TÜRKİYE CUMHURİYETİ
ANKARA ÜNİVERSİTESİ
TIP FAKÜLTESİ

CARNOSOL'ÜN RAT GRASİLİS KASINDA İSKEMİ REPERFÜZYON HASARINA ETKİSİNİN ARAŞTIRILMASI (DENEYSEL ÇALIŞMA)

Dr. Sinan ULUSOY

PLASTİK, REKONSTRÜKTİF VE ESTETİK CERRAHİ
ANABİLİM DALI
TIPTA UZMANLIK TEZİ

DANIŞMAN
Doç. Dr. Savaş SEREL

ANKARA
2012

TÜRKİYE CUMHURİYETİ
ANKARA ÜNİVERSİTESİ
TIP FAKÜLTESİ

CARNOSOL'ÜN RAT GRASİLİS KASINDA İSKEMİ REPERFÜZYON HASARINA ETKİSİNİN ARAŞTIRILMASI (DENEYSEL ÇALIŞMA)

Dr. Sinan ULUSOY

PLASTİK, REKONSTRÜKTİF VE ESTETİK CERRAHİ
ANABİLİM DALI
TIPTA UZMANLIK TEZİ

DANIŞMAN
Doç. Dr. Savaş SEREL

ANKARA
2012

Ankara Üniversitesi Tıp Fakültesi

Plastik Rekonstrüktif ve Estetik Cerrahi Anabilim Dalı

Tıpta uzmanlık eğitimi çerçevesinde yürütülmüş olan "Carnosol'ün Rat Grasilis Kasında İskemi Reperfüzyon Hasarına Etkisinin Araştırılması" başlıklı Dr. Sinan Ulusoy'a ait bu çalışma jüri tarafından Tıpta Uzmanlık Tezi olarak kabul edilmiştir.

Tez Savunma Tarihi: 24.04.2012

Doç. Dr. Savaş Serel
A.Ü.T.F Plastik Rekonstrüktif ve
Estetik Cerrahi Anabilim Dalı
Tez Danışmanı - Jüri Başkanı

Prof. Dr. Zeki Can
A.Ü.T.F Plastik Rekonstrüktif ve
Estetik Cerrahi Anabilim Dalı
(Jüri Üyesi)

Prof. Dr. Serdar M. Gültan
A.Ü.T.F Plastik Rekonstrüktif ve
Estetik Cerrahi Anabilim Dalı
(Jüri Üyesi)

ÖNSÖZ

Plastik, Rekonstrüktif ve Estetik Cerrahi ihtisasım boyunca eğitimimde çok büyük emekleri olan değerli hocalarım Prof. Dr. Erdem Yormuk, Prof. Dr. Serdar Gültan, Prof. Dr. Mustafa Özbek, Prof. Dr. Kutlu Sevin, Prof. Dr. Murat Emiroğlu, Prof. Dr. Zeki Can, Doç. Dr. Savaş Serel ve Uz. Dr. Burak Kaya'ya bilgi ve tecrübelerini benimle paylaşarak yetişmemde çok büyük pay sahibi olduklarını ve onlara her zaman minnetkar kalacağımı belirtmek isterim.

Bu uzun süre boyunca ikinci bir ailem olarak saydığım ve beraber çalışmaktan hep gurur duyduğum asistan arkadaşlarım, hemşireler ve diğer sağlık çalışanlarına teşekkür ederim.

Tezimin oluşmasında emeği olan Dr. Ertan Günal, Dr. Cem Çerkez, Dr. Mehmet Sönmez, Dr.Elçin Işılgan'a ve değerli tez hocam Doç. Dr. Savaş Serel'e ayrıca teşekkür ederim.

Ankara Üniversitesi Tıp Fakültesi Histoloji-Embryoloji Anabilim Dalı'ndan Prof. Dr. Belgin Can ve Dr. Hilal Göktürk'e, Tıbbi Biyokimya Anabilim Dalı'ndan Prof. Dr. Aslıhan Avcı ve Dr. Metin Genç'e, Anesteziyoloji ve Reanimasyon Anabilim Dalı'ndan Doç. Dr. Zekeriyya Alanoğlu'na ve Biyoistatistik Anabilim Dalı'ndan Yrd. Doç. Dr. Kenan Köse'ye teşekkür ederim.

Bana her zaman, her koşulda destek olan biricik eşim Pınar Çervatoğlu Ulusoy'a ve sevgili aileme sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

İÇİNDEKİLER

Önsöz **i**

İçindekiler **ii**

Kısaltmalar Dizini **iv**

Şekiller Dizini **vi**

Tablolar Dizini **ix**

1. GİRİŞ **1**

2. GENEL BİLGİLER **3**

2.1. İskemi Reperfüzyon Hasarı 3

2.1.1. İskemi Reperfüzyon Hasarında Kompleman Sistemi 3

2.1.2. İskemi Reperfüzyon Hasarında Sitokinler 4

2.1.3. İskemi Reperfüzyon Hasarında Nötrofiller 4

2.1.4. İskemi Reperfüzyon Hasarında Mitokondri 5

2.1.5. İskemi Reperfüzyon Hasarında Lipid Peroksidasyonu ve Malonildialdehid 6

2.1.6. İskemi Reperfüzyon Hasarında Nitrik Oksit (NO) 6

2.1.7. İskemi Reperfüzyon Hasarında Myeloperoksidaz (MPO) 7

2.1.8. İskemi Reperfüzyon Hasarında Ksantin Oksidaz (KO) 8

2.1.9. İskemi Reperfüzyon Hasarında Serbest Oksijen Radikalleri 9

2.1.9.1. Süperoksit Radikali 9

2.1.9.2. Hidrojen Peroksit 10

2.1.9.3. Hidroksil Radikali 10

2.1.10. İskemi Reperfüzyon Hasarında Antioksidanlar 10

2.1.10.1. Süperoksit Dismutaz (SOD) 10

2.1.10.2. Katalaz 11

2.1.10.3. Glutatyon peroksidaz 11

2.1.10.4. C Vitamini (Askorbik Asit) 11

2.1.10.5. E Vitamini 11

2.1.10.6. Melatonin 11

2.1.10.7. Carnosol 12

2.2. Sıçan Grasilis Kasının Anatomisi 13

3. GEREÇ ve YÖNTEM **15**
3.1. Deney Hayvanları 15
3.2. Gereçler 15
3.3. Yöntem 16
3.3.1. Çalışma Grupları 16
3.3.2. Cerrahi Teknik 17
3.4. Değerlendirme Yöntemleri 20
3.4.1. Histolopatolojik Değerlendirme 20
3.4.2. Biyokimyasal Değerlendirme 22
3.4.2.1. Katalaz Aktivitesinin Belirlenmesi 22
3.4.2.2. Malonildialdehit (MDA) Seviyesinin Belirlenmesi 22
3.4.2.3. Ksantin Oksidaz (KO) Aktivitesinin Belirlenmesi 22
3.4.2.4. Nitrik Oksit (NO) Seviyesinin Belirlenmesi 22
3.4.3. İstatistiksel Değerlendirme 23
4. BULGULAR **24**
4.1. Histopatolojik Bulgular 24
4.2. Biyokimyasal Bulgular 37
5. TARTIŞMA **40**
6. SONUÇLAR **45**
ÖZET **46**
SUMMARY **47**
KAYNAKLAR **48**

