

**T.C.
BAŞKENT ÜNİVERSİTESİ
TIP FAKÜLTESİ
GENEL CERRAHİ ANABİLİM DALI**

**DENEYSEL İNTESTİNAL İSKEMİ REPERFÜZYON MODELİNDE
“SOLUBLE COMPLEMENT RECEPTOR TYPE 1”İN LOKAL VE
UZAK ORGAN HASARINI ÖNLEMEDEKİ ETKİNLİĞİ**

**UZMANLIK TEZİ
Dr. MAHİR KIRNAP**

**TEZ DANIŞMANI
Doç. Dr. MAHMUT CAN YAĞMURDUR**

ANKARA / 2009

TEŞEKKÜR

Uzmanlık eğitimim boyunca bilgi ve tecrübelerini büyük bir özveri ile aktaran ve yol gösteren başta sayın hocam Prof. Dr. Mehmet HABERAL olmak üzere emeği geçen tüm hocalarıma saygı ve şükranlarımı sunmayı bir borç bilirim.

Ayrıca tez çalışmamda desteği olan; Biyokimya Anabilim Dalı Başkanı sayın Prof. Dr. Suna Türkoğlu'na, Biyokimya Anabilim Dalı Öğretim Üyesi sayın Dr. Nilüfer Bayraktar'a, Patoloji Anabilim Dalı'ndan sayın Dr. Cem Çomunoğlu'na Genel Cerrahi Anabilim Dalı'ndan Öğretim Üyesi sayın Doç Dr. Mahmut Can Yağmurdur'a ve tüm çalışma arkadaşlarıma teşekkürlerimi sunarım.

Uzun ve zorlu eğitim süreci boyunca benden destek ve sevgilerini esirgemeyen değerli ailem ve tüm dostlarıma sonsuz teşekkür ederim.

Dr. Mahir KIRNAP

ÖZET

Bu çalışmada; ratlarda Süperior Mezenterik Arter (SMA) yolu in vivo olarak oluşturulan iskemi/reperfüzyon modelinde lokal ve uzak organlarda oluşan hasar ve kompleman inhibitörünün rolü ve tedavideki etkilerini incelemeyi amaçladık. Elde edilen veriler doğrultusunda kompleman inhibitörünün pratik kullanımı hakkında bilgi edinilecektir.

Çalışmada ağırlıkları 200-250 gram arasında değişen 24 adet erkek rat kullanıldı. Ketamin hidroklorür ve ksilazin hidroklorit ile anesteziyi takiben, 1. Grup ratlarda SMA 60 dakika klemplenmesi ile iskemi ve takiben reperfüzyon oluşturuldu. 2. Grup ratlara laparatomiyi takiben intravenöz olarak “soluble complement inhibitör 1” (sCR1) verildi. 3. grup ratlara SMA 60 dakika klemplenmesi ile iskemi sonrası 60. dakikada intravenöz sCR1 verildikten 1 dakika sonra reperfüzyon uygulandı. 4. Grup ratlara sadece laparotomi uygulandı. Tüm ratlar işlemlerden 4 gün sonra sakrifiye edilip biyokimya, patoloji ve histolojik parametreler için gerekli serum ve karaciğer, böbrek ve intestinal doku örnekleri alındı.

Ratlarda sistemik organ hasarının incelemek amacıyla, Karaciğer hepatosit hasarı açısından serumda Aspartatamino Transaminaz (AST), Alaninamino Transaminaz (ALT) seviyeleri ölçüldü. Böbrek fonksiyonlarını değerlendirmek için serumda Blood Urea Nitrogen (BUN) ve Kreatinin seviyeleri çalışıldı. Ayrıca iskemi ve reperfüzyonun yarattığı sistemik ve lokal inflamasyonu belirlemek için serumdaki total protein ve albumin, Tümör Nekrotizan Faktör alfa (TNF α) ve İnterlökin 6 (IL 6) seviyeleri çalışıldı. Doku örneklerinde lokal ve uzak organ reperfüzyon hasarını değerlendirmek için glutatyon (GSH), malondialdehid (MDA), myeloperoksidaz (MPO) pozitif nötrofil sayısı ölçümleri yapıldı.

Altmış dakikalık iskemi ve dört günlük reperfüzyon sonunda karaciğer GSH düzeyleri anlamlı derecede azalırken, sCR1 uygulaması bu azalmayı anlamlı olarak önlemiştir. MDA değerlerinde ise İR sonucunda arttığı gözlenmiştir. Bu değerlerdeki artış seviyesi sCR1 uygulaması ile azalmıştır. MPO pozitif nötrofil sayısı ise İR sonrasında yüksek bulunmuştur. Nötrofil sayısı hem lokal hem uzak organlarda İR sonrası sCR1 verilmesi ile azalmıştır.

T. protein, BUN ve Kreatinin düzeyleri tüm gruplarda normal bulunurken, AST, ALT ve Albumin düzeylerinde İR sonucunda gözlenen artış da sCR1 uygulaması ile önlenmiştir. TNF α ve IL 6 değerleri ise İR sonrasında artış gösterirken İR sonrası sCR1 uygulanması TNF α ve IL 6 düzeylerini azaltmıştır.

Yapılan istatistiksel analiz sonucunda; sCR1 iskemi-reperfüzyonun indüklediği organ hasarını azalttığı, antiinflamatuvar etki gösterdiği ispatlanmıştır. En önemlisi reperfüzyonun oluşturduğu uzak organ hasarı ortaya konmuş ve sCR1'in bunu engellediği gösterilmiştir. Bu bulgulara bakarak sCR1'in morbidite ve mortaliteyi önemli oranda azaltabileceği düşünülmektedir.

Anahtar Kelimeler: İskemi reperfüzyon hasarı, Soluble complement receptor type 1, Süperior mezenterik arter, uzak ve lokal organ hasarı

İÇİNDEKİLER

Sayfa No

TEŞEKKÜR	iii
ÖZET	iv-v
İÇİNDEKİLER	vi
SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİSİ	vii-viii
RESİMLER LİSTESİ	ix
TABLolar LİSTESİ	x
GRAFİKLER LİSTESİ	xi
1.GİRİŞ VE AMAÇ	1
2.GENEL BİLGİLER.....	4
2.1 İskemi Reperfüzyonun etkileri	4
2.1.1 İskemi Reperfüzyona Karşı Lokal Mikrovasküler Yanıtlar	4
2.1.2 SMA İle Oluşan İskemi-Reperfüzyonun Etkileri.....	5
2.2 İskemi Reperfüzyon Sonrası Uzak Organ Hasarı	7
2.3 Lökositlerin Rolü.....	9
2.4 Serbest Oksijen Radikallerinin Rolü	11
2.5 Kompleman Sistemi	11
2.6 İskemi-Reperfüzyon Hasarında Kompleman Sistemin Rolü	15
2.6.1 C3 İnhibitör (sCR1)	16
2.6.2 C1 İnhibitör (C1 INH)	18
2.7 Glutasyon.....	19
2.8 Malondialdehit	20
2.9 Sitokinler	20
3.GEREÇ VE YÖNTEM	22
3.1. Deney Hayvanları.....	22
3.2. Anestezi.....	22
3.3. sCR1'in Uygulanışı ve Sıvı Replasmanı.....	23
3.4. Cerrahi Teknik.....	23
3.5. Araştırma Parametreleri	28
3.5.1.Biyokimyasal analiz	28
3.5.2.İmmunhistokimyasal Analiz	28
3.5.3.Dokuda MDA ve GSH Analizi	29
3.6. İstatistiksel Analiz	29
4. SONUÇLAR	30
4.1. Patoloji Sonuçları	30
4.2. Biyokimyasal Analiz.....	36
4.3. Dokuda MDA-GSH Analizi.....	43
5. TARTIŞMA	46
6. SONUÇLAR	52
7. KAYNAKLAR	53

SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİSİ

- AMİ:** Akut Mezenterik İskemi
ALT: Alanin aminotransferaz
ARDS: Akut Respiratuar Distres Sendromu
AP: Alkalen Fosfataz
AST: Aspartat aminotransferaz
ATP: Adenozin Tri Fosfat
BUN: Blood Urea Nitrogen
CR1: Kompleman Reseptör 1
CPK: Kreatinin Fosfokinaz
C1: Kompleman 1
C2: Kompleman 2
C3: Kompleman 3
C5a R: Kompleman 5a Reseptörü
C5b-9 (=MAK): Membran Atak Kompleks
DNA: Deoksiribonükleik Asit
ECAM: Endotel Hücre Adezyon Moleküllerinin
ENA: Epitelial Nötrofil Aktive Edici Protein
GSH: Glutasyon
HCl: Hidrojen Klorür
H₂O₂: Hidrojen Peroksid
ICAM: İntersellüler Adezyon Molekülü
IF: İmmunfloresan
Ig: İmmunglobulin
IL: İnterlökin
İR: İskemi Reperfüzyon
KC: Karaciğer
KCFT: Karaciğer Fonksiyon Testleri
KCl: Potasyum Klorür
LAM: Lökosit Adezyon Molekülü
LDH: Laktat Dehidrogenaz
LPS: Lipopolisakkarit
LT: Lökotrien

MAK: Membran Atak Kompleksi
MBL: Mannoz Bağlayıcı Lektin
MDA: Malondialdehit
MODS: Multiple Organ Yetmezliği Sendromu
MPO: Myeloperoksidaz
NAD: Nikotinamid Adenin Dinükleotid
NO: Nitrik Oksit
NOMİ: Non oklüzüv Mezenterik İskemi
RNA: Ribonükleik Asit
PAF: Platelet Aktive Edici Faktör
PG: Prostaglandin
PMNL: Polimorfonükleer Lökosit
PGE2: Prostaglandin E2
PSGL: P-Selektin Adezyon Molekülü
SIRS: Sistemik İnflamatuvar Yanıt Sendromu
SMA: Süperior Mezenterik Arter
SOR: Serbest Oksijen Radikalleri
sCR1: Soluble Kompleman Reseptör 1
TBS: Tris Buffer Saline
TNF α : Tümör nekroz faktör alfa

RESİMLER VE ŞEKİLLER LİSTESİ

Resim 1: SMA 'nın disseksiyonu

Resim 2: SMA 'nın klemlenmesi ve intestinal iskemi oluşturulması

Resim 3: Kuyruk veninden sCR1 verilmesi

Resim 4: Parsiyel Karaciğer Rezeksiyonu

Resim 5: Sağ Nefrektomi

Resim 6: İnce Barsak Rezeksiyonu

Resim 7: Vena Kava İnferiordan Kan Örneklerinin Alınması

Resim 8: İnce Barsak Grup 1 'de (İR) MPO Pozitif Nötrofil boyamaları(x400)

Resim 9: İnce Barsak Grup 2 'de (sCR1) MPO Pozitif Nötrofil boyamaları (x400)

Resim 10: İnce Barsak Grup 3 (İR+sCR1) 'de MPO Pozitif Nadir Nötrofil boyamaları (x400)

Resim 11: İnce barsak dokusu 4. grupta MPO pozitif nötrofil yokluğu boyamaları (x400)

Resim 12: Karaciğer Dokusu 1. Grupta MPO Pozitif Nötrofil boyamaları (x400)

Resim 13: Karaciğer Dokusu Grup 2 'de (sCR1) MPO Pozitif Nötrofil Yokluğu boyamaları (x400)

Resim 14: Karaciğer Dokusu Grup 3 'de (İR+sCR1) MPO Pozitif Nadir Nötrofil boyamaları (x400)

Resim 15: Böbrek Dokusu Grup 1 'de (İR) MPO Pozitif Nötrofil boyamaları (x400)

Resim 16: Böbrek Dokusu Grup 2 'de (sCR1) MPO Pozitif Nötrofil boyamaları (x400)

Resim 17: Böbrek Dokusu Grup 3 'de (İR+sCR1) MPO Pozitif Nötrofil yokluğu boyamaları (x400)

Şekil 1: Kompleman Sistem Aktivasyonu

Şekil 2: Kompleman Sistem Fonksiyonları

TABLULAR LİSTESİ

- Tablo 1:** KC, Böbrek ve Bağırsak Dokusunda Myeloperoksidaz Pozitifliği Gösteren Nötrofil Sayısı İçin Ortalama Nötrofil Sayısı ve Ortalama Standart Hata Değerleri
- Tablo 2:** AST İçin Değerler ve Ortalama Standart Hata Değerleri
- Tablo 3:** ALT İçin Ortalama Değerler ve Ortalama Standart Hata Değerleri
- Tablo 4:** BUN İçin Ortalama Değerler ve Ortalama Standart Hata Değerleri
- Tablo 5:** Kreatinin İçin Ortalama Değerler ve Ortalama Standart Hata Değerleri
- Tablo 6:** Total Protein İçin Ortalama Değerler ve Ortalama Standart Hata Değerleri
- Tablo 7:** Albumin İçin Ortalama Değerler ve Ortalama Standart Hata Değerleri
- Tablo 8:** TNF α İçin Ortalama Değerler ve Ortalama Standart Hata Değerleri
- Tablo 9:** IL 6 İçin Ortalama Değerler ve Ortalama Standart Hata Değerleri
- Tablo 10:** Doku MDA Düzeyi İçin Ortalama Değerler ve Ortalama Standart Hata Değerleri
- Tablo 11:** Doku GSH Düzeyi İçin Ortalama Değerler ve Ortalama Standart Hata Değerleri

GRAFİKLER LİSTESİ

- Grafik 1:** KC, Böbrek Ve Bağırsak Dokusunda Myeloperoksidaz Pozitifliği Gösteren Nötrofil Sayısı İçin İndeks Değerlerinin Gruplar Arası Karşılaştırılmalı Dağılımı
- Grafik 2:** AST İndeks Değerlerinin Gruplar Arası Karşılaştırılmalı Dağılımı
- Grafik 3:** ALT İndeks Değerlerinin Gruplar Arası Karşılaştırılmalı Dağılımı
- Grafik 4:** BUN İndeks Değerlerinin Gruplar Arası Karşılaştırılmalı Dağılımı
- Grafik 5:** Kreatinin İndeks Değerlerinin Gruplar Arası Karşılaştırılmalı Dağılımı
- Grafik 6:** Total Protein İndeks Değerlerinin Gruplar Arası Karşılaştırılmalı Dağılımı
- Grafik 7:** Albumin İndeks Değerlerinin Gruplar Arası Karşılaştırılmalı Dağılımı
- Grafik 8:** TNF α İndeks Değerlerinin Gruplar Arası Karşılaştırılmalı Dağılımı
- Grafik 9:** IL 6 İndeks Değerlerinin Gruplar Arası Karşılaştırılmalı Dağılımı
- Grafik 10:** Doku MDA Değerlerinin Gruplar Arası Karşılaştırılmalı Dağılımı
- Grafik 11:** Doku GSH Değerlerinin Gruplar Arası Karşılaştırılmalı Dağılımı

1.GİRİŞ VE AMAÇ

Pek çok organ ve sistemde iskemi-reperfüzyon (İR) hasarının etkileri deneysel cerrahide en çok araştırılan konulardan biridir. İskemi, dokunun oksijen ve diğer metabolitlere olan ihtiyacının dolaşım tarafından sağlanamaması ve oluşan artık ürünlerin yine dolaşım tarafından uzaklaştırılmaması olarak tanımlanır (1). Reperfüzyon ise bu iskemik dokudaki kan dolaşımının yeniden sağlanmasıdır. İskemik bir dokunun reperfüzyonu dokunun oksijen ve diğer metabolik ihtiyaçlarını karşılarken paradoksal olarak dokularda hasar oluşturur (2).

İskemi ve reperfüzyon hasarında temel patofizyoloji, iskemik dokuların reperfüzyonu sonrası gelişen mikrovasküler disfonksiyondur. Bu durum kendini arteriyollerde endotel bağımlı dilatasyonda bozulma, kapillerlerde sıvı filtrasyonunda, lökosit tıkanmasında artma, postkapiller venüllerde lökositlerde sıkışma ve plazma protein ekstrasvazasyonu şeklinde göstermektedir. Mikrosirkülasyondaki aktive endotel hücreleri reperfüzyon sonrası ilk dönemde daha fazla oksijen radikali, ancak daha az nitrik oksit üretmektedir. Endotel hücrelerindeki süperoksid ile nitrik oksit arasındaki dengesizlik inflamatuvar mediyatörlerin üretim ve salınımına yol açmakta ve lökosit-endotel hücre adezyonuna aracılık eden adezyon moleküllerinin biyosentezini arttırmaktadır. Reperfüzyon sonucunda salınan inflamatuvar mediyatörlerin başlangıçtaki iskemik hasara maruz kalmamış uzak organlardaki endotel hücrelerini de aktive ettiği görülmektedir (3). İskemi ve reperfüzyona karşı verilen bu uzak yanıt, multipl organ disfonksiyon sendromunun özelliği olan lökosit bağımlı mikrovasküler hasara yol açabilir.

Bir dokudaki iskemi ve reperfüzyon (İR) sonucu oluşan hasar, dokunun aynı sürede sadece iskemiye maruz kalması sonucu oluşan hasardan daha fazladır (4). İskemik dokunun reperfüzyonu sonrası gördüğü hasar akciğer, karaciğer, böbrek kalp, beyin ve barsaklar gibi pek çok organda ayrıntılı olarak araştırılmıştır (5-6). Ancak yine de İR hasarının fizyopatolojisi tam olarak aydınlatılmış değildir. İR hasarında serbest oksijen radikallerin oluşumu, polimorf nüveli lökositlerin aktivasyonu, endotel ve kompleman sistemi gibi major komponentlerin rol oynadığı bilinmektedir (7,8). Bu tablo lokal ve sistemik inflamatuvar cevabın başlamasına yol açarak lokal ve uzak organlarda da hasar oluşturmaktadır.

Klinikte İR transplantasyon, travma cerrahisi, vasküler cerrahi, organ rezeksiyonu ve düşük akımlı durumlarda önemlidir. Günümüzde süreye bağlı olarak reperfüzyonun öncesindeki iskemiye göre dokuda daha zararlı olduğu bilinmektedir. 1990'larda İR hasarının

lokal ve sistemik etkileri olduğu ve bu sistemik etkilerin sistemik inflamatuvar reaksiyonu tetikleyebileceği kabul edilmiştir.

İR hasarının lokal ve sistemik etkileri

- ✓ Aktive nötrofillerden
- ✓ Kompleman sisteminden
- ✓ Eikonozoidler
- ✓ Nitrik oksit
- ✓ Sitokinler
- ✓ Serbest oksijen radikalleri gibi proinflamatuvar ve vazoaktif mediatörlerden kaynaklandığı kabul edilmektedir.

İskemi reperfüzyon hasarında kompleman sisteminin her 3 yolu da aktive olmaktadır. Reperfüzyon sırasında kompleman bağımlı proinflamatuvar peptidler (C3a ve C5a) salınır. Bu peptidler;

- ✓ Nötrofil aktivasyonuna
- ✓ Düz kas hücrelerinde kasılmaya
- ✓ Vasküler permeabilitede artışa
- ✓ Makrofaj aktivasyonunda artışa
- ✓ C5b-9 polimerizasyonu ile saldırgan yabancı hücre lizisine
- ✓ Fosfolipid tabakasının bütünlüğünün bozulmasına
- ✓ C3b opsonizasyonuna
- ✓ Anaflatoksinlerin aktivasyonuna
- ✓ Endotel hücrelerinde fibrin depositlerinin birikimine
- ✓ Trombosit agregasyonuna neden olur (9-10).

Kompleman sisteminin baskılandığı hayvanlar; soluble kompleman reseptör 1 (sCR1) ve C5aR inhibitörü ile tedavi edildiğinde iskemi ve reperfüzyon boyunca çok az miktarda nötrofil birikimi saptanmıştır ve hasar anlamlı derecede az olarak tesbit edilmiştir (11).

C3 İnhibitörleri (sCR1) : Çok fazla deneysel çalışma olmamakla birlikte çeşitli organlarda İR hasarına karşı kullanılan kompleman inhibitörlerinden biride sCR1 'dir.

sCR1;

- ✓ Fagositozu düzenler

- ✓ C3 aktivasyonunun potent düzenleyicisidir
- ✓ C3b ve C4b 'e bağlanarak C3-C5 konvertazların yıkımını hızlandırır (11).
- ✓ Tüm yollarda ortak kompleman aktivatörü olan C3' ün aktivasyonunu inhibe eder. Böylece hem C3a ve C5a' nın hemde MAK 'in üretimini engeller.

Deneysel çalışmalarda İR hasarında sCR1 uygulaması infarkt boyutunu azaltır, infarkt alanında PMNL birikimini azaltır, C5a üretimini baskılayarak lökosit adezyon reseptörlerinin salınımını ve lökosit kemotaksisini önler (12,13). Sonuç olarak direkt endotelial hasara neden olan C5b-9 kompleks oluşumu sCR1 tarafından baskılanır (14).

Barsak İR hasarında kompleman inhibitörü olarak sCR1 kullanıldığında mukozal hasarlanmada azalma, vaküler permeabilite de azalma ve sağkalımda artış görülmüştür (15,16).

Karaciğer İR hasarında hayvanlar sCR1 ile tedavi edilmiş ve post iskemik karaciğerde uzun reperfüzyon periyodunda lökosit PMNL birikiminde anlamlı derecede azalma saptanmıştır (17). Bu çalışmada reperfüzyon hasarının geç dönemi boyunca karaciğer nekrozu anlamlı düzeyde azalmıştır. sCR1 oksidatif stresin indüklediği kupffer hücrelerini bloke ederek koruyucu etki göstermiş ve karaciğer fonksiyonlarını ve mikrovasküler perfüzyonu iyileştirmiştir. Parankimal hücre hasarını azaltmıştır (18).

Allogreft cevabı üzerine sCR1 ile yapılan bir çalışmada ise plazma kompleman aktivasyonu %90 'ın üzerinde baskılanmış, doku C3 ve MAK birikimlerinde azalma görülmüştür. Ayrıca lökosit infiltrasyonunda azalma ve greft ömründe artış saptanmıştır (19,20).

AMAÇ:

Pek çok organın lokal İR hasarının etkileri araştırılmış olmasına rağmen lokal İR hasarının uzak organlar üzerinde yarattığı hasarı araştıran fazla çalışma bulunmamaktadır (3). Biz bu çalışmada intestinal iskemi reperfüzyon hasarı ile oluşan lokal ve uzak organ hasarı sonrası kompleman inhibitörünün rolü ve tedavideki etkisini araştırmayı amaçladık. Bu çalışmadaki amacımız lokal ve uzak organ İR hasarında kompleman sistemi sCR1 ile baskılayarak, kompleman inhibisyonunun organ hasarını önlemedeki etkisini değerlendirmek, sonuçta lokal ve uzak organ hasarını en aza indirip fatal organ hasarından koruduğunu

göstermektedir. Ayrıca kompleman inhibitörünün iskemi reperfüzyon sonrası koruyucu etkisi, bunun inflamatur sitokinlerle ve immünolojik yanıtla olan ilişkisi hakkında daha net bilgiler elde etmeyi planladık. Elde edilen bu bulgular doğrultusunda organ transplantasyonları, mezenterik iskemi ve vasküler cerrahi sonrasında kompleman inhibitörünün klinik kullanımı hakkında daha net bilgiler elde edileceğini düşünmekteyiz.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. İskemi Reperfüzyonun etkileri

Bir dokuyu kan akımından yoksun bırakmanın fonksiyonel sonuçları yıllardır bilinmektedir. Son zamanlarda, iskemi sonrası kan akımının yeniden sağlanması anlamına gelen reperfüzyonun iskemik organları daha fazla hücrel nekroz riskine sokabileceği ve böylelikle fonksiyonun geri dönmesini kısıtlayabileceği gösterilmiştir. Parankimal hücrelere karşı ölümcül reperfüzyon hasarı görüşü evrensel olarak kabul edilmemesine karşın mikrovasküler yapıların, özellikle mikroskopik kan damarlarını döşeyen endotel hücrelerin İR'un zararlı sonuçlarına çok yatkın olduğu geniş çapta kabul görmüştür. İR hasarının patogeneğinde mikrovasküler disfonksiyon, erken ve hız belirleyici bir faktördür. İR hasarının neden olduğu vasküler değişiklikleri tanımlama ve bu patolojik sürecin altında yatan mekanizmaları belirlemeye yönelik pek çok çalışma yapılmıştır. Bu araştırmalar damar duvarındaki moleküler ve biyokimyasal değişiklikleri açığa çıkarmıştır (21,22). İskemi sonrası lokal dokuda oluşan inflamatuvar yanıtın şiddeti, uzak organlarda da aynı şiddette olabilir (23). İR'un uzak etkileri sıklıkla akciğer ve kardiyovasküler sistemde gözlenir. Sistemik inflamatuvar yanıt sendromu (SIRS) ve multipl organ disfonksiyon sendromunun (MODS) gelişmesine sebep olabilir. SIRS ve MODS, yoğun bakım ünitelerinde % 30-40 ölümcül seyretmektedir (23).

2.1.1 İskemi Reperfüzyona Karşı Lokal Mikrovasküler Yanıtlar

Kan damarlarının iç yüzeyini döşeyen endotel hücreleri vasküler homeostazın temeli olan vital ve dinamik bir yapı oluşturur. Bu hücreler iskemi ve reoksijenizasyonun zararlı etkilerine karşı duyarlıdır. Uzamış hipoksinin; membran potansiyelini değiştirdiği, iyonların dağılımını bozduğu, hücre içi volümü arttırdığı, membran akışkanlığını azalttığı ve endotel hücrelerinin hücre iskeleti organizasyonunu bozduğu bilinmektedir. Bu değişikliklere enerji depolarının tükenmesi, belirli biyoaktif ajanların üretiminde azalma ve endotelin, trombokan A2 gibi diğer ajanların üretiminde hızlanma eşlik etmektedir. Reperfüzyon, hipoksinin neden

olduğu endotel hücre yanıtının abartılı bir şekilde devam etmesine neden olmaktadır (24). Reperfüzyon hasarının başlangıç döneminde hızlıca ağır endotel hücre disfonksiyonu meydana gelmektedir. Bu durum belirgin morfolojik hücre hasarı olmaksızın da gelişebilir. Bu morfolojik değişiklikler genel olarak hücre şişmesi, pinositik veziküllerin kaybı, endotel hücrelerin alttaki bazal membrandan ayrışması ve aktive olmuş lökositlerin endotel hücre yüzeyine yapışmasını içermektedir (25). Mikrovasküler sistemdeki tüm endotel hücreleri İR'un zararlı etkilerine aynı şekilde maruz kalmasına karşın, sonuçta meydana gelen endotel hücre disfonksiyonu mikrosirkülasyon içerisinde bölgeye özel bir şekilde ortaya çıkmaktadır (22). İR sonrası arteriyollerde endotel bağımlı NO aracılı düz kas gevşemesinde bozulma meydana gelir (27,28). İR sonrası kapillerlerde gelişen endotel disfonksiyonu kendini interstisyuma sıvı filtrasyonunda artış ve perfüze kapiller sayısında azalma şeklinde göstermektedir. Bazı dokularda mikrovasküler kan akımındaki bozukluk, kan akımına karşı şişmiş, kısmen ayrılmış endotel hücreleri ve aktive olmuş lökositlerce kapillerlerin tıkanmasından kaynaklanmaktadır (30). İR sonrası mikrovasküler sistemin tüm bölümlerinde buluna endotel hücreleri oksidan strese maruz kalmakta ve daha çok etkilenmektedir. İR'a karşı en geniş çaplı incelenen venül yanıtı vasküler permeabilite artışıdır. Venül permeabilitesinde İR'a bağlı artış iskemi sonrası venüllerde meydana gelen diğer inflamatuvar olaylara bağlanmıştır. Gerek endotel hücreleri tarafından oksidan üretimini gerekse lökositlerin vasküler endotele adezyonunu hedef alan ajanlar genellikle mikrovasküler permeabilitede İR'a bağlı artışı önlemede etkilidir (21). Mezenterik venüllerdeki çalışmalar venüllerdeki lökositlerin sıkışmasının İR'a bağlı endotel bariyer disfonksiyonunun hız kısıtlayıcı faktörü olduğunu göstermektedir. İskemi sonrası venüllerde albümin kaçağının büyüklüğü ile yapışık ve göç eden lökosit sayısı arasında büyük bir ilişki olduğu ve etkili bir biçimde lökosit yapışmasını ve göçünü azaltan, adezyon molekülünü hedef alan antikorların İR'a bağlı albümin kaçağı üzerine azaltıcı bir etki gösterdiği de bildirilmiştir (33).

