

T.C
ESKİŞEHİR OSMANGAZİ ÜNİVERSİTESİ
TIP FAKÜLTESİ

İLOPROSTUN DENEYSEL İSKEMİ-REPERFÜZYON
MODELİNDE GASTROKNEMİUS KASI HASARI ÜZERİNE
KORUYUCU ETKİSİ

Dr. Elif GÜNEYSU

Kalp ve Damar Cerrahisi Anabilim Dalı

TIPTA UZMANLIK TEZİ

ESKİŞEHİR

2014

T.C
ESKİŞEHİR OSMANGAZİ ÜNİVERSİTESİ
TIP FAKÜLTESİ

İLOPROSTUN DENEYSEL İSKEMİ-REPERFÜZYON MODELİNDE
GASTROKNEMİUS KASI HASARI ÜZERİNE KORUYUCU ETKİSİ

Dr. Elif GÜNEYSU

Kalp ve Damar Cerrahisi Anabilim Dalı

TIPTA UZMANLIK TEZİ

TEZ DANIŐMANI

Prof.Dr. M.Behçet SEVİN

ESKİŞEHİR

2014

TEZ KABUL VE ONAY SAYFASI
T.C.
ESKİŞEHİR OSMANGAZİ ÜNİVERSİTESİ
TIP FAKÜLTESİ DEKANLIĞINA,

Dr. Elif GÜNEYSU' ya ait "İloprostun Deneysel İskemi-Reperfüzyon Modelinde Gastroknemius Kası Hasarı Üzerine Koruyucu Etkisi" adlı çalışma jürimiz tarafından Kalp ve Damar Cerrahisi Anabilim Dalı' nda Tıpta Uzmanlık Tezi olarak oy birliği ile kabul edilmiştir.

Tarih:/...../2014

Jüri Başkanı Prof.Dr. M. Behçet SEVİN
Kalp ve Damar Cerrahisi Anabilim Dalı

Üye Prof.Dr. Bülent TÜNERİR
Kalp ve Damar Cerrahisi Anabilim Dalı

Üye Prof.Dr. Sadettin DERNEK
Kalp ve Damar Cerrahisi Anabilim Dalı

Eskişehir Osmangazi Üniversitesi Tıp Fakültesi Fakülte Kurulu'nun
.....Tarih veSayılı Kararı ile Onaylanmıştır

Prof.Dr. Enver İHTİYAR
Dekan Vekili

TEŞEKKÜR

Uzmanlık eğitimim süresince en iyi şekilde yetişebilmem için bilgi ve deneyimlerini esirgemeyen, eğitimime tecrübeleriyle bana destek veren başta tez danışmanım Prof.Dr. M. Behçet SEVİN olmak üzere tüm hocalarıma,tezimin gerçekleşmesinde yardımlarını esirgemeyen Prof. Dr. Kubilay UZUNER 'e, Prof. Dr. İbrahim Özkan ALATAŞ 'a,Yrd.Doç. Atacan Emre KOÇMAN 'a, Uzm.Dr. Orhan ÖZATİK 'e ve Araş. Gör. Betül CAN 'a teşekkür ederim.

ÖZET

Güneysu, E. İloprostun Deneysel İskemi Reperfüzyon Modelinde Gastrokinemius Kası Hasarı Üzerine Koruyucu Etkisi .Eskişehir Osmangazi Üniversitesi Fakültesi Kalp Ve Damar Cerrahisi Anabilim Dalı Tıpta Uzmanlık Tezi,Eskişehir, 2014.

Bu deneysel çalışmamızda ki amacımız rat alt ekstremitte iskemi reperfüzyon sonrası gastrokinemius kasında oluşan iskemi-reperfüzyon hasarına iloprostun koruyucu etkisini araştırmaktır.

Çalışmamızda 24 adet Wistar Albino cinsi rat kullanıldı. Ratlar randomize olarak, eşit sayıda (n=8) üç gruba ayrıldı. Grup 1' de (sham) 6 saat süresince sadece anestezi uygulandı. Grup 2' de (kontrol) ve grup 3' de (İloprost tedavi grubu) anestezi verildikten sonra, turnike yöntemiyle ratların sağ arka ekstremitelerine, kalça eklemi hizasından turnike uygulanılarak 3 saat iskemi ve turnike açılarak 3 saat reperfüzyon uygulandı. Grup 3' te reperfüzyondan 30 dakika önce sağ internal juguler venden iv 20 µg/kg dozda iloprost infüzyonu başlandı. İnfüzyon reperfüzyon süresince devam etti.

Deney sonunda tüm gruplardan biyokimyasal analizler için kan örneği ve immünohistokimyasal değerlendirme için gastrokinemius kas doku örnekleri alındı. Alınan kan örneklerinde TNF- α , IL-1, IL-6 plazma düzeyleri ölçüldü. Gastrokinemius kas doku örnekleri formaldehit ile fikse edildi. Alınan kas dokudan biyokimyasal olarak MDA ve katalaz düzeyleri, histolojik olarak ışık mikroskobu altında hemotoksilen eosin ile genel doku değerlendirilmesi ve immünohistokimyasal olarak kaspaz tayini yapıldı.

Biyokimyasal inceleme sonuçlarına göre İR grubunda (grup 2) kas dokusunda MDA, serumda TNF- α ve IL-1 düzeyleri tedavi grubuna (grup 3) göre anlamlı derecede düşük bulunurken; kas dokusunda katalaz,serumda IL-6 düzeylerinde anlamlı fark bulunamamıştır. Kaspaz -3 immünohistokimyasal sonuçlarımıza göre ise İloprost iskelet kasında İR hasarının meydana getirdiği apoptozise karşı korumaktadır.

Anahtar Kelimeler: iskemi /reperfüzyon, iloprost, kaspaz, sitokin

ABSTRACT

Güneysu, E. Protective Effect Of İloprost İn Experimental İschemia-Reperfusion Model On To Gastrocnemius Muscle Damage.Eskişehir, 2014

Totally, 24 Wistar Albino-type rat were used in the present study. Rats were randomly divided into three groups (ne=8 in each group). Group 1 (sham) received only anaesthesia for 6 hours. In Group 2 (control) and Group 3 (İloprost treatment group), ischemia was generated by tourniquet method applying the tourniquet onto right back extremities at the level of hip joint for 3 hours after anaesthesia, then reperfusion was completed releasing the tourniquet for 3 hours. Intravenous 20 µg per kilogram infusion was started into right internal jugular vein 30 min before reperfusion in Group 3. The infusion continued during reperfusion.

At the end of the experiment, blood sample for biochemical analysis and gastrocnemius muscle tissue sample for immunohistochemical assessment were obtained in all groups. Tumour necrosis factor- α , IL-1 and IL-6 plasma levels were measured. Gastrocnemius muscle tissue samples were fixed into formaldehyde. Biochemical MDA and catalase levels were measured, histopathologic tissue assessment was performed with hematoxylin eosin under light microscope and immunohistochemical caspase was determined.

According to the biochemical assessments of ischemia-reperfusion groups, while serum TNF- α and IL-1 levels and MDA levels into muscle tissue were significantly lower in Group 2 compared to Group 3, there was no significant difference in serum IL-6 and catalase into muscle tissue between the groups. Based on our immunohistochemical caspase-3 results, iloprost protects the skeletal muscle against the apoptosis result from IR.

Key Words: ischemia/reperfusion, cytokine,caspaze

İÇİNDEKİLER

	Sayfa
TEZ KABUL VE ONAY SAYFASI	iii
TEŞEKKÜR	iv
ÖZET	v
ABSTRACT	vi
İÇİNDEKİLER	vii
SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ	viii
ŞEKİLLER DİZİNİ	x
TABLolar DİZİNİ	xii
1.GİRİŞ	1
2.GENEL BİLGİLER	3
2.1.İskemi	3
2.1.1.Geri Dönüşümlü Hasar	3
2.1.2.Geri Dönüşümsüz Hasar	5
2.2.Reperfüzyon	8
2.3.İskemi Reperfüzyon Hasarı Mekanizmaları	11
2.3.1.Serbest Oksijen Radikalleri	12
2.3.2.İskemi Reperfüzyon Hasarında Polimorfonükleer Lökosit ve Endotel Hücrelerinin Rolü	14
2.3.3.Trombositlerin Rolü	20
2.4.Apopitoz	21
2.5.İskemi Reperfüzyon Sonrası Oluşan İskelet Hasarının Patofizyolojisi	23
2.5.1.Mikrodolaşımda Meydana Gelen Değişiklikler	24
2.5.2.İskelet Kasında Meydana Gelen Lokal İnflamatuar Cevap	25
2.6.İskemi Reperfüzyon Hasarında Tedavi Seçenekleri	26

2.6.1.İskemik ön koşullanma	26
2.6.2.Antioksidan tedavi	28
2.6.3.Antilökosit tedavi	29
2.6.4.Antitrombotik tedavi	29
2.7.İloprost	30
2.7.1.Farmakodinamik Özellikler	30
2.7.2.Farmakokinetik Özellikler	35
2.7.3.İloprost Klinik Kullanım Alanları	37
2.7.4.İloprost Uygulama Şekli ve Dozu	39
2.7.5.İloprostun Kontraendiksyonları	40
2.7.6.İloprostun Yan Etkileri	41
3.GEREÇ VE YÖNTEM	42
3.1.Deney Gruplarının Hazırlanması ve Operasyon Tekniği	42
3.2.Deney Protokolü	43
3.2.1.Anestezi Ve Cerrahi Hazırlama	43
3.2.2.Tedavi Protokolü	45
3.2.3.Ötanazi Protokolü Ve Doku Örneklerinin Toplanması	45
3.3.Biyokimyasal İncelemeler	46
3.3.1.Serum TNF- α , IL-1 VE IL-6 Düzeylerinin Belirlenmesi	46
3.3.2.Doku MDA ve Katalaz Düzeylerinin Değerlendirilmesi	47
3.4.Morfolojik Analizler	47
3.4.1.Işık Mikroskobu	47
3.4.2.Kaspaz-3	48
3.5.İstatiksel Analiz	48

4.BULGULAR	49
4.1.Biyokimyasal Analiz	49
4.2.Histopatolojik İnceleme	54
5.TARTIŞMA	60
6.SONUÇ VE ÖNERİLER	66
KAYNAKLAR	67

SİMGELER VE KISALTMALAR

AA: Araşidonik asit

AMP: Adenozin monofosfat

ATP: Adenozin trifosfat

C5a: Kompleman faktor 5a

Ca: Kalsiyum

CAT: Katalaz

CK: Kreatinin kinaz

COX: Siklooksijenaz

DNA: Deoksiribonükleik asit

GER: Granüllü endoplazmik retikulum

GSH: Glutasyon

GSH-Px : Glutasyon peroksidaz

GR: Glutasyon redüktaz

H₂O₂ : Hidrojen peroksit

IL: İnterlökin

İCAM-1: İnterselüler adhezyon molekülü -1

İR: İskemi reperfüzyon

K: Potasyum

KAT: Katalaz

LDH: Laktat dehidrojenaz

LOO-: Lipid peroksit radikali

LT: Lökotrien

MDA: Malondialdehit

MODS: Multiple organ disfonksiyon sendromu

Na: Sodyum

NADP: Nikotinamid adenin dinükleotid fosfat

NO: Nitrik oksit

NOS: Nitrik oksit sentaz

NF- κ B: Nükleer faktör-kappa B

O₂⁻: Süperoksit radikali

OH⁻: Hidroksil radikali

PAF: Platelet activating factor = Trombosit aktive edici faktör

PECAM-1: Platelet endothelial cell adhesion molecule-1=Trombosit endotel hücre adhezyon molekülü-1

PMNL: Polimorf nüveli lökositler

PG: Prostaglandin

ROT: Reaktif oksijen türevleri

SRT: Serbest radikal toplama

SOD: Süperoksit dismutaz

SOR: Serbest oksijen radikalleri

TNF- α : Tümör Nekrozis Faktör-alfa

TxA₂: Tromboksan A₂

VCAM-1: Vasküler adhezyon molekülü-1

XD: Ksantin dehidrojenaz

XO: Ksantin oksidaz

ŞEKİLLER

Şekil 2. 1. Hücre zedelenmesinde hücre içi kasiyum artışı ve sonuçları	5
Şekil 2.2: İskemide membran hasarının mekanizmaları	6
Şekil 2.3: İskemik zedelenmede olaylar dizisi	7
Şekil 2.4: Apopitozis- Nekroz Mekanizması	22
Şekil 2.5: İloprost un kimyasal yapısı	36
Sekil 2.6: İloprost Metabolizması	36
Sekil 2.7: İloprostun mikrodoloşım üzerine etkileri	38
Şekil 3.1 : sol juguler venden kataterizasyon	44
Şekil3.2:İskemi uygulanan sol alt ekstremitedeki renk değişimi(morarma)	45
Şekil 4.1: MDA(kas)'nın gruplar arası değerlerinin grafiksel analizi	50
Şekil 4.2: CAT(kas)'ın gruplar arası değerlerinin grafiksel analizi	51
Şekil 4.3: TNF- α 'nın gruplar arası değerlerinin grafiksel analizi	52
Şekil 4.4: IL-1'in gruplar arası değerlerinin grafiksel analizi	53
Şekil 4.5: IL-6'in gruplar arası değerlerinin grafiksel analizi	54
Şekil 4.6: Sham grubuna ait deneklerin gastrokinemiyus kası ışık mikroskopik görünümüleri	55
Şekil 4.8:Kontrol grubuna ait deneklerin gastrokinemius kası ışık mikroskopik görünümüleri	56
Şekil 4.8:İR+İloprost grubuna ait deneklerin gastrokinemius kası ışık mikroskopik görünümüleri	56
Şekil 4.9 : Total histolojik hasar skorlarının gruplar arası değerlerinin grafiksel analizi	57
Şekil 4.10 :Sham grubunun İR+İloprost grubunun Gastroknemius kas kesitlerinde immunohistokimyasal olarak Kaspaz-3 ile boyanma özellikleri	57

TABLULAR

Tablo 3.1: Deney grupları ve uygulanan işlemler	43
Tablo 4.1: Tüm gruplara ait malondialdehid sonuçları	49
Tablo 4.2: Tüm gruplara ait Katalaz sonuçları	50
Tablo 4.3: Tüm gruplara ait TNF- α sonuçları	51
Tablo 4.4: Tüm gruplara ait IL-1 sonuçları	52
Tablo 4.5: Tüm gruplara ait IL-6 sonuçları	53
Tablo 4.6: Tüm gruplara ait Total histolojik hasar skorlarının sonuçları	56
Tablo 4.7: Tüm gruplara ait Kaspaz-3 ölçümlerinin sonuçları	59

1.GİRİŞ

İskemi reperfüzyon hasarı klinik veya moleküler düzeyde pek çok basamağı tam olarak çözümlenememiş, karmaşık ve birden fazla faktöründe rol oynadığı fizyopatolojik bir süreçtir. Bu hasarın yol açtığı lokal doku hasarı ve sistemik etkileri, cerrahide önemli bir problem olarak karşımıza çıkmaktadır.

Bir organa gelen kan akımının çeşitli nedenlerle (cerrahi işlemler,tromboz,hipovolemi,transplantasyon gibi) yetersiz olması veya durmasına iskemi denir. İskemi, iskemi reperfüzyon hasarının ilk kısmını oluşturmakta olup metabolizmanın anaerobik tarafa kayması ile karakterizedir. Oksijenlenmenin yeniden başlamasına ise reperfüzyon denir. Anaerobik metabolizma sonucu oluşan metabolitler reperfüzyonla birlikte oksitlenerek dolaşıma karışırlar ve uzak organ hasarından sorumlu olurlar. İskemik kalan canlı dokuda kan akımının yeniden başlamasıyla meydana gelen reperfüzyon sürecinin zararlı etkileri, iskemik hasardan daha geniş çaplı ve daha ciddidir (2).

İskemi reperfüzyon hasarı; oksidan oluşumunun artması,kompleman aktivasyonu, lökosit-endotel-trombosit adhezyonu, mikrovasküler geçirgenlikte artış, endotel bağımlı vazodilatasyon disfonksiyonu, serbest oksijen radikalleri ve inflamatuvar moleküllerin (TNF- α , IL-1,IL-6) artışı ile karakterizedir. Reperfüzyon sonrası iskemik dokuya sürekli lökosit göçü , iskemi reperfüzyona bağlı doku hasarının devamını ve genişlemesini sağlar. Reperfüzyon sonrası iskemik dokuda biriken ilk hücreler trombositler olup endotel aktivasyonu ve lökosit birikimine katkıda bulunurlar. İskelet kası iskemi reperfüzyon hasarlanmasındaki inflamatuvar yanıt baskılandığında, oluşacak organ hasarının da azalacağı düşünülmektedir (4).

İskemiye bağlı hasarın şiddeti, hipoperfüzyonun süresi ve miktarı ile orantılı olup, hücrenin tipi, differansiyasyonu, travmaya karşı hassasiyeti, kan ihtiyacı ve metabolizmasına göre farklılık gösterir. Dokuların iskemiye olan duyarlılıkları da farklılık gösterir. İskemiye en hassas dokular iskelet kası ve barsak mukozasıdır. Bu nedenden dolayı iskelet kası alt ekstremitte iskemi reperfüzyon hasarında önemli rol

oyun ve prognoz kas hasarı miktarına bağlıdır. Reperfüzyonla oluşmuş inflamatuvar yanıt, geri dönüşümlü zedelenme miktarı ile doğru, nekrotik kas miktarı ile ters orantılıdır (6).

İskemi reperfüzyon hasarı; serebrovasküler hadiseler, myokard infarktüsü, şok,sepsis,yanık, travma gibi birçok hastalık ve trombolitik tedavi, koroner anjioplasti, transplantasyon, kardiyopulmoner bypass, anevrizma cerrahisi,periferik arter cerrahisi gibi medikal ve cerrahi girişimler için ortak klinik tablodur. Akut ekstremite iskemisi kollateral damarların gelişmiş olduğu kronik ateroskleroz durumunda bile oldukça ciddi morbidite ve mortaliteye neden olabilen klinik bir sorundur. Akut iskemiyeye yol açan neden ortadan kaldırılıp reperfüzyon sağlanılsa bile mortalite ve morbidite riski devam etmektedir (1).

Çalışmamızın amacı alt ekstremite iskemisi reperfüzyon hasarı sonrası iloprostun gastrokinemius kasında oluşan hasara koruyucu etkilerini araştırmaktır. Bu nedenle, rat kan örneklerinde TNF- α , IL-1, IL-6 plazma düzeyleri, kas dokuda MDA, katalaz düzeyleri ve immünohistokimyasal olarak kaspaz ölçümü değerlendirilmesi yapıldı.

2.GENEL BİLGİLER

2.1.İskemi

İskemi; dolaşım tarafından dokunun oksijen ve diğer metabolitlere olan ihtiyacının perfüzyon bozukluğuna bağlı sağlanamaması ve oluşan atık ürünlerin uzaklaştırılmaması olarak tanımlanır.Dokuya yetersiz oksijen sunumuna ise hipoksi denir.Hipoksinin en sık nedeni ise iskemidir.Normal hücre fonksiyonları için gerekli olan yüksek enerjili fosfat bağları aerobik metabolizma yoluyla sağlanırken hem iskemide hem de hipokside anaerobik metabolizma devreye girer (1,2,3). Ancak iskemide, hem metabolit yetersizliği hem de atık ürün birikimi nedeniyle, glikoliz metabolizması hipoksiye oranla hem daha erken sonlanır hem de hasar çok daha erken oluşur (4). Sonuçta hücrel enerji depolarındaki azalma ve toksik metabolit birikimi hücre ölümüne yol açar (5).

Uzun süreli doku iskemisinde; hücrel şişme, asidoz, hücre içi kalsiyum/sodyum oranında artış, hipoksantin seviyesi artışı, adenzin trifosfat (ATP) / fosfokreatin ve glutation düzeyi azalması, adenzin sinyal aktivitesi artışı, membran potansiyel değişiklikleri, iskelet bütünlüğü kaybı ve nükleotid fosfohidrolizi gibi hücre metabolizması ve iskelet yapısını ilgilendiren birçok değişim meydana gelir (4,6).

2.1.1. Geri Dönüşümlü Hasar

Normal koşullarda 3-4 dakikalık iskemi, yüksek enerjili fosfat olan fosfokreatinin ile adenzin trifosfat (ATP) depolarının bozulmamasına ve enerji bağımlı membran iyon pompalarının normal iyon gradiyentini gerçekleştirememelerine yol açar (7).

Aerobik solunum yani mitokondrilerdeki oksidatif fosforilasyon, hipoksinin hücrede ilk etkilediği yerdir. O₂ basıncının azalmasıyla hücre içi ATP depolarındaki azalma, birçok sistem üzerinde etkili olur. Plazma membranlarında bulunan ATP bağımlı sodyum (Na⁺) pompasının aktivitesi azalır. Bunu, Na⁺ un hücre içinde birikimi ve potasyumun (K⁺) hücre dışına çıkışı takip eder. Na⁺ konsantrasyonundaki artış , suyun

izoozmotik artışına ve akut hücrel şişmeye neden olur. Bu şişme, inorganik fosfatlar, laktik asit ve pürin nükleozitleri gibi diğer metabolitlerin birikimi ile artan hücre içi ozmotik yükü daha da ilerler (8).

Hücrel ATP de azalma ile birlikte adenosin monofosfat (AMP) artışı fosfofrüktokinaz enzimini aktive ederek anaerobik glikolizi artırır. Anaerobik glikoliz ile aerobik glikolizle elde edilen ATP nin ancak % 7' si elde edilebilmektedir (9) .

Sonuçta; glikojen hızla tükenir, artan glikoliz ise fosfat esterlerinin hidrolizi ile laktik asit ve inorganik fosfatların birikimiyle hücrede asidoza neden olur. Ribozomların granüllü endoplazmik retikulumdan (GER) ayrılması ve polizomlardan monozomların oluşumu ile protein sentezinde azalma bunu takip eder. Hipoksinin devam etmesi ile mitokondrial fonksiyonun daha da kötüleşmesi ve membran geçirgenliğinin artışı sonucunda morfolojik hasar artar. Hücrenin ana hatları , mikrovillus gibi ultrastrüktürel özelliklerin kaybı ve hücre yüzeyinde kabarcıkların oluşumu ile bozulur. Mitokondri, endoplazmik retikulum ve tüm hücreler ozmotik regülasyonun bozulmasından dolayı şişmişlerdir. İskemi düzeltilir ve O₂ düzeyleri normale dönerse tüm bu bozulmalar geri dönebilir, ancak iskemi ve hipoksi devam ederse geri dönüşümsüz hasar meydana gelir (7,10) .

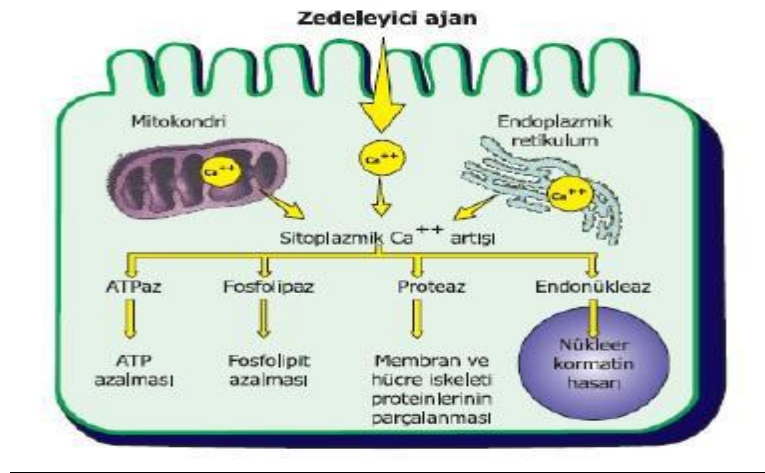
Doku iskemisi sırasında başka birçok mekanizma daha aktive olur. İltihabi araçların ve adhezyon moleküllerinin sentezinde artış olur. Adhezyon moleküllerindeki bu artış, iskemik alan lökosit adhezyonunu artırır. Endotel tarafından sentezlenen NO inaktivasyonu vazokonstriksiyona neden olur. Araşidonik asit metabolizmasında dengenin prostasiklin kaskadına kayması ise vazokonstriksiyon ve trombosit aktivasyonu ile sonuçlanır. NO sentezi için de oksijen kullanımı gerekli olduğundan , iskemik dokuda NO seviyesinde azalma görülür. Bunlara ek olarak kompleman sistem aktivasyonu ve PAF sentez artışı gerçekleşir. Dolayısıyla iskemi, dokuyu reperfüzyon hasarına karşı daha hassas bir duruma getirir. Eğer doku perfüzyonu düzelirse yukarıda da belirtildiği gibi tüm bu değişimler geri dönüşümlü olup iskeminin devamı durumunda ise geri dönüşümsüz hasar ile sonuçlanır (10) .

2.1.2. Geri Dönüşümsüz Hasar

Kritik iskemi zamanı, doku canlılığının sürdürebilmesi için gerekli maksimum iskemi süresi olarak ifade edilir. Hücrenin metabolik aktivitesi ve adaptasyon mekanizmalarına göre kritik iskemi süresi farklılık göstermekle birlikte,% 50 doku kaybına neden olan iskemi zaman dönemidir. Uzun süreli iskemide geri dönüşümsüz hasar ve nekroz kaçınılmazdır (1) .

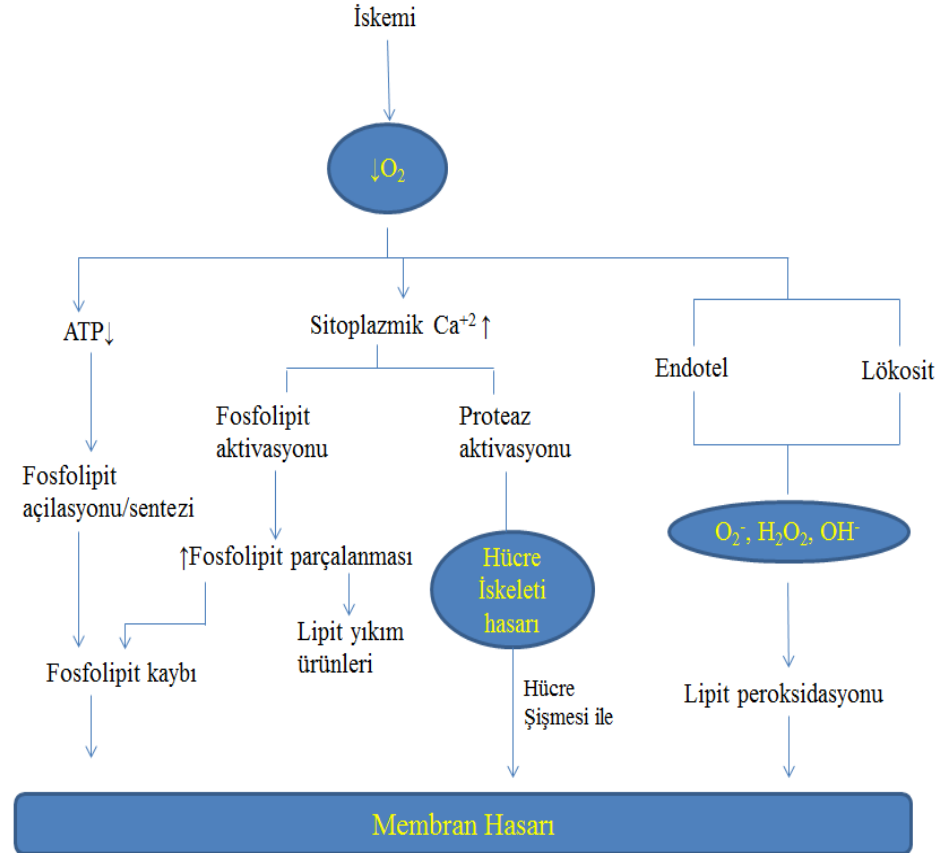
Geri dönüşümsüz hasar hücre zarının zedelenmesi ile oluşur. Morfolojik olarak mitokondri ve mitokondri kristallerinde aşırı vakuolizasyon, plazma zarında aşırı yıkım, lizozomlarda şişme geri dönüşümsüz zedelenmeye yol açan hasarlardır (11) .