KISALTMALAR DİZİNİ

ATP : Adenozin tri-fosfat

CCl_4 : Karbon tetra klorür

EMG : Elektromyografi

H-E : Hematoksilen – Eozin

H_2O_2 : Hidrojen peroksit

HOCl : Hipoklorik asit

İ/R : İskemi reperfüzyon

İCAM-1 : İnterselüler adezyon molekülü 1

İL : İnterlökin

iNOS : İndüklenebilir nitrik oksit sentaz

KO : Ksantin oksidaz

L^- : Lipid serbest radikalleri

LOO^- : Lipid peroksit radikalleri

LT : Lökotrien

M-A : Mallory – Azan boyaları

MDA : Malonildialdehit

MPO : Myeloperoksidaz

MSK : Membran saldırı kompleksi

NAD : Nikotinamid adenin dinükleotid

NADPH : Nikotinamid adenin dinükleotid fosfat

NO : Nitrik oksit

NOS : Nitrik oksit sentaz

NO_2^- : Azot dioksit

NO_2^+ : Nitronyum iyonu

O_2 : Oksijen

O_2^- : Süperoksit

OH^- : Hidroksil radikali

$ONOO^-$: Peroksinitrit

PAF : Platelet aktive edici faktör

PG : Prostoglandin

PMNL **:** Polimorfonükleer lökosit

ROM **:** Reaktif oksijen molekülleri

SOD **:** Süperoksit dismutaz

SS **:** Standart sapma

TBA **:** Tiyobarbitürik asit

TXA2 **:** Tromboksan A2

TNF **:** Doku nekroz faktörü

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 2.1. İskemi reperfüzyon hasarında yer alan olaylar dizisi 5
Şekil 2.2. MPO enzimi ile hidrojen peroksitin reaksiyonu sonucunda hipoklorik asit oluşumu. Hipoklorik asitin diğer moleküllerle tepkimeye girerek doku hasarı yaratan ROM'ların oluşumu. 7
Şekil 2.3. İskemi reperfüzyon hasarında ksantin oksidaz sistemi ve serbest oksijen radikalleri 8
Şekil 2.4. Serbest oksijen radikalleri ve antioksidan enzimler 9
Şekil 2.5. Carnosol'un kimyasal yapısı 12
Şekil 2.6. Sıçanda grasilis kasının ve damar anatomisinin şematik görünümü 14
Şekil 3.1. -20 °C' de muhafaza edilerek saklanmış Carnosol. 16
Şekil 3.2. Sıçanın preoperatif hazırlanması 17
Şekil 3.3. Grasilis kas flebinin planlanması ve planlanan yapıların ortaya konması. 18
Şekil 3.4. Diseke edilmiş grasilis kasının üstten ve alttan görünümü 18
Şekil 3.5. Diseke edilmiş grasilis kasında iskemi yaratmak için mikroklemp yerleştirilmiş. 19
Şekil 3.6. İ/R süresi sonunda doku inceleme için alınmış. 19
Şekil 4.1.A. İ/R grubuna (grup 1) ait M-A boyası. X4 büyütme. Bar= 2 µm Çizgili kasa ait enine ve boyuna kesitler kırmızı renk, bağ dokusu ise mavi renk gözlenmektedir. İnce ok: Çizgili kas boyuna kesitleri, kalın kuyruklu ok: Çizgili kas enine kesitleri, yıldız: Bağ dokusu. 24
Şekil 4.1.B. Carnosol grubuna (grup 2) ait M-A boyası. X4 büyütme. Bar= 2 µm Çizgili kasa ait enine ve boyuna kesitler kırmızı renk, bağ dokusu ise mavi renk gözlenmektedir. İnce ok: Çizgili kas boyuna kesitleri, kalın kuyruklu ok: Çizgili kas enine kesitleri, yıldız: Bağ dokusu. 25
Şekil 4.1.C. Şam grubuna (grup 3) ait M-A boyası. X4 büyütme. Bar= 2 µm Çizgili kasa ait enine ve boyuna kesitler kırmızı renk, bağ dokusu ise mavi renk gözlenmektedir. İnce ok: Çizgili kas boyuna kesitleri, kalın kuyruklu ok: Çizgili kas enine kesitleri, yıldız: Bağ dokusu. 25

Şekil 4.2.A. İ/R grubuna (grup 1) ait kesit. Çizgili kasların enine kesitleri, bağ dokusu ve damar yapısı komşuluğu izlenmektedir. Kalın kuyruklu ok: çizgili kas enine kesitleri, yıldız: bağ dokusu, kalp: damar ve içinde staz oluşturmuş eritrositler. Bar = 1 µm 26
Şekil 4.2.B. Carnosol grubuna (grup 2) ait kesit. Yıldız: bağ dokusu, kıvrımlı ok: ekstravaze eritrosit, ok başı: ödemli çizgili kas lifleri. Bar = 1 µm 27
Şekil 4.2.C. Şam grubuna (grup 3) ait kesit. Kalın kuyruklu ok: çizgili kas enine kesitleri, yıldız: bağ dokusu, kalp: vaskuler staz yapmış eritrositler, kuyruksuz ok: epimisyum. Bar = 1 µm 27
Şekil 4.3.A. İ/R grubuna (grup 1) ait kesit. Bar= 1 µm Ok başı: ödemli kas lifi, yıldız: bağ dokusu, kalp: vaskuler staz yapmış eritrositler, kıvrımlı ok: ekstravaze eritrositler. 28
Şekil 4.3.B. Carnosol grubuna (grup 2) ait kesit. Bar= 1 µm Karo: ondüle kas lifleri, ok başı: ödemli kas lifi, yıldız: bağ dokusu, kalp: vaskuler staz yapmış eritrositler, kıvrımlı ok: ekstravaze eritrositler 29
Şekil 4.3.C. Şam grubuna (grup 3) ait kesit. Bar= 1 µm. Kalın kuyruklu ok: çizgili kas enine kesitleri, kalp: vaskuler staz yapmış eritrositler, yonca: periferik sinir kesiti 29
Şekil 4.4.A. İ/R grubuna (grup 1) ait kesit. Bar= 0,5 µm Ok başı: ödemli kas lifi, dönen ok: inflamatuar hücreler (PMNL) , karo: ondülasyon yapan kas lifleri 30
Şekil 4.4.B. Carnosol grubuna (grup 2) ait kesit. Bar= 0,5 µm Ok başı: ödemli kas lifi, yıldız: bağ dokusu, ince ok: çizgili kas boyuna kesiti, dönen ok: PMNL 31
Şekil 4.4.C. Şam grubuna (grup 3) ait kesit. Bar= 0,5 µm Ok başı: ödemli kas lifi, dönen ok: PMNL, yıldız: bağ dokusu, ince ok başı: merkeze göç eden kas hücresi çekirdeği 31
Şekil 4.5. İ/R grubuna ait H-E ile boyanmış bir kesit. İnce ok: çizgili kas boyuna kesiti, ok başı: merkeze göç eden kas hücresi çekirdeği. X100 büyütme. Bar= 0,25 µm 32

Şekil 4.6.A. İ/R grubuna (grup 1) ait kesit. Bar= 0,5 µm Ok başı: ödemli kas lifi, kıvrımlı ok: ekstravaze eritrosit, kalın ok: epimisyum, kuyruklu ok: çizgili kas enine kesiti, dönen ok: inflamatuar hücreler (PMNL) 33
Şekil 4.6.B. Carnosol grubuna (grup 2) ait kesit. Bar= 0,5 µm Ok başı: ödemli kas lifi, yıldız: bağ dokusu, kuyruklu ok: çizgili kas enine kesiti, dönen ok: PMNL 34
Şekil 4.6.C. Şam grubuna (grup 3) ait kesit. Bar= 0,5 µm Ok başı: ödemli kas lifi, yıldız: bağ dokusu, ince ok: çizgili kas boyuna kesiti, dönen ok: PMNL 34
Şekil 4.7.A. İ/R grubuna (grup 1) ait kesit. Bar= 0,25 µm. Şekil 4.6.A'daki alanın bir kısmının X100 büyütmedeki görünümüdür. Ok başı: ödemli kas lifi, kalp: vaskuler staz yapmış eritrositler, kuyruklu ok: çizgili kas enine kesiti, dönen ok: PMNL 35
Şekil 4.7.B. Carnosol grubuna (grup 2) ait kesit. Bar= 0,25 µm. Şekil 4.6.B'deki bağ dokusu alanındaki PMNL hücreleri X100 büyütme ile görüntülenmiştir. Yıldız: bağ dokusu, dönen ok: PMNL 35