2.1.2 SMA İle Oluşan İskemi Reperfüzyonun Etkileri

Barsakların kan akımının sepsis, septik şok, hemorojik şok veya mezenterik damarların oklüzyonu ile kesilmesi veya azaltılması eğer kollateral sirkülasyon tarafından kompanse edilmez ise barsağı irreversibl hasara uğratabilir (34). Hatta intestinal sirkülasyon tam olarak sağlansa da villusların uçları şiddetli hipoksik kalabilir (34,35). Sonuçta barsağın iskemik hasarı mukozanın villöz katmanında başlar ve mukozal katmanın hasarı proteolitik enzimlerin, endotoksinlerin intestinal lümeninden dolaşıma geçmesine müsade eder (34).

Akut Mezenterik İskemi (AMİ) patofizyolojisi son yıllarda daha iyi anlaşılmasına rağmen mortalitesi halen %60 seviyesindedir (36). AMİ, mezener arter oklüzyonu (emboli veya trombüs), mezenter ven oküzyonu ve Non Oklüzif Mezenterik İskemi (NOMİ) olarak üç şekilde sınıflandırılır (37). Akut süperior mezenterik arter tıkanıklığı intestinal iskeminin en sık görülen sebebidir. Süperior Mezenterik Arter (SMA) embolisi AMİ vakalarının %50'sini oluştururken, vakaların %25'inde daha önce varolan aterosklerotik lezyona sekonder tromboz mezenter iskeminin sebebidir. NOMİ intestinal iskemi vakalarının %25'ini oluşturur (37). SMA'nın çapı geniştir ve aortadan dar bir açılı ile çıkar. Bu anatomik özellik nedeniyle en çok emboli SMA' da görülür (38). Embolilerin %5'i SMA girişinde yerleşirken, büyük bir çoğunluğu orta kolik arterin ayrıldığı bölgeye yerleşir (37,38).

Etyolojiye bağlı olarak lezyonun büyüklüğü ve dağılımı değişse de akut mezenterik arter tıkanıklığında en önemli patofizyolojik sonuç barsak iskemisidir ve iskemiyeye en hassas bölge epiteldir. İskemide barsağın solgun görülmesi intramural damarlarda vazospazma bağlıdır. Otuz dakika içinde histolojik değişiklikler görülür. İskemiyeye cevap olarak değişik inflamatuvar hücre infiltrasyonu görülür. Kapiller bütünlüğün bozulması, submukozal ödeme ve proteinden zengin sıvının barsak lümenine geçmesine neden olur. Epitelyal nekroz mukozal ülserasyonla sonlanır. İskemi daha da uzarsa kas ve seroza tabakalarında nekroze olur. İlerlemiş iskemide barsak siyanotik ve siyah görünümündedir (38).

Semptomların başlangıcından 12 saat içinde iskemik barsağın revaskülarizasyonu sağlanırsa birkaç hafta içerisinde revaskülarize barsağın iyileşmesi sağlanır. Kan akımının tekrar sağlanması iskemik dokunun kurtulması için mutlak gerekli olup, reperfüzyon tükenen enerji deposunun dolmasını ve toksik metabolitlerin temizlenmesini sağlar. Fakat iskemik dokunun reperfüzyonu bir dizi kimyasal olay başlatarak sistemik hasara sebep olur (39).

Parks ve Granger'in yaptığı çalışmada iskemik dönemde intestinal mukozada çok az hasar meydana gelmesine rağmen en çok hasar reperfüzyon esnasında meydana gelir. Üç saatlik iskemi ve bir saatlik reperfüzyon sonrası oluşan hasar, dört saatlik iskemi döneminde oluşan hasardan daha fazladır. Bu çalışma göstermektedir ki reperfüzyon sonucu oluşan hasar iskemi sonucu oluşan hasardan daha fazladır. Granger yaptığı çalışmada geçici intestinal iskemi ve reperfüzyonun intestinal ödem ve bunun sonucu olarak barsak lümenine sıvı kaçışına neden olduğu gösterilmiştir. Burada oluşan ödem intestinal mikrovasküler permabilite artışına

bağlıdır. Eğer intestinal iskemi bir saatten uzun sürerse mukozada ağır bir hasar ve hemorajik ülserasyon görülür (40).

2.2 İskemi Reperfüzyon Sonrası Uzak Organ Hasarı

Doku reperfüzyonunun yıkıcı bir sonucu da, başlangıçtaki iskemik hasara katılmayan organlarda da hasarın gelişmesidir. MODS; barsak (41,42), karaciğer (43-44) ve iskelet kası (47) reperfüzyonu, yanısıra aortik oklüzyon/reperfüzyon (48,49) ve hipovolemik şoka bağlı olarak gelişmektedir. Ayrıca MODS, yoğun bakım hastalarında başlıca ölüm sebebini oluşturmaktadır (50). Çeşitli organlarda İR sonrası splanknik vazokonstriksiyon ve göreceli mezenterik iskemi görülmektedir. Bu yoğun splanknik vazokonstriksiyon MODS'un patogenezine katkıda bulunmaktadır. Kısa sürelerde enterik iskemi bile intestinal mukozal bariyer bütünlüğünün kaybı ve intestinal lümenin mezenterik lenf nodlarına ve portal kana enterik flora veya lipopolisakkarid'in (LPS) hareketine veya translokasyonuna neden olmaktadır (51,52). Enterik makrofajların bakteriyel ürünlerce uyarılması (53) veya reperfüzyon sırasında dolaşıma salınan diğer mediyatörler tarafından hemen her organda makrofaj aktivasyonuna ve vasküler endoteli aktive edebilen inflamatuvar sitokinlerin (TNF α gibi) üretimine neden olabilmektedir (56,57). Üstelik, reperfüzyonun bir sonucu olarak salınan inflamatuvar mediyatörler dolaşan lökositleri, vasküler endotel hücrelerini aktive edebilmekte ve adezyon moleküllerinin üretimini arttırmaktadır (58,59). Bunun sonucunda, vasküler yatakta nötrofil-endotel hücre etkileşimleri gelişmektedir. MODS ile ilişkili akciğer hasarı, akut akciğer hasarı olarak adlandırılan hafif disfonksiyondan, ağır solunum yetmezliği veya akut solunumsal distres sendromuna (ARDS) kadar değişen bir dizi akciğer hasarını temsil etmektedir (60). ARDS ve MODS ile ilişkili akciğer hasarının ayırteci özelliği, pulmoner mikrovasküler permeabilitede ve nötrofilden zengin alveoler sıvı birikiminde artıştır (41,61,62). Solunum yetmezliğinin ardından hepatik, renal ve gastrointestinal disfonksiyon, ayrıca santral sinir sistemi tutulumu ve myokard yetmezliği gelir (63). Yaygın organ sistem tutulumuna ilaveten MODS, koagülasyon kaskadı ve immun sistemde disfonksiyon ile karakterize olup tromboz, dissemine intravasküler koagülasyon ve immun yetmezlik ile sonuçlanır (63). İskemi reperfüzyona bağlı lokal organ disfonksiyonunu açıklayacak birkaç mekanizma önerilmiştir. Fakat, reaktif oksijen türevleri ve inflamatuvar lökositlerin rolü çok fazla ilgi odağı olmuştur (21,64). Şaşırtıcı olmayan bir biçimde, oksidanlar ve aktive olmuş lökositler İR'a bağlı uzak organ hasarının mediyatörleri olarak da gösterilmektedir.

Ksantin oksidaz'a, İR'a bağlı uzak organ hasarına katkıda bulunan bir faktör olarak çok ilgi gösterilmiştir. Endoteliyal yerleşimli bu enzim O₂ ve H₂O₂ üretiminde rol oynar. Plazma ksantin oksidaz aktivitesi, aortik oklüzyon-reperfüzyon (67), hepatik (68) veya intestinal (42) İR'u takiben dramatik bir biçimde artar. Bu artış akciğer, karaciğer ve myokard gibi uzak organ hasarları ile ilişkilidir (42,67,68,69). Ksantin oksidaz inhibisyonunun akciğer ve karaciğer gibi uzak organ disfonksiyonunu azaltması, ksantin oksidaz veya ürünlerinin reperfüzyona bağlı uzak organ hasarına katkıda bulunabildiğini göstermektedir (42,68,69). Ksantin oksidaz'ın kemotaktik faktörlerin üretiminde de rol oynadığını gösteren çalışmalar bulunmaktadır (42). Bu kemotaktik faktörler dokularda inflamatuvar lökosit birikimine yol açarak doku hasarına neden olmaktadır.

Aktive olmuş nötrofiller, endoteliyal bazal membran bileşenlerini ve endoteliyal bariyer fonksiyonunu sürdüren bileşke proteinlerini parçalayabilen güçlü proteaz'lar da üretir (61). İskemik dokularla karşılaşmış lökositler, reperfüzyon sonrası aktive olmuş bir halde tekrar sistemik dolaşıma girebilir. Bu aktive olmuş nötrofiller, İR'a bağlı uzak organ hasarının mediyatörleri olarak gösterilmiştir (41,62,69). İskemi sonrası dokulardan inflamatuvar mediyatörlerin üretimi ve salınımı hem lokal hem de uzak bölgelerde endotel hücre adezyon moleküllerinin (ECAM) üretimine yol açmakta, böylelikle nötrofil-endotel hücre adezyonunu ve nötrofil aracılı vasküler ve doku hasarını kolaylaştırmaktadır.

Dokular iskemi sonrasında dolaşan nötrofilleri aktive edebilen ve/veya kendine çekebilien inflamatuvar mediyatörler üretir (48,59,69). İR'un, inflamatuvar mediyatörlerin sistemik salınımına sebep olup böylece nötrofil aktivasyonuna destek olduğu, yaygın lökosit ve endotel adezyon molekül üretimine yol açtığı ve lökositendotel hücre etkileşimi için fırsatları arttırdığı olasılığını destekleyen çok sayıda kanıt vardır. Hemorajik şok sonrası alınan mezenterik lenf sıvısı, endotel hücrelerine sitotoksik olan ve nötrofil aracılı endotel hasarını şiddetlendiren nötrofil O₂ üretimini arttırmaktadır (59). Oysa, aorta çapraz klemp koyduktan sonra alınan plazma hem nötrofil hem de endotel adezyon molekül üretimine yol açmaktadır (48). Ayrıca, Barry ve arkadaşları, aorta çapraz klemp koyduktan sonra hem TNF α hem de tromboksan B₂'nin sistemik dolaşıma salındığını ve bu mediyatörlerin plazma konsantrasyonlarındaki artışın pulmoner vasküler disfonksiyon ile ilişkili olduğunu göstermiştir (69). Böylece, bir organın İR'u inflamatuvar mediyatörlerin sistemik etkisini artırıp hem lökosit aktivasyonuna hem de uzak organlarda nötrofil ve ECAM üretimine ve vasküler disfonksiyona yol açmaktadır. Hayvanlara ve gönüllü insanlara TNF α 'nın verilmesi, sepsis ve MODS'un

klirik belirtilerini meydana getirmektedir. Dolayısıyla, bu sitokin doğrudan sistemik inflamasyonu ve MODS'u başlatabilen inflamatuvar bir mediyatör olarak kabul edilmektedir (70). Kanıtlar, İR'un başlattığı sistemik inflamatuvar yanıtta TNF α 'nın bir rolü olduğunu da desteklemektedir. İR, sistemik TNF α salınımına yol açarak akciğerde nötrofil sekestrasyonuna ve hasara sebep olur (71,72). Ayrıca, TNF α antiserumu hepatik İR'a bağı pulmoner kapiller kaçağı azaltır (71). Colletti, hepatik kökenli TNF α 'nın akciğerde epiteliyal nötrofil aktive edici protein üretimine yol açarak akciğer hasarını kolaylaştırdığını ileri sürmüştür. Bunun nedeni, ENA antiserumu'nun karaciğer iskemisi sonrası akciğer hasarı ve nötrofil retansiyonunu engelleme açısından TNF α antiserumu kadar etkili olmasıdır (72). Bu yüzden, iskemi sonrasında bir organdan salınan TNF α uzak bölgelerde inflamatuvar mediyatörlerin üretimine sebep olmaktadır. Bu durum, uzak organlarda nötrofil sıkışmasında artışa ve nötrofil aracılı hasara zemin hazırlayabilmektedir. Çeşitli organların reperfüzyonu, kompleman kaskadını aktive ederek mikrovasküler sistemde yaygın biçimde kompleman fragmanlarının birikimine yol açar (73,74). Kompleman aktivasyon ürünleri yalnız lökositler için kemotaktik olmayıp, aynı zamanda nötrofil aktivasyonu, oksidan üretimi ve adezyon molekül üretimine de sebep olur (75). Ayrıca, kompleman aktivasyonunu sCR1 kullanarak engellemenin (73), C5a'nın immünötralizasyonunun (76) veya genetik olarak C5'den yoksun farelerin (77), çeşitli deneysel İR'a bağı uzak organ hasarı modellerinde inflamasyona bağı vasküler hasarı önlediği gösterilmiştir. Bu çalışmalar, İR aracılı lökosit sıkışmasında ve vasküler disfonksiyonda kompleman aktivasyon ürünlerinin bir rolü olduğunu desteklemektedir.

İR hasarı karakteristik olarak;

- PMNL 'nin aktivasyonuna (78)
- Serbest oksijen radikallerinin ortaya çıkmasına (79)
- Sitokinlerinin salınımında artışa (80)
- Eikasonoidlerin üretiminde artışa (81)
- Kompleman sistemin aktivasyonuna neden olur (82).

2.3 Lökositlerin Rolü

Polimorf nüveli lökositlerin başlangıçtaki kemoatraksiyonları endotel hücreleri ve ksantin oksidaz aracılığı ile olur. Aktivasyon ve migrasyonları ise endotel hücrelerde ve lökositlerde bulunan adhezyon molekülleri aracılığı ile olur. Lökosit adhezyon molekülleri (LAM) lökositlerde ve diğer başka hücrelerde de bulunan ve gelişme, haberleşme, inflamasyon

ve apoptosis gibi pek çok biyolojik olaylarda rol alan yapılardır. Selektin grubu adhezyon molekülleri, doku hasarı olan bölgede aktive olmuş endotele, PMNL'lerin başlangıçtaki adhezyonunda rol alırlar. L, P ve E selektin olmak üzere bilinen üç üyesi vardır. İR lökosit aktivasyonu, kemotaksis ve lökosit endotel hücre adhezyonuna yol açar. Polimorf nüveli lökositler de, endotel hücreleri gibi SOR üretme kapasitesine sahiptir. İR hasarında PMNL'in rolü ile ilgili bazı mekanizmalar ileri sürülmüştür. Bunlar;

1. Mikrovasküler oklüzyon
2. Serbest oksijen radikallerinin salınması
3. Sitotoksik enzim salınması
4. Vasküler permeabilite artışı
5. Sitokin salınımında artıştır.

İskemi reperfüzyon endotelde P-selektin ekskresyonunu artırır. Bu molekül, PMNL'lerde bulunan P-selektin glikoprotein 1 (PSGL-1) adlı reseptörü ile etkileşerek düşük afiniteli lökosit endotel bağlantısını oluşturur. İkinci aşamada lökosit Beta-2 integrinler ile endotelial intersellüler adhezyon molekülü 1 (ICAM-1) arasında etkileşim ile lökosit adhezyon ve agregasyonu gelişir. Üçüncü aşamada platelet endotelial hücre adhezyon molekül 1 ile endotel hücre bağlantıları arasındaki etkileşim ile lökosit transmigrasyonu gelişir. Aktive lökositler ekstravasküler kompartmana ulaşınca hasar bölgesine doğru göç etmeye başlarlar (kemotaksis). Burada aktive lökosit cevabı şu mekanizmalarca gerçekleştirilir;

1. Fosfolipaz A2 aktivasyonu sonucu araşidonik asit metabolitleri (prostoglandin ve lökotrienler) üretilir
2. Degranülasyon sonucu lizozomal enzimler salınır
3. Serbest oksijen radikallerinin üretimi gerçekleşir. Bu ürünler endotel hasarı ve doku zedelenmesinin güçlü mediyatörleridir ve başlangıçtaki inflamatuvar uyarının etkisini güçlendirir. Bazı durumlarda lizozomal enzimler hücre dışına salınabilir. Hasar yapıcı etkeni ortadan kaldırmaya veya dilüe etmeye yönelik bu inflamatuvar cevap sonucu mikrovasküler permeabilite artışı, ödem, tromboz ve parankim hücre ölümü de gerçekleşir. Görevini tamamlayan lökositler apoptotik hücre ölümüne uğrarlar ve lenfatik dolaşım ile ortamdan uzaklaştırılırlar.

2.4 Serbest Oksijen Radikallerinin Rolü

İskemi reperfüzyon hasarı serbest oksijen radikallerinin oluşumu ile başlar. İlk basamak hipoksi nedeniyle ATP yapımının durması ve kullanımının devam etmesi, yıkım sırasında açığa çıkan hipoksantin ürik aside oksijen olmadığı için indirgenememesi ve hücrede ksantin birikimidir. İkinci basamak iskemi esnasında büyük orandaki ksantin dehidrogenaz enzimin ksantin oksidaza çevrilmesidir. Ksantin oksidaz enzimi oksijene direkt olarak elektron transferi yaparak süperoksitleri meydana getirir. Fazla miktardaki bu serbest oksijen radikalleri bütün hücrel makromoleküllerle reaksiyona girebilirler. Hücrel hasar oluşumunda özellikle lipid peroksidasyonu önemli rol oynar;

Lipid Peroksidasyonu: Serbest oksijen radikalleri, plazma ve organel membranlarında lipid peroksidasyonuna neden olurlar. Hidroksil radikali membran lipidleri ile çift bağ yapar ve böylece lipid-radikal etkileşimi ile zincirleme reaksiyon sonucu pek çok lipid peroksidasyon ürünü (malondialdehit, dien konjugatları gibi) oluşur. Eritrosit membranlarının, lipozomal membranların (özellikle hücre ve mitokondri) okside olması ile bu yapıların fiziksel ve kimyasal özellikleri değişir. Membranın iyon geçirgenliği bozulur. Eritrositlerde hemoliz olur. Böylece yaygın membran, organel ve hücre hasarı ortaya çıkar.

2.5 Kompleman Sistemi

Kompleman sistemi proteinleri, serum total proteininin %10'nu oluşturur, ve plazmada inaktif olarak bulunan enzimlerin kademeli aktivasyonu ile inflamatuvar peptidlerin, opsoninlerin ve hücre zarı saldırı kompleksinin oluştuğu bir yoldur. Bu yolda oluşan proteinler sistemik anafilatoksik, inflamasyon bölgelerinde ve yaygın vazodilatasyon, vasküler permeabilityyi artıran (C3a, C4a, C5a) ve fagositlerin endotele yapışmasını uyaran etkiler gösterirler. Kompleman sistemi klasik ve alternatif yol (properdin yolu) ve bu iki yolun birleşerek terminal yol ve sonucunda oluşan hücre zarı saldırı kompleksini kapsamaktadır. Mannoza bağlayıcı lektinin (MBL) rol aldığı lektin yolu da klasik yolla birleşmektedir. Hepatositler, monositler, makrofajlar, böbreğin tübül ve glomerüler hücreleri kompleman komponentlerinin sentez yerlerinden bazılarıdır.

Kompleman sistemi yaklaşık olarak 35 proteine sahip olup bazı enzimler (C1r, C1s, C2, Faktör B, Faktör D), kofaktörler, inhibitör veya inaktivatörler, membran ilişkili protein ve reseptörler (C1q, C3a, C4a, C5a, CR1, CR2, CR3) içerir. Bunlara ek olarak; CD55-D59 gibi

membran bileşenleri ve C8 ve C9 gibi membran inhibitörleri de kompleman sisteminin önemli düzenleyici proteinleridir. (83,84)

Aktivasyon sırasında kompleman komponentlerinin çoğu enzimatik olarak, biri daha büyük olmak üzere 2 parçaya ayrılır. Küçük parça anafilatoksik, kemotaksik ve vasküler geçirgenliği artırıcı özellikler gösterirken, büyük fragman bakteri zarları veya immunkompleks gibi farklı yüzeylere bağlanma ve bir sonraki komponenti aktive eden enzimatik bölgeye sahiptirler.

Kompleman sistemi üç yol ile aktive olur;

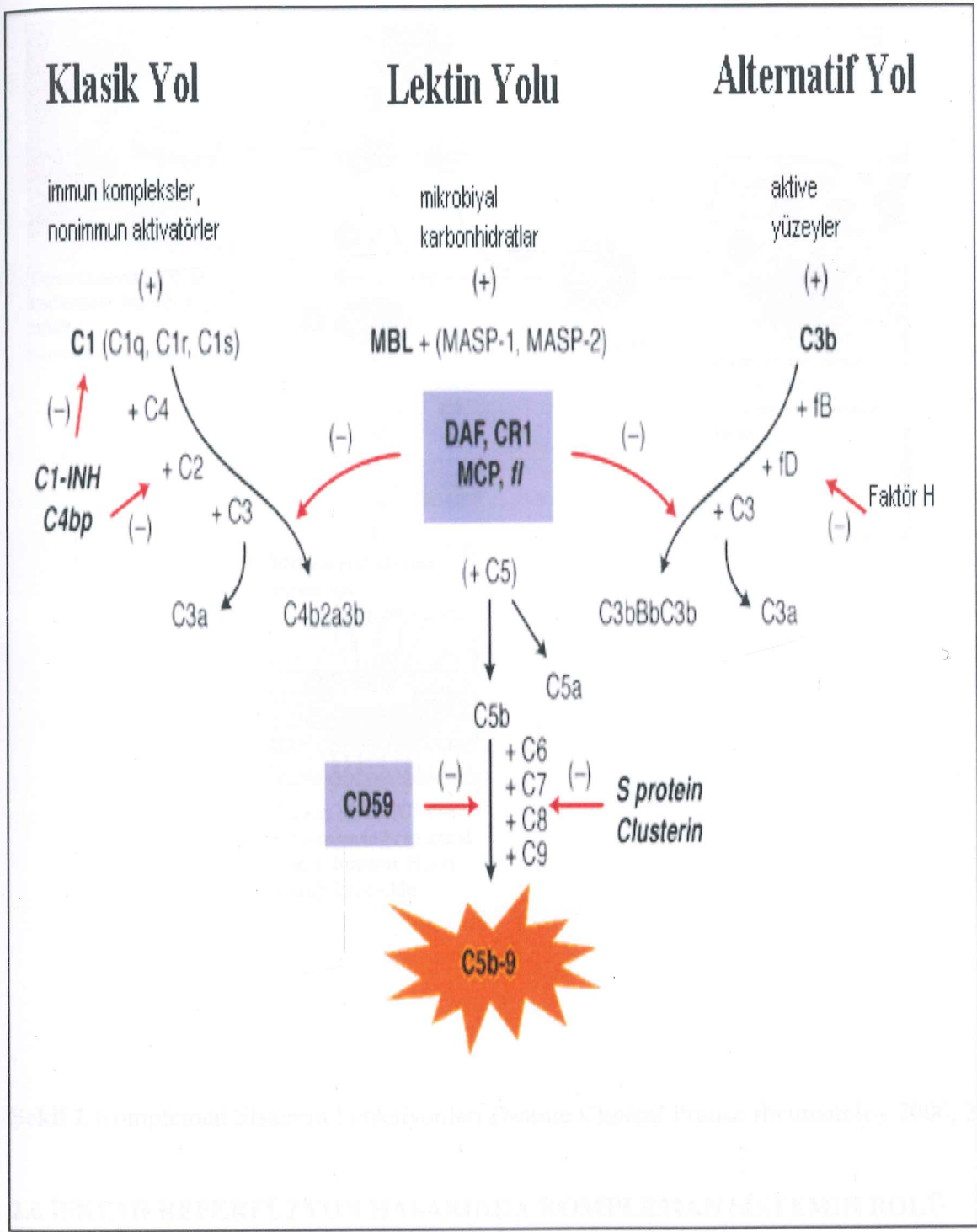
- 1- Antikor bağımlı klasik yol
- 2- Antikor bağımsız alternatif yol
- 3- MBL-MASP yolu

Klasik Yol: Antijen-antikor immun kompleksler, CRP, fibronektin ve fibrinojen klasik yolun aktivatörleridir. E. coli ve Salmonella gibi düşük virulanslı bazı bakteriler, gram negatif bakteriler, parainfluenza virüs gibi virüsler C1q ile direkt olarak etkileşime girerek klasik yolu antikor yokluğunda aktive edebilir. Klasik yolun immunolojik olmayan aktivatörleri de bulunmaktadır. Ürat kristalleri, denatüre DNA, RNA tümör virusleri, bakteri endotoksini, bazı polianyonlar, klasik yolu dolaysız olarak aktive edebilirler. IgG ve alt grupları, IgM grubu immunoglobulinler de klasik yolu aktive edebilir. Bir tek IgM veya iki IgG'nin bakteri veya virüsle enfekte olmuş host hücresi yüzeyine bağlanması, aktivasyon için yeterlidir. Çözünür antijenler ise büyük multimoleküler antijen-antikor kompleksleri halinde kompleman sistemini aktifleştirirler. Sistem aktivasyonu C1 proteinin bu maddelerden birine direkt bağlanması ile veya plazmin gibi bazı fibrinolitik enzimlerin C1 üzerine direkt enzimatik atakları ile başlar. Antikoron C1'e bağlanması ile serin proteaz aktive olur. C4C2' nin C4bC2a 'ya dönüşümünü sağlar. C4bC2a ise C3'ün C3a ve C3b dönüşümünü sağlar. C3b fagositler için opsonin görevi yapar. Ayrıca C3b, C5 'in bağlanması için yer oluşturur. C5 membran atak kompleksin oluşumunu başlatır. MAK hücre zarında porlar meydana getirerek hücre lizisine neden olur (Şekil 1,2).