Membran hasarı sonucu Ca^{+2} , yüksek yoğunlukta bulunduğu hücre içinden hücre dışına geçer. İskemik dokuda reperfüzyon sağlanırsa hücre içine kitlesel kalsiyum alınımı olur. Mitokondriler tarafından kolayca alınan, amorf Ca^{+2} ' den zengin yapılar mitokondri matriksinde gelişir ve kalıcı şekilde mitokondri hasarına yol açar (12)Şekil2.1),



Şekil 2. 1. Hücre zedelenmesinde hücre içi kalsiyum artışı ve sonuçları (12)

Hücresel zarların tümünde gerçekleşen hasar, hücre organelleri ve hücrede şişme, protein, esansiyel koenzim ve ribonükleik asit kaybı, ATP sentezinde kullanılan metabolitlerin depolanamamasına bağlı yüksek enerjili fosfat depolarında azalma ve interstisyel alandaki makromoleküllerin hücre içine geçişiyle sonuçlanır. Lizozomal membran hasarı enzimlerin sitoplazma içine sızmasına yol açar. Asit hidrolazlar, düşük sitoplazmik pH'da, tüm hücresel elemanların enzimatik yıkımına neden olurlar. Lizozomal sindirim, hücre ölümü sonrası interstisyel alanda da devam eder . Sonrasında oluşan hücreler fosfolipit kitleler oluşturarak `miyelin şekiller `olarak tanımlanırlar.Oluşan myelin kitleler ise ortamdan iki şekilde uzaklaştırılırlar.Ya yağ asitlerine parçalanırlar ya da fagositoya uğrarlar (12,13).



Şekil 2.2: İskemide membran hasarının mekanizmaları(14)

Geride Dönüşümsüz Hasar Mekanizmaları ;

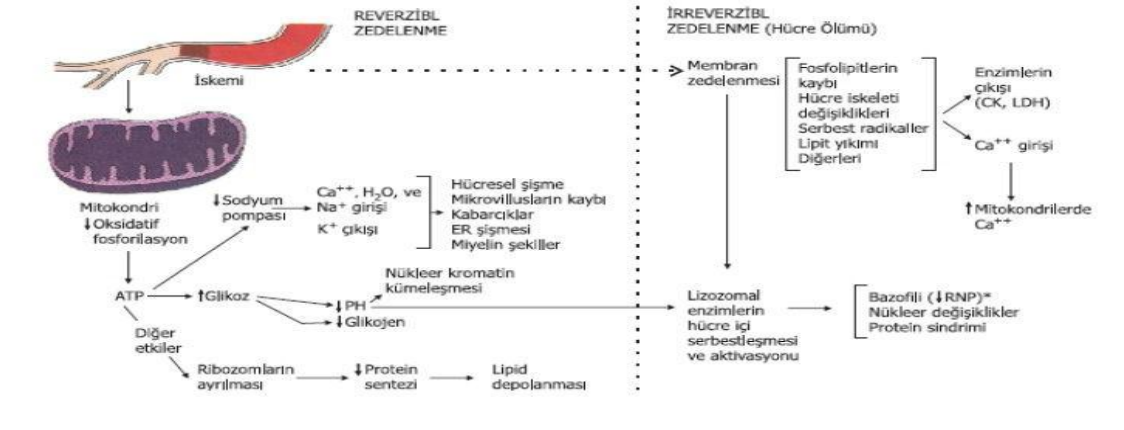
1. Membran fosfolipit kaybı: Hücre zarı membran fosfolipitleri, hem yıkım artışı hem de sentez azalması sonucunda azalır (14) (Şekil 2.2)

2. Hücre iskelet anormallikleri: Hücre zarının iskeletten ayrılıp yırtılması, artmış hücre içi kalsiyum ile aktifleşen proteazlar ve hücre şişmesi sonucu oluşur.

3. Toksik oksijen radikalleri

4. Lipit yıkım ürünleri

Yukarıda belirtilen hasar mekanizmalarıyla 4 ana sistem olan hücre zarı bütünlüğü, oksidatif fosforilasyon, protein sentezi ve hücrenin genetik yapısı etkilenir (15). Hücre fonksiyonları hücre ölümünden önce kaybolur. Hasarın morfolojik görünümü kritik biyokimyasal sistemlerde bozukluklar oluşup geri dönüşümsüz hasar oturduktan çok sonra belirgin hale gelir. Hücre şişmesi dakikalar içinde görülebilen geri dönüşümlü bir hasardır. Geri dönüşümsüz hasar 20-60 dakika içinde ışık mikroskopunda görülebilirken, hücre ölümü ancak 10-12 saatte belirgin hale gelmektedir (12) (Bkz. Şekil 1).



ATP: Adenozin trifosfat; LDH: Laktat dehidrogenaz; CK: Kreatinin kinaz.

Şekil 2.3: İskemik zedelenmede olaylar dizisi (11)

Özet olarak geri dönüşümsüz zedelenme;

- 1.Hücre zarı hasarı sonucu protein, enzim, koenzim, ribonükleik asit ve yüksek enerjili fosfat kaybı,
- 2.Mitokondri matriksinde amorf, düzensiz kalsiyum yoğunluklarının birikimi,
- 3.Lizozomal zarlarda hasar ve lizozomal enzimlerin sitoplazmaya çıkması sonucu organellerin sindirilmesi,
- 4.Ölü hücrelerin fagositozu veya yağ asitlerine dönüşümü,
- 5.Yağ asitlerinin kalsifikasyonu ve kalsiyum sabunu oluşumu (12)(Şekil 2.3) ile karakterizedir.

2.2. Reperfüzyon

İskemik dokuda, hem hücrenin rejenerasyonu, hem de toksik metabolitlerin temizlenmesi için, yeniden kan akımının sağlanması gerekir (12). Ancak birçok çalışmada, İR hasarının iskemik hasara göre çok daha fazla toksik ürün oluşturduğu gözlenmiştir (16).

İskemik fakat yaşayabilen dokularda kan akımının düzeltilmesi, aksine zedelenmeyi hızlandırarak şiddetlendirebilir. Reperfüzyonla birlikte oluşan hasarın büyüklüğü iskeminin süresi ve şiddeti ile doğru orantılıdır. Kısa süreli iskemilerde reperfüzyon hasarının şiddeti hafif olurken, iskemi süresinin uzun ve geri dönüşsüz hasarın olduğu durumlarda reperfüzyonla birlikte hücrelerin kurtarılması mümkün olmayabilir (12,13).

İskemi sonrası kanlanmanın tekrar sağlanmasıyla reperfüzyon hasarı başlamaktadır. İskemi süresine bağlı olarak hedef ve uzak organlarda asemptomatik subklinik hasardan hedef dokuda ödem, çap artışı, nekroz, uzak organlarda fonksiyon bozukluğu, multiorgan yetmezliği ve mortaliteye kadar ilerleyen semptomların olduğu geniş bir yelpazede karşımıza çıkmaktadır. İskemiye bağlı hasarın geri dönüşümlü olabilmesi için mutlaka doku reperfüzyonu gereklidir. Fakat reperfüzyon sonrası oluşan

metabolitler doku hasarının artışına neden olur. Hücresel şişme, hücre iskeleti değişiklikleri ve seçici mikrovasküler geçirgenlik kaybı reperfüzyona bağlı hasarın tipik özellikleridir. Bu mekanizmalar sonucunda doku ödemi ve kapiller kan akımında azalma meydana gelir (2,17).

Reperfüzyon esnasında oluşan reaktif oksijen türevlerinin endotel üzerindeki hasarlayıcı etkisi, endotel kaynaklı endotelin sentezinde artış ve nitrik oksit (NO) sentezinde azalma gibi faktörler endotelde ciddi fonksiyon bozukluğuna yol açar (17).

İskemi sırasında oluşan oksidatif fosforilasyon hasarı, hem ATP depolarında hızlı tükenme ve hipoksantin artışına, hem de azalmış ATP'ye bağlı hücre içi kalsiyumda hızlı artışa neden olur. Dolayısıyla hasarı etkileyen en önemli ve erken mekanizma hücre içi kalsiyumun artış hızı ve miktarı olup, hücre nekrozu ve apopitozuyla direkt ilgilidir (18).

Artmış mitokondriyal kalsiyum, oksijenin suya olan dördüncü seviyeden redüksiyonunu engelleyerek birinci derece redüksiyon ve radikal oluşumuna neden olur . Ek olarak, iskemik dokuda ATP'yi daha fazla azaltıp hasarı derinleştirir (19,20). Hücre içi kalsiyum birikimi reperfüzyon süresince artarak devam eder. Doku iskemisi sonucu gelişen bu hücre içi kalsiyum artışı ve ATP azalması birbirlerini indükleyerek kısır bir döngüye girerler. Kalsiyuma bağlı oluşan bu hasar hücre içi kalsiyum birikiminin engellenmesiyle azaltılır (17).

Artmış hücre içi kalsiyum, bir proteaz enzim olan kalpain aktivasyonunu ve sonuçta ksantin dehidrogenaz (XD) enziminin ksantin oksido-redüktaz (XO) enzim formuna dönüşümünü sağlar. Sağlıklı kişide her iki enzim formu da aktif halde bulunurken XD hakimiyeti hipoksantin'i sırasıyla ksantin ve ürik aside çevirir. XD bu fonksiyonu sırasında oksijene ihtiyaç duymadan elektron taşıyıcı bir molekül olan nikotinamide adenin dinükleotid kullanır. Doku iskemisi sırasında ise, enzimin XO formu baskın hale gelir ancak XO aktivitesi oksijen gerektirdiği için iskemik dokuda XO birikimi olur. Dolayısıyla, iskemik dönemde, hipoksiye bağlı, hipoksantin ve XO birikimi söz konusudur. Reperfüzyon döneminde ise, oksijen sunumuyla birlikte XO

aktivasyonu ve hipoksantinden toksik oksijen radikalleri oluşur. XO enzim seviyesi ve aktivitesi, türden türe ve dokudan dokuya farklılık gösterir. Endotel ve gastrointestinal sistem mukoza villus yapısı, vücutta diğer dokulara oranla daha fazla XO enzim aktivitesine sahip olup, İR hasarına en hassas dokulardır . Reperfüzyon hasarında, reaktif oksijen türevlerinin ilk oluştuğu bölge endotel-kan sınırındır ve XO'a bağlı endotel hasarı İR hasarının en önemli faktörlerindedir (21).

Doku oksijenasyonu yeniden sağlandığında, oksijen, XO ve hipoksantin'in birbirleriyle olan etkileşimi, ürik asit, süperoksit (O_2^-) ve H_2O oluşumuyla sonuçlanır. Oluşan süperoksit, çok zararlı bir molekül olmayıp, hidrojen peroksit (HO_2) için kaynak oluşturur. Süperoksit SOD enzimi aracılığıyla hidrojen peroksit'e dönüşür. Oluşan katalaz enzimi ise hidrojen peroksiti, su ve oksijene çevirir. Hidrojen peroksit'in geçiş metalleriyle (en sıklıkla serbest demir) reaksiyona girmesi sonucunda hidroksil (OH^-) radikali oluşur. Hidrojen peroksitte süperoksit gibi çok zararlı bir molekül olmayıp, en önemli fonksiyonu hidroksil radikali için bir kaynak olusturmasıdır. Dolayısıyla, süperoksit ve hidrojen peroksit radikallerine bağlı lipid peroksidasyonu ancak bu moleküllerin serbest demir ile reaksiyona girip hidroksil radikali oluşturmalarıyla belirgin hale gelir. Hidroksil radikali güçlü bir oksidan molekül olup, SOD ve katalaz enzimleri bu molekülün temizlenmesinde doğal savunma mekanizmalarını oluştururlar. Buna ek olarak, sağlıklı kişilerde demir; kanda hemoglobin, kasta myoglobin, dolaşımda transferrin ve hücrelerde ferritin şekillerinde depolanarak serbest şekilde bulunmaz. Doku iskemisi sonucu oluşan hücresel asidoz, artmış redüktan madde seviyesi ve SOD aktivitesi, ferritine bağlı hücresel demirin serbestlenmesine neden olur. Aynı zamanda artmış hemoliz ve hidrojen peroksit aktivitesinde hemoglobine bağlı demiri açığa çıkartır (22) .

Serbest oksijen radikallerinin diğer kaynakları; aktive olmuş polimorfonükler lökosit (PMNL), mitokondri Nikotinamid adenine dinükleotid fosfat (NADP) dehidrogenaz sistemi, katekolaminlerin otooksidasyonu ve araşidonik asit metabolizmasıdır. Bu serbest radikaller, özellikle de OH^- radikali, hücre zarı lipid peroksidasyonunu başlatıp, araşidonik asit ve lipidperoksil serbest radikallerin salınımına

neden olur. Araşidonik asit, siklooksijenaz [Thromboxane A₂ (TxA₂), PGE₁, PGI₂] veya lipooksijenaz (LT-B₄, LT-C₄, LT-D₄, LT-E₄) enzimleriyle metabolize olup eikosanoidlere dönüşürken, lipitperoksil radikali; lipit peroksidasyonuna devam eder (12).

Bu olaylar sonucunda, hücre zarı seçici geçirgenlik kaybı, DNA hasarı, yapısal proteinlerin yıkımı, hücre zarı etkileşimi enzimlerin inaktivasyonu ve sitoliz görülür. OH⁻ radikali başka bir radikal ile birleşip inaktive oluncaya veya tükeninceye dek bu zincirleme reaksiyon devam eder. İskemik bir dokuda reperfüzyonun başlamasıyla, polimorfonükleer lökositler endotel lökosit adezyon molekülü (ELAM-1), intersellüler adezyon molekülü (ICAM-1), vasküler hücre adezyon molekülü (VCAM-1), L-selektin gibi adezyon moleküllerine tutunarak iskemik dokuya yerleşirler ve birçok yoldan etki göstererek iskemik dokuyu yok ederler (23).

Sonuçta İR zedelenmesinden sorumlu tutulan mekanizmalar olarak serbest oksijen radikalleri, proinflamatuvar mediatörlerin artması, lökosit infiltrasyonu, kalsiyum yüklenmesi, lipit peroksidasyonu ve azalması ileri sürülmektedir (24).

2.3. İskemi Reperfüzyon Hasarı Mekanizmaları

İskemik dokunun reperfüzyonu sırasında dokuya sağlanan oksijen ve metabolitler, hasarı geriletebileceği gibi hasarın ilerlemesine de neden olabilir (25).

İR hasarı ,kalp,adale,karaciger,akciger,böbrek ve barsaklarda sık rastlanılan ve ciddi morbidite ve mortaliteye yol açabilen olaylar dizisidir.Hangi organda olursa olsun sistemik enflamatuvar bir cevaba yol açar.İskelet kasında meydana geldiğinde ekstremitede fonksiyon kaybı ve amputasyonla sonuçlanabilir (25,26).

İR hasarında fizyopatolojik değişikliklere neden olan faktörler (27);

- a.Serbest oksijen radikalleri
- b.Polimorfo nükleer lokositler,trombositler
- c.Kompleman sistemi

d.Endotel hücreleri olarak sıralanabilir.

2.3.1.Serbest Oksijen Radikalleri

Serbest radikaller tek elektron eksiklikleri nedeniyle başka moleküllerle (lipit,protein,karbonhidrat,nükleik asit gb) kolayca elektron alışverişi yapabilir veya onlarla reaksiyona girebilir.Reaksiyona girmesi ile moleküllerin yapı ve fonksiyonlarını değiştirebilir ve hatta çok sayıda hücre ve doku hasarları meydana getirebilirler (28).

Bu hücrel hasar oluşumunda rol oynayan mekanizmalar (28):

a.Lipit peroksidasyonu

b.Protein oksidasyonu

c.DNA hasarı

d.Kalsiyum salınımı olarak sıralanabilir.

Lipit Peroksidasyonu

Çoklu doymamış yağ asitlerinin (araşidonik asit,linoleik asit ve linolenik asit gibi) serbest radikaller ile oksidasyonudur. Serbest radikallerin hücrede başlattığı en önemli ve en zararlı olan hücrel hasar mekanizmasıdır. Bu oksidasyon sonucunda bir çok lipit peroksidasyon ürünü (MDA,dien konjugatları gibi) oluşur (29).

Sonuçta plazma ve organel membranlarının fiziksel ve kimyasal özellikleri değişerek membranın iyon geçirgenliği bozulur.Eritrositlerde hemoliz ortaya çıkar.Böylece yaygın membran,organel ve hücre hasarı meydana gelir.Lipit peroksidasyonunun son ürünü olan MDA nın doku düzeyi ölçülmektedir. Bu ölçüm İR hasarında oluşan serbest oksijen radikali öncülerinin aktiviteleri konusunda fikir verir.

MDA

Non enzimatik oksidatif lipit peroksitlerinin parçalanması sonucu oluşan toksik etkili son ürünlerden bir tanesi MDA'dır. Eikozanoid sentezinde serbestleşen siklik

endoperoksitler ya da ikiden fazla çift bağ içeren yağ asitlerinin otooksidasyonu MDA'nın kaynağını oluşturur (30).Üç veya daha fazla çift bağ içeren yağ asit peroksidasyonu sonucu tiobarbutirik asit ile ölçülen MDA meydana gelir. MDA, yağ asit oksidasyonunun spesifik veya kantitatif indikatörü olmasa da lipit peroksidasyon derecesiyle iyi korelasyon göstermektedir. MDA membran komponentlerinde polimerizasyon ve çapraz bağlanma oluşturarak deformasyon, iyon transportu, hücre yüzey bileşen agregasyonu gibi membran içi özellikleri değiştirir. MDA'nın mutajenik, genotoksik, karsinojenik özelliği mevcuttur (31,32). Kısacası lipit peroksidasyonu,İR hasarının hem tanısında hemde patofizyolojisinde önemli rol oynar (29,33,34).

Protein Oksidasyonu

SOR'lar, aminoasit yan zincirlerinin oksidasyonuna neden olarak protein-protein bağlarının oluşmasına yol açarlar. Ayrıca protein yapısında, ana zinciri okside ederek proteinlerin parçalanmasına neden olurlar. Böylece hücrede fonksiyonel önemi olan enzimlerde bozulmalar ortaya çıkar (35).

DNA Hasarı

SOR'lar, nükleer ve mitokondrial DNA'da timin ile reaksiyona girerek tek zincir kırılmalarına neden olurlar. Hücrelerin enerji kaybetmeleriyle nekrotik tipte hücre ölümü meydana gelir. Reoksidasyon sırasında allopurinol (ksantin oksidaz inhibitörü), SOD veya katalaz uygulamasının endotel hücre hasarını önlediği gösterilmiştir (35).

Kalsiyum Salınımı

Kalsiyum ATP az enzimleri önemli sulfidril gruplarına sahiptir. Ayrıca SOR tarafından inaktive edilebilir.Sitokinler, SOR aracılı yol kullanarak, hücre enerjisini azaltabilirler (35,36,37).

Organizmada serbest radikal oluşumunu engelleyen veya oluşmuş olan serbest radikallerin zararlı etkilerini önlemek için koruyucu mekanizmalar vardır. Bunların hepsine birden antioksidan maddeler denir. Antioksidan maddeler endojen ve eksojen

kaynaklı olmak üzere iki gruba ayrılır (49). Endojen antioksidanlar da enzim olanlar ve enzim olmayanlar olmak üzere iki gruba ayrılır. Enzim olan endojen antioksidanlardan bazıları süperoksit dismutaz, katalaz ve hidroperoksidazdır (50).

Antioksidan enzimler için SOD, CAT, GSH-Px birincil antioksidanlardır. Serbest radikalleri, biyolojik açıdan önemi olan moleküllerle etkileşmeden önce daha zararsız bileşiklere dönüştürerek ya da farklı moleküllerden radikal üretimini engelleyerek etkilerini gösterirler. Oksidanlar hedef hücrelerde çeşitli farklı biyokimyasal değişiklikleri kapsar ve lökositlerin uyarılmasıyla oluşturulurlar (57,58).

Katalaz (CAT)

Katalaz yapısında içerdiği dört tane hem grubundan dolayı hemoprotein olarak kabul edilmektedir (60). Katalazın esas fonksiyonu H_2O_2 'in parçalanmasını katalize etmektir. Kan, kemik iligi, karaciger, böbrek ve müköz membranda yüksek konsantrasyonda olup, H_2O_2 oluşum hızının düşük olduğu durumlarda peroksidatif tepkimeyle (tepkime 1), H_2O_2 oluşum hızının yüksek olduğu durumlarda ise katalitik tepkimeyle (tepkime 2) hidrojen peroksiti suya dönüştürerek ortamdan uzaklaştırır (59,61).



Ayrıca katalaz H_2O_2 'e spesifiktir. Diğer organik peroksitlere etki etmez (60,61).

2.3.2. İskemi Reperfüzyon Hasarında Polimorfonükleer Lökosit ve Endotel Hücrelerinin Rolü

İR hasarında aktif hale gelen ilk ve en elzem hücre nötrofillerdir. Önceden nötrofillerin İR hasarında tetikleyici role sahip olduklarına inanılırken , artık mikrovasküler ve mukoza hasarının çoğundan sorumlu son mekanizma oldukları düşünülmektedir (11). İR hasarı endotel ve lökosit hücre yüzeyleri adezyon molekül oluşumunu arttırarak, lökosit diapediziyle sonuçlanan kaskadın aktivasyonuna neden

olur. Meydana gelen hücre yüzeyindeki adezyon moleküllerinin oluşumu kimyasal aracı maddelerce sağlanır (66).

Doku iskemisi sonrasında platelet, endotel ve nötrofillerden açığa çıkan kemotaktik sinyaller, nötrofil rolling, adezyon ve diapedez süreçleri çok düzenli bir şekilde gerçekleşir. Bu iske mi sonrası dolaşım da serbest halde bulunan nötrofiller aktive olarak iskemik doku endoteline yapışıp intertisyel alana geçerler (11).

Bu süreç; hem lökosit hem de endotel hücreleri üzerindeki glikoproteinler, hareket eden kanın mikrodolaşıma olan yırtıcı kuvveti, lökosit ve endotel hücrelerinin birbirlerine olan elektrostatik itici kuvveti ve hücrelerce (endotel, lökosit, platelet) oluşturulan kimyasal maddeler (ROT, NO, PAF) sonucu oluşur (67) .

İR hasarında PMNL'in rolü ile ilgili ileri sürülen bazı mekanizmalar (68);

1. Mikrovasküler oklüzyon
2. SOR'ların salınması
3. Sitotoksik enzim salınması
4. Vasküler permeabilite artışı
5. Sitokin salınımında artış olarak sıralanabilir.

PMNL'in başlangıçtaki kemoatraksiyonları endotel hücreleri ve ksantin oksidaz aracılığı ile gerçekleşirken ,aktivasyon ve migrasyonları ise endotel hücrelerinde ve lökositlerde bulunan adhezyon molekülleri aracılığı ile olur. Lökosit adhezyon molekülleri lökositlerde ve diğer başka hücrelerde de bulunan gelişme, haberleşme, inflamasyon ve apoptozis gibi çok sayıda ve çeşitte biyolojik olaylarda rol alan yapılardır (3,69).

Migrasyonda rol oynayan bu adhezyon molekülleri,selektin ailesine bağlı moleküllerce sağlanır. Selektinler,seçilmiş bazı şekerleri bağlayan ekstraselüler moleküllerdir.Endotele sınırlı olan E-selektin,endotel ve trombositlerde bulunan P-

selektin ve lökosit yüzeyinde bulunan L-selektin olmak üzere üç tip selektin molekülü bulunmaktadır (11). Bu yuvarlanma etkisi ;lökositleri ,klasik kemoaktran ve kemokinleri yakın temas haline sokar (70,71,72). Normal endotelde bulunmayan E-selektin ,IL-1 ve TNF gibi mediatörlerin hasarlı dokuda uyarımından sorumludur (11).

Lökositler hücreler arasından geçerek bazal membranı aşp ekstrasvasküler alana geçmeden önce (diapedez),endotel yüzeyine sıkıca bağlanarak adezyonu oluştururlar.Endotel-lökosit adezyonu çeşitli integrinlere (CD11a,CD11b,CD11c-CD18) bağlanan immunoglobulin üst ailesinden (ICAM 1,2,3 ve VCAM -1) endotelial adezyon moleküllerince düzenlenir (11).

Reperfüzyon döneminin onuncu dakikasında Lökosit-endotel adezyonu maksimum seviyeye çıkar (73).Reperfüzyona bağlı inflamatuvar cevap, integrin ve reseptör oluşumunu uyararak, lökositlerde hücre iskeleti değişiklikleri ve güçlü endotel-lökosit adezyonuna neden olur (44).

Ekstravazasyondan sonra ,lökositlerin kimyasal bir uyarı izleyerek hasarlı bölgeye doğru göç etmesine kemotaksi denir.Lökositler için kemotaktik ajanlar endojen olabileceği gibi eksojen maddelerde olabilir (11).

Kemotaksis de aktive lökosit yanıtında rol oynayan mekanizmalar (12);

1. Fosfolipaz A2 aktivasyonu sonucu araşidonik asit metabolitlerinin (prostoglandin ve lökotrienler) üretimi
2. Degranülasyon sonucu lizozomal enzimlerin salınımı
3. SOR'ların üretimi şeklinde sıralanabilir.

Lökosit göçü esas olarak venöz kılcallardan olur. Hasarlı dokuya olan lökosit kemotaksisi kompleman sistemi (C5a), araşidonik asit lipooksijenaz yolu ürünleri (LT-B4) ve sitokinler (özellikle kemokinler, IL-8) yoluyla sağlanır (12).

Bu ürünler endotel hasarı ve doku zedelenmesinin güçlü mediyatörleri olup başlangıçtaki inflamatuvar uyarının etkisini güçlendirirler. Bazı durumlarda lizozomal enzimler hücre dışına salınabilir. Hasar yapıcı etkeni ortadan kaldırmaya veya dilüe etmeye yönelik bu inflamatuvar cevap sonucu mikrovasküler permeabilite artışı, tromboz, ödem ve parankim hücre ölümü de gerçekleşir. Görevini tamamlayan lökositler apoptotik hücre ölümü ile lenfatik dolaşım vasıtasıyla ortamdan uzaklaştırılırlar (68).

Reperfüzyon sonrası, dolaşımda IL-1, IL-6 ve Tümör nekrozis faktör- α (TNF- α) gibi sitokinler gözlenir. Bu ajanlara karşı antagonistler kullanılarak, hem IL-1'in hem de TNF- α 'nın vasküler yaralanmaya katkıda buldukları ve endotel adhezyon moleküllerini arttırdıkları gösterilmiştir (3,69). İR de sitokin salınımının bilinmesine rağmen bu sitokinlerin permeabilite üzerine olan etkilerinin direk mi yoksa hücre adhezyon molekülleri ekspresyonu ve nötrofil adhezyon aktivasyonu yoluyla mı olduğu bilinmemektedir (74).

Hasarlanmış bölgede biriken hücre tipi, inflamasyonun süresi ve uyarının tipine göre farklılık gösterir. İskemi reperfüzyon hasarına inflamatuvar yanıt ilk 6-24 saat nötrofil hakimiyeti iken, 24-48 saatlerde ise monosit hakimiyetidir. Bunun sebebi ise nötrofillerin kanda fazla bulunması ,daha hızlı aktivite göstermeleri ,adhezyon moleküllerine daha yüksek afinite ile bağlanmaları ve yarı ömürlerinininde kısa olmasından kaynaklanır (11).