TABLOLAR DİZİNİ

Tablo 3.1. Dejeneratif bulguların değerlendirmesinde kullanılan puan tablosu. 21
Tablo 3.2. Çekirdeğin merkeze göçünün değerlendirmesini gösteren tablo. 21
Tablo 4.1. Her üç grubun aldığı histolojik skorlar. 36
Tablo 4.2. Her bir gruba ait deneklerde PMNL sayısı ve grupların ortalamalarının gösterildiği tablodur. 37
Tablo 4.3. Her bir deneğin aldığı doku biyokimyasal değerler. 38
Tablo 4.4. Grupların aldığı biyokimyasal değerlerin ortalamaları ve standart sapmaları. 39

1. GİRİŞ

Günümüzde teknoloji ve bilimdeki ilerlemelere rağmen birçok hastalığın tedavisinde cerrahi tedavi seçenekleri önemli bir yer almaktadır. Tromboliz, embolektomi, by-pass cerrahisi, mikrovasküler serbest doku nakilleri, replantasyon, organ transplantasyonu, günümüzde popülerlik kazanan yüz ve uzuv nakli gibi kompozit doku nakilleri bu cerrahi tedavilerden sadece bir kaç taneleridir. Bu tedavi yöntemlerinin en önemli, ortak sorunlarından biri iskemi ve sonrasında görülen reperfüzyon hasarının tedavinin etkinliğini ve başarısını azaltmasıdır. Klinik uygulamada iskemi ve sonrasında görülen reperfüzyon hasarının önlenememesi sadece tedavide başarısızlığa neden olmamakta, aynı zamanda maliyet kaybına daha da önemli olarak hastanın hayatını kaybetmesine neden olabilmektedir. Bu nedenle iskemi reperfüzyon (İ/R) hasarını önlemeye yönelik çalışmalar bilim dünyasında önemli bir yer almakta ve üzerinde yoğun çalışmalar yapılmaktadır. Bunun için çok çeşitli maddeler kullanılmakla beraber antioksidanlar üzerinde durulan önemli bir gruptur. Carnosol de aslında eskiden beri bilinen ama günümüzde bilim dünyasının dikkatini yeni çekmiş bir antioksidan maddedir.

Dokunun kan akımının tamamen kesilmesi durumu **'iskemi'** olarak tanımlanır. İskemi durumunda; normal oksijenli solunum oksijensiz solunuma dönerek iskemik hasarı başlatmış olur. Kan akımının tekrar sağlanması ise **'reperfüzyon'** - tekrar kanlanma - olarak adlandırılır. Reperfüzyon çeşitli nedenlerden dolayı iskemik hasardan daha fazla doku hasarına neden olur. İskemi ve sonrasında reperfüzyonun dokularda neden olduğu hasarın tümü ''iskemi reperfüzyon sendromu'' olarak bilinmektedir (1).

Günümüzde çok popüler olan ve kullanımı giderek yaygınlaşan antioksidanlar serbest radikalleri ortadan kaldırarak İ/R hasarını azaltırlar. Antioksidanlar sadece bilim dünyasının değil herkesin dikkatini çekerek market raflarında yerini almış, bilinçli ve bilinçsiz olarak yaygın kullanılan bir ürün haline gelmiştir.

Carnosol biberiye bitkisinin (Rosmarinus officinalis) ana bileşenidir ve kuvvetli bir antioksidan etkiye sahiptir (2,3).

Carnosol'ün bilim dünyasının dikkatini çekmeye başlamasıyla bu madde için de çalışmalar başlamıştır. Bu çalışmada metabolizması hızlı olduğu için iskemi reperfüzyon hasarına diğer dokulara göre daha duyarlı olan kas dokusu seçilmiştir.

Bu çalışmanın amacı Carnosol'ün rat grasilis kasında iskemi reperfüzyon (İ/R) hasarına etkisinin araştırılmasıdır.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. İskemi Reperfüzyon Hasarı

İskemi sonrası doku hasarının ana nedeni; oksijen ve besin kaynaklarının tükenmesi ve normalde olması gereken oksijenli solunumun yerini oksijensiz solunuma bırakmasıdır. İskemi devam ettikçe; asidoz, makromolekül sentezinin durması, hücre içi ve hücre dışı iyon dengesinin bozulması, adenozin tri-fosfat (ATP) yıkım ürünlerinin birikimi gibi olaylar meydana gelir (4,5,6).

Dokular iskemi süresince belirli bir noktaya kadar yaşamlarını devam ettirebilirler. Bu noktadan sonra dokuların canlılığını koruması tehlikeye girer. İşte dokunun kendini idare edebileceği bu maksimum süreye 'kritik iskemi süresi' denir. Her dokunun kendine özgü kritik iskemi süresi mevcuttur. Bu süre iskelet kasında 4 saat, sinir dokusunda 8 saat, yağ dokusunda 13 saat, deride 24 saat ve kemik dokuda 4 gündür (7). Bu bilgiler ışığında kas dokusunun iskemiye ne kadar duyarlı olduğunu görebilmekteyiz.

Uzamış iskemi sonunda dokunun reperfüze edilmesine – tekrar kanlandırılmasına- rağmen mikrodolaşımın geri dönmemesine 'no-reflow' fenomeni denilmektedir. Brooks 1922 yılında köpeklerde uzun süren arteriyel tıkanıklıklar oluşturduktan sonra kan akımını tekrar sağlamıştır. Fakat kaslarda bazı alanlarda arteriyel pulsatil akım görülmesine rağmen perfüze olmayan alanlar olduğu ve bu alanların histolojik kesitlerde nekroza gittiği saptanmıştır (8). Kas dokusunda 'no re-flow' fenomeni oluşması için iskemik süre 6 saatin üzerindedir (9,10).

Oksijenin dokuya yeniden girişine izin veren reperfüzyon ile doku hasarı paradoksal olarak daha da artar (11). İskemi reperfüzyon hasarının mekanizmasının anlaşılabilmesi için rol alan temel bileşenlerin bilinmesi gerekir.

2.1.1. İskemi Reperfüzyon Hasarında Kompleman Sistemi

İskemiye bağlı hücre yüzeyinde yeni bir antijen oluşur. Böylece dolaşımdaki IgM antikoru bu antijene gelip bağlanır. Bunun sonucunda kompleman sistemi bileşenlerinden biri olan C1 bağlanması, kompleman aktivasyonu ve böylece kompleman sisteminin bileşenlerinden C3a ve C3b oluşur. C3b daha sonra kompleman zincirinin geri kalan kısmını aktive ederek ''membran saldırı kompleks'' inin (MSK) oluşumunu sağlar. MSK hasarı oluşturan mediatörlerin temelini oluşturur. MSK ayrıca araşidonik asit metabolizmasını uyararak makrofajlardan

prostoglandin E2, nötrofillerden lökotrien B4, tromboxan B2, prostanoidler, interlökin-1 ve reaktif oksijen molekülleri (ROM) salınımı sağlar (12,13,14). ROM' lar güçlü okside edici ve redükte edici ajanlardır. Böylece lipid peroksidasyonu ile hücre membran hasarı yaratırlar (15).

2.1.2. İskemi Reperfüzyon Hasarında Sitokinler

Sitokinler hücreler arası sinyalleşmeyi sağlayan moleküllerdir. Sitokin terimi ayrıca immünmodulatör ajanlar (interlökinler ve interferonlar) için de kullanılır. Literatürde; interlökin-1 (İL-1), interlökin-6 (İL-6), tromboxan A2 (TXA2), 'tissue necrosis factor' (TNF)' ün İ/R hasarındaki rolleri net olarak belirtilmiştir. Bu sitokinler lökosit ve vasküler endotelyal bariyer arasında sinyal oluşturarak lökositlerin selektif adhezyonunu ve transmigrasyonunu sağlarlar (16,17,18,19,20).