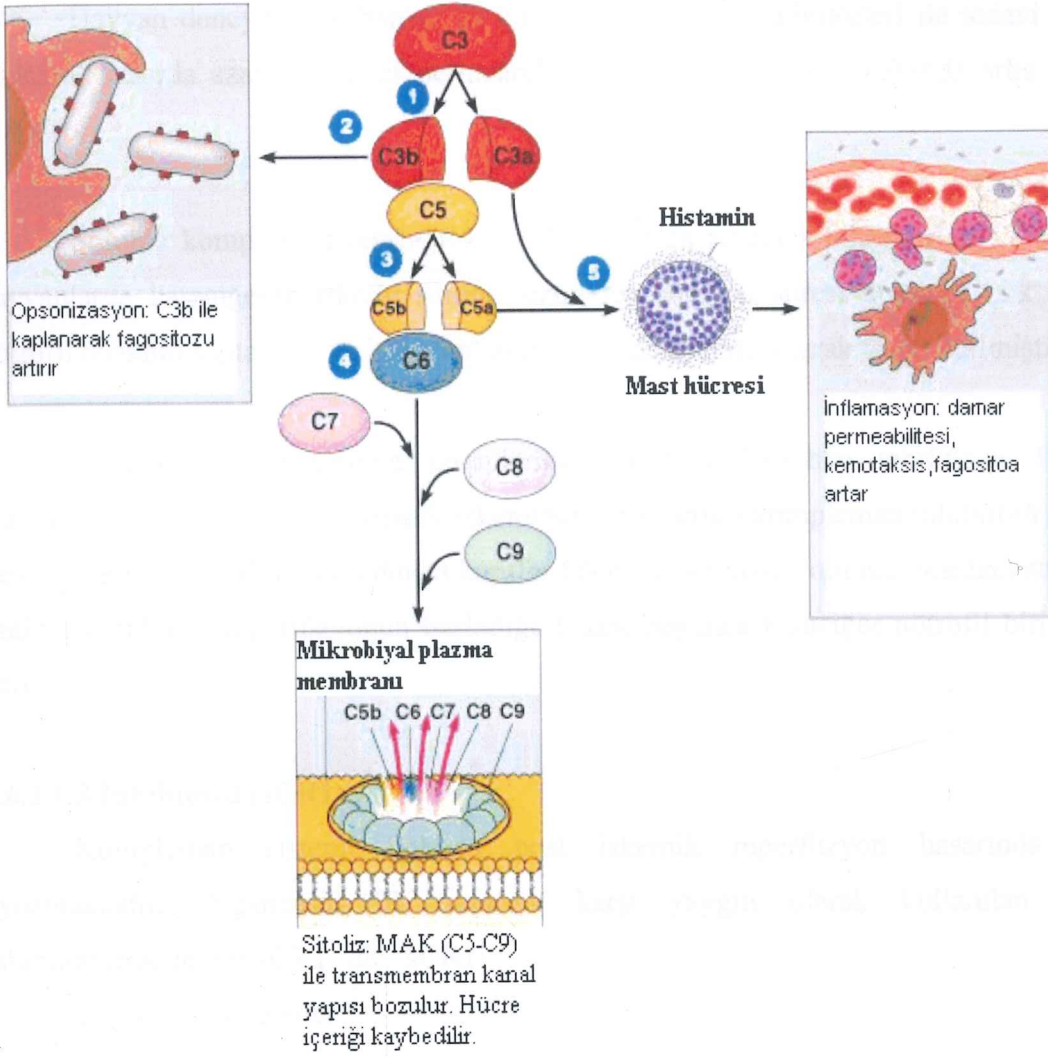
Alternatif yol (Properdin Yolu) : Alternatif yol bakteri hücumunda ön safta yer alır ve henüz konağın antikor üretimi için yeterli zaman bulamadığı dönemde devreye girer. E.coli, tripanozoma, diğer parazitler, virüsle enfekte olmuş hücreler, maya hücre duvarı, kobra venom faktörü, nefritik faktör, dekstran sülfat, polivinil sülfat, nöraminidaz ile muamele edilmiş

eritrositler, insanda diğerk memelilerin eritrositleri, antijen-antikör kompleksleri, IgA ve klasik yolu aktive eden immunglobulinler, lipopolisakkarid ve diğerk bakteri ürünleri kompleman sistemini alternatif yol aracılığı ile aktive ederler. Klasik yolun etkinleştirilmesi sonucunda aktifleşen C3 de, alternatif yolu aktifleştirebilmektedir. C3 klasik ve alternatif yolun birleştiğı noktada yer alır ve kompleman sisteminin en önemli üyelerinden biridir. Dolaşımında C3 proteolitik enzimlerin etkisi ile C3a ve C3b'ye ayrılmakta, ancak faktör I ve H ile sürekli olarak inaktive edilerek düşük düzeyde tutulmaktadır. Patojen mikroorganizmaların polisakkarid ve lipopolisakkaridleri varlığında bu denge bozulduğunda C3b, faktör B ve D ile etkileşime girer. Dolaşımında devamlı olarak hidrolize uğrayarak farklı bir konformasyona çevrilen C3, faktör B'ye, bu ikiliye de faktör D bağlanır ve sonuçta faktör B kırılır. Geride kalan kompleks, alternatif yol C3 konvertazdır. Properdin, bu konvertaza bağlanır ve onu stabilize eder ve kompleman kaskadının devamını sağlar. Faktör D, plazmada aktif halde bulunan bir proteazdır.

MBL_MASP (Lektin Yolu): Mikroorganizmaların yüzeylerindeki mannoz ve N-asetilglikozamin gibi karbonhidratları tanıyan kollektin ailesinin bir üyesi olan mannoz bağlayıcı lektin (MBL) de klasik kompleman yolunu aktive edebilmektedir. Doğal bağışıklıkta, henüz kazanılmış immun cevap oluşmadan önceki devrede, önemli rol üstlenir.



Şekil 1: Kompleman Sistem Aktivasyonu (Nature Clinical Praticce nephrology 2007, 3: 277)



Şekil 2:Kompleman Sistemin Fonksiyonları (Nature Clinical Practice rheumatology 2006, 2: 330)

2.6 İSKEMİ REPERFÜZYON HASARINDA KOMPLEMAN SİSTEMİN ROLÜ

Yapılan birçok çalışmada İR hasarında kompleman sistemin her 3 yolunun da aktive olduğu gösterilmiştir (85,86). Myokarda reperfüzyon sırasında kompleman aktivasyonunu gösteren bir çalışmada komplemanın klasik yolu C3 inhibitörü kullanılarak inhibe edilmiş ve iskemik myokardın reperfüzyon hasarından efektif olarak korunduğu gözlenmiştir (87).

Hayvan deneylerinde barsak İR hasarı kompleman inhibitörleri ile tedavi edildiğinde; mukozal hasarda azalma, damar permeabilitesinde azalma ve sağ kalımda artış saptanmıştır (88,89).

Soluble kompleman reseptör 1 (sCR1) ve C5a reseptör inhibitörleri ile tedavi edilen hayvanlarda karaciğerde iskemi sonrası uzun reperfüzyon süresi boyunca çok az miktarda nötrofil birikimi saptanmış ve hasar anlamlı derecede azalmış olarak tesbit edilmiştir (17,90).

Karaciğer İR hasarında komplemanların rolü Jaeschke tarafından 1993 yılında araştırılmıştır. Bu çalışmada hepatik iskemiden önce serum kompleman inhibitörü olarak kobra venom faktör kullanılmış ve sonuçta kupffer hücrelerinin neden olduğu oksidant strese anlamlı azalma görülmüş, reperfüzyonun başladığı 1 saat boyunca karaciğer nötrofil birikimine karşı korunmuştur.

2.6.1 C3 İnhibitörü (sCR1) :

Kompleman sistemi dokuda post iskemik reperfüzyon hasarında temel rol oynamaktadır. Organlarda İR hasarına karşı yaygın olarak kullanılan kompleman inhibitörlerinden biri sCR1 'dir. sCR1;

- ✓ Fagositozu düzenler
- ✓ C3 aktivasyonunun potent düzenleyicisidir
- ✓ C3b ve C4b 'e bağlanarak C3-C5 konvertazların yıkımını hızlandırır (11)
- ✓ Tüm yollarda ortak kompleman aktivatörü olan C3' ün aktivasyonunu inhibe eder
- ✓ Böylece hem C3a ve C5a' nın hemde MAK 'in üretimini engeller
- ✓ Safra salınımını artırır
- ✓ Organ fonksiyonlarını korur.

Fizyolojik şartlar altında, çözünür proteinler ve membran ilişkili düzenleyici proteinler kompleman kaskat sistemini kontrol eder. Bu proteinlerden biri membran glikoprotein kompleman reseptör tip 1 (CR1, CD35) dir. CR1 immünadherens için reseptör olmasının yanı sıra, membran bond regülatuar bir proteindir. CR1 birçok hematopoetik (eritrosit ve çoğu lökositlerde) hücrenin integral membran proteindir ve plazmada çözünür formda bulunur. Fagositlerde CR1, C3b ile kaplanan partiküllerin ilk bağlanmalarından sorumludur. Ayrıca CR1 C3b'nin faktör I tarafından degranasyonu ve inaktivasyonunda kofaktör olarak görev alır. Tüm yollarda ortak kompleman aktivatörü olan C3'ü inhibe ederek hem C3a ve C5a hem de

membran atak kompleksin (MAK) üretimini engeller. Direkt endotelial hasara neden olan C5a-9 atak kompleks oluşumunu baskılar.

CR1'in rekombinant çözünür formu üretilmiştir (sCR1). Bu form hücredeki CR1'in fonksiyonlarını aynen yapar. Weissman ve arkadaşları sCR1'in faktör H'den (plazmada C3b'nin inaktivasyonundan sorumlu fizyolojik kofaktör) 100 kat daha efektif olduğunu göstermişlerdir.

Hayvan deneylerinde, intestinal İR hasarında sCR1 ile tedavi sonucunda uzun reperfüzyon periyodunda PMNL birikiminde anlamlı derecede azalma saptanmış ve karaciğer, böbrek ve intestinal nekrozunun azaldığı görülmüştür (15). Ayrıca sCR1 oksidatif stresin indüklediği makrofaj hücrelerini bloke ederek koruyucu etki göstermiştir. Bu organlarda parankimal hücre hasarını azaltmış ve fonksiyonlarını ve mikrovasküler perfüzyonu iyileştirmiştir.

Deneysel çalışmalarda İR hasarında sCR1 uygulaması infarkt boyutunu azaltır, infarkt alanında PMNL birikimini azaltır, C5a üretimini baskılayarak lökosit adezyon reseptörlerinin salınımını ve lökosit kemotaksisini önler (12,13). Sonuç olarak direkt endotelial hasara neden olan C5b-9 kompleks oluşumu sCR1 tarafından baskılanır (14).

Karaciğer İR hasarında hayvanlar sCR1 ile tedavi edilmişler ve post iskemik karaciğerde postiskemik karaciğerde uzun reperfüzyon periyodunda lökosit PMNL birikiminde anlamlı derecede azalma saptamışlardır (17). Bu çalışmada ayrıca reperfüzyon hasarının geç dönemi boyunca karaciğer nekrozuda anlamlı düzeyde azalmıştır. sCR1 oksidatif stresin indüklediği kupffer hücrelerini bloke ederek koruyucu etki gösterir. Karaciğer fonksiyonlarını ve mikrovasküler perfüzyonu iyileştirir. KC enzim düzeylerinde ve Parankimal hücre hasarında anlamlı azalma saptanmıştır (18). KC fonksiyonları düzeldikçe KC'den salınan safra miktarıda artmıştır.

sCR1 ile tedavi edilen hayvanlarda sinozoidal kan akımının düzelmesi interstisyel ödemin azalmasına endotel hücrelerindeki şişmenin azalmasına bağlıdır. Bununla birlikte, hem platelet hemde lökosit agregasyonundaki inhibisyona bağlı fibrin birikiminin azalması sinozoidlerdeki mekanik blokajı ortadan kaldırır, asiner hücre perfüzyonunu ve parankim hücre hasarı önlenmiş olur. sCR1 karaciğer greftindeki lökosit adezyonunu etkili biçimde azaltır (18).

Barsak İR hasarında kompleman inhibitörü olarak sCR1 kullanıldığında mukozal hasarlanmada azalma, vasküler permeabilite de azalma ve sağkalımda artış görülmüştür. (15,16)

Allogreft cevabı üzerine sCR1 ile yapılan bir çalışmada ise plazma kompleman aktivasyonu %90 'ın üzerinde baskılanmış, doku C3 ve MAK birikimlerinde azalma görülmüştür. Ayrıca lökosit infiltrasyonunda azalma ve greft ömründe artış saptanmıştır (19,20).

Reperfüzyon hasarına karşı iskemik dokuyu korur. Ratlarda İR hasarı oluşturulan intestinal modellerinde sCR1 ile tedavi edildiğinde perfüze olan sinüzoid sayısında artış saptanmıştır. Ayrıca reperfüzyon öncesi sCR1 verilmesi karaciğer ve böbrek transplantasyonda soğuk iskeminin etkilerine ve doku hasarına karşı koruyucu rol oynamaktadır (91).

2.6.2 C1 İnhibitörü:

C1 inhibitörü de (C1 INH) bir serin proteaz inhibitörü olup birçok farklı proteazı inhibe eden kompleman inhibitörüdür;

- Kompleman sisteminde C1r, C1s ve MASP ' yi
- Kontakt sistemde Faktör 12 ve kallikreini
- Koagülasyon sisteminde Faktör 11 ve trombini
- Fibrinolitik sistemde tPA ve plazmini inhibe eder
- Kompleman klasik yolunu bloke eder ve kompleman aktivasyonunu azaltır.
- C1 inhibitörünün komplemanın alternatif yolunda hiçbir etkisi yoktur (93).

C1 inhibitörleri protektif sitokin olan IL10 ve IL6 düzeyini artırarak antiinflamatuvar etki gösterir (94). Koroner arter tıkanmasını takiben gelişen myokard iskemi reperfüzyon hasarında C1 INH'ün hasarı belirgin azalttığı gösterilmiştir (95,96). Organ transplantasyonları sırasında da IR hasarı sonucu kompleman aktivasyonu meydana gelir. Kompleman aktivasyonu ve ilgili patolojik olaylarda C1 INH ile önlenbilir. C1 INH organ naklinden önce (97,98), perfüzyon sırasında ve perfüzyon solüsyonlarına eklenerek kullanılabilir (99). C1 INH endotel hücrelere bağlanarak tüm fonksiyonel kapasitesini korur. Böylece transplante edilecek organa bağlı komplikasyonlar önemli ölçüde azaltılmış olur (100).

2.7 GLUTATYON

Glutatyon, 1888 yılında Rey Pailhade tarafından keşfedilmiş ve 1930 yılında da glutatyonun L-glutamil-sisteinil-glisin yapısında bir tripeptit olduğu ortaya konulmuştur (101,102,103). Glutatyon ana olarak karaciğerde glutamat, sistein ve glisinden sentezlenen bir tripeptittir. Biyosentez, sitoplazmada yer alan L-glutamilsistein sentetaz ve glutatyon sentetaz enzimlerinin katalizi ile gerçekleşmektedir. Hücre içi yapılar ve diğer hücrelerin glutatyon ihtiyacı sentezlenen glutatyonun plazma ve intersellüler membranlarda yer alan özgün taşıyıcı proteinlerle aktarılması ile karşılanmaktadır. Glutatyon hücre içi majör olmayan bir protein olan tiyoldür. Hücrede serbest ya da çeşitli moleküllere bağlı olarak bulunabilmektedir. Serbest glutatyon formu indirgenmiş (GSH) veya oksitlenmiş tiyol formlarında bulunur.

GSH hücre içi antioksidan sisteminin bir üyesi olup, hücre redoks dengesinin sağlanmasında önemli rol oynamaktadır. Peroksitleri, daha az zararlı olan yağ asitlerine, su ve GSH disülfidlerine dönüştürür. Antioksidan işlevinin yanı sıra sinyal iletilsinin modülasyonu, hücre proliferasyonu ve immünolojik cevapta da işlevleri tanımlanmıştır. (103,104).

GSH bunların dışında;

- 1) DNA' nın deoksiribonükleotid öncüllerinin sentezinde görev alır.
- 2) Esansiyel-SH grupları içeren enzimlerin koruyucusu ve aktivatörü olarak görev yapar.
- 3) GSH-peroksidaz gibi antioksidan enzimler için kofaktör olarak çalışır.
- 4) Hücre için toksik olan sisteini depo eder.
- 5) Hücre içi bakır taşınımı ve detoksifikasyonda görev yapar.

GSH hücre içerisinde özellikle hidrojen peroksit (H_2O_2) detoksifikasyonu sırasında oksitlenmektedir. Oksidasyona uğrayan tiyollerin indirgenmesi ya da olası ise denovo biyosentez ile geri kazanımı NADPH bağımlı glutatyon redüktaz, tiyol transferaz ve glutaredoksin redüktaz enzimleri tarafından sağlanır. GSSG ve protein tiyolleri ile karışık disülfidler bu enzim sistemleri tarafından GSH'a çevrilir (105,106).

GSH'nın çeşitli moleküllerle konjugasyonu, hücre GSH değerinin düşmesi nedenleri arasında yer almaktadır. GSH'nın küçük moleküllerle oluşturduğu bu konjugatlar hücreden atılır. Konjugasyon veya atılım nedeni ile olan GSH miktarındaki azalma, hepatositlerde biyosentez ile ya da eksojen GSH alınımı ile karşılanır. Hücre içi GSH'nın düşmesi erken dönemde hücrede adaptif yanıt oluşturarak GSH biyosentezini arttırmaktadır (107,108,109).

Yüksek GSH değeri hücre fonksiyon ve canlılığının bir göstergesi olarak kabul edilir (110). Bunun aksine GSH derişiminin düşmesi hücre içi savunma sisteminin zayıflamasının ve mitokondriyal hasarın belirteçlerinden olarak kabul edilir (111).

Hücrenin apoptozisi başlatması ya da devam ettirmesinde, hücre içi GSH seviyesinin önemli olduğu görülmüştür. Hücre içi GSH seviyesi düşük olduğunda, hücre içi ROM artmakta ve apoptotik yolda rolü olan kaspaz aktivasyonu uyarılmaktadır (105,112).

Mitokondriyal ve sitoplazmik glutatyonun tüketilmesi, apoptotik hücre ölümünün erken sinyalini oluşturur. GSH'daki azalma mitokondri transmembran potansiyelini değiştirmekte, bu da mitokondrinin hızlı bir şekilde fonksiyonunu kaybederek, sitokrom C'nin sitoplazmaya salınımına sebep olmaktadır. Böylece apoptozise giden yol tetiklenmektedir (105).

2.8 MALONDİALDEHİT

Serbest oksijen radikallerinin; savunma sisteminin koruyucu etkisini aşacak şekilde fazla oluşmaları sonucu, metabolizmada zararlı etkiler oluşturur. SOR'den en yüksek oranda etkilenen bileşik lipidlerdir. Membranlarda bulunan fosfolipidlerdeki doymamış bağlar ve kolesterol, serbest radikallerle kolayca reaksiyona girerek, peroksidasyon ürünlerini meydana getirir. Lipid peroksidasyonunun en önemli ürünü malondialdehittir (113,114).

Oluşan malondialdehit; hücre membranlarından iyon alışverişine etki ederek ve membrandaki bileşiklerin çapraz bağlanmasına yol açarak, iyon geçirgenliği ile enzim aktivitesinin değişimi gibi olumsuz sonuçlara neden olur. Malondialdehit bu özelliğinden dolayı, DNA'nın nitrojen bazları ile de reaksiyona girebilir. Bundan dolayı da malondialdehit mutajenik, kültür hücreleri için genotoksik ve karsinojeniktir (115,116).

2.9 SİTOKİNLER

Diğer hasar oluşturan mediatörler ile kıyaslandığında sitokinlerin dokularda oluşturduğu etki daha önemlidir. Sitokinler, karaciğer hücreleri tarafından, en çok kupffer ve SEC'lerden üretilir. Birçok molekül tanımlanmış olmakla birlikte, TNF α , IL 1 ve IL 6 önemli olan moleküllerdir. Colletti ve arkadaşlarının yaptığı bir çalışmada, uzamış iskemik dönemlerin sitokinlerin aşırı salınımına neden olduğu gösterilmiş ve TNF α 'nın hepatosit ve SEC apoptozisini başlattığı görülmüştür. Kupffer hücrelerinden TNF α salınımının engellenmesi ile soğuk ve sıcak iskemik modellerinde reperfüzyon hasarının azaldığı gösterilmiştir (84).

İskemi sonrası gelişen doku hasarı, proinflamatuvar sitokinlerin salınımı ile inflamatuvar yanıtın oluşmasına neden olmaktadır. Bu sitokinler arasında TNF α , konakçı yanıtının oluşmasına yol açan ilk ve en güçlü mediatördür (117). TNF α ; monositler, makrofajlar ve T hücreleri tarafından sentezlenmektedir. Travmaya yanıt olarak TNF α salınımı hızlı ve kısa sürelidir. Proinflamatuvar uyarıyı takiben TNF α düzeyi hemen yükselir ve başta IL 1 ve IL 6 olmak üzere diğer sitokinleri aktive eder, sonra çok çabuk kaybolur. Endotoksin uyarısı ile akut inflamatuvar yanıt oluşturulan deneysel çalışmalarda, TNF α salınımının monofazik bir eğri izlediği, 90 dakikada pik yapıp 4 saat içinde TNF α düzeylerinde düşme saptandığı bildirilmektedir (63). Yarı ömrü 15-18 dakika olmasına rağmen, TNF α 'nın dolaşımında kısa süreli olması bile önemli metabolik ve hemodinamik değişikliklerin gelişmesine ve döngünün sonraki basamaklarındaki sitokinlerin aktive olmasına neden olmaktadır.

TNF α 'nın diğer fonksiyonları arasında; koagülasyonun faktörlerinin aktivasyonu, platelet aktive edici faktör (PAF), prostaglandin E2 (PGE2), glukokortikoidler ve eikosanoidlerin salınımının arttırılması yer almaktadır (118).

İskemi ve reperfüzyon hasarında salınan diğer önemli bir mediatör IL 6'dır. IL 6'nın iskemi sonrası oluşan antiinflamatuvar döngü üzerine çeşitli mekanizmalar aracılığı ile mediatör etkisi vardır. Akut faz yanıtının modülasyonunu sağlar. İmmun yanıtın ve hematopoezin düzenlenmesinde görev alır. IL 6 ayrıca α -glukoprotein, fibronektin gibi antibakteriyel ürünleri de kapsayan akut faz proteinlerinin hepatik sentezini indüklemektedir. IL 6'nın majör indüktörleri TNF α ve IL-1 β 'dir. Bütün hücre tipleri tarafından sentezlenebilirler. IL 6, doku harabiyetinin boyutu ile plazma/serum düzeyleri arasında korelasyon gösteren duyarlı ve erken bir belirteç olarak görülmektedir (119). İskemiden sonraki 60 dakika içinde dolaşımdaki düzeyi ölçülebilir, 4-6 saatte en üst düzeye ulaşır ve dolaşımda kalma süresi 10 güne kadar uzayabilir. Ölçülebilirliğinin kolay olmasının nedeni daha uzun bir yarı ömrü olmasıdır. IL 6'nın ulaştığı kan düzeyi doku hasarı ile doğru orantılıdır. İskemi sırasında IL 6'nın kan düzeyi yükselir.

Yapılan çalışmalarda IL 6 aktivasyonu ve salınımına TNF α bağımlı mekanizmaların aracılık ettiği bildirilmekte olup çoklu organ yetmezliğinden ölen hastalarda dolaşımda TNF α ve IL 6 düzeylerinin dramatik olarak yükseldiği bildirilmiştir. Özellikle de IL 6 artışının %100 mortalite ile ilişkili olduğu gösterilmiştir (120,121).

3. GEREÇ VE YÖNTEM

3.1. Deney Hayvanları:

Bu çalışma Başkent Üniversitesi Deneysel Araştırma Merkezinde yapılmıştır. Çalışmada her biri 200-250 gram arasında değişen 24 adet erkek Winstar albino ratlar kullanılmıştır. Ratlar çalışmaya başlamadan bir hafta önce üretim merkezinden araştırma merkezine getirilerek deney zamanına kadar, sıcaklığı +22 °C ye ayarlanmış bir odada 12 saat gündüz, 12 saat gece ortamında tutulmuşlar, su ve standart yem ile beslenmişlerdir. Ratlar deneyden iki saat önce aç bırakılıp, su kısıtlaması yapılmamıştır. Bu çalışma öncesinde çalışma projesi, üniversitemiz “Hayvan Deneyi Etik Kurulu” tarafınca onaylanmış ve çalışmada tüm cerrahi girişimler “National Institutes of Health, Guide for the Care and Use of Laboratory Animals” kurallarına uygun olarak gerçekleştirilmiştir.

Çalışma Grupları:

Grup 1: İR (6 Rat)

Grup 2: sCR1 (6 Rat)

Grup 3: İR + sCR1 (6 Rat)

Grup 4: Kontrol (6 Rat)

3.2. Anestezi:

Bütün hayvanların anestezisi, 50 mg/kg Ketamin Hidroklorür (Ketalar, Eczacıbaşı Warner-Lambert ilaç sanayi, Levent, İstanbul) ve 7 mg/kg xylazine Hidroklorit’ in (Rompun, Bayer Şişli, İstanbul) aseptik şartlarda intraperitoneal verilmesi ile sağlandı.

Grup 1 (İskemi Reperfüzyon grubu, 6 Rat): SMA 60 dakika klemplenmesi ile iskemi ve takiben reperfüzyon oluşturuldu. Ardından 4 gün sonra laparotomi ile biyokimyasal ve patolojik inceleme için KC, böbrek, İnce barsaktan doku ve VCI’ dan kan örneği alındı.

Grup 2 (sCR1 grubu, 6 Rat): Laparotomiyi takiben intravenöz olarak sCR1 verildi. Dört gün sonra ratlardan doku ve kan örnekleri alındı.

Grup 3 (İR ve sCR1 grubu, 6 Rat): SMA 60 dakika klemplenmesi ile iskemi sonrası 60. dakikada intravenöz sCR1 verildikten 1 dakika sonra reperfüzyon uygulandı. Dört gün sonra kan ve doku örnekleri alındı.

3. GEREÇ VE YÖNTEM

3.1. Deney Hayvanları:

Bu çalışma Başkent Üniversitesi Deneysel Araştırma Merkezinde yapılmıştır. Çalışmada her biri 200-250 gram arasında değişen 24 adet erkek Wistar albino ratlar kullanılmıştır. Ratlar çalışmaya başlamadan bir hafta önce üretim merkezinden araştırma merkezine getirilerek deney zamanına kadar, sıcaklığı +22 °C ye ayarlanmış bir odada 12 saat gündüz, 12 saat gece ortamında tutulmuşlar, su ve standart yem ile beslenmişlerdir. Ratlar deneyden iki saat önce aç bırakılıp, su kısıtlaması yapılmamıştır. Bu çalışma öncesinde çalışma projesi, üniversitemiz “Hayvan Deneyi Etik Kurulu” tarafınca onaylanmış ve çalışmada tüm cerrahi girişimler “National Institutes of Health, Guide for the Care and Use of Laboratory Animals” kurallarına uygun olarak gerçekleştirilmiştir.