Bütün bu olayların sonucunda lökositler dokuda hasarın genişlemesine neden olurlar. Bu durumun klinik yansıması mikrovasküler tromboz ve disfonksiyon ile karakterize “no –reflow” fenomenidir (1,75,76).

Lökosit-endotel adhezyonu, endotelde şişme ve daha fazla lökosit adhezyonuyla sonuçlanır. Lökosit-trombosit adhezyonu ise trombositlerin subendotelyal alanda birikerek, endotel ayrılmasına neden olur. Bu yapışmış trombositler, selektin ve integrinler yoluyla, daha fazla lökositin trombositlere yapışmasını sağlarlar (76,77). Nötropeni ve trombositopeni modellerinde “no reflow” oluşumunun azaldığı

gözlenmiştir Sonuçta endotel lökosit trombosit etkileşimleriyle, fibrin birikimini takiben, trombüs oluşumu gözlenir (78).

İnflamasyonun Kimyasal Aracıları

Araşidonik asit metabolizmasından kaynaklanan ürünler, inflamasyon ve hemostaz olmak üzere birçok biyolojik olay üzerine etkilidir. Bu ürünler yapıldıkları yerde lokal olarak etki ederler ve daha sonra çok hızlı bir şekilde spontan veya enzimatik olarak yok edilirler . Araşidonik asit; 20 karbonlu, 4 çift bağlı poliansatüre bir yağasididir. Primer olarak diyetdeki linoleik asitten türer ve vücutta yalnızca ester şeklinde, hücre membran proteinlerinin bir komponenti olarak bulunur. Araşidonik asit bu fosfolipitlerden hücre sel fosfolipazlar yoluyla salınır. Hücre sel fosfolipazlar mekanik, kimyasal, fiziksel uyarı veya C5a gibi iltihabi mediatörlerce aktive edilirler. Araşidonik asit metabolizması reaksiyonu başlatan enzimin adıyla anılan siklooksijenaz ve lipooksijenaz olmak üzere iki ana yol boyunca ilerler. Siklooksijenaz (COX) yolunda : PG E2, PG D2, PG F2, PG I2 (prostasiklin) ve TxA2 bulunur. Bunların her biri spesifik bir enzim etkisi ile meydana gelir.Örneğin; trombositlerde tromboksan sentetaz enzimi vardır dolayısıyla güçlü bir trombosit agregan ajan ve vazokonstrüktör olan TxA2 ana prostaglandin ürün olarak bu hücrelerde bulunur. Diğer yandan endotel, tromboksan sentetaz içermez ancak PG I2 oluşumunu sağlayan prostasiklin sentetaz içerir. PG I2 güçlü bir trombosit agregasyon inhibitörü ve vazodilatördür. PG D2, COX yolunun mast hücrelerindeki ana metabolitidir; PG E2 ve PG F2 (daha yaygın) ile birlikte bulunurlar ve PG D2 vazodilatasyona neden olur, ödemi artırır. Aspirin ve ibuprofen gibi nonsteroid antiinflamatuvar ajanlar, proksimal COX aktivitesini inhibe ederek prostaglandin sentezini tümüyle inhibe ederler. Lipooksijenaz yolu ise bu antiinflamatuvar ajanlardan etkilenmez (78).

Siklooksijenaz enzimleri (COX-1 ve COX-2) araşidonik asidin, adı geçen prostanoidlerin prekürsörleri olan prostaglandin G ve H'ye dönüşümünü katalize eder.İlginç olarak gastrik mukozada COX-1 mevcutken, COX-2 yoktur. Bu bölgede mukozal prostaglandinler COX-1 etkisiyle oluşurlar ve aside bağlı hasarı

engellediklerinden koruyucudurlar. Non steroidal antiinflamatuvar ilaçlar ve aspirin, COX'u inhibe ederek prostaglandin sentezini bloke edip, enflamasyonu azaltırken, gastrik ülserde de zemin hazırlarlar (79).

Lipooksijenaz: Nötrofillerde baskın olarak bulunan AA metabolizması enzimi 5-lipooksijenaz'dır. 5-hydroperoxyeicosatetraenoic acid (5-HPETE), AA'in 5-hidroperoksi ürünüdür. 5-HPETE oldukça kararsızdır, ya 5-hydroxyeicosatetraenoic acid'ye indirgenir (nötrofil için kemotaktiktir), ya da topluca lökotrienler diye adlandırılan bileşiklere dönüşür. 5-HPETE'den türeyen ilk lökotrien, LT-A4 olup bu enzimatik hidrolizle LT-B4 oluşumuna veya glutasyon eklenmesiyle LT-C4 oluşumuna yol açar. LT-B4 güçlü kemotaktik bir ajandır ve nötrofillerin agregasyonuna yol açar. LT-C4 ve onun alt ürünleri LT-D4 ve LT-E4 vazokonstriksiyon, bronkospazm ve vasküler permeabilite artışına neden olurlar (79). Eikosanoidler akut inflamasyonun her aşamasında yer alırlar. Eikosanoidlerin iltihabi proseslerin merkezinde rol aldıkları gerçeği klinikte COX aktivitesini baskılayan ajanların (aspirin ve NSAID) güçlü anti inflamatuvar ajanlar olarak kullanılmasıyla kendini gösterir. Glukokortikoidler ile oluşan antiinflamatuvar etki kısmen fosfolipaz A2 inhibisyonuna bağlıdır (79).

Platelet Activating Factor (PAF): PAF, trombosit agregasyonuna ve degranülasyona sebep olması nedeniyle bu şekilde adlandırılır. Asetil gliserol eter fosfokolin yapısındadır. Fosfolipaz A2 etkisiyle nötrofillerin, monositlerin, bazofillerin, endotelin, trombositlerin ve diğer bazı hücrelerin membran fosfolipitlerinden elde edilir. Trombositlerin uyarılmasının yanı sıra; vazokonstriksiyon ve bronkokonstriksiyona neden olurken lökosit adezyonunu (integrinlerde yapısal değişikliklere neden olarak), kemotaksisi, lökosit degranülasyonunu ve oksidatif reaksiyonları artırır. Eikosanoidler başta olmak üzere diğer bazı mediatörlerin sentezini de stimüle eder (79).

Sitokinler: Sitokinler, aktive olmuş lenfositler ve makrofajlar başta olmak üzere birçok hücre tarafından sentezlenen polipeptid moleküllerdir. Kendi üretildikleri hücreleri (otokrin etki) ve yakın çevredeki hücreleri (parakrin etki) etkileyebildikleri gibi sistemik etkileride (endokrin etki) vardır (79).

Hücresel immün cevap üzerine etkilerinin yanı sıra, IL-1, TNF- α ve TNF- β , interferon- γ ve kemokinler başta olmak üzere sitokinlerin inflamatuvar yanıtın oluşumunda ilave rolleri de vardır. IL-1 ve TNF- α , aktive olmuş makrofajlar tarafından sentezlenirken, TNF- β ve interferon- γ , T hücrelerinden sentezlenir (79).

Sitokinlerin sekresyonu; endotoksinler, immün kompleksler, toksinler, fiziksel travma ve bazı inflamasyon mediatörleri tarafından stimüle edilir. IL-1 ve TNF; endotelde “endotelial aktivasyon” olarak isimlendirilen bir grup değişikliği stimüle eder. Bu değişiklikler; adezyon moleküllerinin artmış yüzey ifadesi, bazı sitokin ve büyüme faktörlerinin sekresyonu, eikozanoidlerin ve NO sentezlenmesi ve endotel trombojenitesinin artmasıdır (79).

TNF- α ayrıca nötrofillerin agregasyonu ve aktivasyonunu stimüle eder; mezenkimal hücrelerden proteolitik enzimlerin salınımını uyarak doku hasarına neden olur . IL-1 ve TNF- α enfeksiyonlara ya da yaralanmalara eşlik eden sistemik akut-faz reaksiyonlarını uyarır. Bunun yanı sıra, TNF- α septik şok da hipotansif etkilerin ortaya çıkmasına neden olan NO (myokard kasılmasında azalma ve damar düz kasındaki gevşetici etkisi ile) sentezini de uyarır. IFN- γ , makrofaj ve nötrofiller için güçlü bir aktivatördür; onların oksidatif yıkımdan sorumlu enzimlerini arttırarak, fagosite edilmiş mikroorganizmaların öldürülmesini sağlar. Aynı zamanda bir “NOS” uyarıcısıdır (43,44,45,79).

2.3.3. Trombositlerin Rolü

Trombositler, trombotik etkileri ile beraber kemotaktik fonksiyonlarıyla da inflamatuvar cevapta rol oynarlar. Adhezyon sonrası aktive olmuş trombositler, salgıladıkları kemotaktik faktörlerle direkt olarak etki ettikleri gibi , bağlandıkları hücrelerin (endotel / lökosit) kemotaktik özelliklerini değiştirerek etki ederler (80).

Hücre zarı fosfolipitlerinin peroksidasyonu sonucu; hücre zarı bütünlüğü, geçirgenliği ve hücre yüzey reseptör fonksiyonları etkilenir. Reperfüzyon periyoduyla birlikte şiddetli trombosit aktivasyonu oluşur. Artmış bu aktivite, reperfüzyon

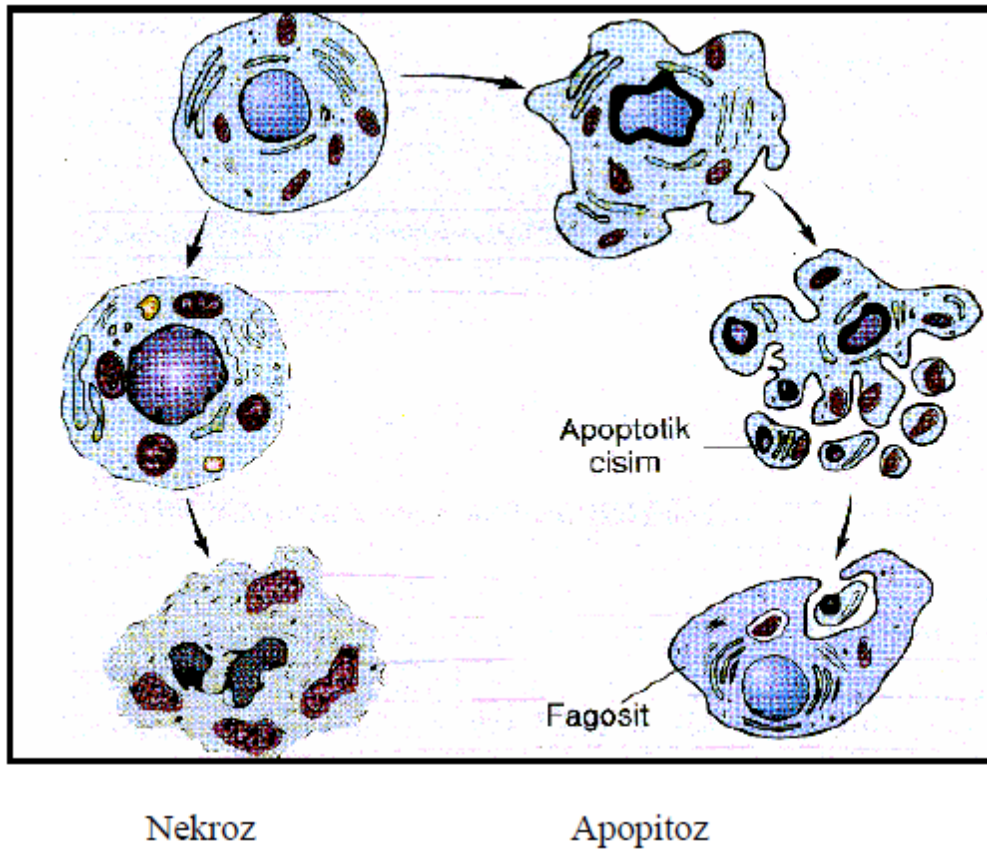
döneminde artmış trombojenite ve yeniden tıkanıklık risklerininide beraberinde getirir. Trombosit aktivasyonun en önemli etkeni tam olarak bilinmemekle birlikte, reperfüzyonla birlikte oluşan SOR patlaması suçlanmaktadır (81).

2.4. Apopitoz

Apoptozis ,organizmanın ihtiyaç duymadığı, biyolojik görevini tamamlamış ve ya hasarlanmış hücrelerin zararsız bir biçimde ortadan kaldırılmasını sağlayan ve genetik olarak kontrol edilen programlı hücre ölümüdür (82,83). Bir grup protein ve gen ekspresyonunun birlikte işlemesi sonucunda meydana gelir. Gen ekspresyonu ile birlikte çekirdek DNA'sı kırılır, kromatin çekirdekte yoğunlaşarak çeperde toplanır, sitoplazma büzülür, bu esnada hücre membran bütünlüğü ve mitokondrion dış yapısı korunur. Sonunda hücre apoptotik cisimcikler oluşturularak parçalanır. Bu cisimcikler yakınındaki yerleşik hücreler, bölgesel makrofajlar, mikroglial hücreler tarafından abartılı bir inflamatuvar reaksiyon olmadan fagosite edilirler(84,85)(Şekil 2.4).

Apoptoz, embriyonal dönemdeki temel hücre ölüm şeklidir. Fetal yaşam sırasında hücrelerin büyük kısmı bu yolla ortadan kaldırılır. Hücre çekirdeğinde DNA hasarı tamir edilemeyecek boyuta geldiğinde (Özellikle yüksek çoğalma yeteneğine sahip hücrelerde) apoptoz programları aktive olabilir (86,87).

Nekrotik hücre ölümü ise apoptozdan çok farklıdır. Hücre şişmesi, membran bütünlüğünün kaybı ve belirgin inflamasyon ile karakterizedir. DNA iplikçikleri, apoptozdaki gibi internükleozomal bağlantı noktalarından, düzenli olarak kırılmaz, rastgele olacak şekilde kırılır (86,88).



Şekil 2.4: Apoptozis- Nekroz Mekanizması (84)

Apoptozisin canlı hücrelerinin reperfüzyondan hasar görmelerinde önemli bir faktör olduğu, hem hayvan deneylerinde, hemde klinik transplantasyon çalışmalarında gösterilmiştir(89,90). Reperfüzyon sonucunda pre- apoptotik proteinler olan caspase-3 ve caspase-8'in aktivasyonu ile apoptoz tetiklenir. Caspase-3 ve caspase-8 birlikte mitokondrial membran yapısında ve fonksiyonlarında bozulmaya yol açmanın yanısıra sitoplazmaya sitokrom C salınımına ve sonuçta nükleer DNA'nın yıkılarak hücrenin ölmesine sebep olmaktadır (87,91). Ölüm reseptörleri aracılığı ile hücre içine iletilir. Ölüm reseptörleri, tümör nekroze edici faktör (TNF) reseptörünün üst ailesine aittirler ve TNF R-1, FAS ve p75 NTR'yi içerirler. Ölüm sinyalinin dışarıdan gelmesi şart değildir hücre içerisinde hasarlanmış DNA, endoplazmikretikulum veya mitokondride bu sinyalin kaynağı olabilir (92).

Apopitozis iki aşamada gelişmektedir.

1. Başlangıç fazı (ölüm faktörleri, ölüm reseptörleri)
2. İkinci faz (mitokondriyal disfonksiyon)

Ölüm faktörleri TNF reseptör-1 (TNF-R1) ve Fas (CD95/APO-1) reseptörleridir. Bu reseptörler ligantları ile bağlandıktan sonra Fas, TNF-R1, adaptör proteinler ve procaspaslardan oluşan bir ölüm kompleksinin oluşmasına aracılık ederler. Oluşan bu kompleks ise caspase-8 ve caspase-3'ün aktivasyonunu sağlar (91). Ölüm faktörlerinin salınımını takiben mitokondriyal disfonksiyon başlar. Mitokondri dış zarı üzerindeki pro ve antiapoptotik Bcl reseptör ailesi üyelerinin birbirleriyle olan etkileşimlerinin hücrede yaşam ile ölüm arasındaki kararın alınmasında rol oynadığı düşünülmektedir (92). Ölüm reseptörleri ile mitokondriyal disfonksiyonun başlaması bir bid proteini ile ilişkilidir. Bid proteini caspase-8 tarafından aktive edildikten sonra mitokondrilerden sitokrom-C salınmaya başlar. Oluşan sitokrom-C Apaf-1 aktivasyonunu sağlar, aktive Apaf-1 caspase 9 aktivasyonunu yapar. Aktive olan caspase-9, caspase-8 ile birlikte caspase-3 aktivasyonunu gerçekleştirir. Kaskadın en sonunda aktive olan caspase-3 nükleazları aktive eder ve çekirdek DNA'sının yıkılması ile hücrenin ölümüne sebep olur (86,93).

2.5. İskemi Reperfüzyon Sonrası Oluşan İskelet Kası Hasarının Patofizyolojisi

1960 yılında Haimovici tarafından , ilk kez “myonefropatik-metabolik sendrom” olarak İskemik ekstremite revaskülarizasyonu ile oluşabilecek risk tariflenmiştir (94). 1969 yılında, iskemik ekstremite revaskülarizasyonunu takiben %85'lik mortalite tariflenmiş olup Haimovici'den farklı olarak mortalitenin kardiyopulmoner nedenlere bağlı olduğu gözlenmiştir (95).

İskemiye karşı olan tolerans dokunun türüne ve kollateral dolaşım varlığına göre değişir. Normotermik doku iskemisinde geri dönüşümsüz hasar; kasta 4.saatte, sinirde 8.saatte, yağ dokusunda 24.saatte ve kemikte yaklaşık olarak 4.günde oluşur . İskelet kası, ekstremiteyi oluşturan primer kütle olup aynı zamanda iskemik hasara en hassas

dokudur. Dolayısıyla iskelet kası hasarı ekstremite reperfüzyon hasarının en önemli bölümünü oluşturur (96).

Kas ölümü sonrası makroskopik ve mikroskopik değişiklikler minimal olduğundan kas ölüm zamanını belirtmek zordur. İskemiye takiben yaklaşık üçüncü saatte ciddi kas hasarı ve altıncı saatte yaklaşık %97'lik fonksiyonel doku kaybı olduğu spektrofotometrik yöntemlerle gösterilmiştir. Dolayısıyla geri dönüşümsüz zedelenme zamanının tayininde spektrofotometre önemlidir (97).

Kas nekrozu ve ATP deposu azalması arasında yakın ilişki saptanmıştır. İskemik kas dokusunda öncelikle glikojen ve kreatin fosfat azalırken bu safhada çok fazla myonekroz oluşmaz. Sonrasında, ATP azalmasıyla birlikte, kas nekrozu hızla artar ve 6 saatlik kas iskemisinin sonucunda, normal kas dokusunda mevcut ATP deposunda %80 azalma ve kas dokusunun tümünde nekroz oluşur (98).

Kas fiberleri, içerdikleri myoglobin miktarına bağlı olarak, kırmızı (tip 1) ve beyaz (tip 2) olarak sınıflandırılır. Çoğu kas her iki türü de içermekteyse de bir tip daha baskın bulunur. Örneğin bacağın ön kompartmanında daha çok tip 1 veya yavaş kasılan fiberler baskın olup, enerji üretiminde aerobik metabolizmayı kullanmaları bu kas grubunu iskemiye daha hassas kılar. Bacağın arka kompartmanında ise tip 2 veya hızlı kasılan fiberler baskın olup, enerji üretiminde anaerobik metabolizma ön plandadır. İskeminin süresi ve etkilenen fiber tipi iskemik hasarda önemli olmakla birlikte dokunun vücuttaki konumu da önemlidir. Örneğin, çabuk soğuma nedeniyle, distal ekstremite kas dokusu proksimal kas dokusuna göre iskemiye daha dirençlidir (96).

2.5.1. Mikrodolaşımda Meydana Gelen Değişiklikler

İskemik dönemde gerçekleşir ve iskemi süresi ile uyum gösterir. İskemi, ilk olarak kapiller endotel hücreleri etkiler. Hem lümen hem de sitoplazmaya doğru uzanan parmaklı çıkıntılar oluşturur. İskeminin devamıyla birlikte endotel veziküllerinde artış başlar. Bu arada, hücreler arası bağlar zayıflar ve geçit genişler. İskeminin dördüncü saatinden sonra mikrosirkülasyonda hücresel etkileşimler (eritrositik, trombositik ve

lökositik) başlar. Venöz ve arteriyel kılcallar, reperfüzyon öncesinde, sıkışmış eritrositlerle kapanmış görünümündedirler. Rulo halindeki eritrosit kümeleri, erken reperfüzyon döneminde, endotel yüzeyde hasarlanma oluştururlar. Endotel hücre sitoplazmasındaki parçalanma sonucu hücreler arası büyük geçitler oluşur. Reperfüzyonla birlikte, özellikle venöz kılcallarda, lümen içi platelet ve fibrin kümeleri ile karakterize trombotik komplikasyonlar oluşur. Bu platelet kümeleri, endotel yüzde meydana gelen geniş defektleri kapatır. Venlerde lökosit diapedezi oluşurken, venöz kılcallarda lökositlerin lenfosit ve monositlerle olan kümeleşmesi oluşur (96).

İskemi süresi uzadıkça damarsal geçirgenlik artışı ve ilerleyici interstisyel ödem meydana gelir. Yapılan bir çalışmada, 4 saatlik iskemi sonrası kas ağırlığının arttığı ve bu ağırlığın reperfüzyonun üçüncü saatinde maksimuma çıktığı belirtilmiştir (99).

2.5.2. İskelet Kasında Meydana Gelen Lokal İnflamatuar Cevap

İskemik doku reperfüzyonu sonucunda inflamatuvar bir cevap ortaya çıkar. Ancak doku nekrozundan reperfüzyon döneminden daha çok iskemik dönem sorumludur. Damar tıkanıklıklarında, hayvan turnike modellerinin aksine, tıkanıklığın bir miktar distaline kadar, kollateral dolaşıma bağlı, normal doku izlenir. Dolayısıyla reperfüzyonla amaç, distaldeki nekrotik alanın değil bu alanın kanlandırılmasıdır. Bu bölge; nekrotik ve ciddi hasarlanmış hücrelerin iç içe olduğu ve inflamatuvar aracılardan sentezlendiği yerdir. Dolayısıyla, reperfüzyon sonrası hasarlı veya nekrotik alan miktarı morbiditeyi belirler. İnflamatuar cevabın tetikleyicileri; asit fosfataz, inorganik fosfat, laktik asit, myoglobin, nükleotidler, potasyum, proteolitik enzimler ve pürin bazları gibi kas yıkım ürünleridir. Bu yıkım ürünleri; prokoagulan özellikte olup, intrinsek pıhtılaşma sistemini aktive ederek venöz kılcal trombozu ve kollateral arteriollerde vazospasm oluştururlar. İnflamatuar cevabın en belirgin olduğu geçiş alanındaki bu tarz bir aktivite, nekrotik alanda genişlemeye neden olur. Dolayısıyla, antitrombotik ve antiplatelet tedaviyle geri dönüşümlü hasar bölgelerine olan kollateral akım ve mikrodolaşım korunarak nekrotik genişleme engellenebilir (96).

2.6. İskemi Reperfüzyon Hasarında Tedavi Seçenekleri

İskemi reperfüzyon hasarını azaltmada kombine stratejilerin etkinliğini bulan az sayıda çalışmalar vardır. İskemi reperfüzyon hasarını azaltmak için tedavi seçenekleri (96);

- 1.Kontrollü,dereceli reperfüzyon
- 2.İskemik ön koşullanma (preconditioning)
- 3.Aspirin-triggered lipoxin analogları
- 4.Antioksidan tedavi
 - a.Süperoksit dismutaz
 - b.N-asetilsistein
 - c.Mannitol
 - d.Vitamin E
- 5.Kalsiyum antagonistleri
- 6.Anjiotensin converting enzim inhibitörleri
7. Anti-kompleman tedavi
- 8.Lökosit depleasyonu-filtrasyonu
- 9.Endotelin reseptör antagonistleri
- 10.Trombosit aktivasyon faktör antagonistleri

2.6.1. İskemik Ön Koşullanma

İskemik ön koşullanma ,dokuların ,ciddi iskemi reperfüzyon hasarı öncesi, kısa süreli iskemi reperfüzyon periyodlarına maruz bırakılmasıdır (100). Böylelikle doku ,uzun süreli iskemi reperfüzyona daha dirençli hale gelir. İskemik önkoşullanma sikluslarının sayısı ve süresi arttıkça koruyuculuğu artar (101). Ön koşullanma özellikle ventriküler fonksiyonu iyilestirmede ve iskemi reperfüzyon sonrası myokardiyal nötrofil birikmesini ve apoptozisi azalttığını göstermiştir (102,103).

İskemik ön koşullanmanın yararlı etkileri bir çok yerde gösterilmiş olmasına rağmen insan klinik verileri sınırlıdır. Akut ve geç iskemik ön koşullanmanın koruyucu

etkilerinin temelini farklı mekanizmalar oluşturur. Akut (erken) ön koşullanmada etki reperfüzyonun ilk dakikalarında başlayıp 2-3 saat sürerken, gecikmiş önkoşullanmada etki reperfüzyonun 12-24'ncü saatinde başlar ve 2-3 gün devam eder (104). Akut (erken) iskemik ön koşullanma; adenozin veya α 1-adrenerjik reseptör aracılı, pertussis duyarlı G protein aktivasyonuna neden olur. Bunun sonucunda fosfolipaz C veya D aktivasyonu oluşarak, protein kinaz C üzerinden ATP duyarlı potasyum kanallarının fosforilasyonu ve 5'-nükleotidaz yapının endotel hücre düzeyinde translokasyonu gerçekleşir. Sonuç olarak, adenozin oluşumu ve hücre sel enerji depolarında artış ile lökosit yapışkanlığında azalmaya neden olur (102).

Kısa ve uzamış iskemik hasar arasındaki zaman aralığı iki saatin üzerine çıktığında önkoşullanmanın akut ve yararlı etkileri kaybediliyor olsada, eğer uzamış iskemik hasar ilk iskemi periyodundan 24 saat sonra oluşursa önkoşullanmanın gecikmiş bir koruyucu etkisi gözlenir (5). İskemik önkoşullanma aynı zamanda artmış interstisyel adenozin oluşumuyla birliktelik göstermekte olup, bu adenozinin CD73 aracılı adenozinmonofosfat defosforilasyonu sonucu oluştuğu düşünülmektedir (105).

Artmış interstisyel adenozin seviyesi; nötrofil adezyonu, mikrovasküler geçirgenlik ve nötrofil yuvarlanma hızına olumlu etkilerde bulunurken nötrofil akış hızını etkilemediği gözlenmiştir (106). Akut yanıtta farklı olarak gecikmiş ön koşullanma gen ifadesindeki değişime bağlı olduğu kadar antioksidan enzimler, nitrik oksit sentaz ve ısı şok proteinlerini içeren yeni protein sentezine bağlıdır (5).

Erken iskemik ön koşullanmada hem akım hemodinamiği hem de lökosit aktivasyonu olumlu yönde etkilenirken, gecikmiş ön koşullanmada sadece lökosit aktivasyonu açısından olumlu fayda elde edilmiştir. Dolayısıyla iskemi, akım dinamiğini daha erken safhada etkilemektedir (1).

İnsanlarda klinik uygulanımı konusunda bilgiler yetersiz olup yapılan son çalışmalarda koroner bypass cerrahisi sonrası artmış (107) ve karaciğer rezeksiyonu sonrası doku hasarında (108) azalma sağladığı bildirilmiştir.