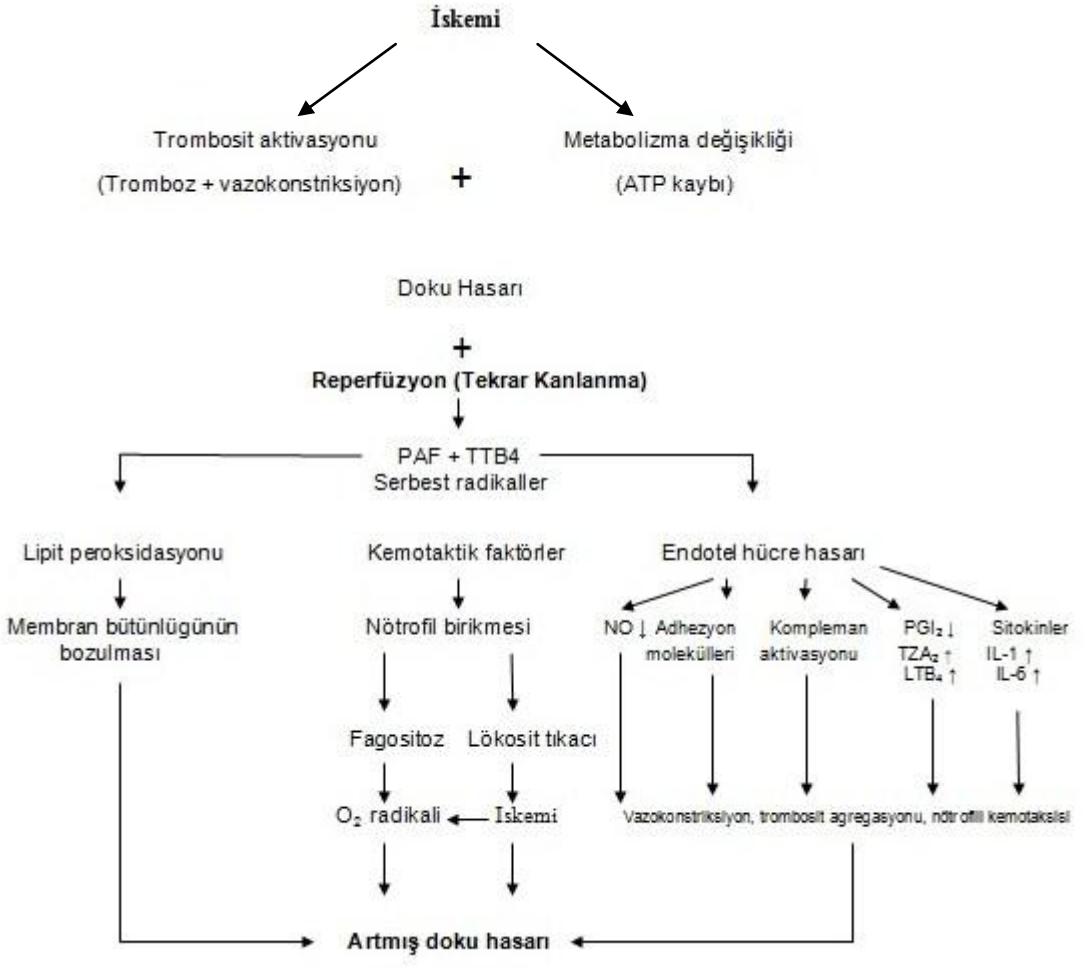
2.1.3. İskemi Reperfüzyon Hasarında Nötrofiller

Nötrofiller bölgesel yanıtın oluşmasında çok önemlidirler. İ/R hasarı sonucunda salınan kemotaktik faktörler nötrofilleri kılcal damar ağına doğru yönlendirir. Yapışma moleküllerinin de yardımıyla önce kan dolaşımındaki nötrofiller endotel boyunca yuvarlanma hareketini gerçekleştirir (21). Daha sonra oluşturdukları kuvvetli bağlarla endotele sıkıca yapışırlar. Endotele yapışma hücrelerin harekete geçmesi ve serbest oksijen radikallerini salınması için gereklidir (22).

Aktive olmuş nötrofiller antimikrobiyal savunma sisteminde kullandıkları mekanizma olan nikotinamid adenin dinükleotid fosfat (NADPH) oksidaz enzimi aktivasyonu ile reperfüzyon sırasında gelen moleküler oksijeni kullanıp seri reaksiyonlar sonucunda süperoksit anyon radikali, hidrojen peroksit (H_2O_2), hidroksil radikali (OH^-), hipoklorik asid (HOCl) ve kloraminleri oluşturarak, ileri doku hasarına neden olurlar (23). Reperfüzyon döneminin en önemli mikrovasküler patolojisi olan kan akımının geri dönmemesi olan 'no re-flow' fenomenine, aktive olmuş nötrofillerin yol açtığı ve nötrofillerin kapillerlerdeki agregasyonları ile kan akımının geri dönmesine engel olan kapiller tıkaçları oluşturduğu bildirilmiştir (24). Reperfüzyon hasarının patogenezinden lökosit infiltrasyonunun sorumlu olduğu birçok çalışma ile de kanıtlanmıştır. Antinötrofil serumun kemoterapotik kullanımı ya da radyasyona maruz tutularak lökopeni yapılan deney hayvanlarında iskemi sonrası doku hasarının önemli ölçüde azalttığı bildirilmiştir (25,26).

2.1.4. İskemi Reperfüzyon Hasarında Mitokondri

Mitokondri oluşan oksijen radikallerini elektron taşıma sistemi ile indirgemektedir. Normal şartlarda oksidatif fosforilasyonda oluşan radikaller farklı redoks mekanizmaları ile indirgenmektedir. Oysa iskemide mitokondri iş yükü, dolayısıyla da radikal oluşumu artmaktadır (27). Karşılanamayan indirgenme mitokondri zar yükünü bozarak, mitokondri zarındaki potasyum kanalları ve geçirgen porları açmaktadır. Bu durum mitokondri içine kontrolsüz iyon geçişine ve enerji metabolizmasının bozulmasına neden olmaktadır. Bu da hücrenin apopitozisi ile sonuçlanmaktadır (27).



Şekil 2.1. İskemi reperfüzyon hasarında yer alan olaylar dizisi.

2.1.5. İskemi Reperfüzyon Hasarında Lipid Peroksidasyonu ve Malonildialdehid

Lipidler hücre zarını oluşturan temel yapılardandır ve hücreyi dış etkenlerden korumada büyük önem taşır. Lipidler serbest radikallerin etkilerine karşı en hassas olan biyomoleküllerdir. Hücre zarlarındaki kolesterol ve yağ asitlerinin doymamış bağları serbest radikallerle kolayca reaksiyona girerek peroksidasyon ürünleri oluştururlar. Çoklu doymamış yağ asitlerinin oksidatif yıkımı lipid peroksidasyonu olarak bilinir. Lipid peroksidasyonu kendini devam ettiren zincir reaksiyonu şeklinde ilerler ve oldukça zararlıdır. Hücre zarlarında lipid serbest radikalleri ($L^{\cdot}$) ve lipid peroksit radikallerinin ($LOO^{\cdot}$) oluşması, reaktif oksijen moleküllerinin neden olduğu hücre hasarının önemli bir özelliği olarak kabul edilir.

Lipid peroksitler (LOOH) yıkıldığında çoğu biyolojik olarak aktif olan aldehitler oluşur. Bu bileşikler ya hücre düzeyinde metabolize edilirler veya başlangıçtaki etki alanlarından hücrenin diğer bölümlerine hasarı yayarlar. Üç veya daha fazla çift bağ içeren yağ asitlerinin peroksidasyonunda malonildialdehit (MDA) meydana gelir. Yağ asidi oksidasyonunun özgün ya da nicel bir göstergesi olmamakla beraber kanda ve idrarda ortaya çıkan malonildialdehit (MDA) lipid peroksidasyon derecesiyle ilgilidir. Bu nedenle biyolojik materyalde malonildialdehit (MDA) ölçülmesi lipid peroksit seviyelerinin göstergesi olarak kullanılır. Non-enzimatik lipid peroksidasyonu çok zararlı bir zincir reaksiyonudur. Direkt olarak zar yapısına ve ürettiği reaktif aldehitlerle dolaylı olarak diğer hücre bileşenlerine zarar verir. Böylece hücre bütünlüğünü bozarak doku hasarına ve birçok hastalığa neden olur (28,29).