Çalışma Grupları:

Grup 1: İR (6 Rat)

Grup 2: sCR1 (6 Rat)

Grup 3: İR + sCR1 (6 Rat)

Grup 4: Kontrol (6 Rat)

3.2. Anestezi:

Bütün hayvanların anestezisi, 50 mg/kg Ketamin Hidroklorür (Ketalar, Eczacıbaşı Warner-Lambert ilaç sanayi, Levent, İstanbul) ve 7 mg/kg xylazine Hidroklorit’ in (Rompun, Bayer Şişli, İstanbul) aseptik şartlarda intraperitoneal verilmesi ile sağlandı.

Grup 1 (İskemi Reperfüzyon grubu, 6 Rat): SMA 60 dakika klemplenmesi ile iskemi ve takiben reperfüzyon oluşturuldu. Ardından 4 gün sonra laparotomi ile biyokimyasal ve patolojik inceleme için KC, böbrek, İnce barsaktan doku ve VCI’ dan kan örneği alındı.

Grup 2 (sCR1 grubu, 6 Rat): Laparatomiyi takiben intravenöz olarak sCR1 verildi. Dört gün sonra ratlardan doku ve kan örnekleri alındı.

Grup 3 (İR ve sCR1 grubu, 6 Rat): SMA 60 dakika klemplenmesi ile iskemi sonrası 60. dakikada intravenöz sCR1 verildikten 1 dakika sonra reperfüzyon uygulandı. Dört gün sonra kan ve doku örnekleri alındı.

Grup 4 (Kontrol grubu, 6 Rat): Laparatomiyi takiben dördüncü gün doku ve kan örnekleri alındı.

3.3. sCR1 'IN Uygulanışı Ve Sıvı Replasmanı:

İskemiden 60 dakika sonra ve reperfüzyondan 1 dakika önce, sCR1 (TP10, Avant Immunotherapeutics Inc. Needham, MA) 15 mg/kg dozda IV olarak ringer laktat içerisinde kuyruk veninden iv verildi. İlacın ve cerrahi uygulamanın getireceği sıvı açığını karşılamak amacı ile her rata ortalama 2 cc ringer laktat ve 3 cc % 5 dekstroz, karın insizyonu kapatılmadan önce intraperitoneal verildi. Anesteziden sonra uyanma süreleri, ortalama dört saat olup ratların beslenme ve sıvı alımları takip edilerek, idrar çıkışları gözlemlendi. İlk 24 saat içinde tek doz fentanyl tüm ratlara 0,02 mg dozda subkütan olarak uygulandı.

3.4. CERRAHİ TEKNİK

Hazırlık: İşlem öncesi ratlar tartıldı. Anestezi alan ratların, insizyon sahası traşlandı. Povidon iyot ile cilt antisepsisi sağlandıktan sonra, ameliyat düzeneğine kol ve bacakları tesbit edildi. Düzenek aspirasyon riskini önlemek amacıyla, 30 derece eğimli tutuldu ve steril örtü insizyon alanı açıkta kalacak şekilde kapatıldı. Ratlara kuyruk veninden sCR1 verilmesi için damar yolu açıldı.

İnsizyon: Üst orta hat insizyonu, kanama daha az olacağı düşünülerek tercih edildi.

İskemi: SMA disseke edildikten sonra SMA'ya yerleştirilen mikrovasküler klemp ile sağlandı. İskemi süresi 60 dakika olarak uygulandı (Resim 1).

Reperfüzyon: Altmış dakikalık bekleme süresi dolduktan sonra klemp kaldırıldı ve reperfüzyon sağlandı.

İskemi Süresini Bekleme: İskemi sürecinde olan ratlara, 2 cc ringer laktat intraperitoneal olarak verildikten sonra insizyon tek tabaka halinde 2 adet dikiş ile yaklaştırıldı. İnsizyon üzerine steril spanç kapatılarak, ısı lambası altında 60 dakika bekletildi ve ısı kontrolü sağlandı.

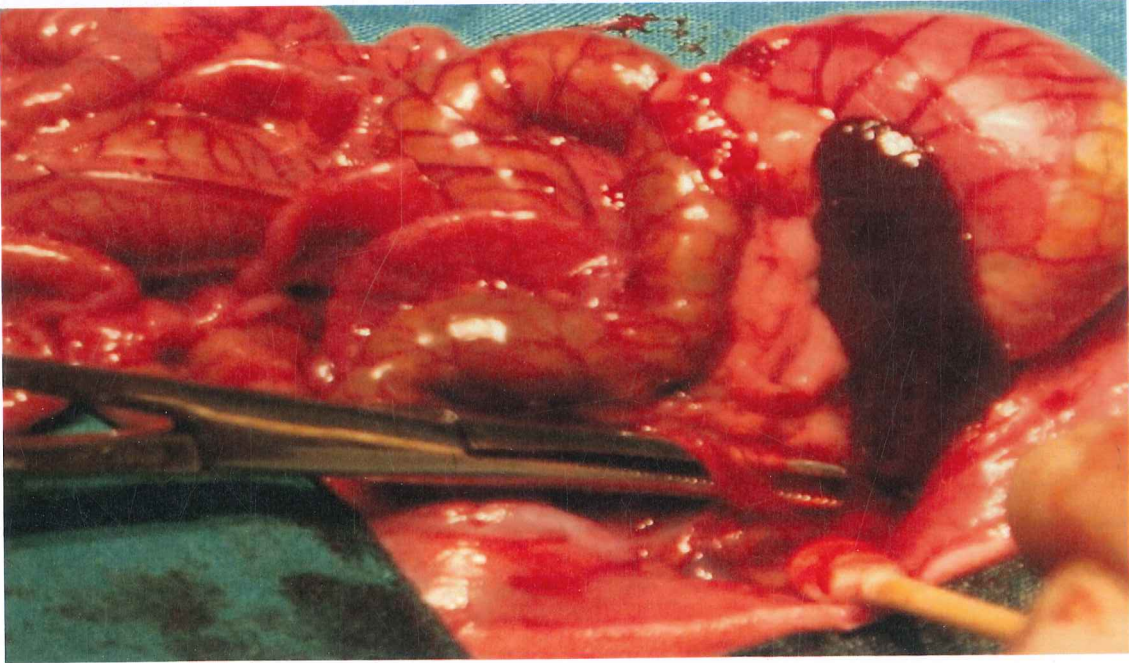
İşlem Sonrası Gözlem: Tüm ratların insizyonu 3/0 ipek kullanılarak 2 tabaka halinde kapatıldı. Kapatılmadan önce %5 lik dekstroz 3 cc intraperitoneal olarak verildi. Anestezi etkisi geçene kadar vücut ısısı ve solunumu normal olacak şekilde izlendi.

Sakrifikasyon: Ameliyat sonrası dördüncü gün, ratlar anestezi altında sakrifiye edildi. Önce sitokin ve organ fonksiyon parametreleri analizi için gerekli 5 cc venöz kanı vena kava inferiordan alındı, Ardından karaciğer sol lobu, sağ böbrek ve parsiyel ince barsak eksize edilerek immunhistokimyasal ve biyokimyasal parametreler için ayrıldı (4,5,6,7)

Hepatektomi: Karaciğer sol lobu total eksize edildi (Resim 4).

Nefrektomi: Sağ böbrek çıkartıldı (Resim 5).

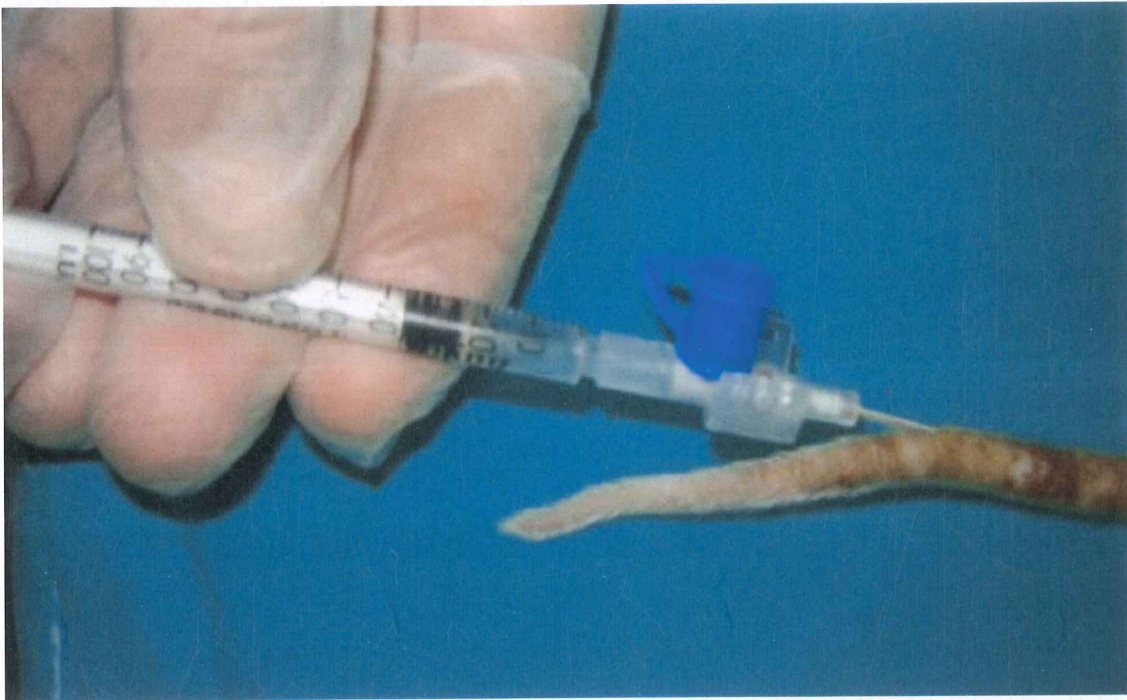
Parsiyel ince barsak rezeksiyonu: 5 cm'lik ince barsak segmenti (jejunum) eksize edildi (Resim 6).



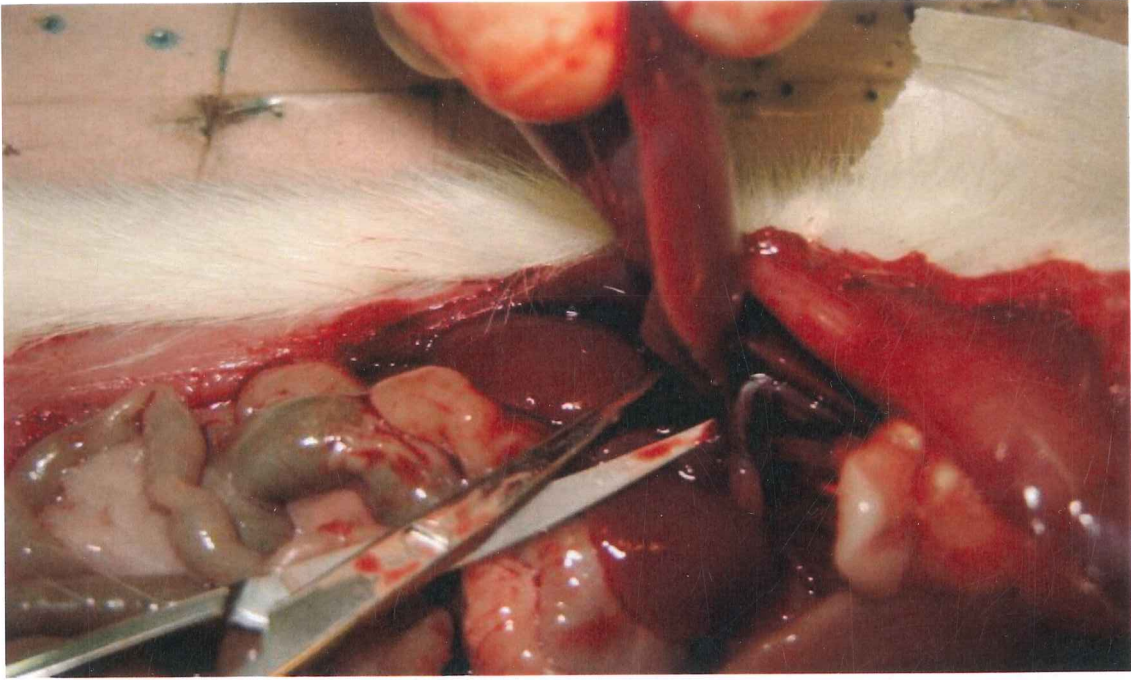
Resim 1: SMA 'nın disseksiyonu



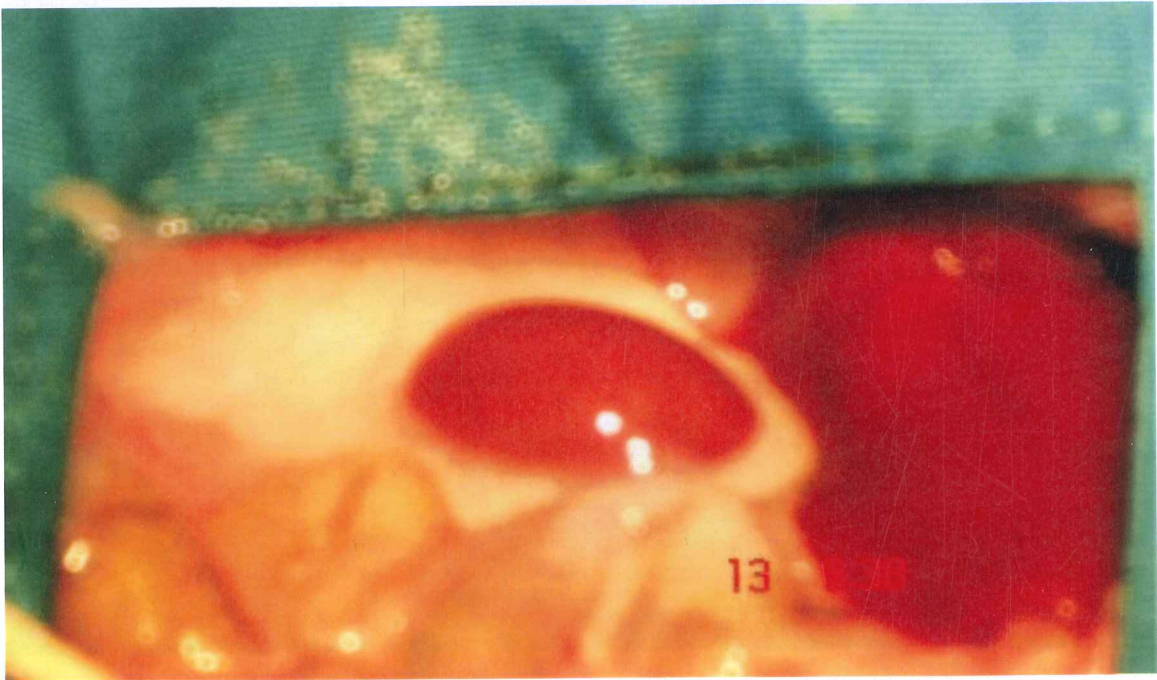
Resim 2: SMA'nın klemplenmesi ve intestinal iskemi oluşturulması



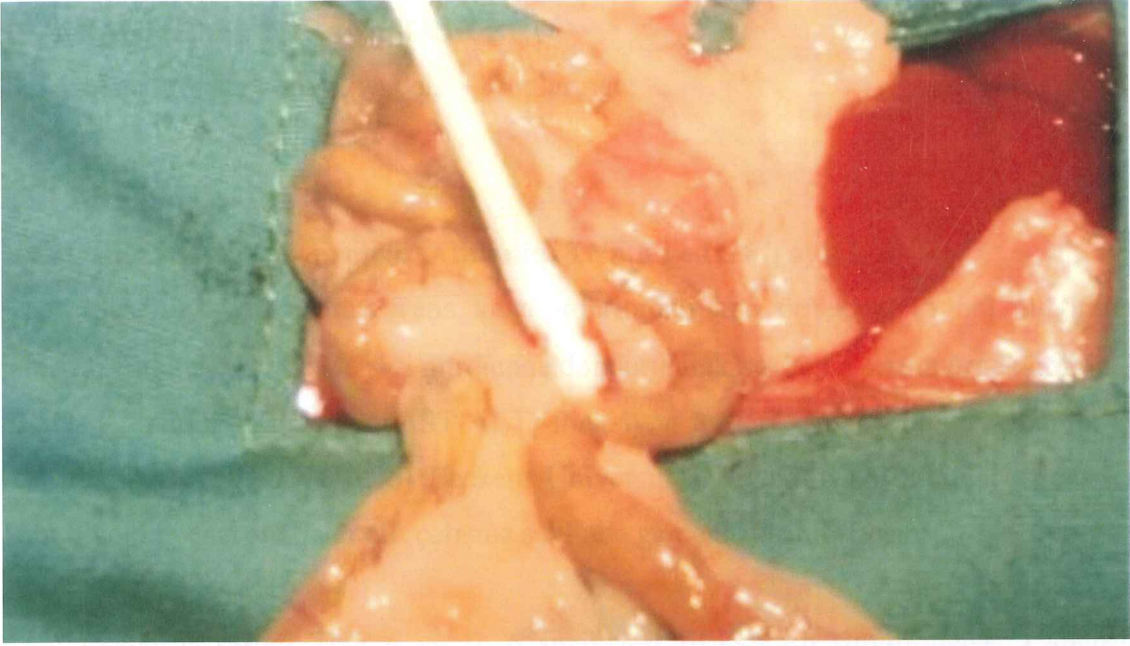
Resim 3: Kuyruk veninden sCR1 verilmesi



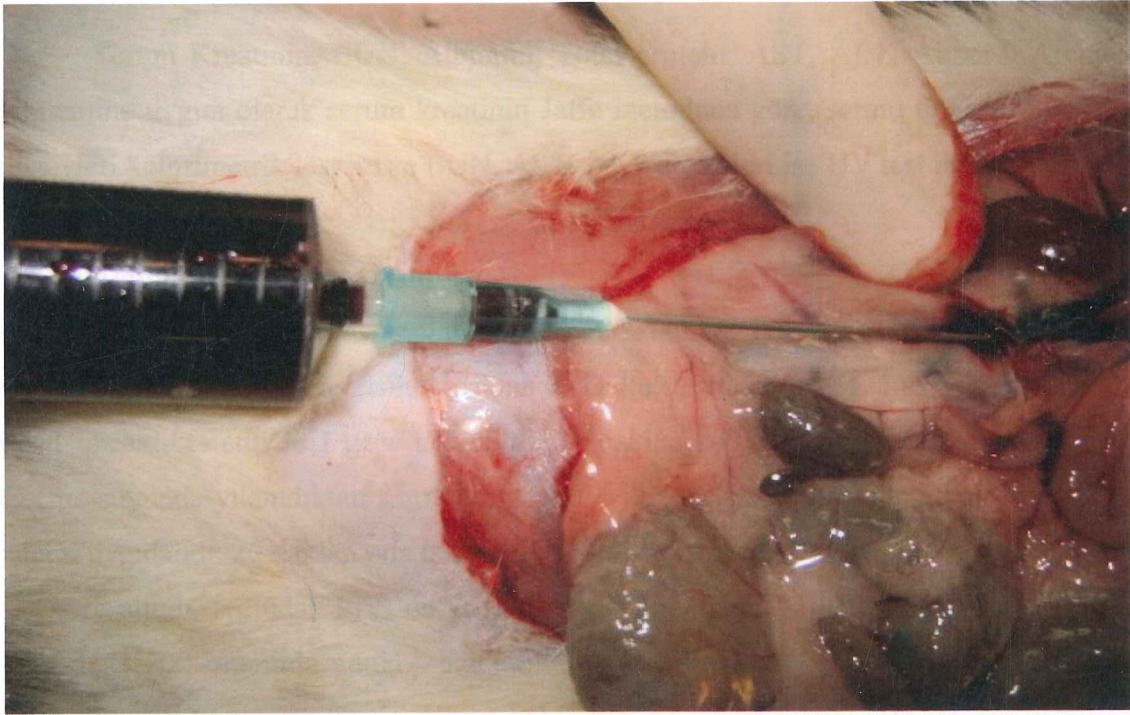
Resim 4: Parsiyel Karaciğer Rezeksiyonu



Resim 5: Sağ Nefrektomi



Resim 6: İnce Barsak (5 cm'lik Jejunal Segment) Rezeksiyonu



Resim 7: Vena Kava İneriordan Kan Örneklerinin Alınması

3.5. ARAŞTIRMA PARAMETRELERİ

Araştırmada kontrol ve deney gruplarında;

3.5.1 Biyokimyasal analiz

BFT, KCFT, T.protein, Albumin, TNF α ve IL 6 Tayini:

Sakrifikasyon sonrası vena kava inferiordan kan örnekleri (5 cc) alındıktan sonra santrifüj edilerek -70 C°'de sıvı nitrojende dondurularak saklanan serum örneklerinde; Böbrek, (BUN- Kreatinin), Karaciğer (AST-ALT) fonksiyon testleri, Total protein, Albumin düzeyleri ve Sitokinler (TNF α ve IL 6) Başkent Üniversitesi Biyokimya Bölümünde değerlendirildi. Tüm biyokimyasal analizler çift çalışma şeklinde gerçekleştirildi (Resim 7)

Ratlarda serum TNF α ve IL 6 seviyeleri ELİSA kit (İnvitrogen® ,Camarillo, CA) uygulama yöntemine göre kantitatif olarak belirlendi.

Serum Kreatinin, BUN, Albumin, Total protein, AST, ALT, Abbot® Architect C800 yöntemine uygun olarak serum kreatinin Jaffe metoduna göre, serum total protein ve albumin düzeyleri kolorimetrik test ile ve BUN, AST, ALT düzeyleri ise UV test ile belirlendi.

3.5.2 İmmünohistokimyasal Analiz:

Sakrifikasyon sonrası ratlardan alınan karaciğer sol lobu, sağ böbrek ve 20 cm'lik jejunal segment formol içerisinde saklandı. Doku kesitleri poly-L Lysin kaplı lamlara alındı. 60° C sıcaklıkta etüvde 1 gece bekletildi. 30 dakika ksilende, 15'er dakika alkolde bekletildi. Çeşme suyunda yıkandıktan sonra citrat buffer ile 20 dakika mikrodalga da "antijen retrieval" işlemi uygulandı. 20 dakika oda ısısında bekletildikten sonra çeşme suyunda yıkandı ve %3'lük H₂O₂'ye alındı, ardından PBS ile yıkandı. 5 dakika Ultra V Block uygulandı ve yine PBS ile yıkandı. 1/200 oranında antikor damlatıldı, 2 saat beklendi. PBS ile 10 dakika yıkandı. 20 dakika biotin, 20 dak avidin, 15 dakika DAB chromogen uyguladı. Her seferde PBS ile yıkandı. Mayers hematoksilen ile 1 dakika zıt boyama yapıldı.

Mikroskopik değerlendirme: Welbourn ve ark. çalışması örnek olarak alındı (140). Her grup kendi içinde değerlendirildi. Lamlarda 10 büyük büyütme alanında sitoplazmik güçlü MPO pozitifliği gösteren nötrofiller kör yöntemle sayıldı.

3.5.3 Dokuda MDA ve GSH Analizi:

Doku MDA Derişiminin Saptanması:

Doku örneklerinde MDA ve redükte glutatyon (GSH) analizleri içinince barsak, böbrek ve karaciğer doku homojenatları soğukta 0,15 M KCl içinde (%10, w/v) cam homojenizatörler kullanılarak hazırlandı.

Lipid peroksidasyon belirteci olarak doku MDA derişimi Beuge ve Aust tarafından tanımlanan yonteme göre analiz edildi. Yontem, MDA'nın tiyobarbitürik asit ile yaptığı kompleksin kalorimetrik olarak ölçümü esasına dayanmaktadır. Bu yonteme göre bir hacim doku homojenat örneğinin iki hacim stok reaktif (0,25 N HCl içinde %14 trikloroasetik asit ve % 0,375 tiyobarbitürik asit içeren) ile reaksiyona girmesi sonrasında hazırlanan reaksiyon karışımları 15 dakika kaynar su banyosunda inkübe edildikten sonra soğutulup, 1000 g'de 10 dakika santrifüj edildi. Süpernatantların absorbanısı spektrofotometrik olarak 535 nm'de reaktif körü'ne karşı ölçüldü. Molar ekstinksiyon katsayısı ($1,56 \times 10^5 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$) kullanılarak hesaplanan sonuçlar nmol MDA/gram doku olarak ifade edildi.

Doku GSH Derişiminin Saptanması

Doku homojenatlarında redükte glutatyon (GSH) düzeyleri Ellman tarafından tanımlanan sülfidril grup analizi prensibine göre tayin edildi. Bu yontemde örneklerin deproteinizasyonu sonrasında Ellman'ın renk reaktifi (%40 DTNB, w/v %1 sodyum sitrat içinde) ile süpernatantların reaksiyonu sonucu oluşan renkli kompleksin absorbanısı 412 nm'de reaktif körüne karşı spektrofotometrik olarak ölçüldü. GSH derişimleri GSH eğrisi kullanılarak hesaplandı. Sonuçlar $\mu\text{mol GSH/mg}$ doku olarak ifade edildi.

3.6. İSTATİSTİKSEL ANALİZ

Araştırma bulgularının istatistiksel analizleri SPSS 10.0 paket programı ile yapılmıştır. İstatistiksel analizde merkezi dağılım ölçütleri olan ortalama ve standart sapmalar hesaplanmış, nonparametrik verilerin analizinde nominal değerlerin gruplar arası farklılıkları Kruskal-Wallis varyans analizi testi kullanılarak gerçekleştirilmiştir ve $p < 0.05$ değerler anlamlı olarak kabul edilmiştir. Alt grup karşılaştırmaları Mann-Whitney Testi kullanılarak yapıldı. Sonuçlar α anlamlılık seviyesi born fenomeni düzeltmesi uygulanarak $< 0,008$ 'den küçük olma durumu anlamlı kabul edilerek yorumlandı.