2.6.2. Antioksidan Tedavi:

Çok sayıda yapılan deneysel hayvan çalışmaları iskemi reperfüzyon hasarını azaltmada ve önlemede antioksidan tedavinin, SOD, CAT, mannitol, vitamin E, N-asetilsistein demir şelate eden bileşikler veya kalsiyum kanal blokerleri etkinliğini göstermiştir (109). İnsan rekombinant SOD ile ilgili küçük bir prospektif çalışmada hemorajik şoklu hastalarda Marzi ve arkadaşları (110) 5 gün boyunca devamlı süperoksid infuzyonu alan hastalarda anlamlı olarak daha az ciddi organ yetmezliği, daha az yoğun bakımda kalım ve daha düşük serum fosfolipaz ve PMNL elastaz konsantrasyonları olduğunu göstermiştir. Ayrıca SOD'un greft canlılığını artırdığı ve kadavra böbrek transplantasyonu sonrası akut rejeksiyon insidansını azalttığı gösterilmiştir (111).

E vitamini, en önemli serbest oksijen radikali temizleyicilerindedir. Bu işlem sırasında kendi de bir serbest radikal haline gelir ancak askorbik asit (vitamin C) gibi moleküllerin yardımıyla yeniden stabil hale dönüştürülür (α -tokoferol + askorbik asit \rightarrow α -tokoferol + askorbik asit). (112). İR sürecinde doku Vit E seviyesinin düştüğü, Vit E tatbikiyle ROT ve lipit peroksidlerin oluşumunun azaltılabildiği gözlenmiştir (113).

Vit E; antioksidan etkisi dışında, endotel hücre yüzeyinde E selektin ve ICAM-1 ifadesini azaltarak endotel-nötrofil etkileşimini ve dolayısıyla nötrofil aktivasyon ve birikimini engeller. Bu etki mikrodolaşım devamlılığının sağlanmasında önemlidir (114).

A, C ve E vitaminlerinin birlikte veya diğer farmakolojik ajanlarla (mannitol) kullanımı ile elde edilen antioksidan etki, monoterapileri sırasında elde edilen antioksidan etkiye göre daha güçlüdür (115). Vitamin E ve ilopost'un birlikte kullanımı ile, lipit peroksidasyonunda azalmaya bağlı, İR hasarında azalma saptanmıştır (116). Bir vitamin E analogu olan Lazaroid bileşikler (U83836E)'in de oksidatif stresi azaltarak İR'a karşı koruyucu oldukları gösterilmiştir (117).

2.6.3. Antilökosit Tedavi

Lökosit aracılı iskemi reperfüzyon hasarını engellemeyi hedefleyen deneysel terapötik stratejiler inflamatuvar mediator salımının veya reseptör bağlanmasıyla lökosit adezyon molekülü sentezinin veya lökosit endotel adezyonunun inhibisyonu üzerine odaklanmıştır. İskemi reperfüzyon sonrası lökosit aktivasyonu histamin, trombosit aktivasyon faktörü, LTB₄ ve TNF α gibi inflamatuvar mediyatorların salınımı ile kolaylaştırılır. Çözülebilir IL-1 reseptör antagonisti, anti- TNF α antikor veya trombosit aktivasyon faktörü- LTB₄ antagonistleri gibi terapötik ajanlar kullanarak inflamatuvar mediyator salımının veya reseptör bağlanmasıyla inhibisyonu iskemi reperfüzyonunun induklediği lökosit aktivasyonunu hafifletir. Aspirin, glukokortikoidler, altın gibi antiinflamatuvar ilaçlar lökosit adezyon molekülü sentezi veya sitokin oluşumunu azaltırlar. Ancak yapılan çalışmalar hayvan deneylerinde etkin olmakla birlikte ,insanlardaki klinik kullanımına ait bilgiler yetersizdir (118).

2.6.4. Antitrombotik Tedavi

Heparin; antitrombotik etkinliğinin yanısıra anti-inflamatuvar etkinliğe de sahiptir. Anti-inflamatuvar etkileri; P ve L selektine bağlanarak lökosit-endotel etkileşiminin engellenmesi, NF- κ B inhibisyonu sağlayarak inflamatuvar kaskadın bozulması ve lökositlerden ROT oluşumunun engellenmesidir. Venöz kılcallarda; endotel-lökosit etkileşimi, trombosit kümeleşmesi ve mikrotrombüs oluşumunu engelleyerek “no reflow” fenomeni etkinliğini azaltır (119).

Etkin bir fibrinolitik olan tissue plasminogen activator'ün iskemi reperfüzyonda uygulanımı sonrası, lökosit adezyon ve diapedezinde azalmaya bağlı, doku inflamasyon ve ödeminde azalma saptanmıştır (120).

2.7. İloprost

Siklooksijenaz yolunun bir metaboliti olan prostaglandin (prostosiklin),1970 li yılların başında keşfedildiği zaman tıp,biyoloji ve kimya alanında çalışan bilim adamlarının hayal dünyalarını altüst etmişti. Prostaglandinler endojen olarak endotel hücrelerinden,düz kaslardan, fibroblastlardan, mast hücrelerinden ,lökositlerden ve trombositlerden salınan aktif mediyatörlerdir.Araşidonik asit metabolizması üzerinden sentezlenen bir maddedir. Prostasiklin, mikrovasküler kan akışının düzenlenmesinde yani trombosit agregasyonu ve vazodilatasyonun inhibe edilmesinde önemli rol oynamaktadır (121,122).

İloprostun etki mekanizması komplekstir ve hala net olarak tanımlanamamıştır. Etkilerini, prostasiklin reseptörleriyle etkileşerek; trombosit adezyonunu ve agregasyonunun inhibisyonu, damar duvarındaki media tabakasındaki düz kas hücrelerinin proliferasyonunun inhibisyonu, profibrinolitik aktivite, vazodilatör etkileri, lökositlerin aktivasyonunun ve kemotaksisin inhibisyonu, lökositler tarafından üretilen süperoksit anyonlarının azaltılması, trombosit-lökosit etkileşiminin azaltılması, kollateral sirkülasyon formasyonunun ve büyümesinin stimüle edilmesi, mikrovasküler sistemde akımın regüle edilmesi yollarıyla gerçekleştirmektedir (123,124). PgI₂ sitoprotektif ,antiagragan ve vazodilatator etkilere sahiptir (127,128,129)

2.7.1. Farmakodinamik Özellikler

İn Vitro antitrombosit etkinlik

Trombosit kümeleşme ve degranülasyonunu arttıran adenindinükleotid, araşidonik asit, kollajen, epinefrin ve U 46619 gibi maddelerin etkilerini, dozla orantılı olarak, engellediği in vitro olarak gösterilmiştir (130).

Diyabetes mellitus ve periferik arter hastalığında artmış trombosit cevabı ve azalmış iloprost cevabı gözlenmiştir. Diyabetik hastalarda kan şekeri kontrolüyle iloprost trombosit etkinliğinin normale yaklaştığı gözlenmiştir (131,132).

İn Vivo Antitrombosit Etkinlik

İntravenöz iloprost'un, trombosit hiperaktivitesi ve travma sonrası hemostazda antitrombosit etkinliklerinin doz bağımlı olduğu hayvan deneylerinde gösterilmiştir (133). İloprost'un klinik kullanımında, antitrombosit etkinin yine doz bağımlı (0,5-2 ng/kg/dk) olduğu görülmüş, yaklaşık 2 ng/kg/dk dozda yan etkilerinin belirginleştiği ve infüzyonun kesilmesini takiben 1 saat içinde antitrombosit etkilerinin yok olduğu gösterilmiştir (134,135).

Fontaine evre II tıkaçıcı periferik arter hastalarında ve akut anterior miyokard infarktüsü tanısı ile izlenen erken dönemdeki 14 hastalık bir grupta iloprost tedavisi ile trombosit aktivitesinin düştüğü ancak tedavi bitiminde bu etkinin normale döndüğü gözlenmiştir. Ayrıca İloprost tedavisi sonrasında aterosklerotik alanlardaki trombosit kümeleşme azalması gama kamera ile gösterilmiştir (135,136)

Trombosit Salınım Reaksiyonları

Trombosit aktivasyonunun son safhası olan degranülasyon da, aynı kümeleşmede olduğu gibi, iloprost tarafından benzer dozlarda engellenir (134,137). İloprost tedavisi almış hastalardan alınan kanların, in vitro, trombojenik maddelerle teması sonrası trombosit serotonin ve β -TG salınımlarının azaldığı gözlenmiştir. Heparinizasyon sonrası trombosit aktivasyonuna bağlı spesifik protein yükselişi iloprost ile engellenememiştir. Dolayısıyla fizyolojik olarak aktive olmuş trombosit salınım reaksiyonları iloprost ile azaltılamamaktadır (138).

Eklenmiş Antitrombosit Etki Mekanizması

Trombositler, yüksek sensitivite ve spesifitede epoprostenol (iloprost) reseptörü içerir. İloprost-reseptör etkileşimi, ilaç kan düzeyi ile orantılı ve geri dönüşümlüdür

(139). Reseptör aktivasyonu, adenilat siklaz aracılığıyla cyclic adenosine monophosphate (cAMP) oluşumuna neden olur. Adenilat siklaz enzim aktivitesi Gi ve Gs ile kontrol edilir. Dolayısıyla iloprost, Gs üzerinden etki ederek, enzim aktivasyonu sağlar. cAMP ise trombositler içinde fosfolipaz ve sitozolik kalsiyum seviyesi regülasyonu sağlar (140). İloprost'un; adenzindifosfat, epinefrin ve trombin'e bağlı trombosit aktivasyonunu engelleyebilmesi, %90 oranında, cAMP artışı sonucu oluşmaktadır (130).

Sigara kullanımı , diabetes mellitus , hiperlipitemi , myokard infarktüsü ve uzun süre iloprost maruziyeti durumlarında; iloprost'un, reseptör afinitesi değişmeksizin bağlanma kapasitesinde düşüklük saptanmıştır (141). Reseptör sayısı ve affinitesi ile iloprost aktivitesi arasında tam bir korelasyon yoktur . Aynı zamanda cAMP cevabı olmadan da iloprost'a bağlı olarak antitrombosit etki meydana gelebilir (130). Bu iki durum, iloprost'un, trombositler üzerinde cAMP dışındaki yollarla da etki ettiğini düşündürmektedir (141).

Platelet Hiperaktivitesi:

İloprost tedavisi verilen periferik arter hastalarında platelet hiperaktivitesine ait yayınlar vardır .Bu duruma, Fontaine IV hastalarında iloprost uygulanımı sonrası rastlanmış ve "iloprost rebound" olarak rapor edilmiştir (142,143). Yapılan çalışmalarda; bu etkinin, düşük plasma konsantrasyonlarında çıktığı, yüksek konsantrasyonlarda (1,6-8 µ/L) ise antitrombosit etkinliğin oluştuğu bildirilmiştir (142).

Kan Akımı Üzerine Etkisi

Kan akışkanlığı artışı ve kırmızı hücre deformasyonuna 1-2 ng/kg/dk dozunda neden olmadığı, ancak doz aralığı yükseltildiğinde (2-4 ng/kg/dk) akışkanlığı ve ekstravazasyonu arttırdığı bildirilmiştir (90). Ancak, periferik arter hastalarında yapılan klinik bir çalışmada; 6 saat 0,5-2 ng/kg/dk iloprost infüzyonuyla, mikrodolaşım fonksiyonlarında düzelme saptanmıştır (144).

Hemodinamik Etkiler

İn vitro Ortamda Damar Üzerine Etkileri

İn vitro olarak, İloprost'un, cAMP aracılı arteryel vazodilatasyon oluşturduğu gösterilmiştir (145). Aortada mevcut olan epoprostenol ve iloprost reseptörlerinin arteryel vazodilatator etkilerinin benzerlik gösterdiği gösterilmiştir. Fakat venöz dilatasyon konusundaki veriler halen yetersizdir. Epoprostenol ve iloprost in vitro olarak, safen ven ve pulmoner ven de vazodilatasyon yapar. Koroner venlerde, epoprostenol doz bağımlı kontraksiyon oluştururken, iloprost tek başına yetersizdir. Ancak, birlikte kullanıldıklarında, iloprost epoprostenolün etkisini yok eder. İloprost'a ait arteryel vazodilatör etki özellikle sağlam endotelde daha belirgindir. Ayrıca İloprost; araziidonik asit TxA2 analoğu U46619 ve angiotensin II gibi vazokonstriktör maddelerin de etkilerini yok eder. Bunun dışında, TxA2-epoprostenol arasındaki dengeye etki ederek, arteryel dilatasyon sağlar (145,146).

İn vivo Ortamda Damar Üzerine Etkileri

Yapılan hayvan deneylerinde, iloprost'un antitrombosit etkinliğinin hipotansif etkisine göre 2-7 kat fazla olduğu gösterilmiştir (147). Buna benzer sonuçlar insanlar üzerinde de saptanmıştır (148). İloprost'un doz bağımlı ve geri dönüşümlü hipotansif etkisi hayvan deneylerinde gösterilmiştir. Yapılan hipertansif hayvan modellerinde oral uygulanım sonrası uzun süreli normotansiyon elde edilmiştir (148). Hipotansiyon veya taşikardiye neden olmayan düşük dozlarda bile mezenterik alt ekstremitte vasküler rezistansında azalma ve kan akımında artış saptanmıştır (149).

Arteryel dilatasyon etkisi, teorik olarak iloprost'un koroner arter hastalığı, primer pulmoner hipertansiyon ve serebrovasküler hastalıkta kullanılabilirliğini destekler. Buna yönelik hayvan deneylerinde, iloprost'un, 60 dakikalık bilateral karotis arter oklüzyonu sonrasında, ödem, kalsiyum birikimi ve öğrenme kapasitesi verileri açısından kontrol grubuna göre etkin olduğu gösterilmiştir (150). Vazodilatasyon ve aynı zamanda trombosit agregasyonu inhibisyonunun başladığı en düşük infuzyon hızının 0.5

ng/kg/dk düzeyinde olduğu ve yüksek iloprost dozlarının etkiyi arttırmadığı gösterilmiştir (138,151).

0.5-2.0 ng/kg/dk dozundan daha yüksek dozlarda vazodilatasyonun artmasına bağlı olarak kanın ciltten kas dokusuna doğru kaçması (steal fenomeni) sonucu terapötik etkiyi değiştirmez. Antiplatelet ve diğer olumlu etkilerinin azalmasına neden olur. Koroner yetmezliği bulunan hastalarda iloprost'un yüksek dozlarda (2.0-6.0 ng/kg/dk) koroner dolaşımdan çalmaya neden olduğu bildirilmiştir (152). Burada iloprost infüzyon dozu değil, optimum dozun hedef alınması gerekliliği sonucuna varılmıştır. Hayvan pulmoner hipertansiyon modelinde ise 0,4 µg/kg/dk iloprost infüzyonuyla, pulmoner arter basıncı ve pulmoner vasküler rezistansda, kardiyak indeks ve kan gazı değişikliği yapmaksızın, belirgin düzelmeye sağladığı saptanmıştır (153) .

Klinik Kullanımında Saptanan Hemodinamik Etkiler

0,5-4 ng/kg/dk iloprost infüzyonuyla; vazodilatasyona bağlı, periferik vasküler rezistans ve ortalama kan basıncında doz bağımlı azalma olurken, kalp hızı ve kardiyak indekste artış oluşur (154). Primer pulmoner hipertansiyonlu hastalarda; iloprost infüzyonuyla, pulmoner vasküler rezistansda doz bağımlı azalma, kardiyak indeks ve pulmoner arter oksijen saturasyonunda ise artış gözlenmiştir (155). Tüm hasta gruplarında, iloprost infüzyonu; böbrek kan akımında doz bağımlı artış ve diüretik etki sağlamıştır (156).

Hücre Koruyucu Etki

İloprost'un myokard fonksiyonunu koruduğu yapılan birçok klinik myokard İR modelinde, gösterilmiştir. İR oluşturulmuş myokardda İloprost'un adrenerjik sinir uçları katekolamin kaybını azaltarak uyarılabilirlik durumunu koruduğu ,mitokondrial disfonksiyon ve oksidatif stresi azalttığı saptanmıştır (157,158).

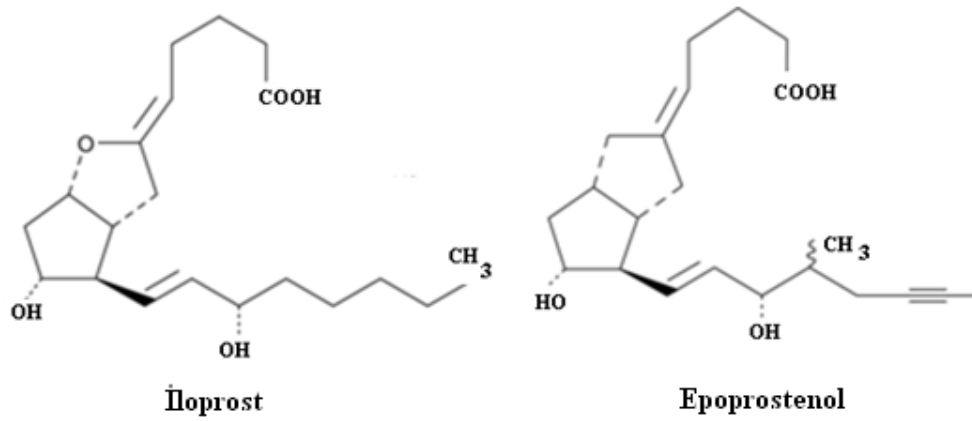
Oluşturulan hayvan myokardiyal iskemi modelinde 0,1 µg/kg/dk iloprost infüzyonu sonucunda hücre zarı fosfolipit kaybının ve dolayısıyla hücre zarı hasarının azaldığı gösterilmiş olup aynı modelde verilen 1,2 µg/kg/dk iloprost infüzyonu

sonucunda ise iskemik alan kan akımı değişmeksizin, sağlıklı myokard dokusu kan akımını arttırdığı ve infarkt alanının küçüldüğü gözlenmiştir (159). Deneysel koroner arter trombozu modellerinde ise iloprost'un, tıkanma süresini %50 uzattığı ve ST segment değişiklikleri gösterilmiştir. İloprost infüzyonuyla, TxA2 ile indüklenmiş infarkt alanında küçülme gözlenmiştir (138). İloprost infüzyonunun en fazla iskemik periyod öncesi başlatıldığında miyokardiyal koruma sağladığı gözlenmiştir (160). İloprost'un düşük dozlarıyla da miyokardiyal korunma sağlanması, bu etkinin hipotansif etkiden bağımsız olduğunu gösterir. (170). Ayrıca İloprost infüzyonu sonrası, infarkt alanı küçültücü etki ile nötrofil birikimini azaltıcı etki arasında korelasyon saptanmıştır (161).

Epoprostenol-TxA2 oranının reperfüzyon aritmilerinde önemli olduğu, iloprost'un bu oranı epoprostenol lehine çevirdiği bildirilmiştir . İn vitro olarak, iloprost'un, aritmojenik maddelerle oluşturulmuş ektopik atım ve fibrilasyonu durdurduğu ancak yüksek dozlarda kendisinin de aritmojenik olduğu gözlenmiştir . İloprost'a bağlı atrial ve ventriküler transmembran aksiyon potansiyelinde değişiklik saptanmamış olup antiaritmik etkinin elektrofizyolojik temeli çözülememiştir. Reperfüzyon aritmisinde, iloprost'un düşük doz (0,1 µg/kg/dk) infüzyonu yüksek doz (1 µg/kg/dk) infüzyon'a göre daha etkindir. Yüksek doz sonucunda oluşan hipotansiyon aritmiye katkıda bulunur (162).

2.7.2. Farmakokinetik Özellikler

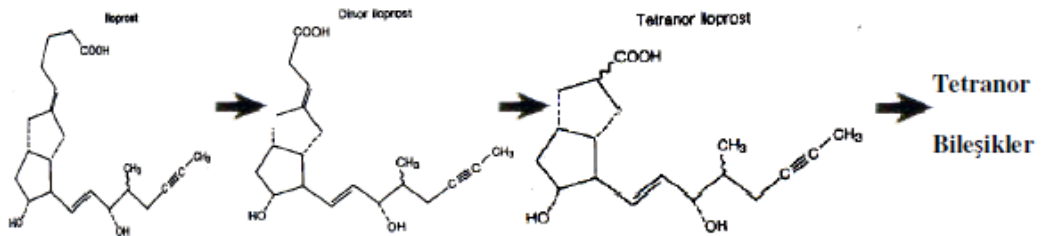
Stabil bir PGI₂ nin 2.jenerasyon analogu olan iloprost PGI₂'ye çok yakın farmakokinetik özellikler göstermektedir. Kimyasal formülü C₃₀ H₃₈ O₅ dir ve Pg I₂ nin sentetik bi analogudur. (138).İloprostun öncüsü olan epoprostenol en fazla damar endotelinde üretilir.Kimyasal yapısı şekil 2.5'de gösterilen iloprostun formülünde epoprostenolden farklı olarak C₁₈,C₁₉ da üçlü bağ ve C₁₆ da metilen grubu içermesidir. Bu moleküler farklılık ,iloprost'un daha stabil bir molekül olmasını sağlarken intravenöz ve oral kullanımına olanak verir.



Şekil 2.5: İloprost un kimyasal yapısı (138)

Proteine bağlanma oranı % 60'dır. Primer olarak karaciğerde ve esas olarak karboksi zincir bölgesinin beta oksidasyonu yoluyla metabolize olur. Yarı ömrü 20-30 dakika kadardır. Oral alındığında, çok hızlı emilime uğrayarak 10 dakika içinde maksimum plazma düzeyine ulaşırken, karaciğer ve barsaklarda çok fazla biyotransformasyona uğradığından %20 si sistemik dolaşıma geçer. İntravenöz uygulama sonrası, son safha dağılım hacmi; yaklaşık 0,7 L/kg'dır. Hayvan deneylerinde maksimum santral sinir sistemi seviyesine (eş zamanlı plazma konsantrasyonunun % 10'undan azdır) yaklaşık 5 dakikada ulaştığı gösterilmiştir (138).

İloprost β oksidasyon ile tetranor türev ve bileşiklerine metabolize olurken metabolitlerin yaklaşık %70'i ilaç alımını takiben ilk 14 saat içinde böbreklerden atılır. % 20 kadarı safra yolu ile atılır (138)(Şekil 2.6).



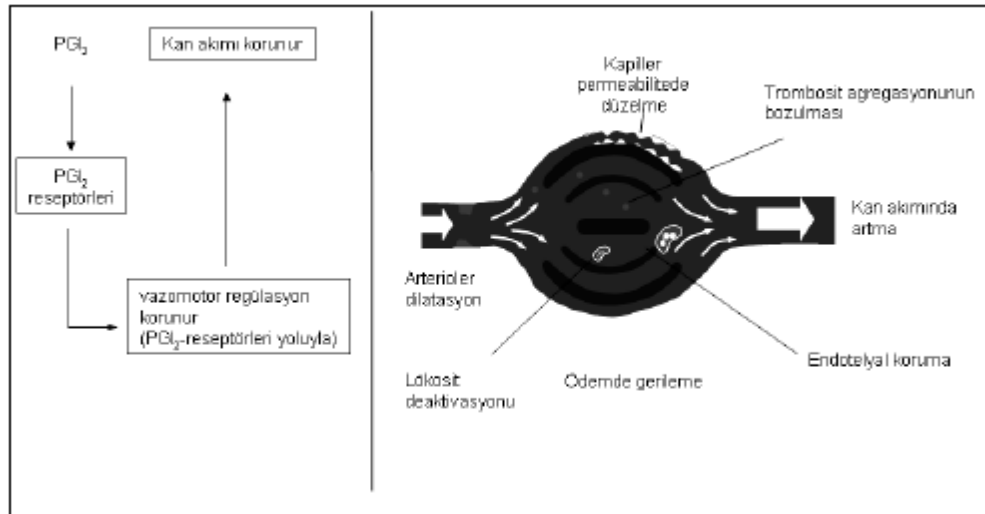
Şekil 2.6: İloprost Metabolizması (138).

Eliminasyonu bifazik olup; önce organ doku dağılımı ($t_{1/2}$: 4dk) sonrası biyotransformasyon ve eliminasyon ($t_{1/2}$: sağlıklı kişilerde 30 dakika iken kritik bacak iskemili kişilerde 37 dakika) safhalarını içerir .Epoprostenol için biyotransformasyon safhasında yarılanma ömrü yaklaşık 3 dk'dır. Böbreklerden elimine olma hızı; normal populasyonda 20 ml/dk/kg, kritik bacak iskemili hastalarda 16 ml/dk/kg ,ciddi karaciğer yetmezliğinde ise 10 ml/dk/kg 'dır Dolayısıyla karaciger sirozlu hastalarda ve diyaliz bağımlı kronik böbrek yetmezligi olan hastalarda iloprost klerensi 2-4 misli azalır. Diyaliz gerektirmeyen grupta ise bu değer normale yakındır (163).

2.7.3. İloprost Klinik Kullanım Alanları

İloprost,farmakolojik özelliklerinden dolayı klinikte birçok alanda kullanılmaktadır.Bu alanların başlıcası;periferik arter hastalığı,diyabetik ayak,venöz ülserler,Raynaud fenomeni,Buerger hastalığı tedavisi olarak sıralanabilir (164,165).

Bilindiği üzere periferik dokuların besin ihtiyaçları mikrosirkülasyon ile sağlanır. Çoğu mikrodolaşım tıkanıklığı geri dönüşümsüz olmakla beraber, iloprost infüzyonuyla; aktive olmuş trombosit-lökosit ve hasarlı endotel arasındaki kısır döngü geçici olarak kırılabilmekte ancak kronik semptomatik rahatlama sağlanamamaktadır (Şekil 2.7). İloprost bu kısır döngüde; dengeyi epoprostenol lehine çevirerek, hücrel aktivasyon ve salınımı engeller (164).



Şekil 2.7: İloprostun mikrodolaşım üzerine etkileri

İloprost kullanımı, primer hastalığa bağlı olmaksızın, mikrodolaşımı düzeltmektedir ve böylece trofik lezyonların iyileşmesi veya dinlenme durumunda ağrının giderilmesi sağlanmaktadır (166).

Kan akımının olmadığı bölgelerde PG I₂ üretimi azalmış, tromboxan A₂ düzeylerinin de artmasının sonucu olarak kapiller düzeyde mikrodolaşım mekanizması bozulur. İloprost'un trombosit ve nötrofillerin iskemik bölgeye toplanmasını engelleyici ve de vazodilatör etkileriyle mikrodolaşımı düzenleyici etkileri mevcuttur (167). Kısacası mikrodolaşım savunma sistemlerinin bileşenlerine karşı PG I₂ ve analogları yararlı etkilere sahiptir (125,126). İloprostun mikrodolaşım üzerine olan etkileri şekil 8'de gösterilmiştir.

İlomedin® antiagregan, vazodilatör, trombosit inhibisyonu yapıcı etkisi, lökosit adezyonu inhibisyonu ve mikrovasküler kan akımında artış nedeniyle periferik arter damar hastalıklarında terapötik etki gösterir (166)

Periferik arter hastalığı temelinde kritik ekstremite iskemisi olan olgularda cerrahi ve katater müdahalesinden sonuç alınmadığında veya yararsız olduğu kanıtlandığında, iloprost tedavisi denenebilir. Randomize ve placebo kontrollü, Evre III.

ve IV. Fontaine tıkaçıcı arter hastalığı olan hastaların katıldığı çalışmalarda intravenöz iloprost kullanımında, ağrının azalması, ülser iyileşmesi ve amputasyon oranlarında plaseboyla karşılaştırıldığında belirgin bir üstünlük elde edilmiştir (168).