2.1.6. İskemi Reperfüzyon Hasarında Nitrik Oksit (NO)

Nitrik oksit (NO) muskarinik veya histaminik reseptörler gibi çeşitli reseptörlerin aktivasyonu sonucu L-arjinin'den nitrik oksit sentaz (NOS) etkisiyle sentezlenir.

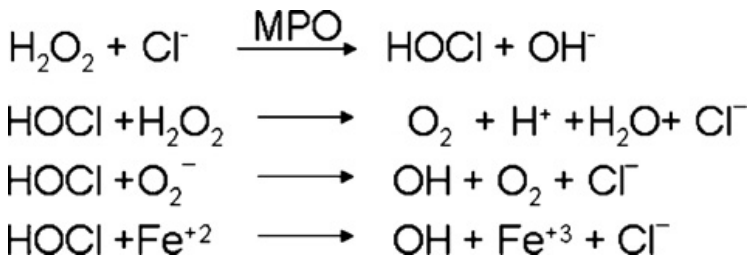
Nitrik oksit (NO) hem fizyolojik hem de patofizyolojik süreçlerde önemli bir serbest radikaldir. NO'nun biyolojik olarak; vazodilatasyon, nörotransmisyon, hemostaz, yara iyileşmesi, inflamasyon ve sitotoksisite gibi birçok görevi vardır (30,31,32). Fakat NO'nun veya türevlerinin (perkosinitrit, nitrojen dioksit) aşırı üretimi durumunda in vivo ortamda mutasyona, septik şoka, tümöral oluşumlara ya

da otoimmün hastalıklara sebep olabilir (33,34,35,36,37). Bu nedenlerle NO'nun yüksek seviyelerde oluşumunun önlenmesi bu hastalıklarla daha az karşılaşılmasını sağlayabilir.

Nitrik oksitin süperoksit dismutaz (SOD) enzimiyle yarışmaya girmesi ve süperoksit (O_2^-) radikaliyle etkileşmesi sonucu peroksinitrit ($ONOO^-$) oluşur. Böylece nitrik oksitin fizyolojik etkisi inhibe edilir, oksidatif etkisi ortaya çıkar. Peroksinitrit nitrik oksit zehirlenmesinin başlıca sorumlusudur. Peroksinitritin protein ve fosfolipidlere ilgisinden dolayı reaktivitesi yüksektir. Bu nedenle protein ve lipitlerin oksidasyonuna neden olur (38,39). Peroksinitritin proteinlere doğrudan zararlı etkileri vardır ve azot dioksit (NO_2^-), hidroksil radikali (OH^-), nitronyum iyonu (NO_2^+) gibi toksik ürünlere dönüşür (29). İ/R hasarının oluşmasında oksijen kaynaklı serbest radikaller gibi azot kaynaklı serbest radikaller de önemlidir. Dokudaki nitrit nitrat düzeylerinin tayin edilmesi azot kaynaklı serbest radikal hasarının bir göstergesi olarak kullanılmaktadır (40).

2.1.7. İskemi Reperfüzyon Hasarında Myeloperoksidaz (MPO)

Myeloperoksidaz, nötrofillerin granüllerinde yer alan bir enzim olan MPO fagosite edilmiş bakterilerin öldürülmesinde önemli rol oynamaktadır. Bu bakterisidal etkiyi hidrojen peroksiti katalizleyerek hipoklorik asit (HOCl) oluşturarak yapar. Hipoklorik asit antimikrobiyal etkisinin yanında çok güçlü bir oksidandır. Hücre zarının geçirgenliğini arttırarak doku hasarına sebep olurken aynı zamanda hücredeki bazı moleküllerle reaksiyona girerek ROM'ları oluşturur (41,42,43) (Şekil 2.2).

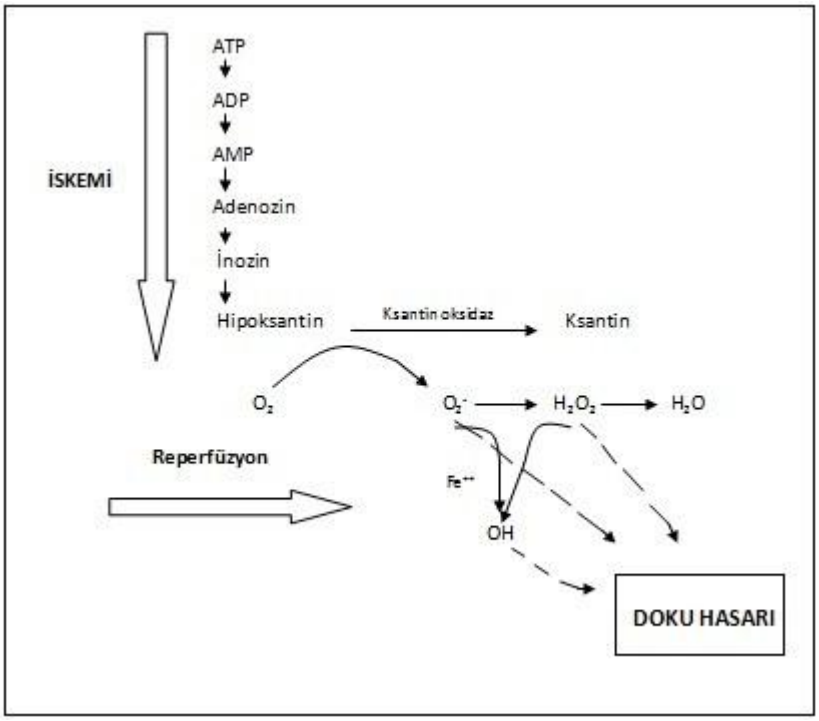


Şekil 2.2. MPO enzimi ile hidrojen peroksitin reaksiyonu sonucunda hipoklorik asit oluşumu. Hipoklorik asitin diğer moleküllerle tepkimeye girerek doku hasarı yaratan ROM'ların oluşumu.

Myeloperoksidaz çeşitli modellerde iskemi-reperfüzyonda nötrofil infiltrasyonunun göstergesi olarak kullanılmıştır (44).

2.1.8. İskemi Reperfüzyon Hasarında Ksantin Oksidaz (KO)

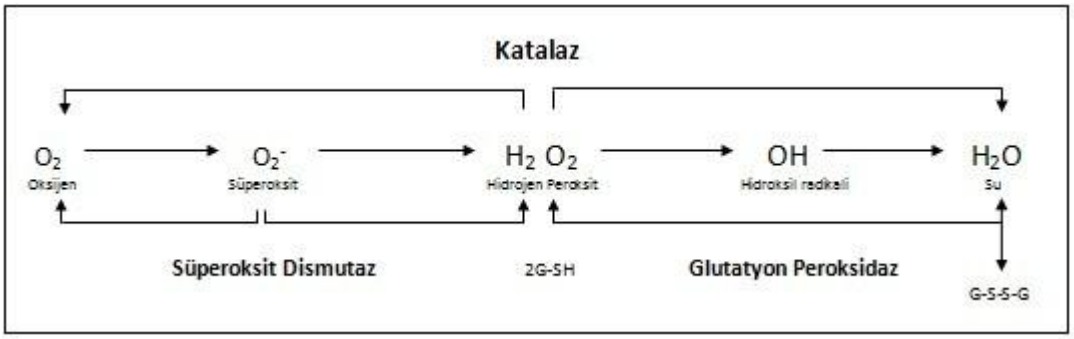
Ksantin oksidaz memeli dokularında bulunan, birçok endojen ve ekzojen kaynaklı substratın oksidasyonuna katılan bir enzimdir. Bu enzim sağlıklı hücrelerde oksidize nikotinamid dinükleotide (NAD^+) bağımlı dehidrogenaz (KDH, D formu) halinde bulunur. Enzimin bu formu reaktif serbest oksijen radikali üretmez. İskemi sırasında KDH, oksidan üreten KO (D formundan O formuna dönüşüm) formuna dönüşür. İskemi sürecinde hücre içindeki ATP, hipoksantin ve ksantine dönüşerek hücresel enerji miktarında azalmaya neden olur. Reperfüzyonun başlaması ile ortama katılan moleküler oksijen, iskemik süreçte birikmiş olan hipoksantin ve ksantin ile KO aracılığı ile reaksiyona girerek süperoksit ve hidrojen peroksit açığa çıkarır (45,46,47) (Şekil 2.3).