4. SONUÇLAR

Yapılan istatistiksel analiz sonucunda Total protein, BUN ve Kreatinin düzeyi Kruskal-Wallis varyans analizi testi sonucunda istatistiksel olarak anlamlı bulunmazken diğer tüm veriler anlamlı bulunmuştur ($p<0.05$). Total protein, BUN ve Kreatinin düzeyleri hem lokal organ hasarı, hemde uzak organ hasarı sonucu kontrol grubu ile karşılaştırıldığında İR, İR+sCR1 ve sCR1 grupları arasında anlamlı fark bulunmamıştır. ($p>0.05$)

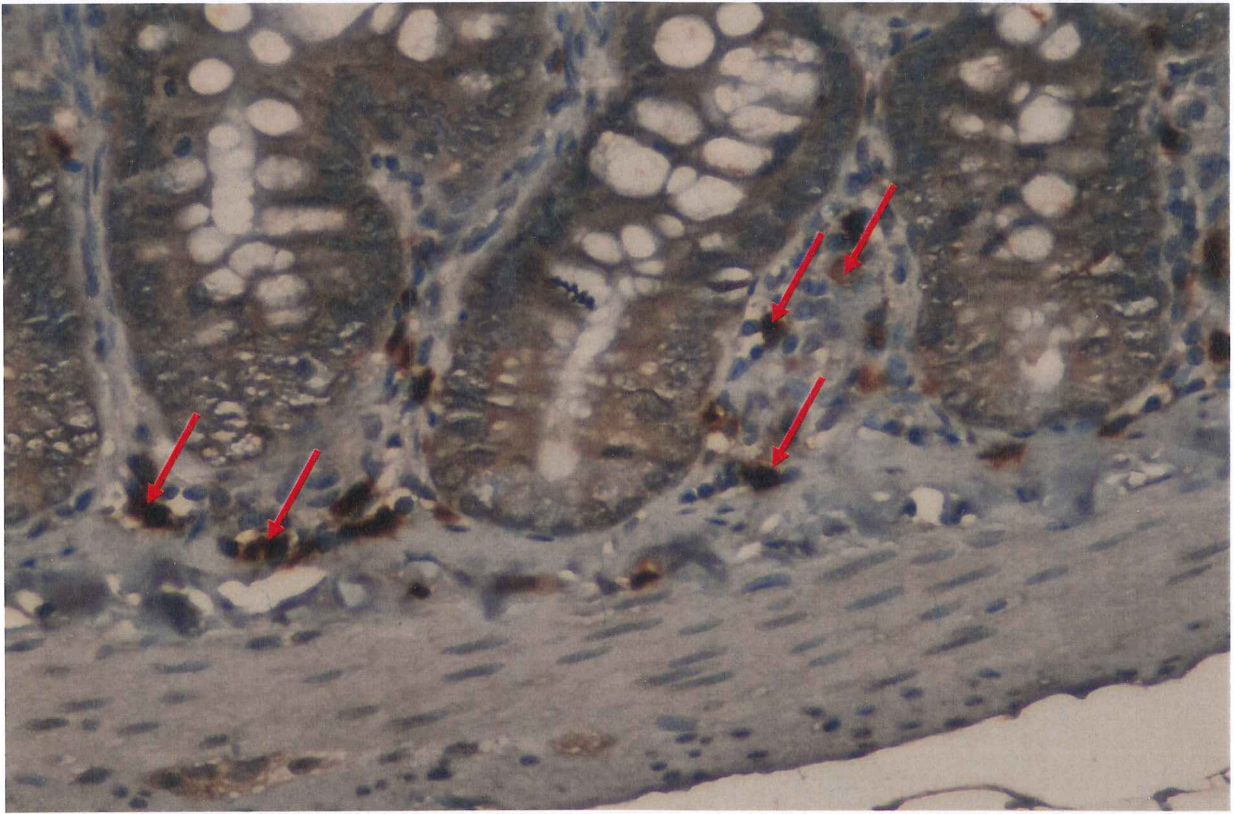
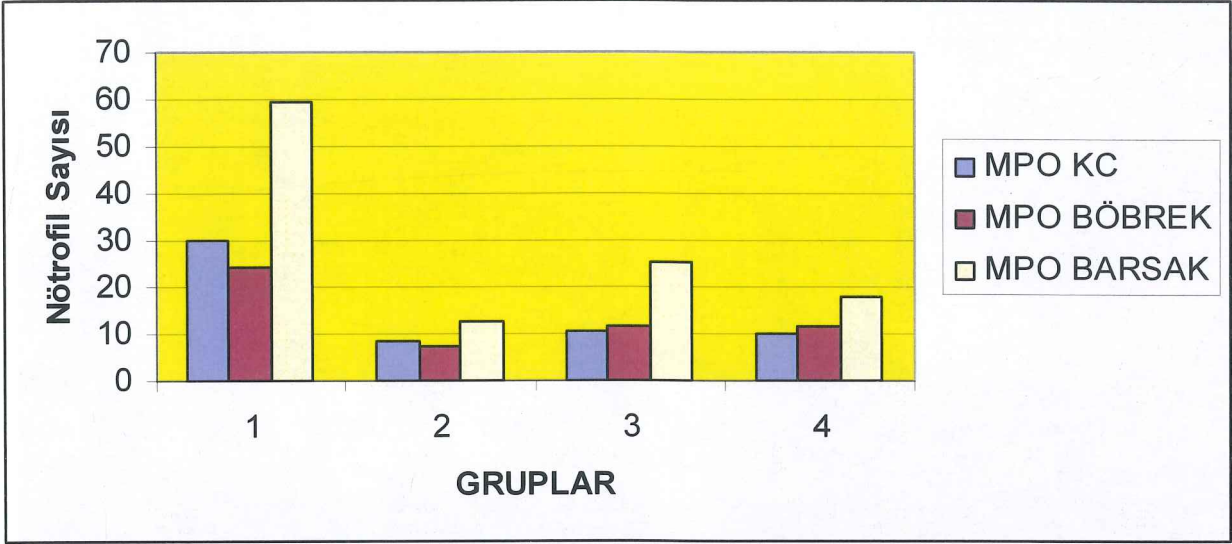
4.1. PATOLOJİ

Myeloperoksidaz pozitif nötrofil sayısı açısından gruplar karaciğer, böbrek ve barsak dokuları açısından karşılaştırıldığında istatistiksel anlamlı fark bulunmuştur ($p<0.05$). Myeloperoksidaz pozitif nötrofil sayısı gruplar arasında karşılaştırıldığında 1. grup (İR) ile diğer gruplar arasında istatistiksel açıdan anlamlı fark bulunmuştur ($p<0.008$). Ancak diğer gruplar kendi aralarında karşılaştırıldığında istatistiksel açıdan anlamlı fark bulunmamıştır ($p>0.008$), (Resim 8,9,10,11,12,13,14,15,16,17).

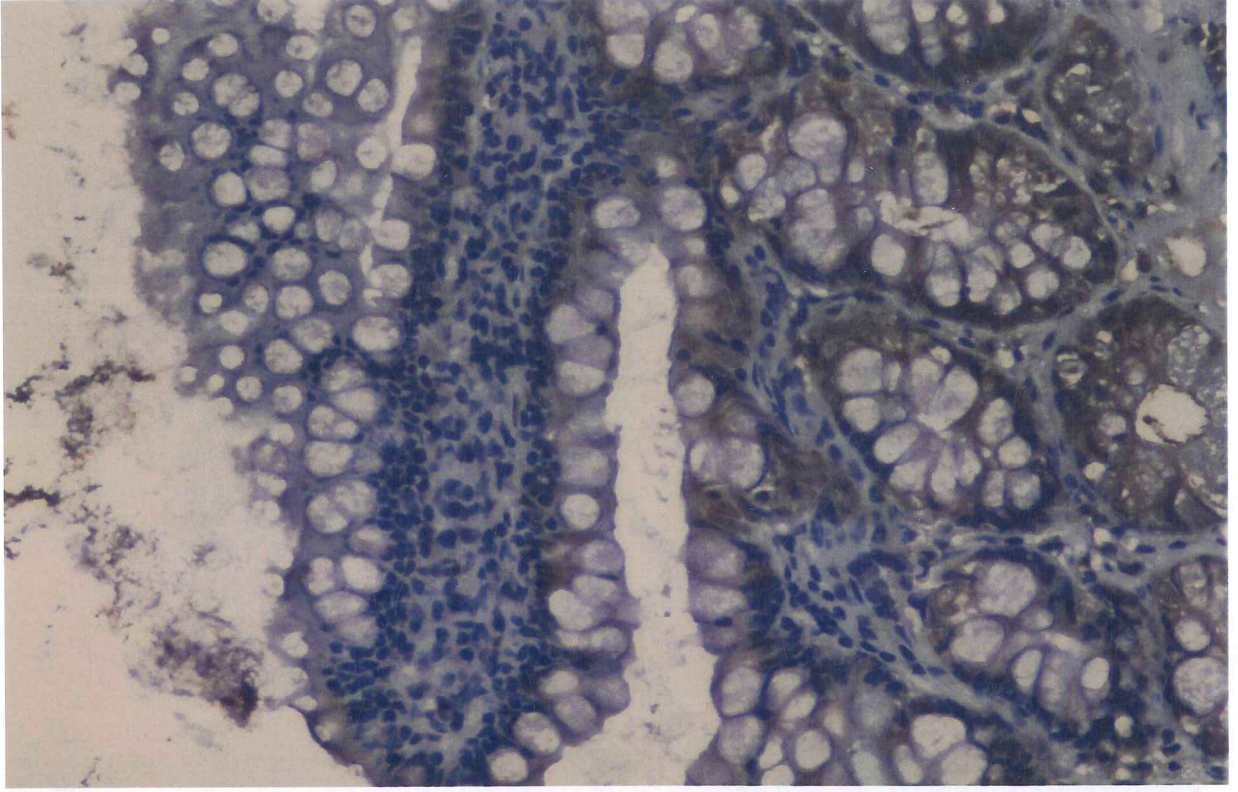
Tablo 1: KC, Böbrek Ve Bağırsak Dokusunda Myeloperoksidaz Pozitifliği Gösteren Nötrofil Sayısı İçin Ortalama Nötrofil Sayısı Ve Ortalama Standart Hata Değerleri

RAT	ORTALAMA NÖTROFİL SAYISI DEĞERLERİ	ORTALAMA STANDART HATA
GRUP 1: (İR, KC)	29,83	±5,3
(İR, BÖBREK)	24,16	±5,7
(İR, BARSAK)	59,5	±11,3
GRUP 2: (sCR1, KC)	8,3	±4,1
(sCR1, BÖBREK)	7,156	±2,8
(sCR1, BARSAK)	12,66	±4,3
GRUP 3: (İR+sCR1, KC)	10,5	±1,4
(İR+sCR1, BÖBREK)	11,33	±2,1
(İR+sCR1, BARSAK)	25,53	±5,5
GRUP 4: (KONTROL, KC)	9,8	±3,5
(KONTROL, BÖBREK)	11,8	±3,4
(KONTROL, BARSAK)	17,8	±4,1

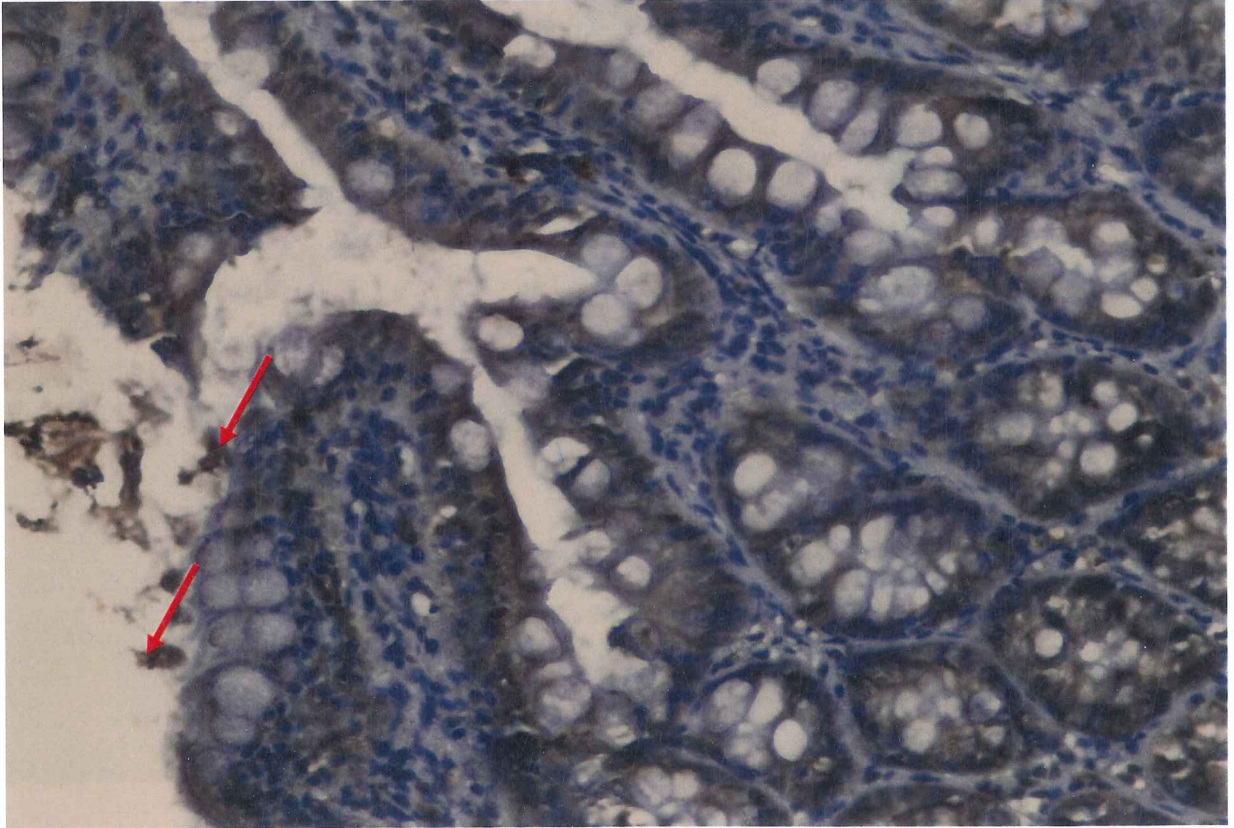
Grafik 1: Karaciğer, Böbrek Ve Bağırsak Dokusunda Myeloperoksidaz Pozitifliği Gösteren Nötrofil Sayısı İçin İndeks Değerlerinin Gruplar Arası Karşılaştırılmalı Dağılımı



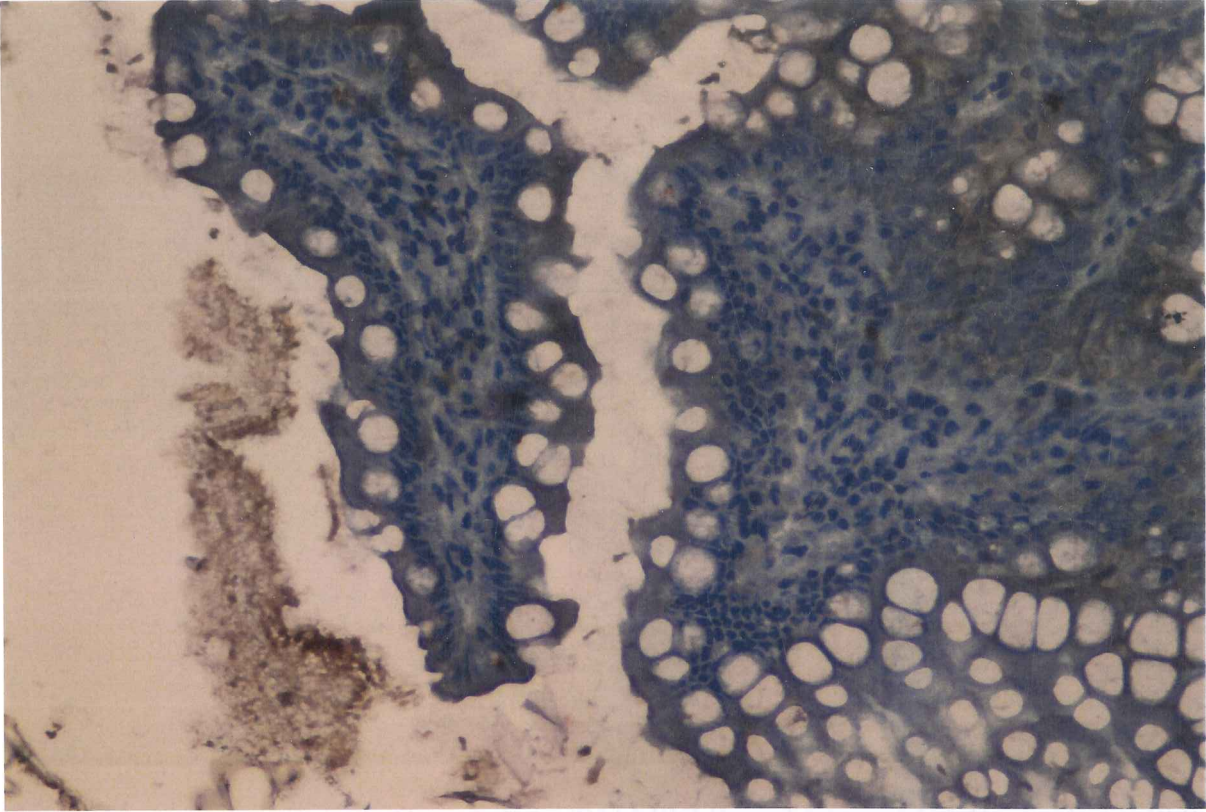
Resim 8: İnce Barsak Grup 1'de (İR) MPO Pozitif Nötrofil Boyamaları (x400) okla işaretlenmiştir.



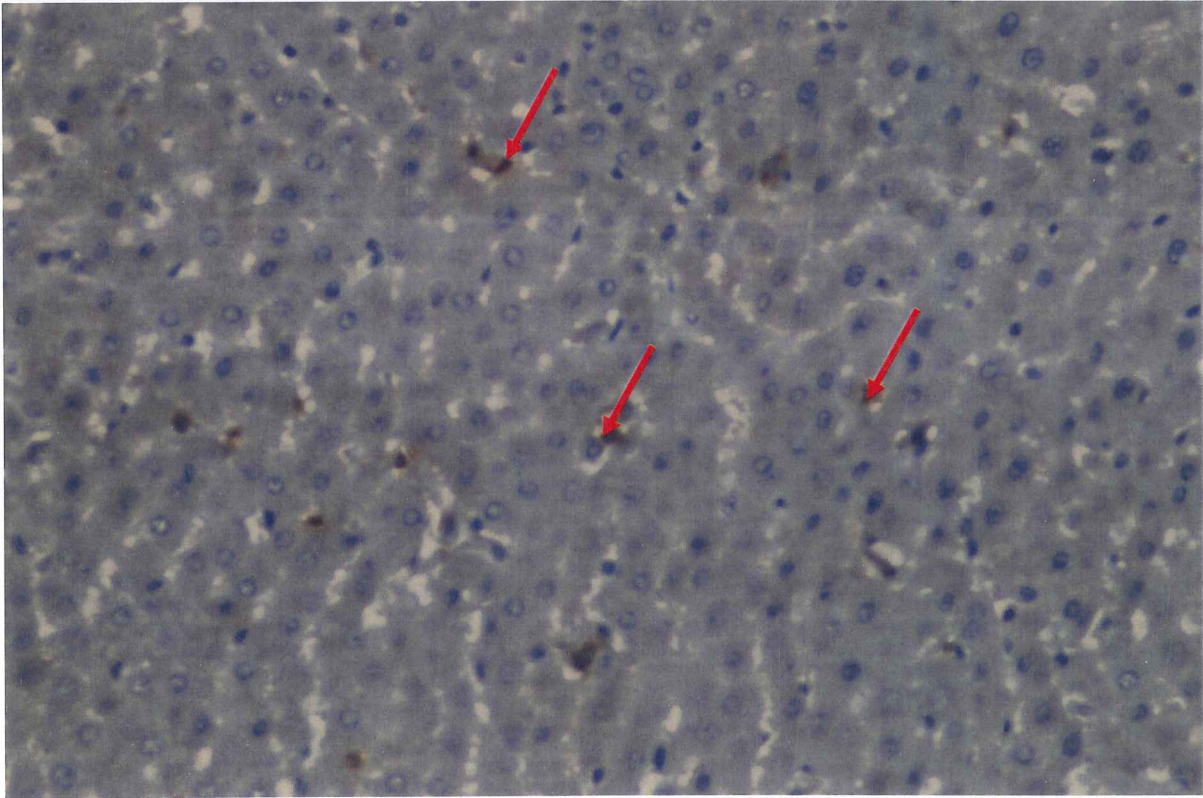
Resim 9: İnce Barsak Grup 2’de (sCR1) MPO Pozitif Nötrofil Görülmemekte (x400).



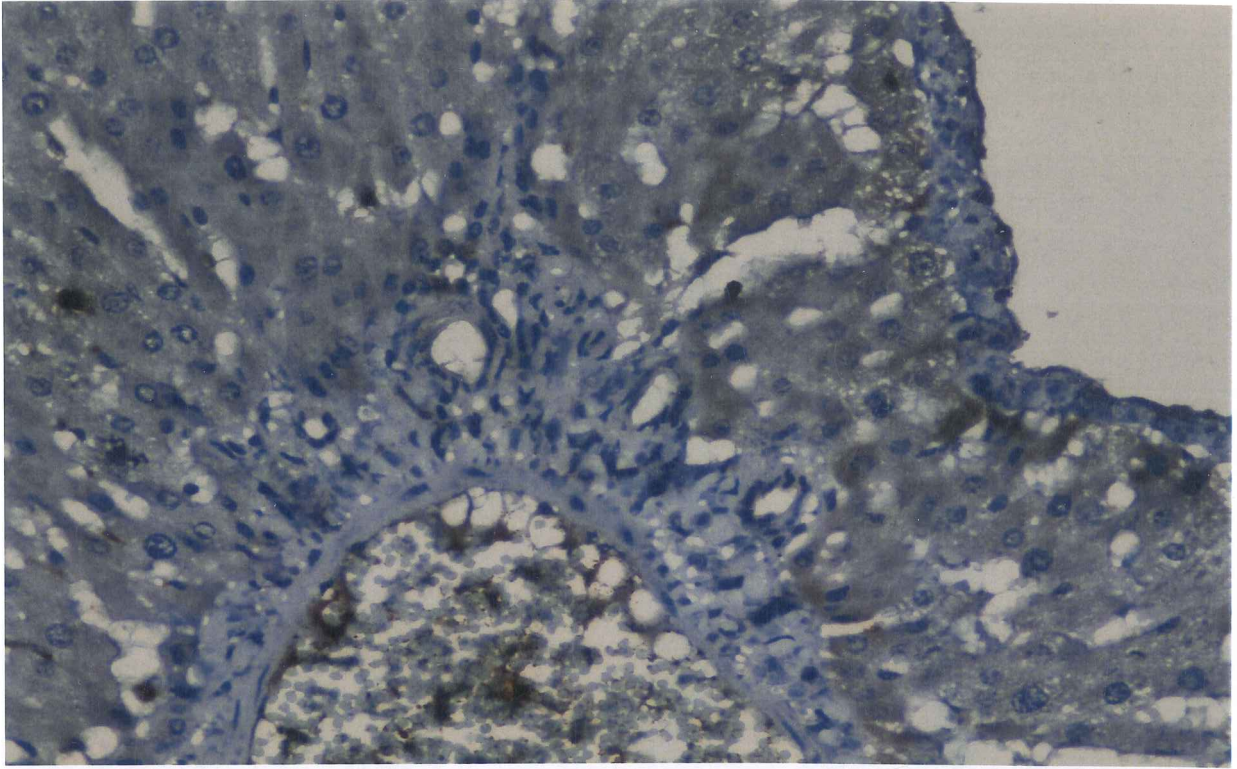
Resim 10: İnce Barsak Grup 3 (İR+sCR1) ‘de MPO Pozitif Nadir Nötrofil boyamaları (x400) okla işaretlenmiştir.



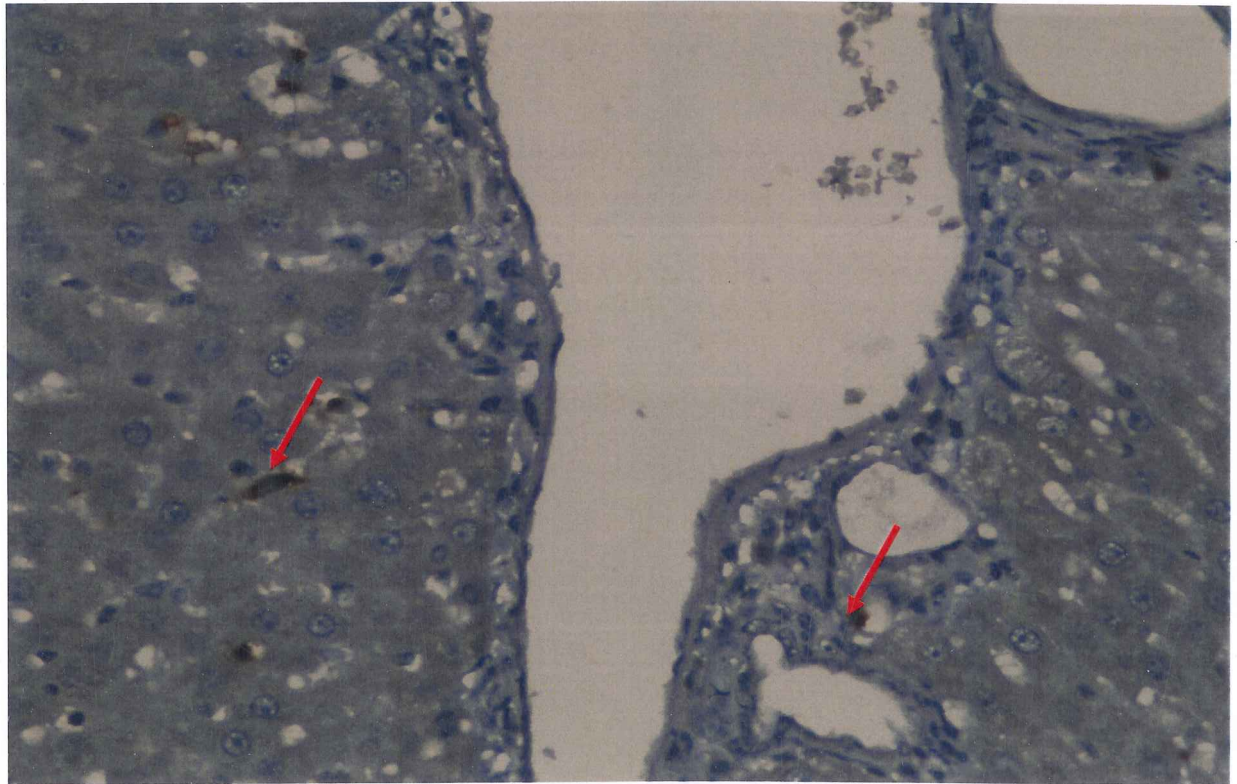
Resim 11: İnce barsak dokusu 4. grupta MPO pozitif nötrofil görülmemekte (x400)



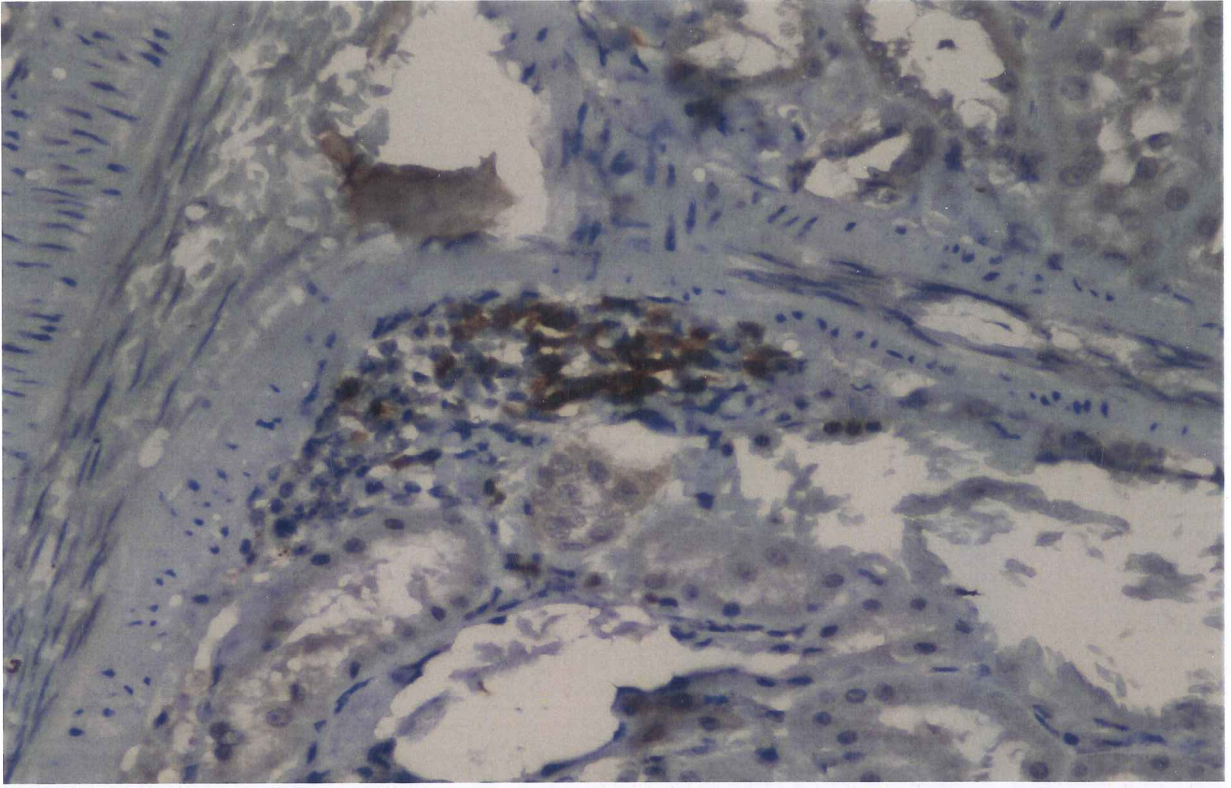
Resim 12: Karaciğer Dokusu 1. Grupta MPO Pozitif Nötrofil Boyamaları (x400) okla işaretlenmiştir.