İloprost'un terapötik sınıflandırılması konusunda oluşturulan görüş birliği belgesi oniki uluslararası uzmanlar birliğinden (Tıkaçıcı Arter Hastalığı Tedavisinde Trans-Atlantik Dernekler-Arası Görüş Birliği) oluşan TASC çalışma grubu tarafından açıklanmıştır.İloprost kontrollü, randomize çalışmalarda bugüne kadar en fazla sayıdaki, ilerlemiş kronik ekstremite iskemili hastada incelenmiş olan prostaglandindir.Eldeki veriler damarlarının yeniden açma girişimleri için uygun olmadığı ya da revaskülarizasyon girişimlerinin başarısız kaldığı kritik ekstremite iskemili hastalarda iloprost kullanımını haklı çıkarmaktadır. Tedaviye yanıt verecek hastaları öngörmek açısından herhangi bir teknik geliştirilmiş değildir, ancak ilacın oldukça yüksek düzeydeki terapötik güvenilirliği; erken bir amputasyon endikasyonunun kaçınılmaz olması dışında, bütün bu hastalarda iloprost'un denenmesini gündeme getirmektedir (169).

İloprost aynı zamanda diyabetik ayak,venöz ülserlerin tedavisinde, pulmoner hipertansiyon,septisemi,renal yetmezlik tedavisinde,donma sonrası,intraarteriyel ilaç enjeksiyonları sonrası,antifosfolipit sendromu,pyoderma gangrenozum ve ağır sistemik sklerozun tedavisinde de klinik olarak kullanılmaktadır (170,171).

İloprostun, iskemi-reperfüzyonla oluşmuş lokal organ hasarında etkin olduğu; böbrek (172), akciğer, kalp (173), spinal kord, mezenterik, karaciğer (174) ve iskelet kası iskemi reperfüzyon modellerinde gösterilmiştir. Aynı zamanda, iskemi reperfüzyona bağlı gelişen böbrek (175) ve akciğer (176) uzak organ hasarlarında da; iloprost'un hasarı azaltmada etkin olduğu gösterilmiştir. Dolayısıyla iloprost; İ-R'a bağlı lokal ve uzak organ hasarlarında etkin bir tedavi modalitesidir (177).

2.7.4. İloprost Uygulama Şekli ve Dozu

Piyasada ilomedin(Bayer Schering Pharma AG®,Berlin,Germany) ticari ismi ile bulunmaktadır.1 ml'lik ampulde 20 microgram iloprost bulunmaktadır.Ampuller

infüzyon pompası ile kullanılmalıdır. Hazırlanan solüsyonlar 24 saat içerisinde kullanılmalıdır. İntramusküler ve direkt intravenöz yoldan kullanılmamalıdır. Bir ampul 100 cc %0.9 NaCl veya %5 dekstroz ile dilüe edilerek 0.5-2 ng/kg/dk dozunda verilmelidir (11).

Pulmoner hipertansiyonda 2,5 µg inhale doz önerilen başlangıç tedavidir. Bu doz hasta tarafından tolere edilmişse günde 6-9 kez 5 µg şeklinde tatbik edilebilir (178). İntravenöz tedaviye 0,5 ng/kg/dk dozunda başlanır ve hasta toleransına uygun olarak her seferinde 0,5 ng/kg/dk artırılarak maksimum doza ulaşılır. Yapılan; çift kör, doz bağımlı etkinlik çalışmasında (DAWİD, Dosis Abhängigkeit der Wirksamkeit von İlomedin® Doppelblind); dozaj yükseldikçe ilaç etkinliğinde artış olmaksızın yan etkilerin belirgin arttığı, dolayısıyla kar/zarar oranı bakımından ilacın maksimum tolere edilen dozda değil optimal dozda verilmesi gerektiği kanaatine varıldı (179). Periferik vasküler hastalık ve diyabetik anjiyopati'de, 14-28 gün boyunca, günde 6 saat 2 ng/kg/dk dozunda infüzyon tedavisi önerilmektedir. Diyabetik anjiyopatide bu protokolün ikinci bir kere tekrar edilmesiyle klinik başarının arttığı görülmüştür. Raynaud hastalarında ise 3 günlük, günde 5-8 saat, 0,5-3 ng/kg/dk infüzyon tedavisi uygulanmakta ve 6-8 hafta klinik rahatlama sağlanabilmektedir (138). 3-36 ng/kg/dk i.v. iloprost tedavisiyle heparine bağlı trombositopenide kardiyovasküler cerrahi prosedürlerin uygulanmasına olanak sağlamıştır (179).

2.7.5. İloprostun Kontraendikasyonları

Gebelik, laktasyon, aktif kanama veya kanama diyatezi, ciddi koroner arter hastalığı veya son 6 ay içinde geçirilmiş myokard infarktüsü durumlarında kullanımı kontrendikedir. Ciddi koroner hastalığı olanlarda, unstabil anjina pectoris olanlarda son altı ay içinde myokard infarktüsü geçirmiş olan hastalarda anjinayı provoke edebileceğinden kontrendikedir. Hamilelerde kullanımında Kategori C ilaçlar (Food and Drug Administration) içinde sınıflandırılmıştır. Özellikle diyalize giren kronik böbrek yetmezliği hastaları ve karaciğer fonksiyon bozukluğunda dozaj ayarlaması yapılmalıdır. İntoksikasyonunda antidotu yoktur, ilaç kesilmesi yeterlidir (138).

Antihipertansifler (beta blokörler, kalsiyum kanal blokörler, angiotensin converting enzim inhibitorleri) ve kanama eğilimini arttıran (heparin, coumadin, asetil salisilik asit) ilaçlar ile etkileşime girerek sinerjik etkide bulunabilir (138).

2.7.6. İloprostun Yan Etkileri

Hastalar arasında yan etkilerde belirgin değişiklikler olup, kişinin iloprost'a olan toleransı dozun kademeli olarak arttırılmasıyla sağlanabilir. İlaça bağlı yan etkiler, doz yükseldikçe artarken ilaç kesildiğinde kaybolur (138). Yüzde kızarma ve en sık görülen yan etki baş ağrısı olup; % 70 oranında rastlanır, sonrasında sırasıyla bulantı (%30) ve kusma (%16) gelir. Gastrointestinal yan etkiler (kramp, diyare) kullanılan dozlar yükseldikçe artış gösterir. Ciddi koroner arter hastalarında, iloprost infüzyonu sonrası anjina olduğu gözlenmiştir. Bu durum, artmış adenosin seviyesine ikincil gelişen taşikardi veya azalmış aortik / poststenotik kan basıncına bağlı gelişmiş olabilir. Tedavisinde iloprost infüzyonu kesilir, adenosin antagonisti olan aminofilin verilir. Periferik arter hastalığı tedavisinde, ≤ 2 ng/kg/dk aralıklı iloprost infüzyonu sırasında ciddi hipotansiyon nadir olup, az da olsa postural hipotansiyon bildirilmiştir.

Hemodiyaliz sırasında 2 ng/kg/dk iloprost tedavisi birçok hastada semptomatik hipotansiyon yapmıştır. Bu durum hemodiyalize bağlı yükselmiş prostanooidlerin iloprost'a olan artmış hassasiyetine bağlanmıştır. Ekstrakorporeal dolaşımda, heparinle indüklenmiş platelet aktivasyonunu engellemek amaçlı yüksek doz (≈ 24 ng/kg/dk) iloprost kullanımı da ciddi hipotansiyona neden olabilir. Bu durum ilacın kesilip norepinefrin uygulanmasıyla düzeltilebilir. Diğer nadir yan etkiler; huzursuzluk, sedasyon, halsizlik, uykusuzluk, ani terleme, lokal eritem, kas ağrıları ve krampları, ağız kuruluğu ve iştahta azalma olarak sayılabilir (138)

3. GEREÇ VE YÖNTEM

Eskişehir Osmangazi Üniversitesi Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulunun-24.02.2014 tarih, 325-2/2014 kayıt nolu onayı alındı. Ratlar Eskişehir Osmangazi Üniversitesi Üniversitesi Tıp Fakültesi Deney Hayvanları Tıbbi ve Cerrahi Deneysel Araştırma Merkezi'nden (TICAM) temin edildi Çalışmada yaklaşık 3.5-4 aylık, dişi cinsten, 250-300 gr ağırlığında, 24 adet Wistar Albino cinsi rat kullanıldı. Ratlar rastgele ve eşit sayıda (n=8) olarak 3 gruba ayrıldı. Ratlar deney öncesi iki haftalık sürede laboratuvar hayvanları bakım ve kullanımına uygun olarak ,şeffaf tel kafeslerde tutularak laboratuvar koşullarına adaptasyonları sağlandı. Ratlar deney süresince 12'şer saatlik aydınlık-karanlık ışıklandırması olan ,ısısı 20-22°C ve nem oranı % 45-50 olacak şekilde otomatik olarak ayarlanan odalarda yaşatıldı. Ratların beslenmesinde standart ticari pellet yemi ve çeşme suyu kullanıldı. Adaptasyon süresi içerisinde gıda ve su erişimi serbest bırakıldı.

Tüm ratların bakımları; Tıbbi Araştırmalar Ulusal Derneği tarafından biçimlendirilen 'Deney Hayvanlarının Bakım Prensipleri'ne ve Laboratuvar Hayvanı Kaynakları Enstitüsü tarafından hazırlanıp Ulusal Sağlık Enstitüsü tarafından yayınlanan (NIH basım no. 85 – 23 , 1985 revize edildi) Laboratuvar Hayvanlarının Bakım ve Kullanımı için Kılavuz'una uygun olarak yapıldı.

3.1. Deney Gruplarının Hazırlanması Ve Operasyon Tekniği

Çalışmada yaklaşık 3.5-4 aylık, dişi cinsten, 250-300 gr ağırlığında, 24 adet Wistar Albino cinsi rat kullanıldı. Ratlar estrus fazında ,rastgele ve her bir grupta sekiz rat olacak şekilde 3 gruba ayrıldı.Grup 1 Sham grubu olarak belirlendi. Sadece juguler kanülizasyon ve anestezi uygulandı. Deney süresince monitorize edildi.Grup 2 kontrol grubu olarak belirlendi. 3 saat iskemiye takiben 3 saat reperfüzyon uygulandı. Grup 3 iloprost olarak belirlendi ve kontrol grubundaki iskemi reperfüzyon süreci uygulandı. Bu gruptaki hayvanlara belirtilen ilaçlar reperfüzyondan 20 dk önce başlayıp infüzyon şeklinde verildi. Çalışma gruplar tablo 3.1'de gösterildi.

Tablo 3.1: Deney grupları ve Uygulanan işlemler

Deney grupları	Uygulanan işlemler
Grup 1: sham	Anestezi verilmesi, juguler kanülüzasyon ve monitörizasyon
Grup2: Kontrol (iskemi-reperfüzyon)	Anestezi verilmesi, juguler ven kanülüzasyonu , monitörizasyon , 3 saat turnike iskemisi ve 3 saat reperfüzyon
Grup 3: iloprost grubu	Anestezi verilmesi, juguler ven kanülüzasyonu , monitorizasyon, 3 saat turnike iskemisi, 3 saat reperfüzyon, reperfüzyondan 10 dk önce iv iloprost infüzyonu ve reperfüzyon süresince devam ettirilmesi

3.2. Deney Protokolü

3.2.1. Anestezi ve Cerrahi Hazırlama

Deneyde kullanılacak tüm ratların yapılacak işlemler öncesinde tartılarak vücut ağırlıkları kaydedildi.

Tüm deney hayvanlarına anestezisi intraperitoneal yolla verilen TIYOPENTAL SODYUM (40-50 MG\KG, PENTAL SODYUM ®IE ULUGAY TURKIYE) ile sağlandı ve devam ettirildi. Gerekli olduğunda deney süresince bir defaya mahsus olmak üzere ek doz yapılması planlandı. Bacaktaki iskemik değişiklikleri daha iyi izleyebilmek için sağ arka bacaklarına kasık bölgesini içerecek şekilde depilasyon yapıldı. Ratlar ısıtıcı lamba altında supin pozisyonda masaya yatırıldı. Denekler ilaç infüzyonu için uygun antisepsi sonrası, sol taraf boyun insizyonu ile mor renkli branül (braun 26 gauge) ile internal juguler venden cut-down yöntemi ile kanüle edildi. Branül 4\0 ipek ile cilde tespit edildi. Sham grubu için branülden ilaç yerine aynı volümde NaCl infüzyonu verildi. İşlemler sham grubunda bu aşamada sonlandırıldı.



Şekil 3.1 : Sol juguler venden kataterizasyon

İR Protokolü

Yukarıda ki işlemler sonrası deneklerin sağ arka bacak 1/3 uyluk bölgesine, kalça eklemi üzerinden 1 cm eninde ve 10 cm boyunda lastik turnikenin 3 kez dolanması sureti ile 3 saat boyunca iskemi uygulandı (Şekil 3.2).

Distal nabızların el doppleri ile alınamaması ve bacak renginin değişmesi iskemi olarak değerlendirildi. İskemi sonrası üçüncü saatin sonunda turnikenin serbestleştirilmesi ile sağ arka bacağın 3 saat boyunca reperfüzyonu sağlandı. Reperfüzyonun sağlandığı el doppleri ile distal nabızlarının alınması ile ve ayak renginin pembeleşmesi ile teyit edildi.



Şekil 3.2 : İskemi uygulanan sol alt ekstremitedeki renk değişimi (morarma)

3.2.2. Tedavi Protokolü

Tedavi gruplarında ayn İR protokolü uygulandı ancak reperfüzyondan 20 dakika önce grup 3 deki hayvanlara sırasıyla internal juguler venden infüzyon şeklinde iloprost(İlomedin 20 mcg/ 1 ml,Bayer ,Berlin, Germany) başlandı. 3 saatlik reperfüzyon süresince ilaç infuzyonlarına devam edildi. Reperfüzyondan 20 dakika önce başlanılmasının nedeni iloprostun intravenöz verildikten sonra kararlı durum konsantrasyonuna 10-20 dakika arasında ulaşmasıdır.

3.2.3. Ötanazi Protokolü Ve Doku Örneklerinin Toplanması

Reperfüzyon sonunda 6. saatte hayvanlardan intrakardiyak kan alınması ile hipotansiyon ve şok oluşturularak ötanazi yapıldı. Ölüm solunum ve kalp atımının durması ile tespit edildi. Solunum ve kalp atımı devam eden hayvanlara ise dekapitasyon işlemi uygulandı. Alınan kanlar Tnf- α ,IL-1 ve IL-6 serum elisa incelemeleri için

biyokimya tüplerine konuldu. Biyokimya laboratuvarına gönderildi. Kan örnekleri oda sıcaklığında yarım saat bekletildikten sonra, 4000 rpm'de 10 dakika santrifüj edildi, sağ arka bacadan lateral ve mediyal gastrokinemius kası çıkarılarak biyokimyasal ve histolojik çalışmalar için 3 parçaya ayrıldı. Örneklemeye için alınan 2 parça doku MDA ve Katalaz incelemeleri için biyokimya laboratuvarına gönderildi. Sıçan serum ve kas örnekleri analizler yapılana kadar -80 derecede saklandı. Geri kalan 1 parça histolojik ve immünohistokimyasal çalışmalar için %10 formaldehit solüsyonuna konularak tespit edildi.

3.3. Biyokimyasal İncelemeler

3.3.1. Serum TNF- α , IL-1 VE IL-6 Düzeylerinin Belirlenmesi

Serum örneklerinde Tümör Nekroz Faktör Alfa ölçümü ELISA Kiti (Rat TNF- α , invitrogenTM, Invitrogen Corp., Camarillo, CA) kullanılarak ELISA cihazı (VICTORTM X3 Multilabel Plate Reader, PerkinElmer, Inc., Waltham, USA)'nda 450 nm dalga boyunda yapıldı (Kit Katalog No: KRC3011). Örneklerdeki TNF- α konsantrasyonları pg/ml olarak ifade edildi.

İnterlökin-1 β ölçümü için, ELISA Kiti (Rat IL-1 β Platinum ELISA, eBioscience, Bender MedSystems GmbH, Vienna, Austria) kullanılarak ELISA cihazı (VICTORTM X3 Multilabel Plate Reader, PerkinElmer, Inc., Waltham, USA)'nda 450 nm dalga boyunda yapıldı (Kit Katalog no: BMS630). Örneklerdeki interlökin-1 β konsantrasyonları pg/ml olarak ifade edildi.

Serum örneklerinde İnterlökin-6 ölçümü ELISA Kiti (Rat IL-6, invitrogenTM, Invitrogen Corp., Camarillo, CA) kullanılarak ELISA cihazı (VICTORTM X3 Multilabel Plate Reader, PerkinElmer, Inc., Waltham, USA)'nda 450 nm dalga boyunda yapıldı (Kit Katalog No: KRC0061). Örneklerdeki interlökin-6 konsantrasyonları pg/ml olarak ifade edildi.

3.3.2. Doku MDA ve Katalaz Düzeylerinin Değerlendirilmesi

Doku örneklerindeki MDA düzeyini belirlemek için, Ohkawa ve ark. (1979) tarafından bildirilen yönteme göre, spektrofotometre cihazında (Shimadzu UV-1601 UV-vis spectrophotometer, Shimadzu Corporation, Tokyo, Japan) 532 nm dalga boyunda absorbans ölçümleri yapıldı. MDA düzeyleri mg protein başına nmol MDA olarak hesaplandı. Standart olarak 1,1,3,3 tetraetoksipropan (Sigma T9889) kullanıldı. Protein miktar tayini için Biüret yöntemi uygulandı. (Gornall ve ark., 1949).

Doku örneklerinde katalaz aktivitesi ölçümü Beutler (1986) tarafından bildirilen yönteme göre yapıldı. Hidrojen peroksitin su ve oksijene katalaz tarafından bozunum hızı spektrofotometre cihazında (Shimadzu UV-1601 UV-vis spectrophotometer, Shimadzu Corporation, Tokyo, Japan) 230 nm dalga boyunda ölçüldü. Katalaz aktivitesi U/ml olarak hesaplandı. Protein miktar tayini için Biüret yöntemi uygulandı (Gornall ve ark., 1949). Katalaz spesifik aktivitesi ise U/mg protein olarak aşağıdaki formüle göre hesaplandı:

$$\text{Katalaz spesifik aktivitesi (U/mg protein)} = \frac{\text{Katalaz Aktivitesi}}{\text{Protein Miktarı}}$$

3.4. Morfolojik Analizler

3.4.1. Işık Mikroskobu

Sağ alt ekstremite gastrokinemius kasından alınan doku örnekleri, incelemenin yapılacağı güne kadar % 10'luk formal içinde, her bir rat için ayrı saklama kabında bekletildi. İnceleme yapılacağı zaman doku örnekleri doku takip kasetlerine alınarak parafin blok haline getirildi. Her parafin bloktan 5 µm kalınlığında kesitler hazırlandı. Kesitler önce parafinden arındırıldı, daha sonrada 5 dakika süre ile hidrate edildi ve Mayers Hematoksilen (Mayer's Hematoxylin, 06002L®, Bio-Optica, Milano, İtaly) ile boyandı. Deparafinizasyon işlemi için 20 dakika ksilende bekletilirken , dehidratasyon işlemi için; 20 dakika %96 alkolde bekletildi. Tüm bu işlemler sonrasında, preperatlar 2

dakika alkolden geçirildi ve kurutuldu. Kurumuş preparatlar ksilene konulup entellan ile kapatılarak mikroskopik değerlendirme için hazır hale getirildi. Tüm kesitler mikroskop altında inflamasyon, konjesyon, sentrilizasyon ve nekroz açısından değerlendirildi. Kesitler tek bir histolog tarafından, kör olarak değerlendirildi. Histopatolojik hasar morfolojik ve kantitatif olarak değerlendirildi. İmmünohistokimyasal skorlama için onluk büyütmede birbiriyle örtüşmeyen on alan rastgele yöntemle seçildi. Değerlendirme kriteri; kas lifi dejenerasyonu, nukleus sentrilizasyonu, inflamatuvar hücre infiltrasyonu, vazokonjesyon ve disorganizasyon olarak belirlendi. Hasar skoru 0: normal, 1: hafif, 2: orta, 3: ciddi olarak hesaplandı. En düşük skor 0, en yüksek skor 15 olarak kabul edildi.

3.4.2. Kaspaz-3

Hazırlanan kas doku paraffin bloklarından 6 µm kalınlığında kesitler alınarak immünohistokimyasal boyamaları yapıldı. Çalışmada kas dokusunda apoptozisin belirlenmesi amacıyla; kaspaz-3 tavşan poliklonal antikoru (Thermo Scientific, USA) ve antikaspaz -3 antikoru (RB-1197-P1) ile işlem den geçirildi. Kaspaz-3 aktivitesinin hesaplanması kör araştırmacı prensibi ile yapıldı. Kaspaz-3 pozitif myosit nukleusları her on alanda ve 40 büyütmede sayıldı. Apoptoz skor hasarı her alandaki kaspaz-3 pozitif nukleus (stained Brown) sayısına göre belirlendi. Elde edilen bloklardan alınan kesitler ışık mikroskopunda incelenerek yüksek çözünürlüğe sahip kamera ile görüntüldü.

3.5. İstatistiksel Analiz

Sonuçlar ortalama \pm standart sapma olarak ifade edildi. Verilerin gruplar arası karşılaştırmalarında Kruskal Wallis test kullanıldı. Gruplar arası fark bulunduğunda farklılığın hangileri arasında olduğunu belirlemede Mann Whitney U testi kullanıldı. $p < 0.05$ değeri istatistiksel anlamlılık sınırı olarak kabul edildi. İstatistiksel analizlerde Eskişehir Osmangazi Üniversitesi Tıp Fakültesi Biyoistatistik Anabilim Dalının SPSS 19.0 (Lisans no=10240642 SPSS Inc, Chicago, IL, ABD) istatistiksel paket programı kullanıldı.

4.BULGULAR

4.1. Biyokimyasal Parametreler

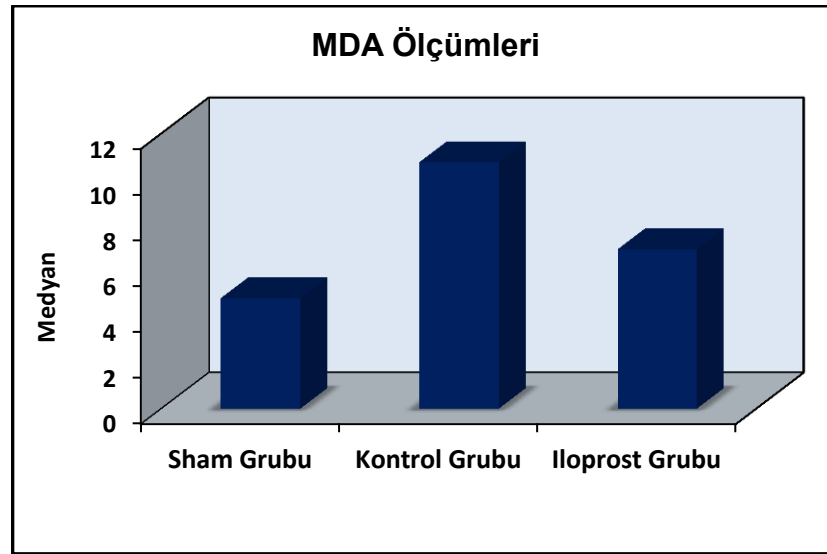
4.1.1 Malondialdehit (MDA)(Kas)

Tablo 4.1’de sham, iskemi reperfüzyon (İR), iskemi reperfüzyon ve iloprost (İR + İloprost) gruplarına ayrılmış ratların gastrokinemius kası lipit peroksidasyon göstergesi olan malondialdehit’e (nmol/g) ait istatistiksel değerler sunulmuştur. Sonuçlar ort ± SD olarak verilmiştir.

Tablo 4.1: Tüm gruplara ait malondialdehid (kas)(nmol/ml) sonuçları

	MDA Ölçümleri			^a p
	N	Ort±SD	Medyan	
Sham Grubu	8	5,33±1,31	4,82	
Kontrol Grubu	8	10,63±3,66	10,75	0,001**
Iloprost Grubu	8	7,21±1,66	6,95	

Sham grubu ile karşılaştırıldığında kontrol grubunda MDA (kas) düzeylerinde istatistiksel olarak anlamlı bir artış olduğu bulunmuştur (p=0.001). İR + İloprost grubunun MDA değerleri İR grubuna göre anlamlı derecede düşük olduğu saptanmıştır (Bkz. Şekil 4.1).



Şekil 4.1: MDA(kas)'nın gruplar arası değerlerinin grafiksel analizi.

4.1.2. Katalaz (Kas)

Tablo 4.2'de ayrılmış olan gruplara göre katalaz değerlerine ait istatistiksel değerler sunulmuştur.

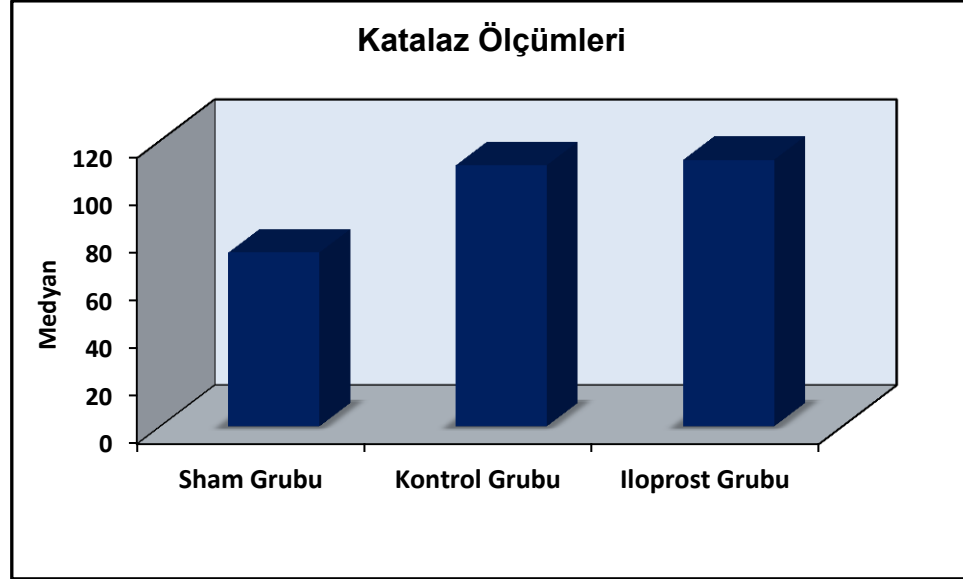
Tablo 4.2: Tüm gruplara ait Katalaz (kas)(nmol/ml) sonuçları

	Katalaz Ölçümleri			P
	n	Ort±SD	Medyan	
Sham Grubu	8	66,48±28,64	72,96	0,042*
Kontrol Grubu	8	120,32±51,94	109,60	
Iloprost Grubu	8	104,75±35,39	111,90	

Kruskal Wallis Test

Sham grubunun Katalaz ölçümleri ortalama $66,48 \pm 28,64$ iken; Kontrol grubunun ortalaması $120,32 \pm 51,94$ ve iloprost grubun ortalaması $104,75 \pm 35,39$ 'dur. Gruplara göre Katalaz ölçümleri arasında anlamlı farklılık saptanmasına rağmen kontrol grubu ile

iloprost grubunun Katalaz ölçümleri arasında istatistiksel olarak anlamlı farklılık saptanmamıştır ($p>0,05$) (Bkz. Şekil 4.2)



Şekil 4.2: CAT(kas)'ın gruplar arası değerlerinin grafiksel analizi.