Şekil 2.3. İskemi reperfüzyon hasarında ksantin oksidaz sistemi ve serbest oksijen radikalleri.

2.1.9. İskemi Reperfüzyon Hasarında Serbest Oksijen Radikalleri

Serbest radikaller dış yörüngede tek sayıda eşleşmemiş elektron içeren atom veya moleküllerdir. Serbest radikallerin dış yörüngelerindeki eşleşmemiş elektron nedeniyle reaktiviteleri çok fazladır, yaşam süreleri çok kısadır ancak yapılarındaki dengesizlik nedeniyle çok aktiftirler ve tüm hücre bileşenleri ile etkileşebilme özelliğine sahiptirler (23,48). Bu yapılar bazı spesifik enzimlerin katalize ettiği reaksiyonlarla birbirlerine dönüşerek organizmada dengede bulunurlar. Organizmada en sık oluşan süperoksit radikalinin oluşum mekanizması Şekil 2.4'de özetlenmiştir. Normal hücre metabolizmasında düşük miktarlarda oluşan serbest radikaller fizyolojik mekanizmalarla kolaylıkla etkisiz hale getirilebilmektedir. Serbest radikaller çeşitli biyokimyasal reaksiyonları katalize ederler. Hücrenin mitokondrial enerji metabolizmasında, prostaglandin sentezinde, fagositozda, ksenobiyotiklerin detoksifikasyonunda rol alırlar (23,48,49).



Şekil 2.4. Serbest oksijen radikalleri ve antioksidan enzimler.

İskemi sırasında ATP kaynakları kullanılmakta ve hipoksantin oluşmaktadır. Reperfüzyon evresinde oksijenin yardımıyla hipoksantin ksantine dönüşmekte ve bu sırada süperoksit (O_2^-) radikali oluşmaktadır. İskemi uzayıp ATP tüketimi arttıkça hipoksantin üretimi dolayısıyla da reperfüzyon sırasında üretilen süperoksit radikallerinin miktarı artmaktadır.

2.1.9.1 Süperoksit Radikali

Süperoksit radikali tüm aerobik hücrelerde ksantin oksidaz ve NADPH oksidaz sistemi aracılığı ile oksijen molekülünün bir elektron alarak indirgenmesi sonucu meydana gelir (23).

Bazı durumlarda süperoksit radikalinin yapımı hücresel fonksiyonlar için gerekli olmaktadır. Aktive olan fagositik lökositler bol miktarda süperoksit üreterek yabancı organizmaları öldürürler (23).

Genel olarak reaktivitesi düşük olan süperoksit radikalinin asıl önemi hidrojen peroksit kaynağı olması ve geçiş metal iyonları ile hidroksil radikali oluşturmak için reaksiyona girebilmesidir (Şekil 2.3).

2.1.9.2. Hidrojen Peroksit

Süperoksit radikalinin süperoksit dismutaz enzimi (SOD) ile katalizlenmesi sonucu oluşur. Biyolojik zarları kolayca geçebilen hidrojen peroksit yapısında eşleşmemiş elektron içermediği için aslında radikal özelliği taşımaz. Reaktif bir tür olarak bilinmesinin nedeni; bakır (Cu), demir (Fe) gibi metal iyonları varlığında güçlü bir radikal olan hidroksil radikalinin öncülü olmasıdır (23,48) (Şekil 2.3).

2.1.9.3. Hidroksil Radikali

Reaktif oksijen türleri içerisinde bilinen en güçlü ve en reaktif radikaldir. Yarılanma ömrü çok kısadır ve bu nedenle oluştuğu yerde veya oluştuğu yerin yakınlarında etkisini gösterir. Hidroksil radikalleri canlı hücrelerde bulunan her moleküle hasar verebilir. Proteinlerde denatürasyona, fonksiyon bozukluklarına neden olabilirler. Hücre zarındaki yağ asitleriyle etkileşerek lipid peroksidasyonunu başlatırlar; bu durum da zar yapısının bozularak geçirgenliğinin artmasına ve sonuçta hücre ölümüne yol açabilir (23,48,50).

2.1.10. İskemi Reperfüzyon Hasarında Antioksidanlar

Serbest radikallerin toksik etkilerini azaltan, nötralize eden ya da engelleyen maddelere ″antioksidan″ denilmektedir.

Antioksidan moleküller reaktif oksijen moleküllerinin oluşumunu engelleyerek veya zararsız ürünlere indirgeyerek, ortamdaki serbest radikalleri doğrudan temizleyerek, hasar gören hedef moleküllerin tamirini gerçekleştirerek etkilerini gösterirler. Literatürde birçok antioksidan madde tanımlanmış ve çalışılmıştır.

2.1.10.1. Süperoksit Dismutaz (SOD)

Süperoksit anyon radikalinin hidrojen peroksit ve moleküler oksijene dönüşümünü katalizler (Şekil 2.3).

Enzimin fizyolojik fonksiyonu oksijeni metabolize eden hücreleri süperoksit anyon radikalinin zararlı etkilerine karşı korumaktır. Bu reaksiyon oksidatif strese karşı ilk savunma olarak da adlandırılır. Çünkü süperoksit zincirleme radikal reaksiyonlarının güçlü bir başlatıcısıdır. Bu sistem sayesinde hücresel kompartmanlardaki süperoksit düzeyleri kontrol altında tutulur (23).

2.1.10.2. Katalaz

Süperoksit dismutaz (SOD) aracılığıyla oluşmuş olan hidrojen peroksit aslında bir serbest radikal olmamasına karşın en reaktif radikallerden birisi olan hidroksil radikalinin öncüsüdür. Bu nedenle birçok reaktif oksijen ürününden daha fazla oksidatif hasara aracı olur. Katalaz hidrojen peroksiti; su ve moleküler oksijene dönüştürür (23) (Şekil 2.3). Böylelikle hidrojen peroksiti ortadan kaldırarak hidroksil radikalinin oluşmasını engellemiş olur.

2.1.10.3. Glutatyon peroksidaz

Hidrojen peroksiti katalaz enzimi gibi indirgeyerek ortamda hidroksil radikalinin oluşumunu engeller.

2.1.10.4. C Vitamini (Askorbik Asit)

Suda çözünen en güçlü antioksidan moleküldür. Süperoksit, hidroksil radikali ve moleküler oksijeni yakalayarak etkisizleştirir (51). Askorbik asit E vitamininin ve redükte glutatyonun rejenerasyonunu sağlayarak yeniden kullanıma sokar (23).

2.1.10.5. E Vitamini

Lipofilik bir antioksidan olan E vitamini hücre membranında ve lipoproteinlerde bulunur. Hücre membran fosfolipidlerinde bulunan poliansatüre yağ asitlerini serbest radikal hasarından korur. Peroksil radikalleri ile reaksiyona girerek lipid peroksidasyonunu önler. E vitamini süperoksit ve hidroksil radikallerini, moleküler oksijen gibi reaktif oksijen ürünlerini indirger (23).

2.1.10.6. Melatonin

Melatonin memelilerde başta pineal bez olmak üzere over, lens ve kemik iliği hücreleri ile safra ve gastrointestinal sistemden sentezlenip salgılanan bir hormondur. Sentezinin düzenlenmesi primer olarak geceye, diğer bir deyişle karanlığa bağlıdır. Dokulara ve hücrelere kolaylıkla girebilmektedir. Oral uygulamada ilk geçiş etkisine maruz kalır. Melatonin esas olarak karaciğerde metabolize edilir ve idrar ile atılır.

Melatonin özellikle Amerika'da ilaç olarak bulunabilen ve en çok "jetlag" için kullanılan bir maddedir. Bununla beraber melatoninin kanseri önleyici etkileri, hücresel hasarın onarımındaki rolü ve bağışıklık sistemini destekleyici etkileri olduğu da gösterilmiştir (52).