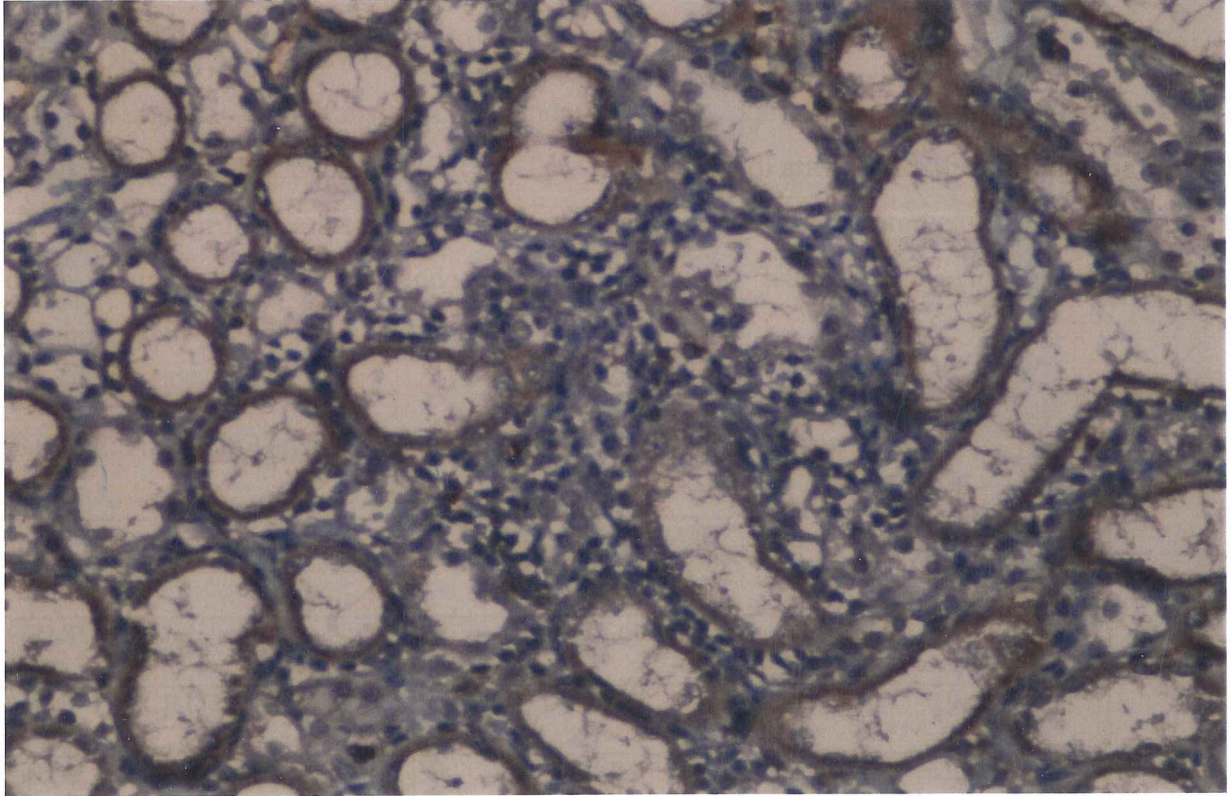
Resim 13: Karaciğer Dokusu Grup 2'de (sCR1) MPO Pozitif Nötrofil Görülmemekte (x400)



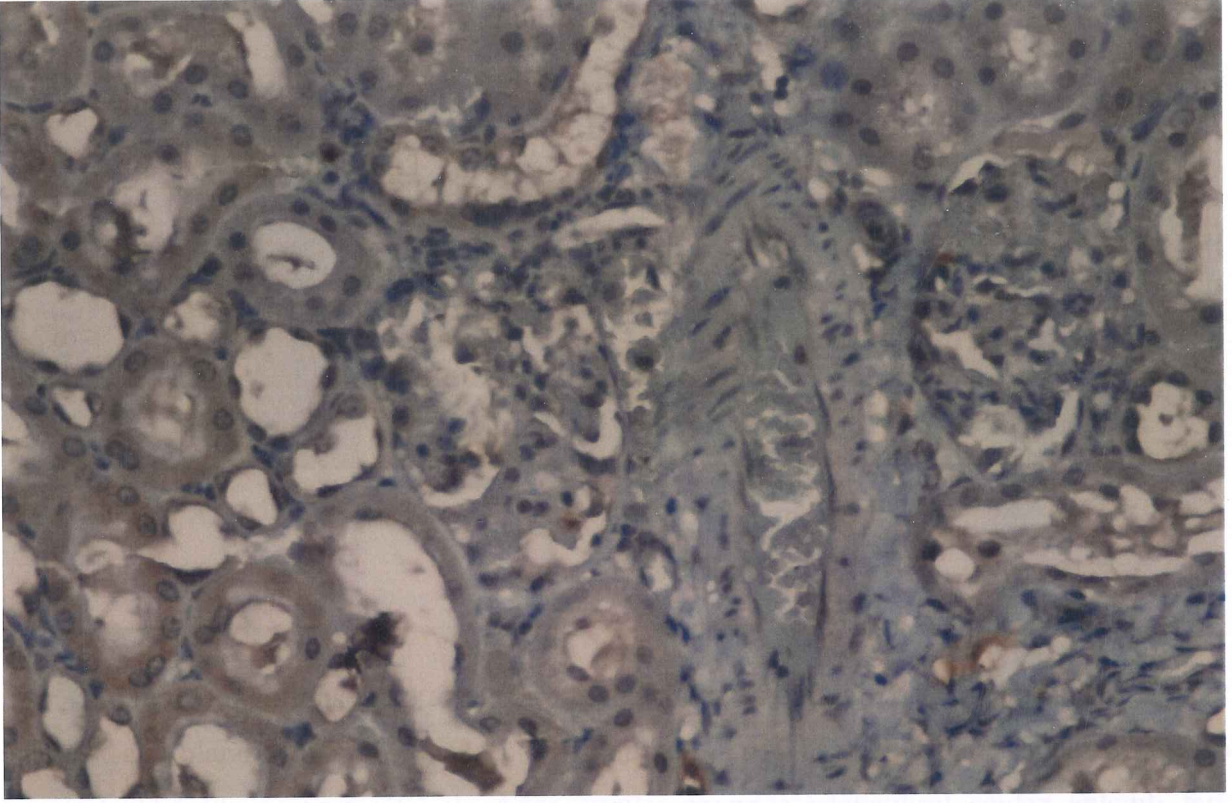
Resim 14: Karaciğer Dokusu Grup 3'de (İR+sCR1) MPO Pozitif Nadir Nötrofil Boyamaları (x400) okla işaretlenmiştir.



Resim 15: Böbrek Dokusu Grup 1'de (İR) MPO Pozitif Nötrofil Boyamaları (x400)



Resim 16: Böbrek Dokusu Grup 2'de (sCR1) MPO Pozitif Nötrofil Görülmemekte (x400)



Resim 17: Böbrek Dokusu Grup 3’de (İR+sCR1) MPO Pozitif Nötrofil Görülmemekte (x400).

4.2. BİYOKİMYASAL ANALİZ

Aspartat aminotransferaz açısından gruplar karşılaştırıldığında gruplar arasında istatistiksel anlamlı fark bulunmuştur ($p < 0.05$). Gruplar kendi arasında karşılaştırıldığında 1. grup (İR) ile diğer gruplar arasında istatistiksel açıdan anlamlı fark bulunmuştur ($p < 0.008$). Ancak diğer gruplar kendi aralarında karşılaştırıldığında istatistiksel açıdan anlamlı fark bulunmamıştır ($p > 0.008$).

Tablo 2: AST İçin Değerler Ve Ortalama Standart Hata Değerleri

RAT	ORTALAMA AST DEĞERLERİ	ORTALAMA STANDART HATA
GRUP 1: (İR)	171,67	±35,8
GRUP 2: (sCR1)	72,17	±9,6
GRUP 3: (İR+sCR1)	71,83	±5,91
GRUP 4: (KONTROL)	110,67	±6,68

Grafik 2: AST İndeks Değerlerinin Gruplar Arası Karşılaştırılmalı Dağılımı

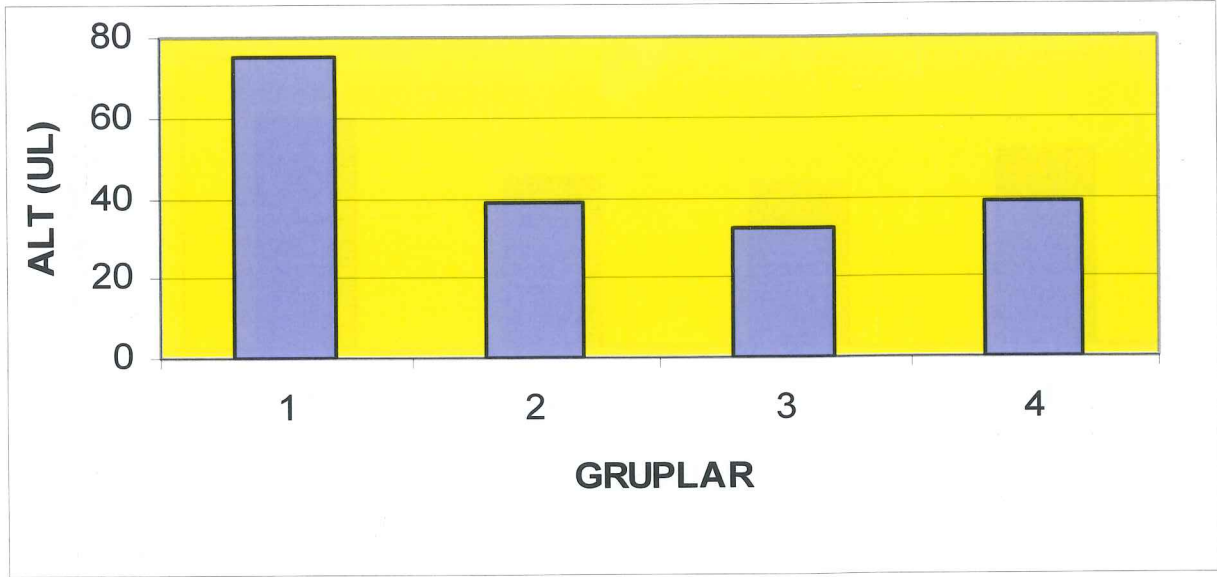


Alanin aminotransferaz açısından gruplar karşılaştırıldığında gruplar arasında fark istatistiksel olarak anlamlı yüksek bulunurken ($p < 0.05$). Gruplar kendi arasında karşılaştırıldığında 1. grup (İR) ile diğer gruplar arasında istatistiksel açıdan anlamlı fark bulunmuştur ($p < 0.008$). Ancak diğer gruplar kendi aralarında karşılaştırıldığında istatistiksel açıdan anlamlı fark bulunmamıştır ($p > 0.008$).

Tablo 3: ALT İçin Ortalama Değerler Ve Ortalama Standart Hata Değerleri

RAT	ORTALAMA ALT DEĞERLERİ	ORTALAMA STANDART HATA
GRUP 1: (İR)	75,67	±17,24
GRUP 2: (sCR1)	39,17	±5,49
GRUP 3: (İR+sCR1)	32,33	±7,17
GRUP 4: (KONTROL)	38,5	±5,54

Grafik 3: ALT İndeks Değerlerinin Gruplar Arası Karşılaştırılmalı Dağılımı

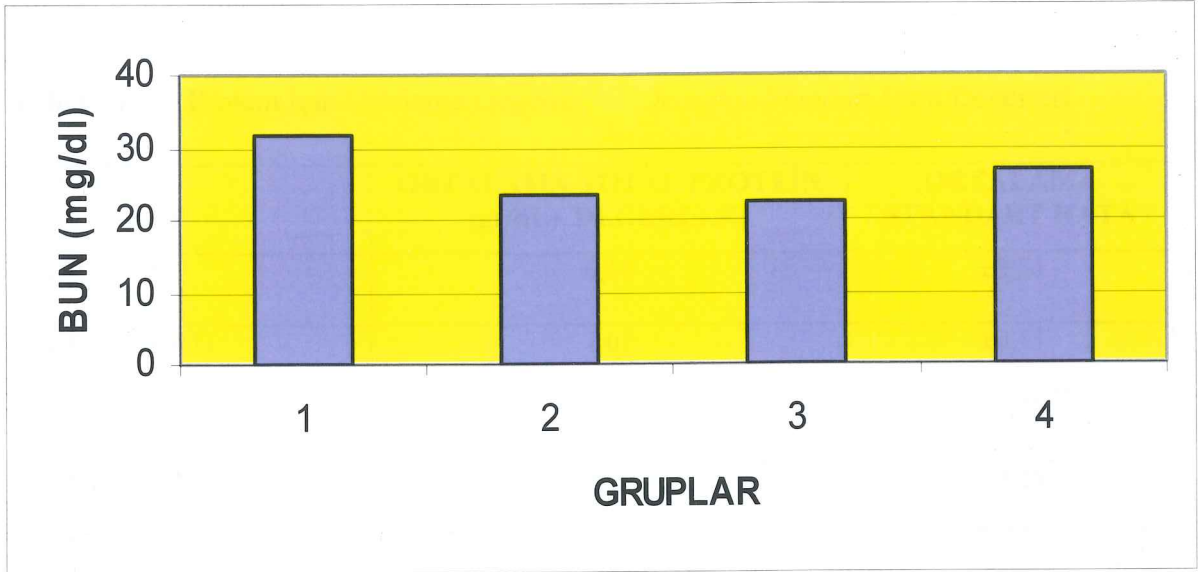


BUN için gruplar karşılaştırıldığında grup1 (İR) ile diğer gruplar (sCR1, İR+sCR1, Kontrol) arasındaki fark istatistiksel olarak anlamlı yüksek bulunmuştur ($p<0.05$). Gruplar kendi arasında karşılaştırıldığında 1. grup (İR) ile diğer gruplar arasında istatistiksel açıdan anlamlı fark bulunmuştur ($p<0.008$). Ancak diğer gruplar kendi aralarında karşılaştırıldığında istatistiksel açıdan anlamlı fark bulunmamıştır ($p>0.008$).

Tablo 4: BUN İçin Ortalama Değerler Ve Ortalama Standart Hata Değerleri

RAT	ORTALAMA BUN DEĞERLERİ	ORTALAMA STANDART HATA
GRUP 1: (İR)	31,83	$\pm 2,04$
GRUP 2: (sCR1)	23,5	$\pm 2,25$
GRUP 3: (İR+sCR1)	22,67	$\pm 3,73$
GRUP 4: (KONTROL)	26,13	$\pm 4,61$

Grafik 4:BUN İndeks Değerlerinin Gruplar Arası Karşılaştırılmalı Dağılımı



Kreatinin için gruplar karşılaştırıldığında gruplar arasında istatistiksel fark anlamlı bulunmamıştır ($p>0.008$).

Tablo 5: Kreatinin İçin Ortalama Değerler Ve Ortalama Standart Hata Değerleri

RAT	ORTALAMA CREATİNİN DEĞERLERİ	ORTALAMA STANDART HATA
GRUP 1: (İR)	0,56	$\pm 0,057$
GRUP 2: (sCR1)	0,53	$\pm 0,081$
GRUP 3: (İR+sCR1)	0,49	$\pm 0,056$
GRUP 4: (KONTROL)	0,46	$\pm 0,027$

Grafik 5: Kreatinin İndeks Değerlerinin Gruplar Arası Karşılaştırılmalı Dağılımı



Total protein değerleri için gruplar karşılaştırıldığında gruplar arasında istatistiksel fark anlamlı bulunmamıştır. ($p>0.008$).

Tablo 6: Total Protein İçin Ortalama Değerler Ve Ortalama Standart Hata Değerleri

RAT	ORTALAMA TOTAL PROTEİN (gr/dL) DEğERLERİ	ORTALAMA STANDART HATA
GRUP 1: (İR)	6,61	$\pm 0,34$
GRUP 2: (sCR1)	7,05	$\pm 0,45$
GRUP 3: (İR+sCR1)	6,45	$\pm 0,23$
GRUP 4: (KONTROL)	6,5	$\pm 0,28$

Grafik 6: Total protein İndeks Değerlerinin Gruplar Arası Karşılaştırılmalı Dağılımı

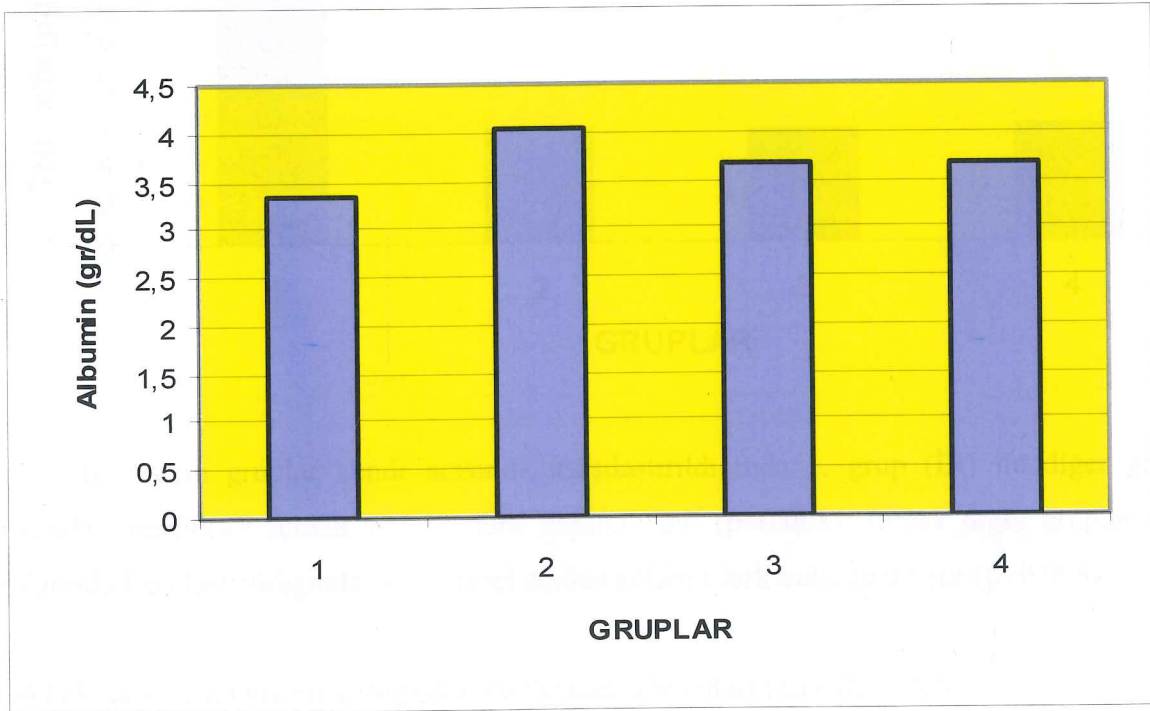


Albumin için gruplar karşılaştırıldığında gruplar arasında istatistiksel fark anlamlı bulunmamıştır. ($p>0.008$).

Tablo 7: Albumin İçin Ortalama Değerler Ve Ortalama Standart Hata Değerleri

RAT	ORTALAMA ALBUMİN DEĞERLERİ	ORTALAMA STANDART HATA
GRUP 1: (İR)	3,33	$\pm 0,21$
GRUP 2: (sCR1)	4,05	$\pm 0,20$
GRUP 3: (İR+sCR1)	3,65	$\pm 0,16$
GRUP 4: (KONTROL)	3,66	$\pm 0,13$

Grafik 7: Albumin İndeks Değerlerinin Gruplar Arası Karşılaştırılmalı Dağılımı

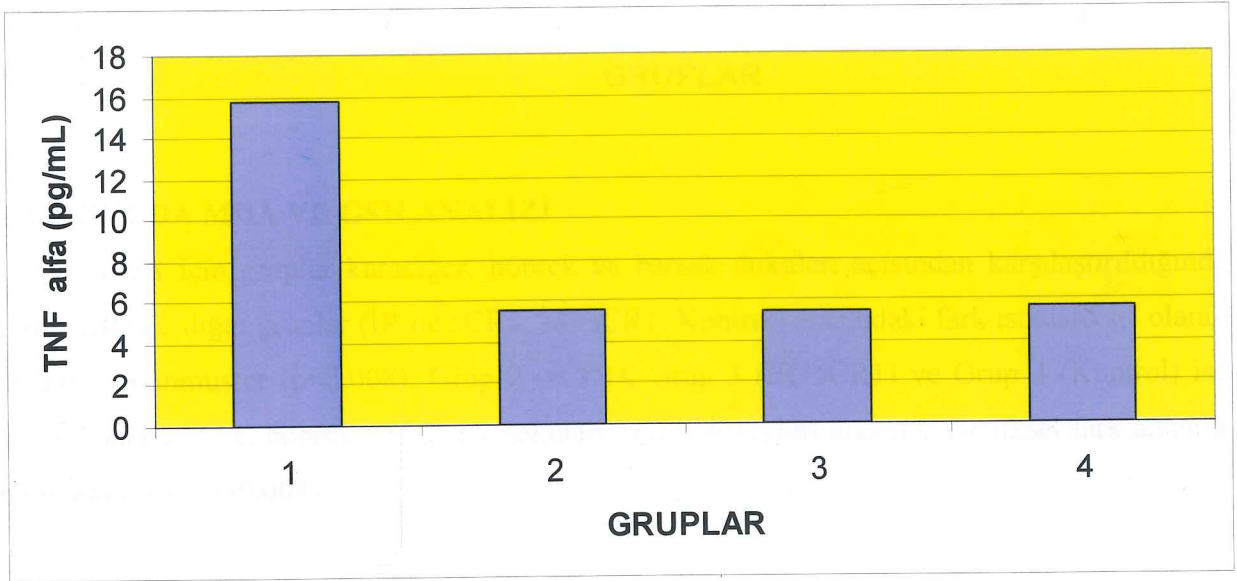


TNF α için gruplar kendi arasında karşılaştırıldığında 1. grup (İR) ile diğer gruplar arasında istatistiksel açıdan anlamlı fark bulunmuştur ($p<0.008$). Ancak diğer gruplar kendi aralarında karşılaştırıldığında istatistiksel açıdan anlamlı fark bulunmamıştır ($p>0.008$).

Tablo 8: TNF α İçin Ortalama Değerler Ve Ortalama Standart Hata Değerleri

RAT	ORTALAMA TNF α DEĞERLERİ	ORTALAMA STANDART HATA
GRUP 1: (İR)	15,7	$\pm 0,52$
GRUP 2: (sCR1)	5,5	$\pm 0,38$
GRUP 3: (İR+sCR1)	5,4	$\pm 0,66$
GRUP 4: (KONTROL)	5,6	$\pm 0,27$

Grafik 8: TNF α İndeks Değerlerinin Gruplar Arası Karşılaştırılmalı Dağılımı

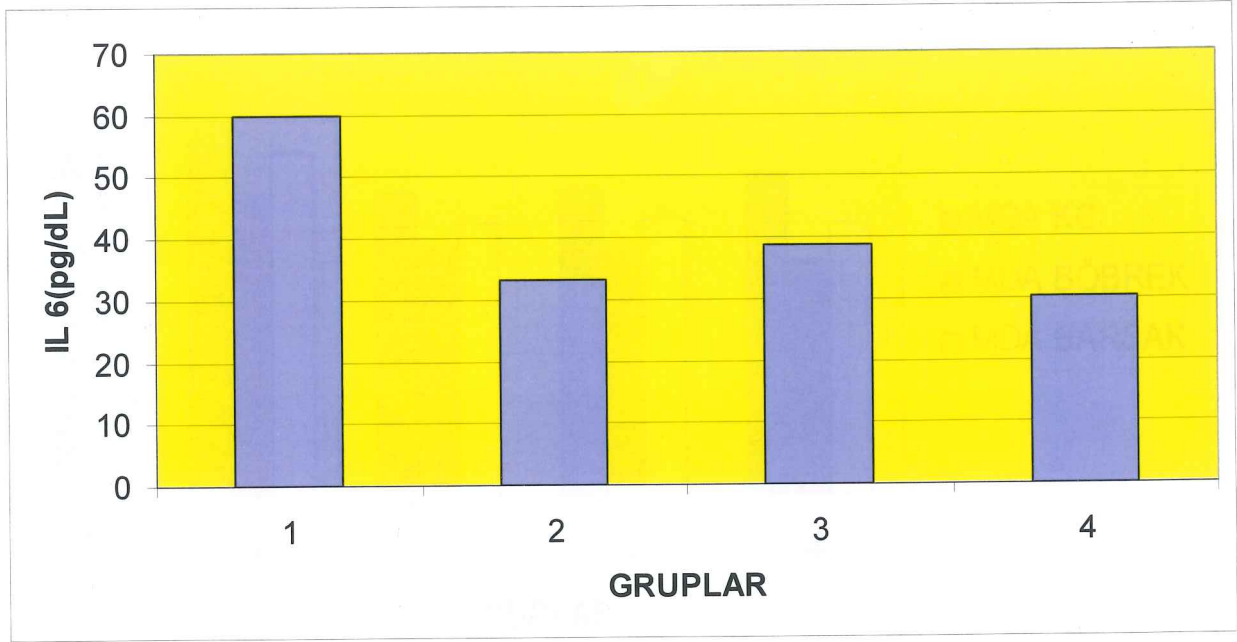


IL 6 için gruplar kendi arasında karşılaştırıldığında 1. grup (İR) ile diğer gruplar arasında istatistiksel açıdan anlamlı fark bulunmuştur ($p < 0.008$). Ancak diğer gruplar kendi aralarında karşılaştırıldığında istatistiksel açıdan anlamlı fark bulunmamıştır ($p > 0.008$).