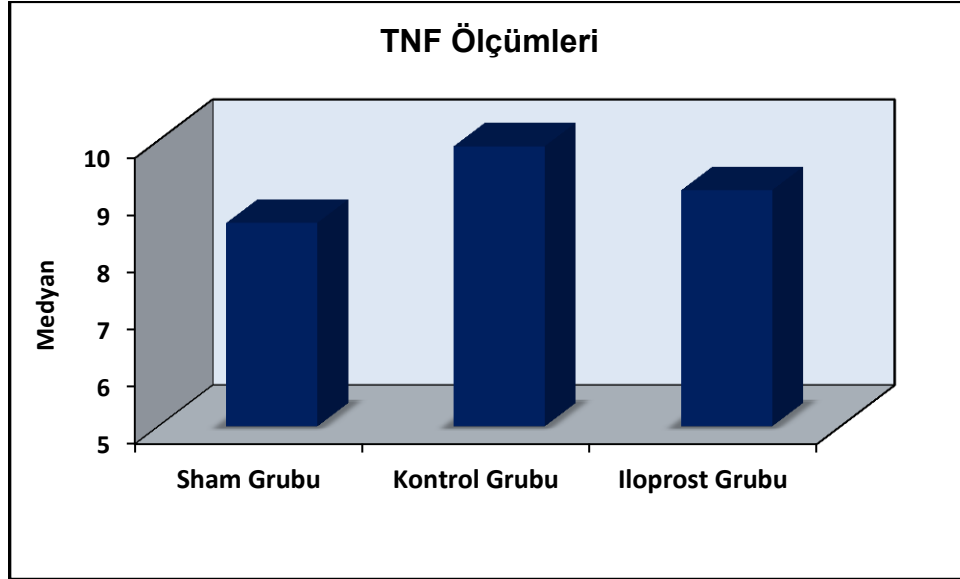
4.1.3. TNF- α

Tablo 4.3'de ayrılmış olan gruplara göre TNF- α değerlerine ait istatistiksel değerler sunulmuştur.

Tablo 4.3: Tüm gruplara ait TNF- α (nmol/ml) sonuçları

	TNF- α Ölçümleri			<i>P</i>
	n	Ort±SD	Medyan	
Sham Grubu	8	8,34±1,07	8,56	0,017*
Kontrol Grubu	8	10,86±2,16	9,90	
Iloprost Grubu	8	8,90±1,50	9,13	

Sham grubunun TNF- α ölçümleri ortalama $8,34 \pm 1,07$ iken; Kontrol grubunun ortalaması $10,86 \pm 2,16$ ve İloprost grubun ortalaması $8,90 \pm 1,50$ 'dir. TNF- α düzeyi, İR + iloprost grubunda kontrol grubuna göre anlamlı derecede düşük bulundu ($p < 0,05$). Sham ve İR + iloprost gruplarının TNF ölçümleri arasında ise istatistiksel olarak anlamlı farklılık saptanmamıştır ($p > 0,05$) (Bkz.Şekil 4.3)



Şekil 4.3: TNF- α 'nın gruplar arası değerlerinin grafiksel analizi.

4.1.4. IL- 1

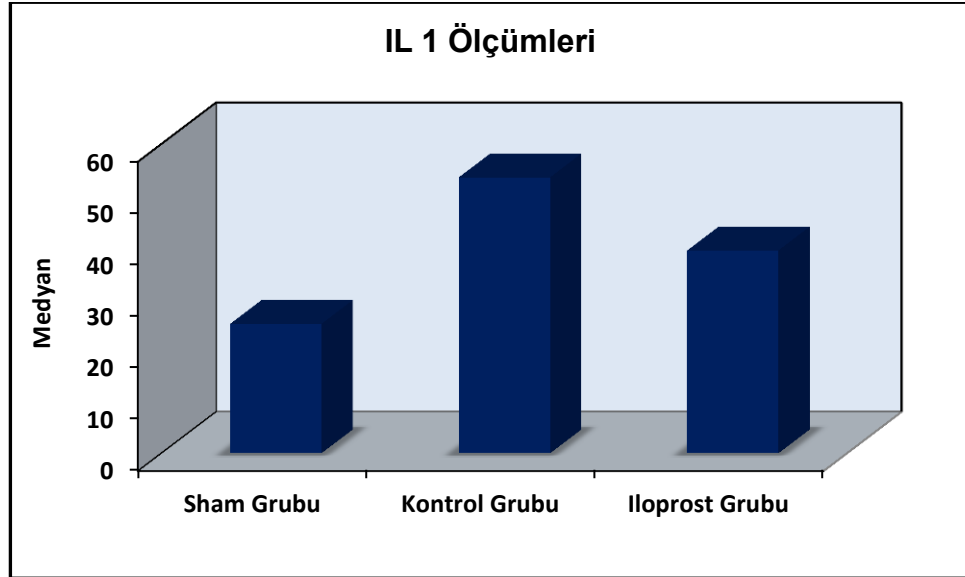
Tablo 4.4'de ayrılmış olan gruplara göre IL- 1 değerlerine ait istatistiksel değerler sunulmuştur.

Tablo 4.4: Tüm gruplara ait IL-1 (nmol/ml) sonuçları

	IL 1 Ölçümleri			^a p
	n	Ort \pm SD	Medyan	
Sham Grubu	8	32,02 \pm 15,60	25,08	0,026*
Kontrol Grubu	8	61,26 \pm 25,63	53,51	
Iloprost Grubu	8	38,13 \pm 10,36	39,33	

Kruskal Wallis Test

Sham grubunun IL- 1 ölçümleri ortalama $32,02 \pm 15,60$ iken; Kontrol grubunun ortalaması $61,26 \pm 25,63$ ve iloprost grubun ortalaması $38,13 \pm 10,36$ 'dır. İR + iloprost grubunun IL-1 düzeyi İR grubuna göre anlamlı düzeyde düşük saptandı ($p > 0,05$) (Bkz. Şekil 4.4).



Şekil 4.4: IL-1'in gruplar arası değerlerinin grafiksel analizi.

4.1.5. IL-6

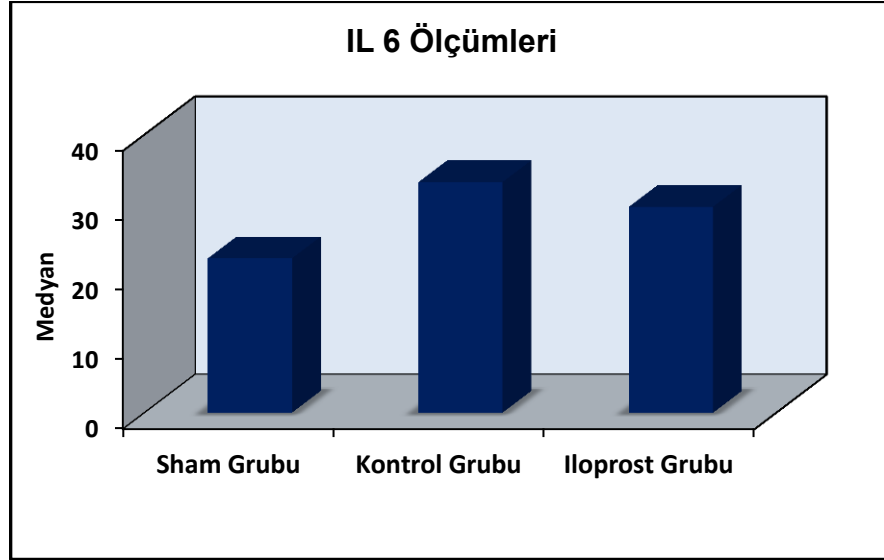
Tablo 4.5'de ayrılmış olan gruplara göre IL- 6 değerlerine ait istatistiksel değerler sunulmuştur.

Tablo 4.5: Tüm gruplara ait IL-6 (nmol/ml) sonuçları

	IL 6 Ölçümleri			P
	n	Ort±SD	Medyan	
Sham Grubu	8	22,83±7,11	22,18	0,051
Kontrol Grubu	8	35,39±11,08	33,14	
Iloprost Grubu	8	28,25±7,44	29,61	

Kruskal Wallis Test

Sham grubunun IL- 6 ölçümleri ortalama $22,83 \pm 7,11$ iken; Kontrol grubunun ortalaması $35,39 \pm 11,08$ ve Iloprost grubun ortalaması $28,25 \pm 7,44$ 'dür. Tüm gruplar arasında IL-6 düzeylerinde anlamlılığa yakın fark saptanmıştır ($p=0,051$; $p>0,05$). Fakat İR + iloprost ve İR grubu karşılaştırıldığında IL-6 düzeyleri arasında istatistiksel olarak anlamlı farklılık saptanmamıştır ($p=0,208$; $p>0,05$) (Bkz.Şekil 4.5)

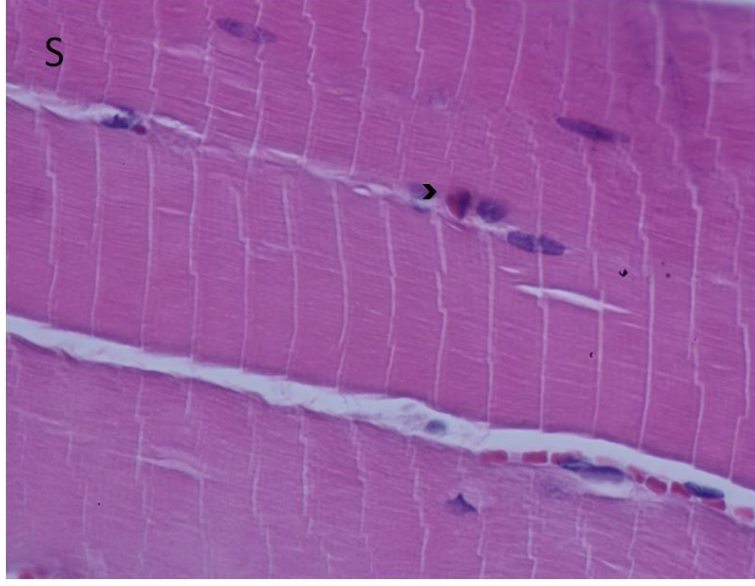


Şekil 4.5: IL-6'in gruplar arası değerlerinin grafiksel analizi.

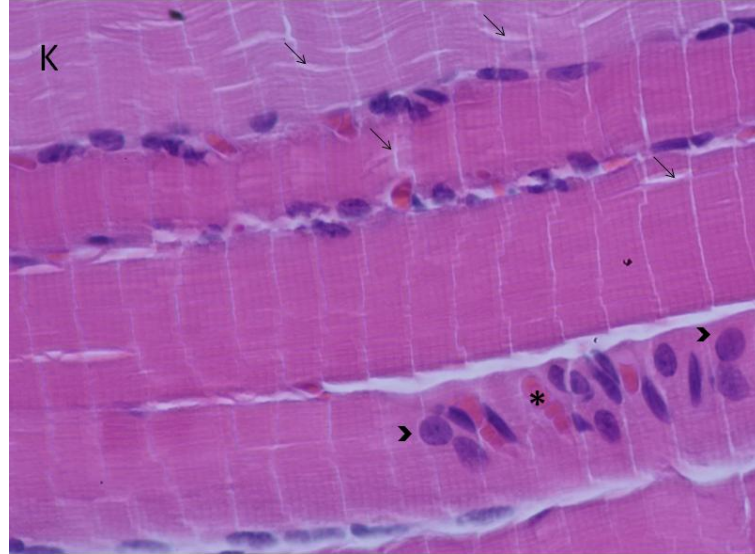
4.2.Histopatolojik İnceleme

Işık Mikroskopisi Bulguları

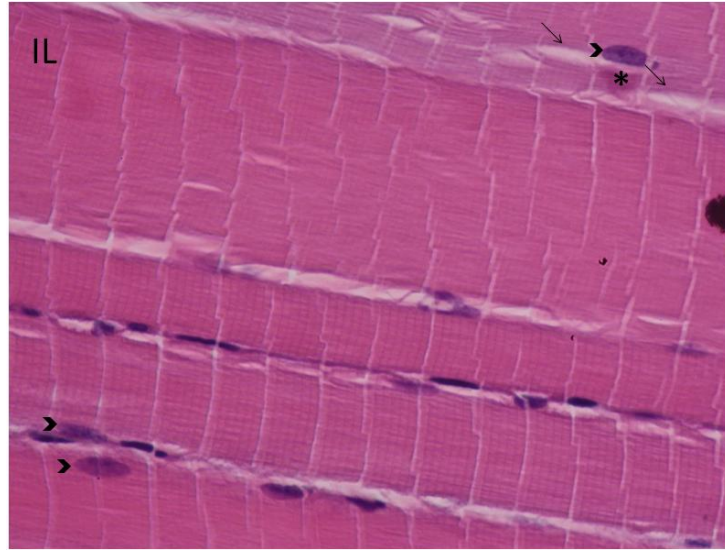
Sırasıyla sham ,İR ve İR + iloprost gruplarına ait histolojik görüntüler şekil 4.6, 4.7, 4.8' de gösterilmiştir. Sham grubunda normal kas yapısı gözlenirken (Bkz.Şekil4.6) İR grubunda doku hasarına ait kas dejenerasyonu, nötrofil infiltrasyonu,disorganizasyon ve sentrilizasyona ait bulgular saptanmıştır (Bkz.Şekil4.7). İR+ iloprost grubunda ise kontrol grubuna göre normal kass yapısının daha iyi korunduğu ve nötrofil infiltrasyonunun azaldığı görülmüştür (Bkz.Şekil4.8). Gruplara göre total histolojik hasar skorları ortalaması Sham grubunda $0,25 \pm 0,03$; kontrol grubunda $1,96 \pm 0,11$ ve iloprost grubunda $1,34 \pm 0,05$ 'dir (Tablo 4.6). Gruplara göre total hasar skorları arasında istatistiksel olarak ileri düzeyde anlamlı farklılık saptanmıştır ($p<0,01$).



Şekil 4.6: Sham grubuna ait deneklerin gastrokinemius kası ışık mikroskobik görünümleri. (Kesit 5 μm , Boya: H-E). Okbaşı: Nötrofil infiltrasyonu



Şekil 4.7: kontrol grubuna ait deneklerin gastrokinemius kası ışık mikroskobik görünümleri. (Kesit 5 μm , Boya: H-E). Okbaşı: Nötrofil infiltrasyonu, İnce uzun ok: Disorganizasyon ve Dejenerasyon, Yıldız: Vazokonjesyon

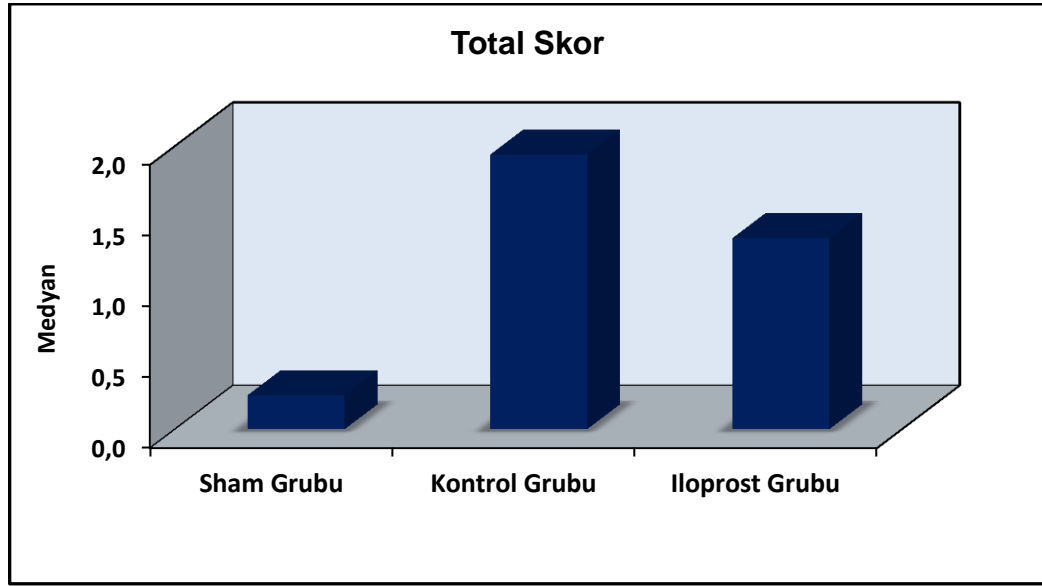


Şekil 4.8: İR+İloprost grubuna ait deneklerin gastrokinemius kası ışık mikroskopik görünümleri. (Kesit 5 μ m, Boya: H-E). Okbaşı: Nötrofil infiltrasyonu, İnce uzun ok: Disorganizasyon ve Dejenerasyon, Yıldız: Vazokonjesyon

Tablo 4.6: Tüm gruplara ait Total histolojik hasar skorlarının sonuçları

	Total Skor			
	n	Ort \pm SD	Medyan	
Sham Grubu	8	0,25 \pm 0,03	0,24	<i>p</i> < 0,001*
Kontrol Grubu	8	1,96 \pm 0,11	1,94	
Iloprost Grubu	8	1,34 \pm 0,05	1,35	

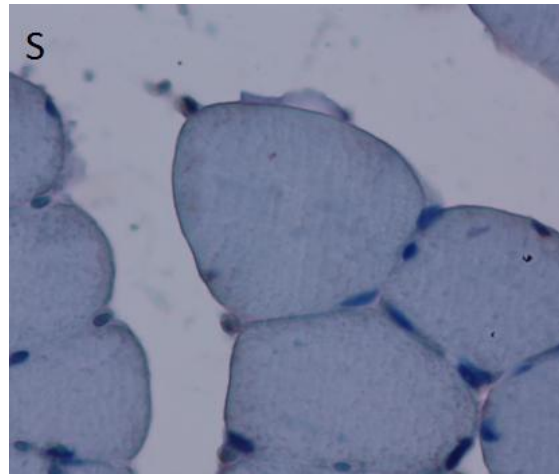
Kruskall Wallis testi



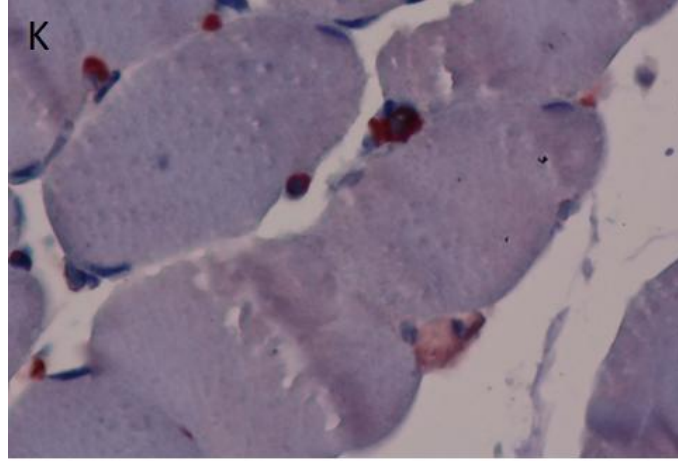
Şekil 4.9 : Total histolojik hasar skorlarının gruplar arası değerlerinin grafiksel analizi

Kaspaz-3 ve Apoptozis Skoru

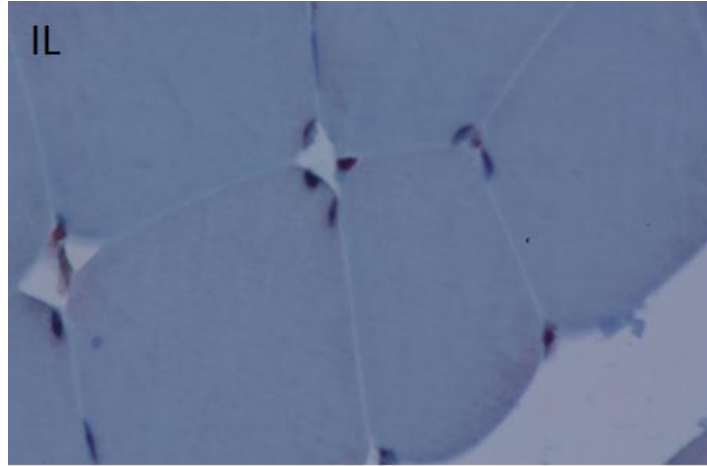
Hazırlanan kaspaz-3 histolojik kesitleri şekil 4.10, 4.11, 4.12' de gösterilmiştir.(x40, kaspaz-3 tavşan poliklonal antikor ve antikaspaz -3 antikor)



Şekil 4.10 : Sham grubunun İR+İloprost grubunun Gastrocnemius kas kesitlerinde immunohistokimyasal olarak Kaspaz-3 ile boyanma özellikleri



Şekil 4.11: İR grubunun İR+İloprost grubunun Gastrocnemius kas kesitlerinde immunohistokimyasal olarak Kaspaz-3 ile boyanma özellikleri (Kahverengi nucleus boyaması apoptozisi göstermektedir).

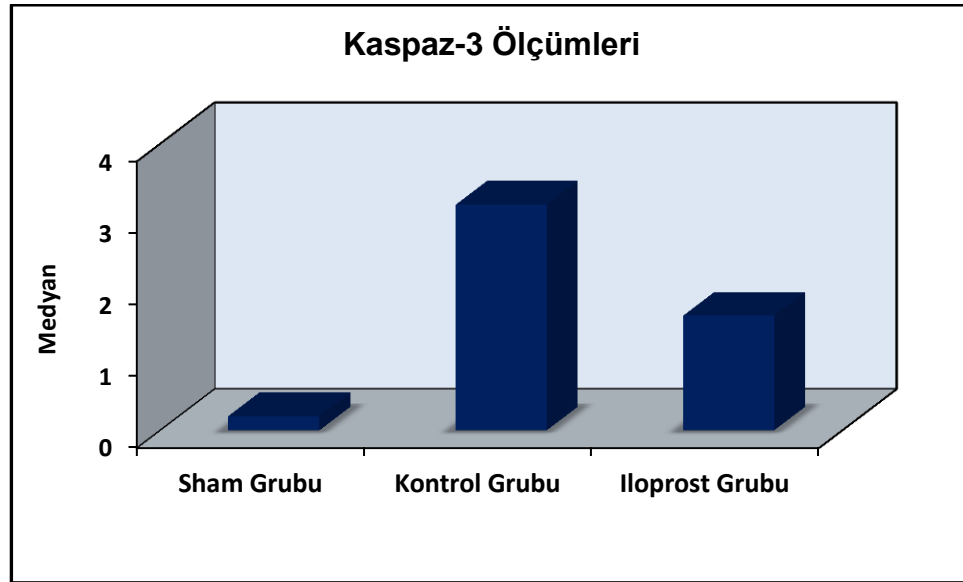


Şekil 4.12: İR+İloprost grubunun Gastrocnemius kas kesitlerinde immunohistokimyasal olarak Kaspaz-3 ile boyanma özellikleri (Kahverengi nucleus boyaması apoptozisi göstermektedir).

Sham grubunun Kaspaz-3 ölçümleri ortalama $0,19 \pm 0,06$ iken; Kontrol grubunda $3,16 \pm 0,07$ ve iloprost grubunda $1,59 \pm 0,08$ 'dir (Bkz.Tablo 4.7). Sham grubunda kaspaz-3 hücre çekirdeği saptanmazken, İR grubunda yoğun kaspaz-3 boyanması saptanmıştır. Bu yoğun kaspaz-3 boyanması İR+ iloprost grubunda İR grubuna göre daha az görülmüştür(Bkz.Sekil 4.13)

Tablo 4.7: Tüm gruplara ait Kaspaz-3 ölçümlerinin sonuçları

	Kaspaz-3 Ölçümleri			<i>P</i>
	N	Ort±SD	Medyan	
Sham Grubu	8	$0,19 \pm 0,06$	0,20	
Kontrol Grubu	8	$3,16 \pm 0,07$	3,15	<i>0,001*</i>
İloprost Grubu	8	$1,59 \pm 0,08$	1,60	



Şekil 4.13 : Kaspaz-3'ün gruplar arası değerlerinin grafiksel analizi.

5. TARTIŞMA

Bir organa gelen kan akımının organ transplantasyonu esnasında ve vasküler cerrahi işlemler gibi çeşitli nedenlerle yetersiz hale gelmesine iskemi denir (1). İskemiye hipoksik doku hasarı izler. Dokunun kanlanması yeniden başlamasına ise reperfüzyon denir (2).

İskemik durumlarda temel amaç, reperfüzyon süresini kısaltarak kas nekrozunu önlemektir. İskemi sonrası görülen doku hasarı, genellikle reperfüzyon döneminde oluşur (180). İskemi reperfüzyon hasarı, kalp ,kas,akciğer,karaciğer, böbrek ve barsaklarda sık görülen ve ciddi patolojilere neden olarak, sistemik inflamatuvar bir cevaba yol açar (1).

İskelet kası iskemiye karşı diğer dokulara göre daha dayanıklıdır (181). İskemi reperfüzyon hasarı sonucu iskelet kasının yeniden kanlanması şiddetli doku hasarı ve sistemik komplikasyonları beraberinde getirir ve ölüm oranı % 25-50, amputasyon ise % 15-40 olarak belirtilmiştir (182).

Akut ekstremitte iskemi reperfüzyon hasarını açıklayabilmek için birçok hipotezler öne sürülmüştür . Bunlar arasında iskemi sonrası Ca^{+2} artışı,asidoz,enerji sağlayan ATP depolarının boşalması sonucunda dokunun oksijenlenmesiyle oluşan ksantin oksidazdan üretilen serbest oksijen radikallerinin başlattığı, hücre ölümü ile sonuçlanan nötrofil aktivasyonunun rol oynadığı gösterilmiştir (183). Sağlıklı kişilerde normal metabolizma sonucunda meydana gelen serbest oksijen radikalleri vücudun savunma mekanizması olan antioksidan enzim sistemiyle uzaklaştırılır.SOR ve antioksidan savunma sistemleri birbirleriyle denge halindedir. Bu denge SOR lehine bozulursa ‘oksidatif stres’ oluşur (184,185). Bu oksidatif stres esnasında reaktif O_2 ürünleri (SOR lar); kas fibrillerinin kasılmasının onarılmasına,dejenerasyonuna, kas nekrozuna, vasküler endotel hücre şişmesine ve mikrovasküler geçirgenliğin artmasıyla birlikte, hüresel proteinlerin salınımı ve bu proteinlerin damar dışına ekstravazasyonunu içeren çok sayıda özelliğe sahiptir (186,187,188).

Wehrens ; ratların ekstremiteleredeki kollateral dolaşımının , insanlardaki ile aynı olması için devamlı ve derin iskemiye ulaşılması ve bunun içinde femoral akım ve kolleteral dolaşımında engellenmesi gerektiğini bildirmiştir (189). Çünkü iskemi süresi uzadıkça reperfüzyon döneminde oluşacak doku hasarı artar (187).

Çalışmamızda ; kritik iskemi süresini dikkate alarak ratlarda sağ alt ekstremitenin olabildiğince proksimalinden femoral arter ve kollateral dolaşımı turnpike yöntemi ile engelleyerek 3 saat iskemi ve 3 saat reperfüzyon dönemi uygulayarak İloprost ' un gastrokinemius kası üzerinde koruyucu etkisini araştırdık. Reperfüzyon döneminin sona ermesi ile kas dokusunda MDA ,katalaz , serumda proinflamatuvar sürecin göstergesi olan TNF- α , IL-1, IL-6 düzeyleri bakılırken, gastrokinemius kasında hasarı göstermek için ışık mikroskopunda Hemotoksilen-Eozin boyaması ve apoptozisi göstermek için kaspaz-3 boyaması yapılmıştır.

MDA , poliansaüre yağ asitlerinin peroksidasyonu sonucu oluşan stabil bir son üründür . Artmış serbest oksijen radikalleri (özellikle hidroksil radikali), hücre zarı fosfolipitlerinin (araşidonik asit, linoleik asit gibi çoklu doymamış yağ asitleri) peroksidasyonuna neden olarak hücre zarı bütünlüğünde bozulma, hücre şişmesi ve arşidonik asit /lipitperoksit salınımına neden olur. Bu süreçte , zincirleme bir serbest oksijen ve yağ asidi radikali oluşumu ile ilerleyici hücre zarı hasarı gerçekleşir (1,190). Dolayısıyla , bu kısır döngü sırasında meydana gelen ve stabil bir molekül olan MDA düzeyi ölçümü ile reaktif O₂ türevleri ve membran hasarının derecesi hakkında fikir sahibi olunabilir (37).