Melatonin ve metabolitlerinin direkt serbest radikal süpürücü etkisi vardır (53). En reaktif radikallerden birisi olan hidroksil radikali ile direkt reaksiyona girer (23).

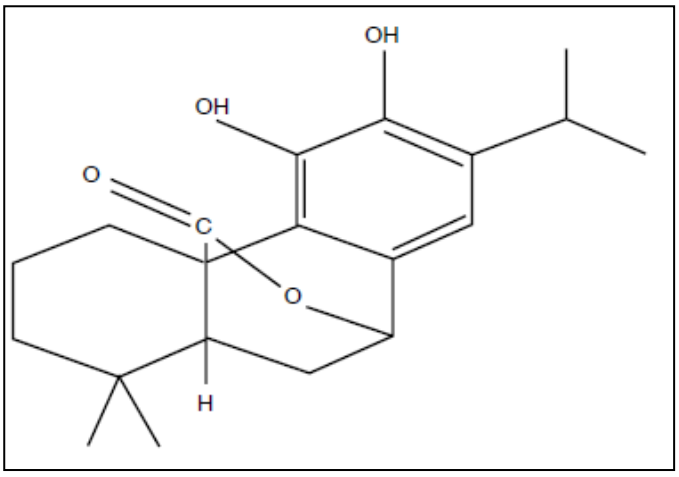
Ayrıca melatonin; iskelet kasındaki mikrovasküler yapıyı da reperfüzyon yaralanmasına neden olan serbest radikallerden korumakta ve böylece iskelet kası doku hasarının azaltılmasında sinerjistik bir etki göstermektedir (54). Melatoninin bir diğer serbest radikal süpürücü etki mekanizması ise vücuttaki antioksidan enzim sistemini uyararak gerçekleştirmesidir. Melatoninin glutatyon peroksidaz antioksidan enzim sisteminin sentezini direkt uyardığı gösterilmiştir (55).

2.1.10.7. Carnosol

Carnosol biberiye bitkisinde (Rosmarinus officinalis) bol bulunan fenolik yapıda bir moleküldür. Biberiye daha çok Güney Avrupa'da yetişen ve günlük diyette sıkça kullanılan bir baharattır (56).

Antioksidan olduğu uzun yıllardır bilinen biberiyenin bu antioksidan özelliğinin %90'ı içeriğinde bulunan Carnosol'e aittir (56).

Carnosol'un kuvvetli antioksidan olmasının yanında; antiinflamatuar, antimikrobiyal ve antitümöral özellikleri de mevcuttur (57,58,59).



Şekil 2.5. Carnosol'un kimyasal yapısı.

Carnosol lipid peroksidasyonunu azaltarak güçlü antioksidan özellik gösterir. İyi bir elektron verici özelliği sayesinde hücre zarı stabilizasyonunu sağlar ve radikal oluşumuna engel olarak lipid membranı oksidatif hasardan korur (60).

Aruoma ve arkadaşlarının 1992 yılında in vitro oksidatif stres modellerinde Carnosol'un peroksil radikallerine karşı iyi bir süpürücü olduğunu ve hidroksil radikallerinin oluşumunu engellediğini göstermiştir (61).

Lo ve arkadaşlarının yaptığı deneysel çalışmada fare makrofajlarında Carnosol'un nitrik oksit (NO) üretimini inhibe ettiği gösterilmiştir. Nitrik oksit, NO sentaz (NOS) enzimi ile L-arjininden oluşan bir serbest radikaldir. Üç çeşit NOS izoformu vardır. Endotelyal NOS, nöronal NOS ve indüklenebilir NOS (iNOS). İskemi reperfüzyon hasarında asıl rol alan iNOS izoformudur. Bu çalışmada fare makrofajlarında iNOS geninin ekspresyonunun Carnosol ile inhibe olduğu gösterilmiştir. Aynı çalışmada $H_2O_2/FeSO_4^-$ reaksiyonu ile oluşturulan hidroksil radikalini süpürerek Carnosol'ün DNA hasarını azalttığı saptanmıştır. Hatta burada Carnosol; vitamin E ve vitamin C ile karşılaştırılmış ve onlardan daha güçlü bir antioksidan etki göstermiştir. Carnosol molekülünün içeriğindeki hidroksil grubunun bu antioksidan etkiyi sağladığı hatta içerdiği ikinci bir hidroksil grubuyla antioksidan etkisini daha da artırdığı belirtilmiştir (62).

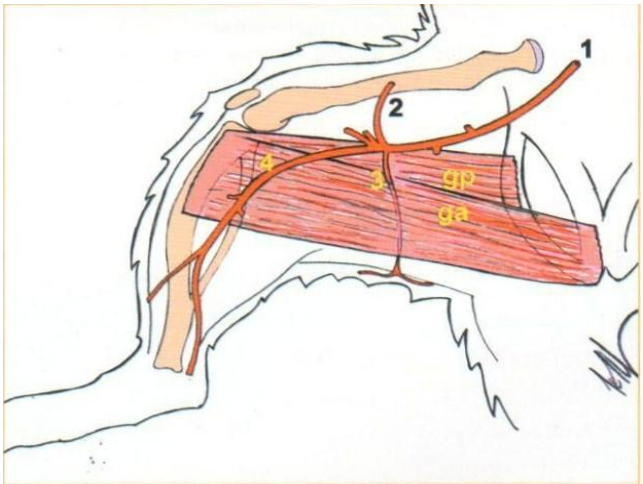
Poeckel ve arkadaşlarının 2008'de yaptığı in-vitro bir çalışmada ise Carnosol ile stimule olmuş insan polimorfonükleer lökositlerin (PMNL) inflamatuar öncesi yanıtı baskıladığı gösterilmiştir. Buradaki anti-inflamatuar etkiyi iki ana mekanizmayla açıklamışlardır; 1) Carnosol 5-lipooksijinaz ve 12-lipooksijinaz enzimlerini inhibe ederek lökosit içindeki lipooksijinazlar tarafından üretilen lökotrienlerin oluşumunu baskılamıştır, 2) Carnosol lökosit içindeki elastaz enziminin salınımını ve ROM'un oluşumunu önlemiştir (63).

2.2. Sıçan Grasilis Kasının Anatomisi

Grasilis kası anterior ve posterior olmak üzere iki karnı bulunan tek bir yapı olarak uyluk ön yüzünde yer alır. Görünüm olarak iki ayrı karın yapısı açıkça belli olmamakla birlikte künt diseksiyonda aradaki plan ortaya çıkar. İnsandaki grasilis kası da segmenter innervasyonu ve beslenmesi ile evrim sürecinde birleşmiş ayrı kaslar fikrini desteklemesine karşın yapı olarak sıçandakinden farklı görünümdedir ve segmentleri diseksiyonla birbirinden ayrılamaz. Sıçan grasilis kasının

insandakinden farklı bu özelliğine karşın kasa giren pedikül her iki segmenti de besler. Bu kas modeli kolay ulaşılabilir olması, mikrocerrahiye uygun damar çapları ve innervasyon özellikleri ile sıçanda tanımlanmış en kullanışlı kas flebi modellerinden biridir. Hsieh ve ark. 2010'da, Medling ve ark. 2009 yılında, Wang ve ark. 2010 yılında sıçan grasilis kasında femoral arter-veni klempleyerek iskemi reperfüzyon hasarı hakkında çalışmalar yapmışlardır.

Anterior grasilis simfizis pubisten köken alıp tibianın medial kenarına, posterior grasilis ise iskiyum kolundan köken alıp anterior bacak kompartmanının derin planında tibia tümseğine yapışır. Bunlar yassı, dikdörtgen biçimli kaslar olup diz ekleminin fleksiyonuna ve bacak addüksiyonuna katılırlar.



Resim 1: Grasilis kasının damar anatomisi.
1. Femoral arter; **2.** Epigastrik arter;
3. Müsküler dal (grasilis pedikülü); **4.** Safen arter; **ga:** anterior grasilis kası; **gp:** posterior grasilis kası.