Tablo 9: IL 6 İçin Ortalama Değerler Ve Ortalama Standart Hata Değerleri

RAT	ORTALAMA IL 6 DEĞERLERİ	ORTALAMA STANDART HATA
GRUP 1: (İR)	59,8	$\pm 8,49$
GRUP 2: (sCR1)	33,3	$\pm 5,6$
GRUP 3: (İR+sCR1)	38,6	$\pm 8,6$
GRUP 4: (KONTROL)	30,3	$\pm 2,3$

Grafik 9: IL 6 İndeks Değerlerinin Gruplar Arası Karşılaştırılmalı Dağılımı



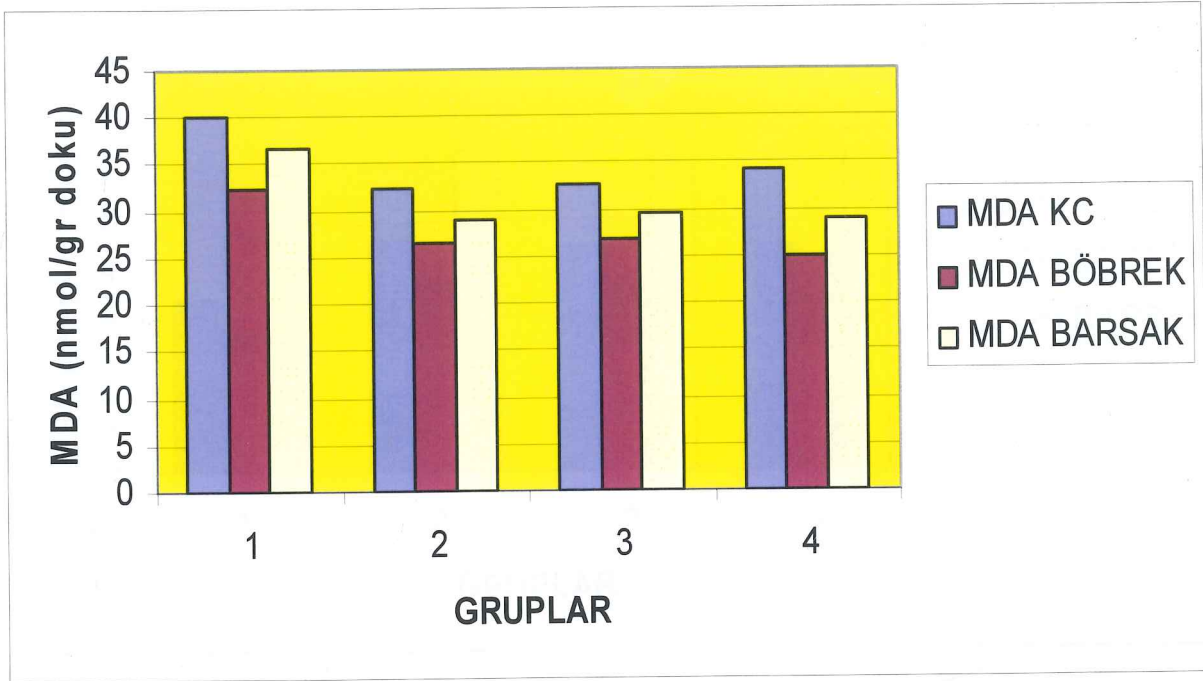
4.3. DOKUDA MDA VE GSH ANALİZİ

MDA için gruplar karaciğer, böbrek ve barsak dokuları açısından karşılaştırıldığında grup1 (İR) ile diğer gruplar (İR ile sCR1, İR+sCR1, Kontrol) arasındaki fark istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur ($p < 0.008$). Grup 2 (sCR1), Grup 3 (İR+sCR1) ve Grup 4 (Kontrol) ise kendi aralarında kc, böbrek ve barsak dokuları MDA düzeyleri arasında istatistiksel fark anlamlı bulunmamıştır ($p > 0.008$).

Tablo 10: Doku MDA Düzeyi İçin Ortalama Değerler Ve Ortalama Standart Hata Değerleri

RAT	MDA (nmol/g doku) ORTALAMA DEĞERLER	MDA (nmol/g doku) STANDART HATA
GRUP 1:(İR, KC)	40,21	± 1,7
(İR, BÖBREK)	32,58	± 1,5
(İR, BARSAK)	36,6	± 1,75
GRUP 2: (SCR1, KC)	32,3	± 1,4
(SCR1, BÖBREK)	26,6	± 1,8
(SCR1, BARSAK)	28,98	± 1,25
GRUP 3: (İR+SCR1, KC)	32,7	± 2,8
(İR+SCR1, BÖBREK)	26,8	± 1,48
(İR+SCR1, BARSAK)	29,58	± 2,24
GRUP 4: (KONTROL, KC)	34,1	± 0,98
(KONTROL, BÖBREK)	24,9	± 1,04
(KONTROL, BARSAK)	29,08	± 0,97

Grafik 10: Doku MDA Değerlerinin Gruplar Arası Karşılaştırılmalı Dağılımı

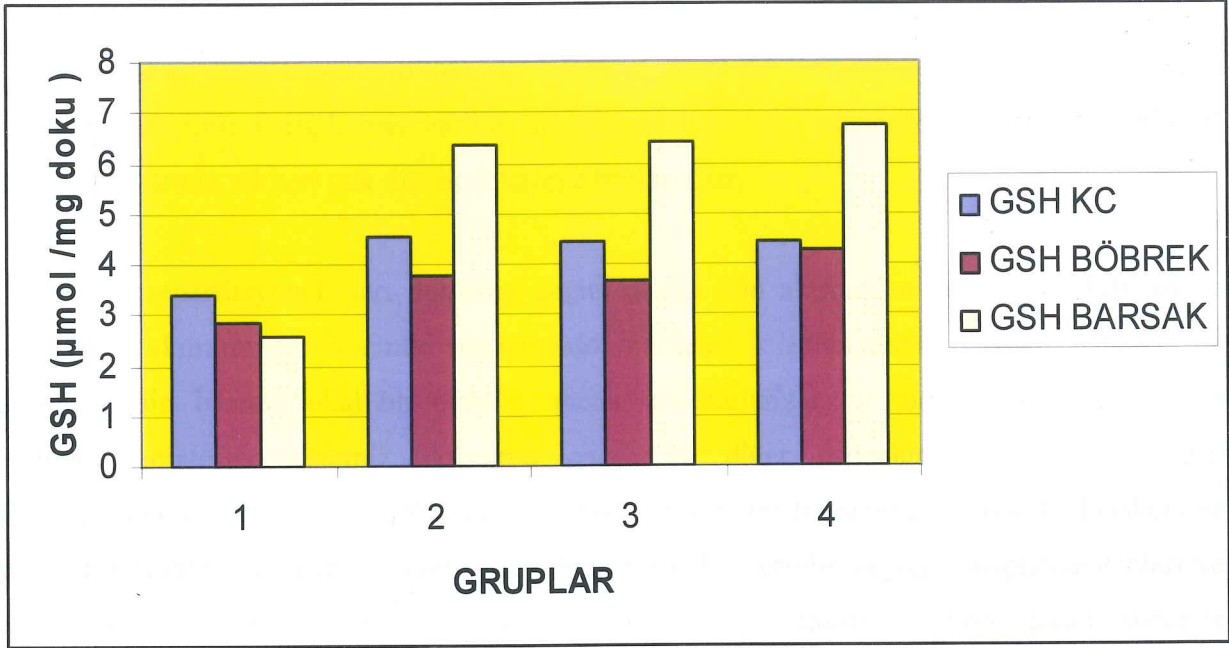


GSH için gruplar karaciğer ve barsak dokuları açısından karşılaştırıldığında grup1 (İR) ile diğer gruplar (İR ile sCR1, İR+sCR1, Kontrol) arasındaki fark istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur ($p < 0.008$). Grup 2 (sCR1), Grup 3 (İR+sCR1) ve Grup 4 (Kontrol) ise kendi aralarında kc ve barsak dokuları GSH düzeyleri arasında istatistiksel fark anlamlı bulunmamıştır ($p > 0.008$). Fakat GSH böbrek dokusunda tüm gruplar arasında istatistiksel açıdan anlamlı fark bulunmamıştır ($p > 0.008$).

Tablo 11: Doku GSH Düzeyi İçin Ortalama Değerler Ve Ortalama Standart Hata Değerleri

RAT	GSH ($\mu\text{mol/g doku}$) ORTALAMA DEĞERLER	GSH ($\mu\text{mol/g doku}$) STANDART HATA
GRUP 1 (İR, KC)	3,37	$\pm 0,51$
(İR, BÖBREK)	2,83	$\pm 0,45$
(İR, BARSAK)	2,56	$\pm 0,44$
GRUP 2: (SCR1, KC)	4,55	$\pm 0,39$
(SCR1, BÖBREK)	3,8	$\pm 0,33$
(SCR1, BARSAK)	6,39	$\pm 0,27$
GRUP 3: (İR+SCR1, KC)	4,43	$\pm 0,40$
(İR+SCR1, BÖBREK)	3,68	$\pm 0,46$
(İR+SCR1, BARSAK)	6,44	$\pm 0,46$
GRUP 4: (KONTROL, KC)	4,42	$\pm 0,2$
(KONTROL, BÖBREK)	4,28	$\pm 0,33$
(KONTROL, BARSAK)	6,78	$\pm 0,21$

Grafik 11: Doku GSH Değerlerinin Gruplar Arası Karşılaştırılmalı Dağılımı



5. TARTIŞMA

İntestinal ve diğer organların lokal İR hasarındaki etkileri bir çok çalışmada araştırılmış ve İR hasarı üzerinde kompleman inhibitörlerinin etkili olduğu gösterilmiştir. Son yıllarda İR hasarının sistemik etkileri çok dikkat çekmeye başlamıştır.

İskemi reperfüzyon hasarı dokunun geçici olarak kan akımından yoksun bırakılması ve takiben kan akımının geri dönmesi sonucu ciddi bir sistemik inflamatuvar cevabın başlaması ile karakterizedir. İskemi lokal bir olaydır, ancak revaskülarizasyon sonrası iskemik dokudan salınan mediatörler sistemik dolaşıma geçer ve diğer organları etkiler. Multiorgan disfonksiyonuna sebep olabileceğinden İR hasarı sistemik bir fenomendir. Organlarda iskemiye neden olan olayların başında; travma cerrahisi, vasküler cerrahi, organ transplantasyonları ve hemorajik şok gelmektedir. Kan akımının kesilmesini takiben ortaya çıkan sistemik disfonksiyonun nedeni reperfüzyon sonrası meydana gelen hücre hasarı ve organ hassasiyetinin artmasıdır (122,123). Sistemik hasara neden olan faktörler; SOR, lökosit migrasyonu ve aktivasyonu, sinüzoidal endotel hücre hasarı, mikrosirkülasyondaki düzensizlikler, koagülasyon sisteminin aktivasyonu ve kompleman sisteminin aktivasyonu olarak özetlenebilir.

İskemi reperfüzyon hasarında sistemik olarak kompleman sistemin hem klasik yolu hem de alternatif yolu aktive olur. Normal şartlar altında hücre membranında bulunan "Decay accelerating factor" ve membran kofaktör protein hücreyi kompleman saldırısına karşı korur. Reperfüzyon sırasında kompleman bağımlı proinflamatuvar peptidler (C3a-C5a) salınır. Bu peptidler de; nötrofil birikimine, düz kas hücrelerinde kasılmaya, vasküler permeabilitede artışa ve kupffer hücrelerinde aktivasyona yol açar (122,123,124). Reperfüzyon sırasında da hücre içi elemanlardan mitokondri membranları ve intermediate filamanlar komplemanın etkisine maruz kalır (125). Ayrıca endotel hücrelerinde fibrin depositler birikir, trombosit agregasyonu ve nötrofil adezyonu meydana gelir (126,122,124).

Nötrofiller bu sistemik etkide merkezi rolü oynar. Reperfüzyon sonrası iskemik dokudan eikozoidler, sitokinler, SOR ve kompleman aktivatörleri ortaya çıkar ve nötrofil ve endotel aktivasyonuna eden olur. Nötrofil aktivasyonu İR hasarının süresi ile ilişkilidir. Reperfüzyonun ilk dakikasında sistemik inflamatuvar reaksiyon tetiklenir, lokal ve sistemik ciddi mikrovasküler disfonksiyona neden olur.

İskemik dokunun reperfüzyonu ile sistemik sirkülasyona geçen ksantin oksidaz sirkülasyondaki substratlarla reaksiyona girerek ilk başta intravasküler Serbest Oksijen Radikalleri oluşturarak uzak organ hasarına neden olabilir. Ek olarak dolaşımdaki sitokinlerde uzak organlarda endotelial hücreleri aktive eder, artmış adezyon moleküllerinin salınımı aktive nötrofillerin endotel ile reaksiyona girmesine ve hasara neden olur.

En belirgin ve en çok araştırılmış uzak organ hasarı akciğerlerde görülür. Endotel hücrelerinden ATP depleasyonu, artmış vasküler permabiliteye, intraparankimal hemoraji ve nötrofil akümülyasyonu akciğerlerde görülür. Alt ekstremitelerde de oluşturulan İR hasarı sonrasında intestinal mukozada kalınlaşma, intestinal mukozal geçirgenlikte artış, bakteriyel translokasyonda artış, sistemik endotoksin konsantrasyonunda artış ve hepatik ve renal disfonksiyonda artıştır. SOR koruyucuları, ksantin oksidaz inhibitörleri, adezyon molekülleri veya sitokinlere karşı antikolar, araşidonik asit inhibitörleri ve kompleman inhibitörleri İR'in lokal ve sistemik etkilerinden korunmak için kullanılabilir. Mediatörleri bloklamak hem lokal, hem de sistemik etkileri önlemede faydalıdır.

Ratlarda bir saatlik intestinal iske mi villus epitelyum harabiyeti ve villus yükseklik kaybına neden olur. Kan akımının tekrar sağlanması mukozal hasarı arttır (15,16). Bu hasar intestinal nötrofil sekestrasyonuna ve reaktif oksijen radikallerine bağlanır. Buna göre hasarın derecesi nötrofil adezyon reseptörü olan CD18'e karşı antikolarla azaltılabilir. Belirgin lokal hasarın dışında sistemik TNF α ve IL 6'nın artışı, sistemik doku hasarına neden olur. Bizde çalışmamızda 60 dakikalık iske miyi takiben 4 günlük reperfüzyon hasarını inceledik.

Kompleman kaskadının inhibisyonu ile İR hasarının azaldığını ve fatal organ hasarının önlendiğini gösteren birçok çalışma yapılmıştır. Myokarda reperfüzyon sırasında kompleman aktivasyonunu gösteren bir çalışmada kompleman sisteminin sCR1 ile inhibe edilmiş ve iskemik myokard reperfüzyon hasarından efektif olarak korunmuştur (85). Takip eden çalışmalarda barsak ve böbrekte yapılan İR hasarı modellerinde kompleman sistemin anahtar rol oynadığı gösterilmiştir (85,89,127,128,129).

sCR1 CR1'in rekombinant çözünür formudur. Bu form hücredeki CR1'in fonksiyonlarını aynen yapar. Weissman ve arkadaşları sCR1'in faktör H'den (plazmada C3b'nin inaktivasyonundan sorumlu fizyolojik kofaktör) 100 kat daha efektif olduğunu

göstermişlerdir. Yapılan birçok çalışmada sCR1'in değişik İR modellerinde sCR1'in (Avant Immunotherapeutics Inc. Needham, MA) ortalama 15mg/kg dozunda iv yoldan kullanılarak iskemi oluşturulan ratlarda doku hasarını engellediği gösterilmiştir. Bizim çalışmamızda da sCR1 15mg/kg dozunda iv verildi. sCR1 verilmeyen gruplara ise iv ringer laktat verildi.

Kompleman aktivasyonunun etkilerini önlemek için daha önce yapılan çalışmalarda sCR1'in iskemi sonrası ve hemen reperfüzyon öncesi uygulanmasının reperfüzyon sonrası uygulanmasına göre hasarı azaltmakta daha etkili olduğu gösterilmiştir (130). Bu nedenle bizde sCR1'i iskemi oluşturduktan 60 dakika sonra yavaş infüzyon olarak gidecek şekilde intravenöz uyguladık.

Reperfüzyon iskemik dokuda ve sistemik olarak kompleman aktivasyonunu artırır. Kompleman kaskadının inhibisyonu post iskemik reperfüzyon dokularında ve reperfüzyon sonucu oluşan lokal ve sistemik inflamatuvar olayı azaltmaktadır. Bu çalışmadaki amacımız lokal ve uzak organ İR hasarında kompleman sistemi sCR1 ile baskılayarak, kompleman inhibisyonunun organ hasarını önlemedeki etkisini değerlendirmek, sonuçta lokal ve uzak organ hasarını en aza indirip fatal organ hasarından koruduğunu göstermektir.

Bu çalışmada İR'un barsakta ciddi mukozal hasar yarattığı görüldü. Bu dokudaki nötrofil sayısı, MDA ve GSH ile değerlendirildi. Barsaktaki ciddi mukozal hasarın ayrıca karaciğer ve böbrekte uzak organ hasarı yarattığı gösterildi. Uzak organ hasarı dokudaki nötrofil sayısı, MDA ve GSH düzeyleri ve organ biyokimyasal fonksiyon testleri ile değerlendirildi.

Nötrofil infiltrasyon ve aktivasyon parametresi olarak MPO boyanma özelliğine göre değerlendirildi. Sonuçlar incelendiğinde her üç dokuda da (Barsak, KC, Böbrek) gruplar arasında arasında belirgin bir fark olduğu görüldü. Sitoplazmik güçlü MPO pozitifliği gösteren nötrofil sayısı Grup 1'de anlamlı derecede yükselmiş ve bu da dokuda inflamasyonun belirgin olarak arttığını göstermiştir. İR+sCR1 grubundaki ratlarda ise kontrol grubuna göre yükselmekle beraber, İR grubuna göre daha az oranda yükseldiği, İR grubunun çok altında kaldığı ve bu farkında istatistiksel olarak anlamlı olduğu görüldü ($p < 0.008$). Sonuç olarak KC,

Böbrek ve Barsak dokularında kompleman inhibitörlerinin (sCR1) nötrofil infiltrasyonu ve aktivasyonunu engellediği ve reperfüzyon hasarından koruduğu gösterildi.

MDA sonuçlarımızın değerlendirilmesinde; Karaciğer, böbrek ve barsak dokularında MDA düzeyi İR oluşturulan grup ile sCR1, İR+sCR1, Kontrol grupları arasındaki fark istatistiksel olarak anlamlı yüksek bulunmuştur. Grup 2 (sCR1), Grup 3 (İR+sCR1) ve Grup 4 (Kontrol) ise kendi aralarında karaciğer, böbrek ve barsak dokuları MDA düzeyleri arasında istatistiksel fark anlamlı bulunmamıştır. Bu da sCR1 ile kompleman inhibisyonun İR sonrası dokularda oluşan lokal ve sistemik serbest oksijen radikallerine bağlı lipid peroksidasyon varlığını ve dolayısı ile hücre hasarını önlediğini göstermektedir.

Glutasyonun iskemi ve reperfüzyon hasarı sırasında konjugasyona uğrayarak tüketilmesi, hücre içi GSH düzeyinin düşmesine neden olur. Glutasyon miktarındaki azalma, hepatositlerdeki biyosentez veya ekzojen GSH alımı ile karşılanır. Hücre içi GSH'nın düşmesi erken dönemde hücrede adaptif yanıt oluşturarak GSH biyosentezini arttırmaktadır (131,132).

Yüksek GSH derişimi hücre fonksiyon ve canlılığının bir göstergesi olarak kabul edilir (133). Bunun aksine GSH derişiminin düşmesi hücre içi savunma sisteminin zayıflamasının ve mitokondrial hasarın belirteçlerinden olarak kabul edilir (114).

Çalışmamızda GSH düzeyleri karaciğer, böbrek ve barsak dokuları açısından karşılaştırıldığında karaciğer ve barsak dokuları açısından karşılaştırıldığında grup1 (İR) ile diğer gruplar (İR ile sCR1, İR+sCR1, Kontrol) arasındaki fark istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur ($p<0.008$). Grup 2 (sCR1), Grup 3 (İR+sCR1) ve Grup 4 (Kontrol) ise kendi aralarında karaciğer ve barsak dokuları GSH düzeyleri arasında istatistiksel fark anlamlı bulunmamıştır ($p>0.008$). Fakat GSH böbrek dokusunda gruplar arasında karşılaştırıldığında istatistiksel olarak anlamlı fark görülmedi ($p>0.008$).

Barsak dokusunda GSH ölçümlerinin iskemi grubunda (İR) düşük bulunması iskemi reperfüzyonun geç döneminde hücre içi reaktif oksijen metabolitlerinin artmasına bağlı mitokondrial hasarın betirteci olarak düşünülebilir. Ayrıca düşük GSH seviyesi mitokondrial ve sitoplazmik glutasyonu tüketilmesi ve apoptotik hücre ölümünün erken sinyalinin oluşturmaktadır. İR+sCR1 oluşturulan grupta GSH düzeyinin yüksek bulunmasını; sCR1'in hem nötrofillerin neden olduğu lipid peroksidasyonunu azaltarak hemde oksidatif stresi

azaltarak hücreyi özellikle de mitokondriyi İR'unun oluşturduğu lokal hasarından koruduğu şeklinde yorumladık. Ayrıca karaciğer dokusunda GSH düzeyi; İR oluşturulan grupta diğer gruplara göre daha düşük bulunmuştur ve iskemi reperfüzyon hasarı sonrası sCR1 verilen grup ile kontrol grupları arasında da istatistiksel bir fark bulunmamıştır ($p>0.008$). Böbrek dokusunda ise GSH düzeyleri arasında anlamlı fark bulunmamasının kanlanmanın aortadan direk olması toksik maddelerden ve oksidatif stresten daha geç etkileneceği şeklinde yorumladık sCR1 iskemi sonrası reperfüzyondan hemen önce uygulandığında sistemik olarak lipid peroksidasyonu ve oksidatif stresi azaltarak hepatositlerde oluşacak hasarı engellemektedir. Bu da bize sCR1'in sistemik olarak da dokularda nötrofillerin neden olduğu lipid peroksidasyonu engelleyerek iskemi sonrası sistemik reperfüzyon hasarından organizmayı koruduğu şeklinde yorumladık.

Sistemik organ hasarının karaciğer ve böbrek fonksiyonları üzerindeki etkileri değerlendirildiğinde hepatosit hasarı göstergesi olan AST ve ALT değerleri karşılaştırıldığında İR oluşturulan grup'da diğer gruplara göre AST ve ALT yüksek bulunmuştur. Bunu karaciğerin oluşan İR hasarından hepatositlerin indirekt olarak etkilendiği şeklinde yorumladık. Böbrek fonksiyonları açısından değerlendirilen BUN ve kreatinin düzeyi tüm gruplarda benzer bulunmuştur. Böbrek lokal oluşturulan İR hasarında karaciğer kadar etkilenmemiştir. Bunu karaciğerin İR hasarı oluşturulan barsak venöz drenajının direkt karaciğere etkisi şeklinde yorumladık. ALT ve BUN düzeyleri İR sonrası kompleman inhibitörü verilen grupla kontrol grubu karşılaştırıldığında aralarında istatistiksel anlamlı bir fark bulunmamıştır.

Doku hasarı ve inflamasyon sonucu serumda katabolizmaya bağlı olarak albumin azalmaktadır. Rat serumlarında albumin düzeyi İR oluşturulan grupta diğer gruplarla karşılaştırıldığında anlamlı olarak düşük bulunmuştur. İR+sCR1 grubunda ise serum albumin değerleri kontrol grubu ile karşılaştırıldığında anlamlı bir fark bulunmamıştır. Bu da sCR1'in doku hasarını ve inflamasyonu engellediğini göstermiştir. Total protein düzeyleri ise gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı fark görülmedi.

Sitokinler iskemi sonrası oluşan inflamatuvar yanıtta önemli rol oynamaktadırlar. Proinflamatuvar uyarıyı takiben ilk salınan sitokin TNF α 'ın dolaşımında kısa süreli bulunması bile önemli metabolik ve hemodinamik değişikliklerin gelişmesine ve döngünün sonraki basamaklarındaki sitokinlerin aktive olmasına neden olmaktadır. TNF α uyarısı ile IL 6

düzeşinin yükselmesi doku harabiyetinin boyutu ile korelasyon gösteren erken sensitif bir belirteç olarak görölmektedir. Bizim çalışmamızda İR oluşturduğumuz grupta TNF α ve IL 6 düzeyleri istatistiksel olarak anlamlı yüksek bulunmuştur. Grup 3 'de (İR+sCR1) TNF α ve IL 6 düzeyleri kontrol grubuna göre yüksek bulunmasına rağmen grup 1 (İR) ile karşılaştırıldığında sCR1'in, inflamatuvar yanıtın temel taşlarından olan ve doku harabiyetinin önemli bir göstergesi olan TNF α ve IL 6 düzeyini azalttığı, bu nedenle lokal ve sistemik olarak İR hasarını önlemede etkili olduğunu düşünmekteyiz.

Sonuç olarak İskemi lokal bir olaydır, ancak revaskularizasyon sonrası iskemik dokudan salınan mediatörler sistemik dolaşıma geçer ve diğer organları etkiler. Çoklu organ disfonksiyonuna sebep olabileceğinden İR hasarı sistemik bir fenomendir. Kompleman sistemi iskemi reperfüzyon sonrası lokal ve uzak doku hasarında önemli rol oynamaktadır. sCR1 ile kompleman sisteminin inhibisyonu oluşabilecek lokal ve uzak organ hasarını önlediği gösterilmiştir.

6. SONUÇLAR

Kompleman inhibitörünün iskemi reperfüzyon sonrasında lokal ve uzak organ hasarı üzerindeki rolünü ve tedavideki etkisini araştırmak amacıyla yaptığımız bu çalışmadan elde edilen sonuçlar:

1. İskemi lokal bir olay olduğu ancak revaskülarizasyon sonrası iskemik dokudan salınan mediatörlerin sistemik dolaşıma geçerek diğer organları etkilediği dolayısıyla İR hasarının sistemik bir fenomen olduğu doğrulanmıştır.
2. Kompleman sistemi iskemi reperfüzyon sonrası lokal ve uzak doku hasarı oluşumunda önemli rol oynadığı doğrulanmıştır.
3. İR hasarının önlenmesinde sCR1 uygulaması doku hasarı boyutunu azalttığı, iskemik doku alanında PMNL birikimini azalttığı, C5a üretimini baskılayarak lökosit adezyon reseptörlerinin salınımını ve lökosit kemotaksisini önlediği gösterilmiştir. Sonuç olarak direkt endotelial hasara neden olan C5b-9 kompleks oluşumu sCR1 tarafından baskılandığı doğrulanmıştır.
4. sCR1 verilmesi serumda TNF α ve IL 6 düzeylerini azaltarak inflamasyonu azalttığı gösterilmiştir.
5. Barsak İR hasarı sCR1 ile tedavi edildiğinde; mukozal hasarda ve damar permeabilitesinde azalma görülmüştür.
6. sCR1 oksidatif stresin indüklediği makrofaj hücrelerini bloke ederek koruyucu etki göstermiştir. Bu da lokal ve sistemik hücre hasarını azaltmış, fonksiyonlarını ve mikrovasküler perfüzyonunu iyileştirmiştir.
7. sCR1 ile kompleman inhibisyonu lokal ve uzak organ hasarını azaltarak morbidite ve mortaliteyi azaltıcı etkileri klinikte yararlı olabileceği söylenebilir.