Çalışmamızda , iskemi reperfüzyon sonrası kas dokusunda MDA seviyesinin arttığı gözlenirken , İR + İloprost grubundaki MDA seviyelerinin İR grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı düzeyde azaldığı gözlemlendi . Aydın ve arkadaşları (76), yaptıkları deneysel İR modelinde 1 saat iskemi ardından 2 saat reperfüzyon uygulamış ve doku MDA düzeyinin İR + İloprost tedavi grubunda İR grubundaki düzeye göre düşük olduğunu bildirmektedir . Köksal ve arkadaşları (116), köpeklerde yaptıkları deneysel kardiyopulmoner bypass modelinde kardiyoplejik solüsyon ile birlikte iloprost

verilmesinin myokard performansına olan etkisinin araştırdıkları çalışmalarında iloprost tedavi grubunda kontrol grubuna göre MDA düzeyinde anlamlı düşüş saptamışlardır . Emrecan ve arkadaşlarının (191), yaptığı tavşan alt ekstremite iskemi reperfüzyon hasarında iloprost ve pentoksifilinin etkisinin değerlendirdikleri çalışmada ise yine iloprost tedavi grubunun MDA seviyelerinin anlamlı düzeyde azaldığını saptamışlardır. Benzer Şekilde , Baltarlı ve arkadaşları (176), İloprost ve vitamin C ‘nin rat alt ekstremite İR hasarı sonrası akciğer hasarına olan etkisini araştırdıkları çalışmalarında , İR + iloprost grubunda MDA düzeylerinin İR grubundaki dzeyele göre anlamlı derecede azaldığını bulmuşlardır . Benzer çalışmaların sonuçları ile kendi çalışmamızın MDA değerlerinin paralellik içinde olduğu görülmektedir. Sonuçta iloprost ‘ un iskemi reperfüzyon hasarı sonrası oluşan lipid peroksidasyonu miktarını azalttığını düşündürmektedir .

Katalaz enzimi, peroksidazlarda SOD tarafından oluşturulan hidrojen peroksidin su ve oksijene çevrilmesini sağlar. Vücutta doğal olarak oluşan bir metalloproteindir. SOD ile kombine bir Şekilde etki eder. Kiriş ve arkadaşları infrarenal aortik iskemi reperfüzyon modelinde godolinyum klorürün böbrek hasarı üzerine olan etkisini araştırdıkları çalışmada aortik IR grubunda kontrol grubuna göre katalaz aktivitelerinde anlamlı artış saptamışlardır. Erten ve arkadaşları yaptıkları çalışmada deneysel spinal kord iskemi reperfüzyon hasarında melatoninin etkisini araştırmışlar ve IR grubunda katalaz aktivitesinin anlamlı olarak arttığını saptamışlardır. Mezetti ve arkadaşları kardiyopulmoner bypass esnasında miyokardiyal iskemi reperfüzyon sonrası katalaz ve diğer antioksidan enzim aktivitelerinin arttığını göstermişlerdir (193). Bizim alışmamızda ise gruplara göre katalaz ölçümleri arasında anlamlı farklılık saptanmasına rağmen kontrol grubu ile iloprost grubunun katalaz ölçümleri arasında istatistiksel olarak anlamlı farklılık saptanmamıştır.

İskemi reperfüzyon hasarındaki süreçte nötrofil aktivasyonu ile beraber SOR retimi , kompleman sisteminin aktivasyonu ve proinflamatuvar sitokinlerin salınımıyla inflamatuvar süreç başlar. TNF -, IL-1, IL-6 iskemi reperfüzyon aracılı inflamatuvar süreçte rol oynayan proinflamatuvar sitokinlerdir (192). Eğer inflamatuvar süreç

baskılanırsa iskelet kası İR hasarı sonucunda oluşacak organ hasarının azalacağı düşünülmektedir.

Sitokinler , organizmanın infeksiyon ,inflamasyon ve immünolojik reaksiyonlaar cevapta rol oynayan , lenfoid ve N- lenfoid birçok hücreden salgılanabilen düşük molekül ağırlıklı proteinlerdir (193). TNF $-\alpha$ ve IL-1 inflamasyonun erken döneminde ortaya çıkarak , benzer sinyal molekülleri üzerinden IL-6 üretiminde kontrol ederler . IL-6, nötrofillerin oksidatif patlamasından ve SOR 'ların salınımından sorumlu proinflamatuvar sitokindir (194). Ayrıca TNF $-\alpha$ ve IL-1 apoptozu tetikleyerek lökosit infiltrasyonuna neden olur (193,194).

İloprost, primer olarak endotel hücreleri tarafından arasıdonik asitten sentezlenir. Sentetik bir epoprostenol analogudur (prostaglandin I₂). Farmakodinamik olarak güçlü sitoprotektif, antiagregan, antiproliferatif, antiinflamatuvar ve vazodilatasyon özelliklere sahiptir. Trombosit agregasyonunu inhibe ederek , adezyon molekül üretimini azaltır. Sonuçta , lökosit ve endotel ilişkisini bozarak lökosit infiltrasyonunu inhibe eder . Böylece inflamasyon sürecini baskılayarak sitokin salınımının dramatik olarak azalmasına neden olarak doku mikrosirkülasyonunun devam etmesinde de etkilidir (12,194).

Wei V ve arkadaşları deneysel İR modelinde 3 saat iskemi , 1 saat reperfüzyon uygulayarak uzak organ hasarını araştırdıkları çalışmalarında iloprostun antienflamatuvar etki göstererek TNF $-\alpha$, IL-1, IL-6 düzeylerini azalttığı gösterilmiştir (195). Katırcıoğlu ve arkadaşları (196), tarafından yapılan deneysel kardiyopulmoner bypass modelinde miyokard performansına kardiyoplejik soüsyon ile birlikte iloprost uygulamasının etkisi araştırılmış ve iloprost grubunda kontrol grubuna göre plazma TNF $-\alpha$ düzeyinde anlamlı düşüş saptanmıştır . Hastürk ve arkadaşlarının (197) , spinal kord iskemi reperfüzyon hasarı modelinde TNF $-\alpha$, IL-1, IL-6 serum düzeylerinin sham grubuna göre anlamlı derecede yükseldiğini saptamışlardır. Jorres ve arkadaşlarının yaptıkları in vivo çalışmada, LPS ile stimüle edilen insan polimorfonükleer lökositlerde TNF $-\alpha$ nin transkripsiyonel aktivitesini azalttığını göstermiştir (198). Eisenhunt ve arkadaşlarının

yaptığı deneysel çalışmada ise iloprostun cAMP düzeylerini arttırarak TNF $-\alpha$ düzeyini azalttıkları saptanmıştır (199). M. Di Renzo ve arkadaşları yaptıkları klinik bir çalışmada TNF $-\alpha$ nın iloprost tedavisi ile inhibe olduğunu fakat IL-6 da aynı etkiyi gözlemleyememişlerdir (200).

Prostosiklinin iskemi reperfüzyon modelinde uzak organ hasarını (spinal kord,myokard,böbrek) azalttığını gösteren deneysel çalışmalar mevcut olmakla birlikte direkt organ hasarını gösteren çok fazla çalışma bulunmamaktadır . Bizim yaptığımız çalışmada ise serum TNF $-\alpha$ ve IL-1 düzeyleri İR + İloprost grubunda kontrol grubuna göre anlamlı derecede düşük bulunurken, IL-6 düzeylerinde istatistiksel olarak fark bulunamamıştır.

Histopatolojik inceleme için, Hemotoksilen-Eozin ile boyanan gastrokinemius kası doku örnekleri ışık mikroskobu ile incelendi . hücre şişkinliği,hücre iskelt yapısının dejenerasyonu ve selektif membrane geçirgenliğinin kaybolması reperfüzyon hasarının karakteristik özellikleridir. Bu değişikliklerin tümü doku ödemi ve kapiller kan akımının azalması ile sonuçlanır. Bizim çalışmamızda histopatolojik total skorlama yapılırken preperatlarda ; kas lifi dejenerasyonu, nukleus sentrilizasyonu, inflamatuvar hücre infiltrasyonu,vazokonjesyon ve disorganizasyon değerlendirildi. Çalışmamızda İR grubunda bu bulguların artmış olduğu gözlenirken iloprost verilen grupta ise bu hasar bulgularında azalmaya neden olmuştur. Ancak histolojik bulguların değerlendirilmesinde farklılıklar mevcuttur. Tekin ve arkadaşlarının yaptıkları çalışmada iloprost uygulamasının histolojik hasarı azaltmadığı görülürken Avcı T. ve arkadaşlarının yaptıkları çalışmada bizim çalışmamızla benzer şekilde histolojik hasarın ilopost teavisi ile azaldığı görülmüştür. Bu farklılıkların nedeni uygulanan deneysel model, iskemi reperfüzyon süresi ve ilaç uygulanma şekli gibi pekçok sebebe bağlı olabilir. İloprost uygulanmasının kas hasarına etkisinin olup olmadığının gösterilmesi için daha fazla çalışmaya ihtiyaç vardır. Ancak bu çalışmada uyguladığımız doz ve sürede iloprost iskemi reperfüzyon hasarının önlenmesinde histolojik olarak gösterilmiştir.

Apoptozis hücrelerin programlı bir şekilde elimine edildiği hücre ölüm şeklidir. İskemi reperfüzyon hasarında meydana gelen apoptozisin ortaya çıkan serbest radikaller sonucu oluştuğu gösterilmiştir. Aksoy ve arkadaşlarının yaptığı deneysel iskemi reperfüzyon modelinde kaptopril ve iloprostun rat retinasında apoptozisin önlenmesindeki rolü araştırılmış olup, iloprostun kaspaz-3 aktivitesini İR grubuna göre anlamlı bir şekilde baskıladığı görülmüştür.ve arkadaşları antioksidan olan allopurinolün iskemi reperfüzyon sonrası yenidoğan ratlarında beyin dokusundaki apoptozun öncül proteinleri olan kaspaz-3 ve kaspaz-8 aktiviteleri araştırılmış ve iskemi reperfüzyon grubunda kaspaz-3 aktivitesi artarken ,tedavi grubunda kaspaz-3 aktivitesinde azalma görülmüştür (201). Bizim çalışmamızda İR grubunda kaspaz-3 aktivitesi artış gösterirken ,İR + iloprost verilen grupta kaspaz-3 aktivitesinde anlamlı derecede azalma saptanmıştır. Bu sonuçlar, iloprostun serbest oksijen radikallerinin oluşmasını azaltarak antioksidan etki göstermesi ve TNF - α sentezini inhibe etmesi sonucu iskemi reperfüzyon hasarında koruyucu etkisini göstermektedir. Kısacası kaspaz-3 immunohistokimyasal sonuçlarımıza göre iskelet kasında iskemi reperfüzyon hasarının meydana getirdiği apoptozise karşı korumaktadır. Kas iskemi reperfüzyon hasarı sonucu meydana gelen apoptozisin önlenmesine yönelik yapılmış pekçok çalışma olmakla birlikte literatürde iloprostun iskelet kasında apoptozisi önleyici etkisini gösteren çalışmaya rastlanmamıştır. Bu çalışma iloprostun apoptozisi önlemede etkinliğini gösteren ilk çalışmadır.

Sonuç olarak, iloprost antioksidan ve antiinflamatuvar özellikleri ile iskemi reperfüzyon hasarını azaltmaktadır.

6.SONUÇ VE ÖNERİLER

Çalışmamızda ölçülen parametreler göz önüne alındığında , iskemi reperfüzyon grubunda MDA, TNF- α , IL-1 düzeylerinin çok yükseldiği izlenirken iloprost grubunda bu parametrelerde anlamlı derecede azalma tespit edilmiştir. Fakat ölçülen diğer parametrelerden katalaz ve IL-6 düzeylerinde aynı anlamlı sonuçlara ulaşılamamıştır.

Histopatolojik olarak ışık mikroskobu değerlendirmesinde iskemi reperfüzyon grubunda kas dejenerasyonu,nötrofil infiltrasyonu,disorganizasyon ve sentrilizasyona ait bulgular saptanırken, iloprost grubunda bu bulgularda azalma tespit edilmiştir. Apoptozisin belirlenmesi amacıyla bakılan kaspaz-3 boyanması iskemi reperfüzyon grubunda yoğun olarak saptanırken iloprost grubunda daha az olarak saptanmıştır.

Sonuç olarak çalışmamızda ölçülen parametrelere ve histopatolojik bulgularımıza bakıldığında ; ratlarda deneysel iskemi reperfüzyon modelinde iloprost 'un ,reperfüzyon aşamasından önce intravenöz infüzyon şeklinde uygulanmasının iskelet kası hasarını azaltmada etkili olabileceği sonucuna varılmıştır.

KAYNAKLAR

1. Siemionow M, Arslan E. Ischemia/reperfusion injury: a review in relation to free tissue transfers. *Microsurgery*. 2004;24:468-75.
2. Ege T. Kalp ve damar hastalıklarında iskemi-reperfüzyon hasarı. Duran E (Editör). *Kalp ve Damar Cerrahi*. I. Baskı. İstanbul: Çapa Tıp Kitabevi; 2004. s.197-215.
3. Grace PA. Ischaemia-reperfusion injury. *British Journal of Surgery*, 1994, 81: 637-647.
4. Cell Injury, Cell Death and Adaptations. In Kumar V, Abbas AK, Fausto N (eds) *Robbins and Cotran Pathologic Basis of Disease*, 8th Edition, Philadelphia: Elsevier Saunders, 2007: 1-29
5. Carden DL, Granger DN. Pathophysiology of ischeamia-reperfusion injury. *J Pathol* 2000; 190:255-66.
6. Eltzschig HK, Collard CD. Vascular ischaemia and reperfusion injury. *Br Med Bull*. 2005; 139: 73-74.
7. Krause GS, White BC, Aust SD, et al. Brain cell death following ischemia and reperfusion: a proposed biochemical sequence. *Crit Care Med* 1988;16:714-726
8. Eltzschig HK, Collard CD. Vascular ischaemia and reperfusion injury. *Br Med Bull* 2004; Oct 19;70:71-86. Print 2004. Review. Erratum in: *Br Med Bull* 2005;73-74:139.
9. Lehninger AL. Generation of ATP in anaerobik cell. In: *Bioenergetics* Ed: 2, Menlopark, Calif: WA Benjamin 1971:53-71
10. Newmeyer DD, Ferguson-Miller S. Mitochondria: releasing power for life and unleashing the machineries of death. *Cell*. 2003;21;112(4):481-90.
11. Karakaya A. Akut alt ekstremite iskemi-reperfüzyon sonrasında gelişen böbrek hasarına ilioprost ve levosimendanın etkilerinin araştırılması (tez). Eskişehir: Eskişehir Osmangazi Üniversitesi; 2009.

- 12.Kumar V, Cotran RS, Robbins SL. Hücre zedelenmesi adaptasyonu ve ölümü. Çevikbaş U (Ed.). Robbins temel patoloji 7th ed. İstanbul: Nobel Tıp Kitabevi; 2003. s.3-9.
- 13.CDI, Robbins and Cotran pathologic basis of disease [CD-ROM]. Kumar V, Abbas AK, Fausto N. WB Saunders Company, producers. 7th ed. Philadelphia: WB Saunders Company, 2004.
- 14.Kumar V, Cotran R, Robbins SL. Basic Pathology. In: Wi B. (ed). 6 th ed. Philadelphia, W.B. Saunders Company, 2000: 10, 30-36.
- 15.Droge W. Free radicals in the physiological control of cell function *Physiol Rev.* 2002; 82: 47-95.
- 16.Mangino MJ, Anderson CB, Murphy MK, et al. Mucosal arachidonate metabolism and intestinal ischemia–reperfusion injury. *Am J Physiol.* 1989; 257:299–307.
- 17.Homer-Vanniasinkam S, Crinnion JN, Gough MJ: Post-ischaemic organ dysfunction: a review. *Eur J Vasc Endovasc Surg* 1997;14:195-203.
- 18.Hatanaka N, Kamike W, Shimizu S. Ca²⁺ release from mitochondria induces cytosolic enzyme leakage in anoxic liver. *J Surg Res* 1995; 58:485–90.
- 19.Parr Dr, Wimshurst JM, Harris EI. Calcium-induced damage of rat heart mitochondria. *Cardiovasc Res* 1975; 9: 366-372. 33.
- 20.Steenbergen C, Murphy E, Watts JA, London RE. Correlation between cytosolic free calcium contracture, ATP, and irreversible ischemic injury in perfused rat heart. *Circ Res* 1990; 66: 135-146.
- 21.Schoenberg MH, Beger HG. Reperfusion injury after intestinal ischemia. *Crit Care Med* 1993; 21:1376–1386.
- 22.Maureen McMichael DVM, DACVECC, Rustin M. Moore DVM, PhD, DACVS Ischemia- reperfusion injury pathophysiology, part I. *Journal of Veterinary Emergency and Critical Care* 2004; 14 (4): 231–241.

- 23.Heinzelmann M, Mercer-Jones MA, Passmore JC. Neutrophils and renal failure. Am J Kidney Dis 1999;34(2):384-99.
- 24.Kiriş İ, Okutan H, Savaş Ç, Yönden Z, Delibaş N. Deneysel aortik iskemi-reperfüzyon modelinde renal hasara gadolinyum klorürün etkisi. Turkish J Vasc Surg 2005;14(2):13-18.
- 25.Hinder RA,SteinHJ.Oxygen derived free radicals.Arch Surg 1991;126:104-5.
- 26.Welbourn CRB,Godman G,Paterson IS,et al. Pathophysiology of ischemia reperfusion injury:Central role of the neutrophil.Br J Surg 1991;78:651-5.
- 27.Şener G, Yeğen BÇ. İskemi reperfüzyon hasarı. Klinik Gelişim Derg 2009;22(3):5-14.
- 28.Pellegrini N, Miglio C, Del Rio D, Salvatore S, Serafini M, Brighenti F. Effect of domestic cooking methods on the total antioxidant capacity of vegetables. International Journal of Food Sciences and Nutrition, 2009, 2: 12-22.
- 29.Ertan T, Soran A, Kılıç M, Aşlar AK, Koç M, Cengiz Ö. Kan Malondialdehid ve total antioksidan seviyesinin(TAS) önemi. Cerrahi Tıp Bülteni 2001; 4:154-67.
- 30.Yagi K. Lipit peroxides and human diseases. Chem Phys Lipids 1987; 45: 337-51.
Slater TF. Overview of methods used for detecting lipit peroxidation methods in enzymology. 1984; 105: 283-93.
- 31.Akkus I. Serbest radikaller ve fizyopatolojik etkileri. 1. Baskı: Konya, Mimoza Yayınları, 1995
- 32.Akyol Ö, İşçi N, Temel İ, et al. The relation between plasma and erythrocyte antioxidant enzymes and lipit peroxidation in patients with rheumatoid arthritis. Joint Bone Spine 2001; 68; 31: 1-7.
- 33.Davies SJ, Reichardt-Pascal SY, Vaughan D, Russell GI. Differential effect of ischaemia-reperfusion injury on anti-oxidant enzyme activity in the rat kidney. Experimental Nephrology, 1995, 3: 348-354.

34. Schiller HJ, Andreoni KA, Bulkley GB. Free radical ablation for the prevention of post-ischemic renal failure following renal transplantation. *Wien Klin Wochenschr*, 1991, 69: 1083-1094.
35. Unno N, Fink MP. Nutritional, physiologic, and pathophysiologic considerations of the gastrointestinal tract. Intestinal epithelial hyperpermeability. Mechanisms and relevance to disease. *Gastroenterology Clinics* 1998; 2: 289-307
36. Akkuş I, Kalak S, Vural H. Leukocyte lipid peroxidation, superoxide dismutase, glutathione peroxidase and serum and leukocyte vitamin C levels of patients with type II diabetes mellitus. *Clin Chim Acta* 1996; 244:221-7.
37. Kingston R, Kelly CJ, Murray P. The therapeutic role of taurine in ischaemia-reperfusion injury. *Curr Pharm Des*. 2004;10(19):2401-10.
38. Ozgür O, Kubilay I, Fazil TA, Dilara Z, Sevda FM. Sildenafil attenuates renal ischemia reperfusion injury by decreasing leukocyte. *Acta Histochem* 2009;10: 10–6
39. Slatter T. Free radicals and tissue injury: Fact and the fiction. *Br J Cancer* 1987;55:5–10.
40. McCord JM. Oxygen derived free radicals in post-ischemic tissue injury. *New Engl J Med* 1985;312:159–63.
41. Cadanas E. Biochemistry of oxygen toxicity. *Annu Rev Biochem* 1989; 58:79–110.
42. James TW. Pharmacologic approaches to reperfusion injury. *Br J Pharmacol* 1997;9:291–313.
43. Zimmerman BJ, Granger DN. Reperfusion injury. *Surg Clin North Am*. 1992;72:65–83.
44. Anaya-Prado R, Toledo-Pereyra LH, Lentsch AB, Ward PA. Ischemia/reperfusion injury. *The Surg Res* 2002;105(2):248-58.
45. Lefer AM, Lefer DJ. The role of nitric oxide and cell adhesion molecules on the microcirculation in ischaemia-reperfusion. *Cardiovasc Res* 1996;32(4):743-51.

- 46.Ozgür O, Kubilay I, Fazil TA, Dilara Z, Sevda FM. Sildenafil attenuates renal ischemia reperfusion injury by decreasing leukocyte. *Acta Histochem* 2009;10: 10–6.
- 47.Ergün O, Ulman C, Kılıçalp AS. Carnitine as a agent in experimental renal ischemia–reperfusion Injury. *J UroI Res* 2001; 29: 186–9.
- 48.Grace PA. Ischemia–reperfusion injury. *Br J Surg* 1994;81: 637–47.
49. Marnett LJ. Oxyradicals and DNA damage. *Carcinogenesis* 2000; 21: 361-70
- 50.Spitz DR, Oberley LW. An assay for superoxide dismutase activity in mammalian tissue homogenates. *Anal Biochem* 1989; 179: 8-18.
- 51.Porter NA. Chemistry of lipit peroxidation. *Methods Enzymology*, 1984, 105: 273-282.
- 52.Southorn PA, Powis G. Free radicals in medicine. I. Chemical nature and biologic reactions. *Mayo Clinic Proceedings*, 1988, 63: 381-389.
- 53.Gulcin I, Oktay M, Kirecci E, Kufrevioglu OI. Screening of antioxidant and antimicrobial activities of anise (*Pimpinella anisum* L.) seed extracts. *Food Chemical*, 2003, 83: 371-382.
- 54.Cochrane CG. Cellular injury by oxidants. *American Journal of Medicine*, 1991, 91: 23-30.
- 55.Gulcin I. Antioxidant activity of food constituents: an overview. *Archives of Toxicology*, 2012, 86: 345-391.
- 56.Gulcin I. Antioxidant and antiradical activities of L-carnitine. *Life Science*, 2006, 78: 803-811.
- 57.Girotti AW. Lipit hydroperoxide generation, turnover, and effector action in biological systems. *Journal of Lipit Research*, 1998, 39: 1529-1542.
- 58.Ertan T, Soran A, Kılıç M, Aşlar AK, Koç M, Cengiz Ö. Kan Malondialdehid ve total antioksidan seviyesinin (TAS) önemi. *Cerrahi Tıp Bülteni*, 2001, 2: 154-167.

59. Rodriguez C, Mayo JC, Sainz RM, Antolin I, Herrera F, Martin V, Reiter RJ. Regulation of antioxidant enzymes: a significant role for melatonin. *Journal of Pineal Research*, 2004, 36: 1-9.
60. Stahl W, van den Berg H, Arthur J, Bast A, Dainty J, Faulks RM, Gartner C, Haenen G, Hollman P, Holst B, Kelly FJ, Polidori MC, Rice-Evans C, Southon S, van Vliet T, Vina-Ribes J, Williamson G, Astley SB. Bioavailability and metabolism. *Molecular Aspects of Medicine*, 2002, 23: 39-100.
61. Notarjan D. Oxidants and signal transduction in vascular endothelium. *J. Clin. Med.* 1994; 125(35): 26-37
62. Seven A, İnci F, Civelek S, Burçak G, İnci E, Korkut N. Larenks Kanseri Olgularında Lipit Peroksidasyon ve Antioksidan Statü Göstergelerinin Dokuda İncelenmesi. *Türk ORL Arşivi* 1998; 36: 33-36
63. Meister A, Anderson ME. Glutathione. *Annual Review of Biochemistry*, 1983, 52: 711-760.
64. Reiter RJ, Melchiorri D, Sewerynek E, Poeggeler B, Barlow-Walden L, Chuang J, Ortiz GG, Acuna-Castroviejo D. A review of the evidence supporting melatonin's role as an antioxidant. *Journal of Pineal Research*, 1995, 18: 1-11.
65. Ross D. Glutathione, free radicals and chemotherapeutic agents. Mechanisms of free-radical induced toxicity and glutathione-dependent protection. *Pharmacology and Therapeutics*, 1988, 37: 231-249.
66. Springer TA. Traffic signals for lymphocyte recirculation and leukocyte emigration: the multistep paradigm. *Cell* 1994; 76: 301-314.
67. Granger DN, Kubes P The microcirculation and inflammation: Modulation of leukocyte-endothelial cell adhesion. 1994; *J. Leukocyte Biol.* 55: 662
68. Yavuzer N. Karaciğerde İskemi Reperfüzyon ile İndüklenmiş Rejenerasyon Modelinde Kompleman İnhibitörünün Rolü. Tıp Fakültesi, Genel Cerrahi Anabilim Dalı, Uzmanlık Tezi, Ankara: Başkent Üniversitesi, 2008.

69. Lin E LS, Calvano SE. The systemic response to injury. In: Sı S (ed). Principles of Surgery, 7 th ed. Cambridge, Blackwell Science, 1999: 13-32.
70. Jassem W, Roake J. The molecular and cellular basis of reperfusion injury following organ transplantation. *Transplant Rev* 1998;12:14.
71. Schall TJ, Bacon KB. Chemokines, leukocyte trafficking, and inflammation. *Curr Opin Immunol* 1994;6: 865-873.
72. Butcher EC. Leukocyte-endothelial cell recognition: three (or more) steps to specificity and diversity. *Cell* 1991;67: 1033-1036.
73. Anaya-Prado R, Toledo-Pereyra LH, Lentsch AB, Ward PA Ischemia/reperfusion injury. *J Surg Res.*2002; 15;105(2):248-58.
74. 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. *Scandinavian Journal of Gastroenterology*, 2001, 36: 55-6
75. Majno G, Ames A III, Chiang J, et al. No reflow after cerebral ischemia. *Lancet* 1967; 2: 569–70.
76. Aydın C. İskemi-reperfüzyon hasarı İloprost ve prostosiyanidin ile önlenebilir mi?Hayvan modelinde bir alt ekstremite iskemi çalışması (Tez). Ankara. AnkaraÜniversitesi Tıp Fakültesi 2012.
77. Kuijper PH, Gallardo Torres HI, van der Linden JA, et al. Platelet-dependent primary hemostasis promotes selectinand integrin-mediated neutrophil adhesion to damaged endothelium under flow conditions. *Blood* 1996; 87: 3271–81.
78. Barroso-Aranda J, Schmid-Schonbein GW, Zweifach BW, et al. Granulocytes and no-reflow phenomenon in irreversible hemorrhagic shock. *Circ Res* 1988; 63: 437–47.
79. Kumar V, Abbas AK, Fausto N, eds Robbins and Cotran Pathologic Basis of Disease, 7th Edition, Philadelphia: Elsevier Saunders, 2004.

