Pharmacological manipulation of gastrocnemius muscle blood flow in an animal model of reperfusion injury. *J Biomed Eng* 1991; 13:263-6.
- 102- Ferrari R, Ceconi C, Curelo S, et al: Role of oxygen free radicals in ischemic and reperfused myocardium. *Am J Clin Nutr* 1991; 53: 215-22.
- 103- Shah DM, Bock DE, Darling RC, et al: Beneficial effects of hypertonic mannitol in acute ischemia-reperfusion injures in humans. *Cardiovasc Surg* 1996; 4:97-100.

- 104- Smeets HJ, Camps J, Van Milligen de Wit AW, et al: Influence of low dose allopurinol on ischemia-reperfusion injury during abdominal aortic surgery. *Eur J Vasc Endovasc Surg* 1995; 9:162-9.
- 105- Sciamanna MA, Lee CP: Ischemia/reperfusion-induced of forebrain mitochondria and protection by ascorbate. *Arch Biochem Biophys* 1993; 305:215-24.
- 106- Genç F, Tütüncü A, et al: Alt ekstremitenin deneysel iskemi-reperfüzyon modelinde süperoksit dismutazın lokal-sistemik etkileri engellemedeki yeri. *Klinik ve Deneysel Cerrahi* 1998; 6:211-7.
- 107- Sonthosu PA, Powis G: Free radicals in medicine chemical nature and biologic reactions. *Mayo Clin Proc* 1988; 63:381-9.
- 108- Rabl H, Khoschorur G, Colombo T, Tatzber F, Esterbauer H: Plasmal lipid peroxide levels show a strong transient increase after successful revascularization operations. *Free Rad Biol Med* 1992; 13:281-8.
- 109- Feng F: Biochemical metabolism and oxygen free radical changes following ischemic and reperfused injured limbs. *Chung Hua Waikotsa Chih* 1990; 28:693-6.
- 110- Tassiopoulos AK, Hakim TS, Finck CA, et al: Neutrophil sequestration in the lung following acut aortic occlusion starts during ischemia and can be attenuated by toumor necrosis factor and nitric oxide blokade. *Eur J Vasc Endovasc Surg* 1998; 16: 36-42.
- 111- Weiss AP, Carey LA ve ark: Oxygen radical scavengers improve vascular patency and bone muscle cell survival in an ischemic extremity replant model. *Plast and Reconstr Surg* 1982; 84:117-23.
- 112- Feller MA, Roth CA: Experimental evaluation of oxygen free radical scavengers in the prevention of reperfusion injury to skeletal muscle. *Ann Plast Surg* 1989; 22:321-331.
- 113- Faust KB, Chiontella V: oxygen derived free radical scavengers and skeletal muscle ischemia-reperfusion injury. *The Am Surg* 1988; 54:709-18.
- 114- Seekamp A, Mulligan MS, Till GO, Smith CW, Myasaka M, Tamatom T: Role of beta 2 integrins and ICAM-1 in lung injury following ischemia reperfusion of rat hind limbs. *Am J Pathol* 1993; 14:464-72.