7. KAYNAKLAR

- 1- Majino G, Joiris I. Apoptosis, oncosis and necrosis: An overview of the death cell. *Am J Pathol.* 146:3-9, 1995
- 2- Zimmerman BJ, Granger N. Reperfusion injury. *Surg Clin North Am.* 72:65-83, 1992
- 3- Grace PA, Mathie RT: Ischemia-reperfusion Injury. London, Blackwell Science, 1999.
- 4- Parks P, Granger DN, Contributions of ischemia reperfusion to mucosal lesions formation. *Am J Physiol* 250:G749-753, 1986
- 5- Harton JW, Walker PB; Oxygen radicals, lipid peroxidation and permeability changes after intestinal ischemia and reperfusion. *J Appl.* 74:1515-1520, 1993
- 6- Collard CD, Gehran S. Pathophysiology, clinical manifestations and prevention of ischemia reperfusion injury. *Anest* 94:1122-1138, 2001
- 7- Carden DL, Granger DN, Pathophysiology of ischemia reperfusion injury. *J Pathol,* 190:255-66, 2000
- 8- Chamoun F, Burne M, Rabb H, Pathophysiologic role of selectins and their ligands in ischemia reperfusion injury. *Front Biosci.* 5:E103-109, 2000.
- 9- Kirschfink M: Targeting complement in therapy. *Immunol Rev* 180:177-189, 2001
- 10- Jaeschke H., Farhood A., Smith C.W.: neutrophils contribute to ischemia-reperfusion injury in rat liver in vivo *FASEB J.* 4:3355-3359, 1990.
- 11- McGreal E, Gasque P. Structure-function studies of the receptors for complement C1q. *Biochem Soc Trans,* 30:1010-4, 2002.
- 12- Weisman HF, Bartow T, Leppo MK. Soluble human complement receptor type 1: in vivo inhibitor of complement suppressing post-ischemic myocardial inflammation and necrosis. *Science,* 249:146-51, 1990.
- 13- Shandelya SM, Kuppusamy P, Herskowitz A, Weisfeldt ML. Soluble complement receptor type 1 inhibits the complement pathway and prevents contractile failure in the postischemic heart. Evidence that complement activation is required for neutrophil mediated reperfusion injury. *Circulation,* 88:2812-26, 1993
- 14- Zacharowski K, Otto M, Hafner G, Marsh Jr HC, Thiernemann C. Reduction of myocardial infarct size with sCR1sLex, an alternatively glycosylated form of human sCR1, possessing sialyl Lewis x. *Br J Pharmacol* 128:945-52, 1999
- 15- Hill J, Lindsay TF, Ortiz F, Yeh CG, Hechtman HB, Moore Jr FD. sCR1 ameliorates the local and remote organ injury after intestinal ischemia/reperfusion injury in the rat. *J Immunol* 149:1723-8, 1992
- 16- Austen Jr WG, Kyriakides C, Favuzza J. intestinal ischemia/reperfusion injury is mediated by the membrane attack complex. *Surgery* 126:43-8, 1999
- 17- Jaeschke H, Farhood A, Bautista AP, Spolarics Z, Spitzer JJ. Complement activates kupffer cells and neutrophils during reperfusion after hepatic ischemia. *A J Physiol,* 264:G801-9, 1993.
- 18- Lehmann TG, Koepfel TA, Munch S, Impact of inhibition of complement by sCR1 on hepatic microcirculation after warm ischemia. *Microvasc Res,* 62:284-92, 2001
- 19- Pratt JR, Hibbs MJ, Laver AJ, Smith RA, Sacks SH. Allograft immune response with sCR1 intervention. *Transplant Immunol* 4:72-5, 1996
- 20- Stammberger U, Hamacher J, Hillinger S, Schmid RA. sCR1 sLe ameliorates ischemia/reperfusion injury in experimental lung transplantation. *J Thorac Cardiovasc Surg* 120:1078-84, 2000
- 21- Granger DN: Role of xanthine oxidase and granulocytes in ischemia-Reperfusion injury. *Am J Physiol* 255:1269-75; 1988

- 22- Granger DN: Ischemia-reperfusion: mechanisms of microvascular dysfunction and the influence of risk factors for cardiovascular disease. *Microcirculation*, 6:167-78; 1999
- 23- Neary P, Redmond HP: Ischaemia-reperfusion injury and the systemic inflammatory response syndrome. In: Grace PA, Mathie RT, eds. *Ischemia-Reperfusion Injury*. London, Blackwell Science, pp: 123-36, 1999.
- 24- Kvietyts PR, Granger DN: Endothelial cell monolayers as a tool for studying microvascular pathophysiology. *Am J Physiol*; 273:1189-99, 1997.
- 25- Parvums DV: The pathology of ischemia-reperfusion. In: Grace PA, Mathie RT, eds. *Ischemia-Reperfusion Injury*. London, Blackwell Science, pp: 3-19, 1999.
- 26- Grisham MB, Granger DN, Lefer DL: Modulation of leukocyte-endothelial Interactions by reactive metabolites of oxygen and nitrogen: relevance to ischemic heart disease. *Free Rad Biol*: 25:404-33, 1998.
- 27- Banda MA, Lefer DJ, Granger DN: Postischemic endothelium-dependent vascular reactivity is preserved in adhesion molecule deficient mice. *Am J Physiol*; 273:2721-5, 1997.
- 28- Kuo L, Davis MJ, Chilian WM: Endothelial modulation of arteriolar tone. *NIPS*; 7:5-9, 1992.
- 29- Harris NR, Granger DN: Neutrophil enhancement of reperfusion-induced capillary fluid alteration associated with hypercholesterolemia. *Am J Physiol*; 271:1755-61, 1996.
- 30- Skalak R, Skalak TC: Flow behavior of leukocytes in small tubes. In: Granger DN, Schmid-Schonbein GW, eds. *Physiology and Pathophysiology of Leukocyte Adhesion*. New York, Oxford University Press, pp: 97- 115, 1995.
- 31- Jerome SN, Kong L, Korthuis RJ: Microvascular dysfunction in postischemic skeletal muscle. *J Invest Surg* 1994;7:3-16.
- 32- Granger DN: Physiology and pathophysiology of the microcirculation. *Prog Cardiovasc Med*; 3:123-40, 1998.
- 33- Jerome SN, Kong L, Korthuis RJ: Microvascular dysfunction in postischemic skeletal muscle. *J Invest Surg*; 7:3-16, 1994.
- 34- Schoenberg M.H.; Beger H.G.: Reperfusion after intestinal ischemia. *Critical Care Medicine*; 21: 1376-1386, 1993
- 35- Haglung U.: Gut iskemia, *Gut* 1994; 1:73-76
- 36- Adams J.T. : Abdominal Wall, Omntum, Mesentry and retroperitoneum. Schwarz S.L., ed. *Prinsiples of Surgery*, sixth Edition, Vol.I, Mc Gram Hill, Inc. Health Professions Division, New- York, p. 1490-1505, 1994
- 37- Schwarz L:B., Grewetz B.L. : *The surgical Clinics of North America, Mezenteric Ischemia*. W.B. Saunders Company, Philedelphia 77:307-325,1997
- 38- O'Mara C.S, Ernst, C.B.: Acute mesenteric ischemia. Zuidema, G.D. ,ed. *Shackelford's Surgery of Alimentary Tract*, Fourt Edition, Vol 2, W. B. Saunders Company, Philelphia, p17-29, 1996
- 39- Boley S. J., Brandt L.J. : *The Surgycal Clinics of North America, Intestinal Iskemia* W.B. sunders Company, Philelphia, 27:65-83, 1992
- 40- Parks, D.A., Granger D.N. : Coutributions of ischemia & reperfusion to mucosal lesion formation. *Am. J. Physiol.*, 250:674, 1986
- 41- Carden DL, Young JA, Granger DN: Pulmonary microvascular injury after intestinal ischemiareperfusion: role of P-selectin. *J Appl Physiol*; 75:2529-34, 1993
- 42- Terada LS, Dormish JJ, Shanley PF, Leff JA, Anderson BO, Repine JE: Circulation xanthine oxidase mediates lung neutrophil sequestration after intestinal ischemia reperfusion. *Am J Physiol*; 263:394-401, 1992.

- 43- Liu DL, Jeppsson B, Hakansson CH, Odselius R: Multiple system organ damage resulting from prolonged hepatic inflow interruption. *Arch Surg*; 131:442-7, 1996.
- 44- Weinbroum AA, Nielson VG, Tan S: Liver ischemiareperfusion increases pulmonary permeability in rat: role of circulating xanthine-oxidase. *Am J Physiol*; 268:988-96, 1995
- 45- Collard C.D., Gelman S.: Pathophysiology, clinical manifestations, and prevention of ischemia-reperfusion injury. *Anest.* 94: 1133-1138, 2001.
- 46- Hillegas L.M., Griswold D.E., Brickson B., Albrghtson-Winslow C.: Assesment of myeloperoxidase activity in whole rat kidney. *J. Pharmacol. Methods*, 24: 285-295, 1990.
- 47- Fantini GA, Conte MS: Pulmonary failure following lower torso ischemia: clinical evidence for a remote effect of reperfusion injury. *Am Surg*; 61:316-9, 1995.
- 48- Barry MC, Wang JH, Kelly CJ, Sheehan SJ, Redmond HP, Bouchier-Hayes DJ: Plasma factors augment neutrophil and endothelial activation during aortic surgery. *Eur J Vasc Endovasc Surg*; 13:381-7, 1997.
- 49- Harward TR, Welborn MB 3rd, Martin TD: Visceral ischemia and organ dysfunction after thoracoabdominal aortic aneurysm repair: a clinical and cost analysis. *Ann Surg*; 223:729-34, 1996.
- 50- Neary P, Redmond HP: Ischaemia-reperfusion injury and the systemic inflammatory response syndrome. In: Grace PA, Mathie RT, eds. *Ischemia-Reperfusion Injury*. London, Blackwell Science, pp: 123-36, 1999.
- 51- Deitch EA, Xu D, Franko L, Ayala A, Chaudry IH: Evidence favoring the role of the gut as a cytokinegenerating organ in rats subjected to hemorrhagic shock. *Shock*; 1:141-5, 1994.
- 52- Livingston DH, Mosenthal AC, Deitch EA: Sepsis and multiple organ dysfunction syndrome: a clinicalmechanistic overview. *New Horizon* : 3:257-66, 1995.
- 53- Gallay P, Jongeneel CV, Barras C: Short time exposure to lipopolysaccharide is sufficient to activate human monocytes. *J Immunol*: 150:5086-93 1993.
- 54- Horton J. W., Walker P. B.: Oxygen radicals, lipid peroxidation, and permeability changes after intestinal ischaemia and reperfusion. *J. Appl.*, 74: 1515-1520, 1993.
- 55- Weight S. C., Bell P. R. F., Nicholson M. L.: Renal ischemia-reperfusion injury *Br. J. Surg.*, 83: 162-170, 1996.
- 56- Eppihimer MJ, Wolitzky B, Anderson DC, Labow MA, Granger DN: Heterogeneity of expression of E- and Pselectins in vivo. *Circ Res*: 79:560-9, 1996
- 57- Eppihimer MJ, Russell J, Anderson DC, Wolitzky BA, Granger DN: Endothelial cell adhesion molecule expression in genetargeted mice. *Am J Physiol*: 273:1903-8 1997.
- 58- Foulds S, Mireskandari M, Kalu P: Visceral ischemia and neutrophil activation in sepsis and organ dysfunction. *J Surg Res* 1998;75:170-6.
- 59- Upperman JS, Deitch EA, Guo W, Lu Q, Xu D: Posthemorrhagic shock mesenteric lymph is cytotoxic to endothelial cells and activates neutrophils. *Shock*: 10:407-14, 1998
- 60- Murray JF, Matthay MA, Luce JM, Fick MR: An expanded definition of the adult respiratory distress syndrome. *Am Rev Respir Dis*: 138:720-3, 1988.
- 61- Carden DL, Xiao F, Moak C, Willis BH, Robinson- Jackson S, Alexander S: Neutrophil elastase promotes lung microvascular injury and proteolysis of endothelial cadherins. *Am J Physiol*: 275:385-92, 1998.
- 62- Xiao F, Eppihimer MJ, Young JA, Nguyen K, Carden DL: Lung neutrophil retention and injury following intestinal ischemia-reperfusion. *Microcirculation*: 4:359-67, 1997.
- 63- Bulkley GB: Mesenteric vascular insufficiency. *Curr Probl Surg* 1997;34:943-90.

- 64- Granger DN, Korthuis RJ: Physiologic mechanisms of postischemic tissue injury. *Annu Rev Physiol*: 57:311-32, 1995.
- 65- Hendriks THLB, Vereecken WLEM, Hesp PHM, Schillings PHM, De Boer HHM. Loss of collagen from experimental intestinal anastomoses: early events. *Exp Mol Pathol*: 42:411-418, 1985.
- 66- Ladipo JK, Seidel SA, Bradshaw LA, Halter S, Wikswa JP Jr, Richards WO. Histopathologic changes during mesenteric ischaemia and reperfusion. *West Afr J Med*: 22:59-62, 2003.
- 67- Nielsen VG, Tan S, Baird MS, McCammon AT, Parks DA: Gastric intramucosal pH and multiple organ injury: impact of ischemia-reperfusion and xanthine oxidase. *Crit Care Med*: 24:1339-44, 1996.
- 68- Weinbroum AA, Nielson VG, Tan S: Liver ischemiareperfusion increases pulmonary permeability in rat: role of circulating xanthine-oxidase. *Am J Physiol*: 268:988-96, 1995.
- 69- Poggetti RS, Moore FA, Moore EE, Koeike K, Bannerjee A: Simultaneous liver and lung Injury following gut ischemia is mediated by xanthine oxidase. *J Trauma*: 32:723-7 1992.
- 70- Starnes HF, Warren RS, Jeevanandam M: Tumor necrosis factor and the acute metabolic response to tissue injury in man. *J Clin Invest*: 82:1321-5, 1988.
- 71- Colletti LM, Burtch GD, Remick DG: The production of tumor necrosis factor alpha and the development of a pulmonary capillary injury following hepatic ischemia/reperfusion. *Transplantation*: 49:268-72,1996.
- 72- Colletti LM, Kunkel SL, Walz A: Chemokine expression during hepatic ischemia/reperfusion-induced lung injury in the rat. The role of epithelial neutrophil activating protein. *J Clin Invest*: 95:134-41, 1995.
- 73- Xiao F, Eppihimer MJ, Willis BH, Carden DL: Complement mediated lung injury and Neutrophil retention following intestinal ischemia-reperfusion. *J Appl Physio*: 82:1459-65, 1995.
- 74- Helliwell TR, Wilkinson A, Griffiths RD, Palmer TE, McClelland P, Bone JM: Microvascular endothelial activation in the skeletal muscles of patients with multiple organ failure. *J Neurol Sci*: 21:26-54, 1998.
- 75- Witthaut R, Farhood A, Smith CW, Jaeschke H: Complement and tumor necrosis factor a contribute to Mac-1 (CD11b/CD18) up-regulation and systemic neutrophil activation during endotoxemia in vivo. *J Leukoc Biol*: 55:105-11, 1994.
- 76- Stevens JH, O'Hanley P, Shapiro JM: Effects of anti-C5a antibodies on the adult respiratory distress syndrome in septic primates. *J Clin Invest*: 77:1812-6, 1986
- 77- Olson LM, Moss GS, Baukus O, Das Gupta TK: The role of C5 in septic lung injury. *Ann Surg*: 202:771-61985.
- 78- Carden DL, Granger DN: Pathophysiology of ischemia-reperfusion injury. *J Pathol* 190:255-266, 2000.
- 79- Rose S, Floyd RA, Eneff K, Buhren V, Massion W: Intestinal ischemia: reperfusion mediated increase in hydroxyl free radical formation as reported by salicylate hydroxylation. *Shock* 1:452-456, 1994.
- 80- Shames BD, Barton HH, Reznikov LL, Cairns CB, Banerjee A, Harken AH, Meng X: Ischemia alone is sufficient to induce TNF-alpha mRNA and peptide in the myocardium. *Shock* 17:114-119, 2002.
- 81- Myers SI, Hernandez R, Turnage RH, Bartula L, Taylor-Kalley B: Resuscitation of ischemia/reperfusion with hyperalimentation increases intestinal PGI2 synthase (PS) content and PGI2 release. *Shock* 3:422-429, 1995.

- 82- Riedemann NC, Ward PA: Complement in ischemia reperfusion injury. *Am J Pathol* 162:363-367, 2003.
- 83- Schifferli JA., Peters DK. The role of complement and its receptor in the elimination of immune complexes. *N Engl J Med* 315:488-495, 1986.
- 84- Morgan BP. Complement regulatory molecules: Application to therapy and transplantation. *Immunol Today* 16:257-9, 1995.
- 85- Arumugam TV, Shiels IA, Woodruff TM, Granger DN, Taylor SM. The role of complement system in ischemia reperfusion injury. *Shock* 21:401-409, 2004
- 86- Link C, Hawlisch H, Meyer zu Vilserdorf A, Gyleruz S, Nagel E, Kohl J. Selection of phage-displayed anti-guinea pig C5 or C5a antibodies and their application in xenotransplantation. *Mol Immunol* 36:1235-47, 1999.
- 87- Buerke M, Murohara T, Lefer AM, Cardioprotective effects of a C1 esterase inhibitor in myocardial ischemia and reperfusion. *Circulation* 91:393-402, 1995
- 88- Atkinson C, Song H, Lu B. Targeting complement inhibition by C3d recognition ameliorates tissue injury without apparent increase in susceptibility to infection. *J Clin Invest* 115:2444-53, 2005.
- 89- Fleming SD, Mastellos D, Karpel-Massler G, Shea Donohue T. C5a causes limited, polymorphonuclear cell-independent, mesenteric ischemia-reperfusion induced injury. *Clin Immunol*, 108:263-73, 2003.
- 90- Arumugam TV, Woodruff TM, Stocks SZ. Protective effects of a human C5a receptor antagonist against hepatic ischemia-reperfusion in rats. *J Hepatol*, 40: 934-41, 2004
- 91- Thorsten G. Lehmann, Thomas A. Koeppel, Steffen Munch, Michael Heger, Michael Kirschfink, Ernst Klar and Stefan Post. Impact of Inhibition of Complement by sCR1 on Hepatic Microcirculation after Warm Ischemia, *Microvascular Research* 62:284-292, 2001.
- 92- Straatsburg IH, Boermeester MA, Wolbink GJ. Complement activation induced by ischemia-reperfusion in humans: a study in patients undergoing partial hepatectomy. *J Hepatol*, 32:783-91, 2000.
- 93- Lehmann TG, Heger M, Munch S, Kirschfink M, Klar E. In vivo microscopy reveals that complement inhibition by C1-esterase inhibitor reduces ischemia-reperfusion injury in the liver. *Transpl Int*, 13:S547-50, 2000
- 94- Storini C, Rossi E, Marrella V., C1-inhibitor protects against brain ischemia-reperfusion injury via inhibition of cell recruitment and inflammation. *Neurobiol Dis*, 19:10-7, 2005.
- 95- Marco Cicardi, Lorenza Zingale, Andrea Zanichelli, Emanuela Pappalardo, Benedetta Cicardi: C1 inhibitor molecular and clinical aspects; *Springer semin Immunol* 27: 286-298, 2005.
- 96- Horstick G, Berg O, Heimann A, Gotze O, Loos M, Hafner G. Application of C1-esterase inhibitor during reperfusion of ischemic myocardium: dose-related beneficial versus detrimental effects. *Circulation*, 104:3125-3131, 2001.
- 97- Lehmann TG, Heger M, Munch S, Kirschfink M, Klar E. In vivo microscopy reveals that complement inhibition by C1-esterase inhibitor reduces ischemia/reperfusion injury in the liver. *Transpl Int* 13:S547-S550, 2000.
- 98- Scherer M, Demertzis S, Langer F, Moritz A, Schafers HJ. C1-esterase inhibitor reduces reperfusion injury after lung transplantation. *Ann Thorac Surg* 73:233-238, 2002.
- 99- Bergamaschini L, Gatti S, Caccamo L, Prato P, Latham L, Trezza P. C1 inhibitor potentiates the protective effect of organ preservation solution on endothelial cells during cold storage. *Transplant Proc* 33:939-941, 2001

- 100- Bergamaschini L, Gobbo G, Gatti S, Caccamo L, Prato P, Maggioni M. Endothelial targeting with C1-inhibitor reduces complement activation in vitro and during ex vivo reperfusion of pig liver. *Clin Exp Immunol* 126:412-420, 2001
- 101- Zvi Symon, M.D., Micha Levi, M. Sc., William D. Ensminger, M. D., Selective radioprotection Of Hepatocytes By Systemic And Portal Vein Infusions Of Amifostine In A Liver Tumor Model. *Virchows Arch.* 431: 119-124, 1997.
- 102- Fernandez-Checa JC, Kaplowitz N. Hepatic mitochondrial glutathione: transport and role in disease and toxicity. *Toxicol Appl Pharmacol.* 204: 263-73, 2005.
- 103- Ault J G, Lawrance D A. Glutathione distubation in normal and oxidatively stressed cells. *Exp Cell.* 285: 9-14, 2003.
- 104- Patel T, Gores GJ. Apoptosis and hepatobiliary disease. *Hepatology.* 21: 1725-1741, 1995.
- 105- Bayramiçli M. Deneysel Mikrocerrahi Temel Araştırma, Doku ve Organ Nakli Modelleri; 227-228, 2005.
- 106- Bluege J A, Aust S D. Microsomal lipid peroksidation. *Methodts Enzymol.* 52: 302-310, 1978.
- 107- Jaeschke H. Moleculer mechanisms of hepatic ischemia reperfusion injury and preconditioning. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol.* 125: 917-36, 2003.
- 108- Terada T, Nakanuma Y. Detection of apoptosis and expression of apoptosis-related roteins during human intrahepatic bile duct development. *Am J Pathol.* 146: 67-74, 1995.
- 109- Ronen R L, Esther S. Cerebral ischemia and trauma-different etiologies yet similar mechanisms. *Neuropotective opportunities.* 39: 55-73, 2002.
- 110- Ballotori N, Hammond C L, Krance S M. Molecular mechanism of reduced glutathione transport: Role of the MRP/ CFTR / ABCC and OATP / SCL21A families of membrane proteins, *Toxicol App Pharmacol,* 204: 238-255, 2005.
- 111- Shaw L. A-phase Study Comparing Bioavialability of intra-venous and Subcutaneous Administration of Amifostine. *Proc Am Soc Clin Oncol.* 16: 250, 1997.
- 112- Patel T, Gores GJ. Apoptosis and hepatobiliary disease. *Hepatology.* 21: 1725-1741,1995.
- 113- Carecani P, Rosenbulum E.R, Van Thiel D. H., Reoxygenation Injury in Isolated Rat Hepatocytes: Relation to Oxigen Free Radicals and Lipid Peroxidation *Am J. Physiol:* 266-806, 1994.
- 114- Foschi D., Castoldi L., Lesma A., Musazzi M., Effects of Ischemia and Reperfusion on Liver Regeneration in Rats. *Eur I Surg:* 159:393-398, 1993
- 115- Niki E. Antioxidant in Relation to Lipid Peroxidation. *Chem. Phy Lipids:*44, 227-253, 1987.
- 116- Porter N.A. Chemistry of Lipid Peroxidation, *Methods in Enzymology:*105, 273-283, 1984.
- 117- Grace PA. Ischaemia-reperfusion injury. *British J of Surgery:*81: 637-647, 1994.
- 118- Lin E, Lowry SF, Calvano SE. The systemic response to injury. Schwartz SI (ed), *Principles of Surgery.* Mc Graw-Hill 7th Edition: Vol I: 13-32, 1999.
- 119- Sun Z, Wang X, Lasson A, Bojesson A, Annborn M, Andersson R. Effects of inhibition of PAF, ICAM-1 and PECAM-1 on gut barrier failure caused by intestinal ischemia and reperfusion. *Scand J Gastroenterol:* 36;1: 55-65, 2001.
- 120- Engelmann H, Aderka D, Rubinstein M, Rotman D, and Wallach D, (1989), *I. Biol Chem* 264;11974-11980.
- 121- Seckinger P, Kaaz S, and Dayer JM. (1988) *I. Exp Med* 167, 1511-1516.
- 122- Thorsten G. Lehmann, Thomas A. Koepfel, Steffen Münch, Michael Heger, Michael Kirschfink, Ernst Klar and Stefan Post. Impact of Inhibition of Complement by sCR1

- on, Hepatic Microcirculation after Warm Ischemia, *Microvascular Research* 62:284-292, 2001.
- 123- Vollmar B, Glasz J, Leiderer R, Post S, Menger MD, Hepatic microcirculatory perfusion failure is a determinant of liver dysfunction in warm ischemia reperfusion. *Am J Pathol*, 145:1421-1431, 1994.
 - 124- Platt JL, Dalmaso AP, Lindman BJ, Ihrcke NS, Bach FH, The role of C5a and antibody in the release of heparan sulfate from endothelial cells . *Eur J Immunol* 21:2887-2890, 1991.
 - 125- Marco C, Lorenza Z, Andrea Z, Emanuela P, Benedetta C. C1 inhibitor: molecular and clinical aspects, *Springer Semin Immun* 27:286-298, 2005.
 - 126- Chavez-Cartaya R.E., DeSola G.P., Wright L., Jamieson N.V.: regulation of the complement cascade by soluble complement receptor type 1. Protective effect in experimental liver ischemia and eperfusion. *Transplantation* 59:1047-1052, 1995.
 - 127- Stahl GL, Xu Y, Hao L. Role of alternative complement pathway in ischemia reperfusion injury. *Am J Pathol* 162:449-455, 2003.
 - 128- Hart MI, Coenzo KA, Shaffer LA, Gastrointestinal ischemia-reperfusion injury is lectin complement pathway dependent without involving C1q. *J Immunol*, 174:6373-80, 2005.
 - 129- Arumugam TV, Shiels IA, Strachan AJ, Abbenante G, Fairlie DP, Taylor SM. A small molecule C5a receptor antagonist protects renal ischemia-reperfusion injury in rats. *Kidney Int*, 63:134-42, 2003.
 - 130- Haglind E, Haglund U, Lundgren O, Stenberg B. Mucosal lesions of the small intestine after intestinal vascular obstruction in the rat. *Acta Chir Scand*: 151:147-50, 1985.
 - 131- Jaeschke H. Molecular mechanisms of hepatic ischemia reperfusion injury and preconditioning. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*. 125: 917-36, 2003.
 - 132- Patel T, Gores GJ. Apoptosis and hepatobiliary disease. *Hepatology*. 21: 1725-1741, 1995.