80. Gawaz M. Role of platelets in coronary thrombosis and reperfusion of ischemic myocardium. *Cardiovasc Res.* 2004; 15: 498-511.
81. Leo R, Pratico D, Iuliano L, Pulcinelli FM, Ghiselli A, Pignatelli P, Colavita AR, FitzGerald GA, Violi F. Platelet activation by superoxide anion and hydroxyl radicals intrinsically generated by platelets that had undergone anoxia and then reoxygenated. *Circulation.* 1997; 18: 885-91.
82. Kremer AE, Rust C, Eichhorn P, Beuers U, Holdenrieder S. Immune-mediated liver diseases: programmed cell death ligands and circulating apoptotic markers. *Expert Rev Mol Diagn* 2009;9(2):139-56.
83. Ayaşlıoğlu E. [Apoptosis]. *Turkiye Klinikleri J Med Sci* 2001;21(1):57-62.
84. Chalmers- Redman R, Franser A.D, Ju W. Mechanisms of nerve cell death: Apoptosis or necrosis after cerebral ischemia, Neuroprotective agents and cerebral ischemia. *Academia Press Lmt.* 2-25, 1997
85. Majno G. Apoptosis, oncosis and necrosis. An overview of cell death. *Am. J. Pathol;* 146: 3-15,1995
86. Patel T, Gores GJ. Apoptosis and hepatobiliary disease. *Hepatology.* 21: 1725-1741, 1995;
87. Micha L, James A, William D, Susan J, Chunzhi D, Susan M, Heather S, Leslie M. Regional Pharmacokinetics Of Amifostine in Anesthetized Dogs: Role Of The Liver, Gastrointestinal Tract, Lungs, And Kidneys. *Anti- cancer Drugs.*; 13: 181-209. 2002
88. Majno G. Apoptosis, oncosis and necrosis. An overview of cell death. *Am. J. Pathol;* 146: 3-15,1995
89. Hwang WYK, Koh LP, Ng HJ, Tan PHC, Chuah CTH, Fook SC, Chow H, Tan KW. A randomized trial of amifostine as a cytoprotectant for patients receiving

- myeloablative therapy for allogeneic hematopoietic stem cell transplantation. *Hepatology*.; 5: 388-395,1986
- 90.Nagano T, Yamamoto K, Matsumoto S, Okamoto R, Tagashira M, Ibuki N, Matsumura MK, Yabushita K, Okano N, Tsuji T. Cytokine profile in the liver of primary biliary cirrhosis. *J Clin Immunol.*;19: 422-427, 1999
- 91.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
- 92.Rust C, Gores GJ. Apoptosis and liver disease. *Am J Med.*; 108: 567-574, 2000
- Ankarcrona M, Dybukt M, Bonfoco E. Glutamate- induced neuronal death: a succession of necrosis or apoptozis depending on mitochondrial function. *Neuron*, 15. 961-973, 1995
- 93.Surinder SY,David S,David KP, Piere AC. Ischemic Preconditioning Protects the Mouse Liver by Inhibition of Apoptosis Through a Caspase-Dependent Pathway. *Hepatology*.30: 1223-1231, 1999
- 94.Haimovici H. Metabolic complications of acute arterial occlusions and related conditions: myonephropathic-metabolic syndrome. Futura Publ Co, Mount Kisco, NY, 1988.
- 95.Stallone RJ, Blaisdell FW, Cafferata HT et al. Analysis of morbidity and mortality from arterial embolectomy. *Surgery*, 1969; 65, 207–217.
- 96.Blaisdell FW: The pathophysiology of skeletal muscle ischemia and the reperfusion syndrome: a review. *Cardiovasc Surg* 2002; 10:620-630
- 97.Belkin M, Brown RD, Wright JG et al. A new quantitative spectrophotometric assay of ischemia reperfusion injury in skeletal muscle. *Am J Surg*, 1988; 156, 83–86.
- 98.Hayes G, Liauw S, Romaschin AD, Walker PM. Separation of reperfusion injury from ischemia- induced necrosis. *Surg Forum*, 1988; 39, 306–308.

99. Harman JW. The significance of local vascular phenomena in the production of ischemic necrosis in skeletal muscle. *Am J Pathol*, 1948; 24, 625–641.
100. Murry CE, Jennings RB, Reimer KA. Preconditioning with ischemia: a delay of lethal cell injury in ischemic myocardium. *Circulation*. 1986 Nov;74(5):1124-36.
101. Cutrn JC, Perrelli MG, Cavalieri B, Peralta C, Rosell Catafau J, Poli G. Microvascular dysfunction induced by reperfusion injury and protective effect of ischemic preconditioning. *Free Radic Biol Med* 2002;33:1200_1208.
102. Jerome SN, Akimitsu T, Gute DC, Korthuis RJ. Ischemic preconditioning attenuates capillary no-reflow induced by prolonged ischemia and reperfusion. *Am J Physiol*, 1995; 268, H2063–H2067.
103. Wang NP, Bufkin BL, Nakamura M, Zhao ZQ, Wilcox JN, Hewan-Lowe KO, Guyton RA, Vinten-Johansen J: Ischemic preconditioning reduces neutrophil accumulation and myocardial apoptosis. *Ann Thorac Surg* 1999; 67:1689-95
104. Adanalı G, Ozer K, Siemionow M. Early and late effects of ischemic preconditioning on microcirculation of skeletal muscle flaps. *Plast Reconstr Surg* 2002;109:1344_1351.
105. Minamino T, Kitakaze M, Morioka T et al. Cardioprotection due to preconditioning correlates with increased ecto-5'-nucleotidase activity. *Am J Physiol* 1996; 270, H238–H244.
106. Kubes P, Payne D, Ostrovsky L. Preconditioning and adenosine in I/R-induced leukocyte endothelial cell interactions. *Am J Physiol* 1998;274:1230_1238.
107. Wu Z-K, Iivainen T, Pehkonen E, Laurikka J, Tarkka MR. Ischemic preconditioning suppresses ventricular tachyarrhythmias after myocardial revascularization. *Circulation*, 2002; 106, 3091–3096.
108. Clavien PA, Yadav S, Sindram D, Bentley RC. Protective effects of ischemic preconditioning for liver resection performed under inflow occlusion in humans. *Ann Surg*, 2000; 232, 155–162.

109. Maxwell SR, Lip GY. Reperfusion injury: a review of the pathophysiology, clinical manifestations and therapeutic options. *Int J Cardiol.* 1997 Jan 31;58(2):95-117. Review.
110. Marzi I, Buhren V, Schuttler A, Trentz O: Value of superoxide dismutase for prevention of multiple organ failure after multiple trauma. *J Trauma* 1993;35:110-9
111. Land W, Schneeberger H, Schleibner S, Ilner WD, Abendroth D, Rutili G, Arfors KE, Messmer K: The beneficial effect of human recombinant superoxide dismutase on acute and chronic rejection events in recipients of cadaveric renal transplants. *Transplann* 1994;57:211-7
112. Jarrod Wall. Antioxidants In Prevention Of Reperfusion Damage Of Vascular Endothelium. *TSMJ*, 2000 May; Volume 1: 67-71.
113. Massey KD, Burton KP Alpha-tocopherol attenuates myocardial membrane-related alterations resulting from ischemia and reperfusion. *Am J Physiol* 1989; 256: H1192-H1199.
114. Lehr HA, Vajkoczy P, Menger MD. Vitamin E: focus on microcirculation. *Microcirculation* 1998; 5: 117-128.
115. Bilgin-Karabulut A, Ademoglu E, Aydin I, Erer M, Gokkusu C. Protective effects of vitamins A and E pretreatment in venous ischemia/reperfusion injury. *J Reconstr Microsurg.* 2001 Aug;17(6):425-9.
116. Bozkurt AK. Alpha-tocopherol (Vitamin E) and iloprost attenuate reperfusion injury in skeletal muscle ischemia/reperfusion injury. *J Cardiovasc Surg (Torino).* 2002 Oct;43(5):693-6
117. De Vecchi E, Lubatti L, Beretta C, Ferrero S, Rinaldi P, Galli Kienle M, et al. Protection from renal ischemia-reperfusion injury by the 2-Methylaminochroman U83836E. *Kidney Int* 1998; 54 (3): 857-863.
118. Panes J, Perry M, Granger DN. Leukocyte-endothelial cell adhesion: avenues for therapeutic intervention. *Br J Pharmacol* 1999; 126, 537-550.

119. Khalil AA, Aziz FA, Hall JC. Reperfusion injury. *Plast Reconstr Surg*. 2006 Mar;117(3):1024-33
120. Krapohl BD, Siemionow M, Zins JE. Effect of tissue-plasminogen activator on leukocyte-endothelial interactions at the microcirculatory level. *Plast Reconstr Surg* 1998;102:2388_2394.
121. Oberender, H., Kraus, T., and Schafer, e.a., *Adv Prost Tromb Leuk Res. Ann Thorac Surg*, 1989. 19 : p. 311-316.
122. Carlson LA, Eriksson I. Femoral -artery infusion of prostaglandin E1 in severe peripheral vascular disease. *Lancet* 1973; 1(795): 155–6.
123. Ymashita, C., Oobo, H., Tsuji, F., et al., Effect of prostoglandin I2 and superoxide dismutase on reperfusion injurj of warm ischemic lung. . *Ann Thorac Surg*, 1992. 54 : p. 921-4.
124. Allison, R.C., Kyle, J., Adkins, W.K., et al., Effect of ischemia reperfusion or hypoxia reoxygenation on lung vascular permeability and resistance. *J Appl Physiol* 1990. 69 : p. 597-603.
125. Saniabadi AR, Lowe GDO, Belch JJF, Forbes CD, Prentice CRM, Barbener JC. The novel effect of a new prostacyclin analogue ZK 36374 on the aggregation of human platelets in whoole blood. *Thromb Haemostas* 1983; 50 (3): 718–21.
126. Hopkins NK, Gorman RR. Regulation of endotelial cell cyclic nucleotide metabolism by prostacyclin. *J Clin Invest* 1981; 67: 540–6.
127. Katırcıoğlu S.F, Küçükaksu D.S, Bozdayı M, Saydam G, Zorlutuna I.Y, Taşdemir O and Beyazıt K. Effects of prostacyclin on heparin reversal with protamin. *Vasc Surg* 1992;8:464-472 51
128. Katırcıoğlu S.F, Gökçe P, Özgencil E, Sarıtaş Z, Şener E, Yılmazkaya B, Koç B, Taşdemir O, Beyazıt K. Prostacyclin usage for spinal cord during experimental thoracic aortic cross-clamping. *Vasc Surg* 1996;30:97-101

129. Grylewski RJ. The impact of prostacyclin studies on the development of its stable analogues in: prostacyclin and its stable analogue iloprost. Berlin Heidelberg, Springer-Verlag 1987:3-16
130. Fisher CA, Kappa JR, Sinha AK, Cottrell ED, Reiser HJ, Addonizio VP. Comparison of equimolar concentrations of iloprost, prostacyclin, and prostaglandin E1 on human platelet function. *J Lab Clin Med.* 1987;109:184- 90.
131. Oliva DW, Maderna P, Accomazzo MR, Nicosia S, Tremoli E. Iloprost binding and inhibition of aggregation in platelet rich plasma. Differences between normal and type IIa hypercholesterolemic subjects. *Biochem Pharmacol.* 1989 Jan 1;38(1):39-45.
132. Zahavi J, Zahavi M. Enhanced platelet release reaction, shortened platelet survival time and increased platelet aggregation and plasma thromboxane B2 in chronic obstructive arterial disease. *Thromb Haemost.* 1985 Feb 18;53(1):105-9.
133. Casals-Stenzel J, Buse M, Losert W. Comparison of the vasodepressor action of ZK36-374, a stable prostacyclin derivative, PGI₂ and PGE₁ with their effect on platelet aggregation and bleeding time in rats. *Prostaglandins Leukot Med.* 1983;10:197-212.
134. Belch JJ, Greer I, McLaren M, Saniabadi AR, Miller S, Sturrock RD, Forbes CD. The effects of intravenous ZK36-374, a stable prostacyclin analogue, on normal volunteers. *Prostaglandins.* 1984 Jul;28(1):67-77.
135. Cowley AJ, Heptinstall S, Hampton JR. Effects of prostacyclin and of the stable prostacyclin analogue ZK 36374 on forearm blood flow and blood platelet behaviour in man. *Thromb Haemost.* 1985 Feb 18;53(1):90-4
136. Fitscha P, Tiso B, Kraus T, Sinzinger H. Effect of iloprost on in vivo and in vitro platelet function in patients with peripheral vascular disease (PVD). *Advances in Prostaglandin, Thromboxane and Leukotriene Research.* 1987; 450-54.
137. Sturzebecher CS, Losert W. Effects of Iloprost on platelet activation in vitro. In: Grylewski RJ & Stock G, eds. *Prostacyclin and its Stable Analogue Iloprost.* Berlin: Springer-Verlag, 1987; 3: 39-45

138. Grant SM, Goa KL. Iloprost. A review of its pharmacodynamic and pharmacokinetic properties, and therapeutic potential in peripheral vascular disease, myocardial ischaemia and extracorporeal circulation procedures. *Drugs*. 1992; 43: 889-924.
139. Steurer G, Jankovic B, Ettl K, Schernthaner G. Investigation of selective [³H]iloprost binding sites on human platelet membranes. *Prog Clin Biol Res*. 1987;242:25-34
140. Jaschonek K, Faul C, Schmidt H, Renn W. Desensitization of platelets to iloprost. Loss of specific binding sites and heterologous desensitization of adenylate cyclase. *Eur J Pharmacol*. 1988 Mar 1;147(2):187-96.
141. Jaschonek K, Weisenberger H, Tidow S, Daiss W, Renn W, Ostendorf P. Platelet prostacyclin binding in smokers. *J Lab Clin Med*. 1986 Aug;108(2):88-95.
142. Kovacs IB, Mayou SC, Kirby JD. Infusion of a stable prostacyclin analogue, iloprost, to patients with peripheral vascular disease: lack of antiplatelet effect but risk of thromboembolism. *Am J Med*. 1991 Jan;90(1):41-6.
143. Hossmann V, Schrör K. Iloprost: a stable prostacyclin analog, for the treatment of obliterative arterial disease(OAD) st. IV: a placebo controlled cross-over study. 1985; *Thrombosis and Haemostasis* 54; 136.
144. Ciuffetti G, Sokola E, Lombardini R, Pasqualini L, Pirro M, Mannarino E. The influence of iloprost on blood rheology and tissue perfusion in patients with intermittent claudication. *Kardiol Pol*. 2003; 59: 197-204
145. Ioannou P, Talesnik J. Platelet antiaggregatory substances inhibit arachidonic acid induced coronary constriction. *Can J Physiol Pharmacol*. 1986; 64: 398- 405.
146. Groom TM, Gautieri RF. Influence of a stable prostacyclin analogue (iloprost) and cyclooxygenase inhibition on angiotensin-II in the perfused human placenta. *Res Commun Chem Pathol Pharmacol*. 1989; 66: 21-32.

147. Herman F, Hadhazy P, Magyar K. Critical evaluation of the in vivo selectivity between hypotensive and platelet antiaggregating actions of iloprost and prostacyclin in beagle dogs. *Arch Int Pharmacodyn Ther.* 1989 Jul-Aug;300:281-91.
148. Bergman G, Kiff PS, Atkinson L et al: Dissociation of platelet aggregation and vasodilatation with iloprost, a stable, orally active prostacyclin derivative. *Circulation* 1983; 68: 398.
149. Steinberg H, Medvedev OS, Luft FC, Unger T. Effect of a prostacyclin derivative (iloprost) on regional blood flow, sympathetic nerve activity, and baroreceptor reflex in the conscious rat. 1: *J Cardiovasc Pharmacol.* 1988;11: 84-9.
150. Borzeix MG, Cahn R, Cahn J. Effects of new chemically and metabolically stable prostacyclin analogues (iloprost and ZK 96480) on early consequences of a transient cerebral oligemia, in the rat. *Prostaglandins.* 1988; 35: 653-64.
151. Caspary L, Creutzig A, Alexander K. Intravenous infusion iloprost in arterial occlusive disease: Dose –dependent effects on skin microcirculation. *Eur J Clin Pharmacol* 1991; 41: 131–6.
152. Buigardini R, Galvani M, Ferrini D, et al. Myocardial ischaemia during intravenous prostacyclin administration: Hemodynamic findings and precautionary measures. *Am Heart J* 1987; 113: 234–40.
153. Dormandy JA. Clinical experience with iloprost in the treatment of critical leg ischaemia. In: Rubanyi GM, ed. *Cardiovascular Significance of Endothellum-Derived Vasoactive Factors.* New York: Futura Publishing 1991; 335–47.
154. Kaukinen S, Ylitalo P, Pessi T, Vapaatalo H. Hemodynamic effects of iloprost, a prostacyclin analog. *Clin Pharmacol Ther.* 1984; 36: 464-9.
155. Scott JP, Higenbottam T, Wallwork J. The acute effect of the synthetic prostacyclin analogue iloprost in primary pulmonary hypertension. *Br J Clin Pract.* 1990; 44: 231-4.

156. Arzilli F, Giovannetti R, Lenzi M, Salvetti A. Acute hemodynamic (systemic and renal) and humoral effects of three increasing doses of iloprost in essential hypertensives. *Am J Hypertens.* 1989; 2: 856-60.
157. Ferrari R, Cargnoni A, Curello S, Boffa GM, Ceconi C. Effects of iloprost (ZK 36374) on glutathione status during ischaemia and reperfusion of rabbit isolated hearts. *Br J Pharmacol.* 1989 Oct;98(2):678-84.
158. Van Gilst WH, Boonstra PW, Terpstra JA, Wildevuur CR, de Langen CD. Improved recovery of cardiac function after 24 h of hypothermic arrest in the isolated rat heart: comparison of a prostacyclin analogue (ZK 36 374) and a calcium entry blocker (dilti. *J Cardiovasc Pharmacol.* 1985 May-Jun;7(3):520-4.
159. Chiariello M, Golino P, Cappelli-Bigazzi M, Ambrosio G, Tritto I, Salvatore M. Reduction in infarct size by the prostacyclin analogue iloprost (ZK 36374) after experimental coronary artery occlusion- reperfusion. *Am Heart J.* 1988 Mar;115(3):499-504.
160. Farber NE, Pieper GM, Thomas JP, Gross GJ. Beneficial effects of iloprost in the stunned canine myocardium. *Circ Res.* 1988 Feb;62(2):204-15
161. Simpson PJ, Fantone JC, Mickelson JK, Gallagher KP, Lucchesi BR. Identification of a time window for therapy to reduce experimental canine myocardial injury: suppression of neutrophil activation during 72 hours of reperfusion. *Circ Res.* 1988 Dec;63(6):60-9.
162. Aksulu HE, Ercan ZS, Turker RK. Further studies on the antiarrhythmic effect of iloprost. *Arch Int Pharmacodyn Ther.* 1985 Oct;277(2):223-34
163. Hildebrand M, Krause W, Oberender HA, Zurdel-Dillinger S, Junger M, Bodenburg H. Pharmacokinetics of iloprost in patients with severe peripheral arterial occlusive disease. *Eicosanoids.* 1990;3(3):145-8.
164. Dormandy J. Use of prostacyclin analogue iloprost in the treatment of patients with critical limb ischemia. *Therapie* 1991;46:319-322.

165. Wigley FM, Wise RA, Seibold JR, et al. Intravenous iloprost infusion in patients with Raynaud phenomenon secondary to systemic sclerosis. A multicenter, placebo-controlled, double-blind study. *Ann Intern Med* 1994;120:199-206.
166. Dormandy JA. The pathophysiology of critical limb ischemia and pharmacological intervention with a stable prostacyclin analogue, iloprost. Royal Society of Medicine Services, London, 1989.
167. Degaetano G, Bertele V, Cerletti C. Mechanism of action and clinical use of prostanoids. In Dormandy J, Stock G, eds. *Critical leg ischaemia -its pathophysiology and management..* Berlin: Springer- Verlag 1990; 115–143.
168. Staben P, Albring M. Treatment of patients with peripheral arterial occlusive disease Fontaine stage III and IV with intravenous iloprost: an open study in 900 patients. *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids*. 1996 May;54(5):327-33.
169. TASC, Supplement to *J of Vasc Surgery* 2000; 31(1) part 2.
170. Levin M, Nakhoul F, Keidar Z, Green J. Acute oliguric renal failure associated with unilateral renal embolism: a successful treatment with iloprost. *Am J Nephrol* 1998;18:444-7.
171. Mazzone A, Mazzucchelli I, Fossati G, et al. Iloprost effects on phagocytes in patients suffering from ischemic diseases: in vivo evidence for down-regulation of alpha M beta 2 integrin. *Eur J Clin Invest* 1996;26:860-6.
172. Kawashima M, Nakamura T, Schneider S, Vollmar B, Lausberg HF, Bauer M, Menger MD, Schafers HJ. Iloprost ameliorates post-ischemic lung reperfusion injury and maintains an appropriate pulmonary ET-1 balance. *J Heart Lung Transplant*. 2003 Jul;22(7):794-801.
173. Saeed SA, Waqar MA, Zubairi AJ, Bhurgri H, Khan A, Gowani SA, Waqar SN, Choudhary MI, Jalil S, Zaidi AH, Ara I. Myocardial ischaemia and reperfusion injury: reactive oxygen species and the role of neutrophil. *J Coll Physicians Surg Pak*. 2005 Aug;15(8):507-14. Review.

174. Okboy N, Yegen C, Aktan AO, Dosluoglu HH, Sav A, Yalin R, Ercan S. The effect of iloprost and NDGA in ischemia reperfusion injury in rat liver. *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids*. 1992 Dec;47(4):291-5
175. Aytacoglu BN, Sucu N, Tamer L, Polat A, Gul A, Degirmenci U, Mavioglu I, Dikmengil M. Iloprost for the attenuation of ischaemia/reperfusion injury in a distant organ. *Cell Biochem Funct*. 2006 Jul- Aug;24(4):341-6.
176. Baltarli A, Ozcan V, Bir F, Aybek H, Sacar M, Onem G, Goksin I, Demir S, Teke Z. Ascorbic acid(vitamin C) and iloprost attenuate the lung injury caused by ischemia/reperfusion of the lower extremities of rats. *Ann Vasc Surg*. 2006 Jan;20(1):49-55
177. Tekin İ. İloprost'un deneysel aortik iskemi-reperfüzyon modelinde femoral arter endoteli ve gastrokinemius kası hasarı üzerine etkisi (tez). Isparta. Süleyman Demirel Üniversitesi Tıp Fakültesi 2007.
178. Product Information: Ventavis iloprost inhalation solution. CoTherix, Inc, SouthSan Francisco, CA (original 12/2004) reviewed 12/2004.
179. Beischer W, Dembski JC, Gruss JD et al: Low-dose iloprost infusions compared to the standard dose in patients with peripheral arterial occlusive disease Fontaine stage IV. 1998; *VASA* 27:15-19
180. Toledo-Pereyra LH, Lopez –Neblina F, Toledo AH. Reactive oxygen species and molecular biology of ischemia/reperfusion. *Ann Transplant* 2004;9:81-3
181. Klenerman L, Biswas M, Hulands GH, Rhodes AM. Systemic and local effects of the application of a tourniquet. *J Bone Joint Surg [Br]* 1980;62:385-8
182. Hobson II RW, Milazzo VJ, Duran WN. Pathophysiology of skeletal muscle ischemia-reperfusion injury. In: Ih H (ed). *Vascular Surgery*, New York, Blackwell Science, 1996: 497-508.
183. Hearse DJ: Ischemia, reperfusion, and the determinants of tissue injury. *Cardiovasc Drugs and Ther* 1990;7:67-76

184. Gülmen Ş, Doğuç DK, Ceylan BG, Çetin NK, Meteöglu İ, Okutan H ve ark. Deneysel aortik iskemi-reperfüzyonda beta-glukanın böbrek hasarı üzerine etkisi. *Türk Göğüs Kalp Damar Cer Derg* 2011;19(2):234-41.
185. Karaca Ş, Güder H. Dermatolojide antioksidan sistem. *Turk J Dermatol* 2009;3:32-9.
186. Belkin M, LaMorte WL, Wright JG, Hobson RW, 2nd. The role of leukocytes in the pathophysiology of skeletal muscle ischemic injury. *Journal of Vascular Surgery*, 1989, 10: 14-19.
187. Petrsek PF, Homer-Vanniasinkam S, Walker PM. Determinants of ischemic injury to skeletal muscle. *Journal of Vascular Surgery*, 1994, 19: 623-631.
188. Erkanli K, Kayalar N, Erkanli G, Ercan F, Sener G, Kirali K. Melatonin protects against ischemia/reperfusion injury in skeletal muscle. *J Pineal Res* 2005;39:238-42
189. Wehrens XHT, Rouwet EV, Egbrink MGA, Slaaf DW, Ramsay G. Effects of experimental lower limb ischemia-reperfusion injury on the mesenteric circulation. *British Journal of Surgery*, 2002, 89:
190. Kumar V, Abbas AK, Fausto N, eds Robbins and Cotran Pathologic Basis of Disease, 7th Edition, Philadelphia: Elsevier Saunders, 2004.
191. B. Emrecan, E. Tulukoglu, S. Bozok, M. Kestelli, G Onem, A Kupelioglu, S. Yagdi, A. Gurbuz. Effects of iloprost and pentoxifylline on renal ischemia-reperfusion in rabbit model. *European Journal of Medical Research*. 2006
192. Huda R, Solanki DR, Mathru M. Inflammatory and redox responses to ischaemia/reperfusion in human skeletal muscle. *Clin Sci (Lond)* 2004; 107: 497–503.
193. Clementsen T, Reikeras O. Cytokine patterns after tourniquet-induced skeletal muscle ischaemia reperfusion in total knee replacement. *Scand J Clin Lab Invest* 2008; 68: 154–159.

194. Riquelme A, Avellanal M, Vigil D, et al. Ischemia-reperfusion challenge in human skeletal muscle: study in knee arthroplasty surgery. *J Anesth Clin Res* 2011; 2: 1–7
195. Wei W, Wei FC, Hung LM. Diazoxide ameliorates microcirculatory disturbances through PKC dependent pathway in I/R-injured rat cremaster muscles. *J Biomed Sci.* 2005;12(3):521-9.
196. Katırcıoğlu SF, Saritas Z, Ulus AT, Yamak B, Yücel D, Ayaz S. Iloprost added to the cardioplegic solutions improves myocardial performance. *Prostaglandins other Lipid Mediators.* 1998; 55: 51-65
197. Hasturk A, Atalay B, Calısaneller T, Ozdemir O, Oruckaptan H, Altınors N. Analysis of serum pro-inflammatory cytokine levels after rat spinal cord ischemia-reperfusion injury and correlation with tissue damage. *Turkish Neurosurgery* 2009;19:353-359.
198. A. Jorres, H. Dinter, N. Topley, G.M. Gahl, U. Frei, P. Scholz, Inhibition of tumour necrosis factor production in endotoxin-stimulated human mononuclear leukocytes by the prostacyclin analogue iloprost: cellular mechanisms, *Cytokine* 9 (1997) 119–125.
199. Czeslick, A. Simm, S. Grond, R.E. Silber, A. Sablotzki, Inhibition of intracellular tumour necrosis factor alpha and interleukin-6 production in human monocytes by iloprost, *Eur.J. Clin. Invest.* 33 (2003) 1013–1017.
200. M. Di Renzo, D. Pieragalli, S. Meini et al. Iloprost treatment reduces TNF- α production and TNF-RII expression in critical limb ischemia patients without affecting IL-6
201. Kenan Özcan, Mehmet Satar et al. Allopurinol's effect on caspase-3 and caspase-8 activity in hypoxic-ischemic newborn rats.
www.turkpediatriarsivi.com/sayilar/196/buyuk/48-522.pdf