Şekil 2.6. Sıçanda grasilis kasının ve damar anatomisinin şematik görünümü

Kasın dominant pedikülü femoral arterden çıkıp ön yüzden kasa giren müsküler daldır. Bu pedikül her iki parçayı da etkin biçimde kanlandırır. Müsküler dalın çapı yaklaşık 0.3-0.4 mm civarındadır.

Grasilis kasının motor siniri yaklaşık 0.5 mm çapıyla mikrokoaptosyona uygun bir yapı olan obturatör sinirden gelir.

3. GEREÇ VE YÖNTEM

Bu tez çalışması için Ankara Üniversitesi Yerel Etik Kurulu'ndan 07.09.2011 tarih ve 2011-119-465 karar numaralı onayı alınmıştır. Etik kurul onayını takiben çalışma; Ankara Üniversitesi Tıp Fakültesi Plastik, Rekonstrüktif ve Estetik Cerrahi Anabilim Dalı, Histoloji-Embriyoloji Anabilim Dalı ve Biyokimya Anabilim Dalı'nın olanakları kullanılarak, Ankara Üniversitesi Deney Hayvanları Üretim ve Araştırma Laboratuvarı'nda yürütülmüştür.

3.1 Deney Hayvanları

Bu çalışmada Ankara Üniversitesi Deney Hayvanları Üretim ve Araştırma Laboratuvarı'nda yetiştirilmiş toplam 18 adet, ağırlıkları 280-320 gram arasında değişen Wistar Albino cinsi erkek sıçan kullanıldı.

Sıçanlar hayvan laboratuvarında uygun kafeslerde, 21 ± 2 °C sıcaklıkta ve ışıkların saat 08:00' de yakılıp, saat 20:00'de söndürülmesiyle 12 aydınlık - 12 saat karanlık ritminin – sirkadyan ritminin - sağlandığı koşullarda barındırıldı. Hayvanlar standart sıçan yemi ile beslendi, herhangi bir diyet ya da su kısıtlaması yapılmadı. Tüm hayvanlar ayrı kafeslerde barındırıldı.

3.2 Gereçler

Çalışmada kullanılan cerrahi gereçler, sarf malzemeleri ve ilaçlar:

1- Carnosol 10 mg'lık preparat (Cayman Chemical)
2- Etanol
3- Temel cerrahi aletler (pens, penset, portegü, bistüri sapı, bistüri, vb.)
4- Steril cerrahi gazlı bez
5- Steril enjektörler (1, 2.5, 5, 10 cc)
6- Steril cerrahi eldiven
7- Povidone iodine
8- Mikroklemp
9- Traş bıçağı
10- Serum fizyolojik
11- %10'luk Formol
12- Ketamin baz (Ketalar, Pfizer)
13- Ksilazin (%2'lik Rompun, Pfizer)

14- Dijital fotoğraf makinası (Canon 200 IS, Canon S3 IS)
15- Nikon Eclipse E600 marka ışık mikroskobu
16- Lam, Lamel
17- Hematoksilen Eozin (H-E) ve Mallory Azan (M-A) histolojik boyaları
18- Parafin



Şekil 3.1. -20 °C' de muhafaza edilerek saklanmış Carnosol.

3.3. Yöntem

3.3.1. Çalışma grupları

Hayvanlar her grupta 6 hayvan olacak şekilde randomizasyon yöntemi ile 3 gruba ayrıldı. Gruplar; kontrol grubu (grup 1), deney grubu (grup 2) şam grubu (grup 3) olarak adlandırıldı.

Deney grubundaki (grup 2) hayvanlara operasyondan 1 saat önce 5 mg/kg dozunda olacak şekilde etanol ile sulandırılmış Carnosol intraperitoneal yolla verildi. Kontrol grubundaki (grup 1) hayvanlara da aynı stresi yaşatmak için aynı hacimde etanol enjeksiyonu operasyondan 1 saat önce intraperitoneal olarak uygulandı. Şam grubundaki (grup 3) hayvanlara herhangi bir enjeksiyon yapılmadı.

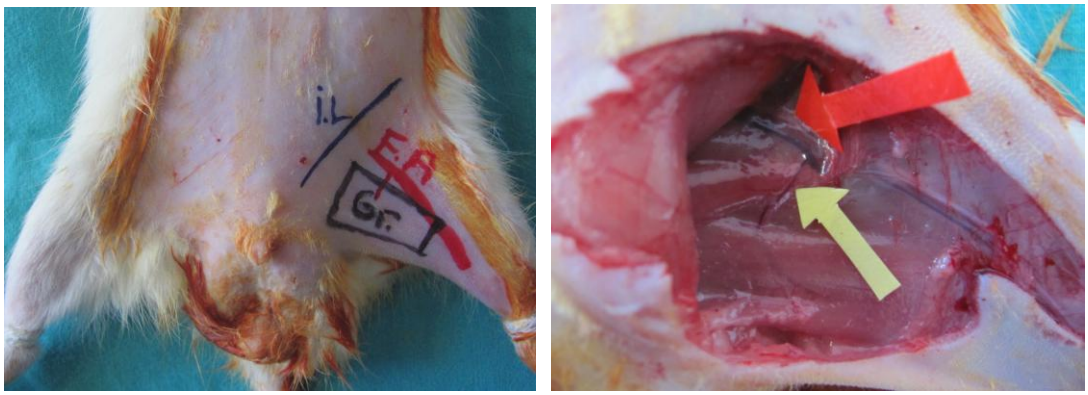
3.3.2. Cerrahi Teknik

Deney başlamadan önce sıçanlara intraperitoneal yolla verilen 10mg/kg ksilazin ve 80 mg/kg ketamin ile anestezi sağlandı. Sıçan sırtüstü pozisyonda tespit edildi ve her sıçanın inguinal bölgesi ameliyat öncesi traş edilerek povidone iodine ile preoperatif hazırlık yapıldı (Şekil 3.2). Tüm cerrahi işlemler asepsi, antisepsi kurallarına uygun olarak gerçekleştirildi.



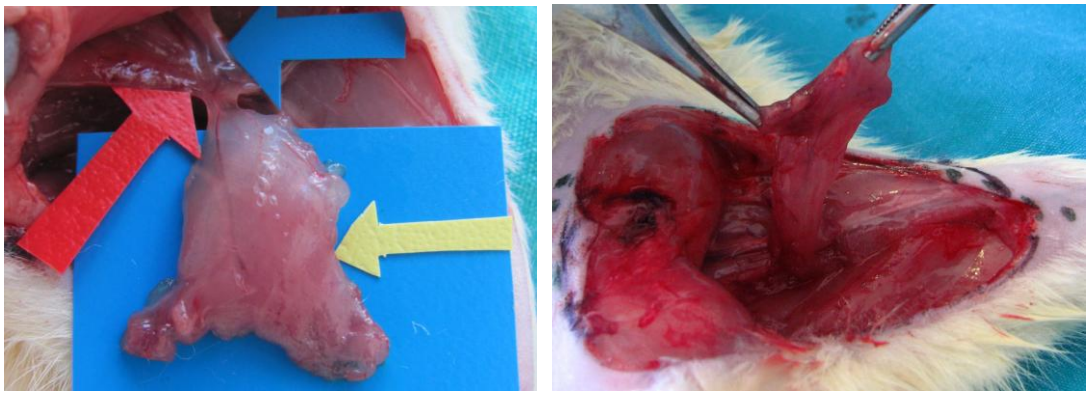
Şekil 3.2. Sıçanın preoperatif hazırlanması

Operasyon öncesi planlama yapıldı. İnguinal ligamamentin hemen kraniyalinden başlayıp bacak iç yüzüne doğru, femoral ve safen damarlara paralel uzanan bir kesi ile cilt-ciltaltı geçildi. Kası ve damarları örten deri iki tarafa doğru, damarlara ve kasa zarar vermeyecek şekilde diseke edildi. Böylece grasilis dahil bütün bacak iç yüzü kasları, femoral, safen damar sistemi ve bizim için önemli olan grasilis kasının muskuler dalı ortaya çıkarıldı (Şekil 3.3).



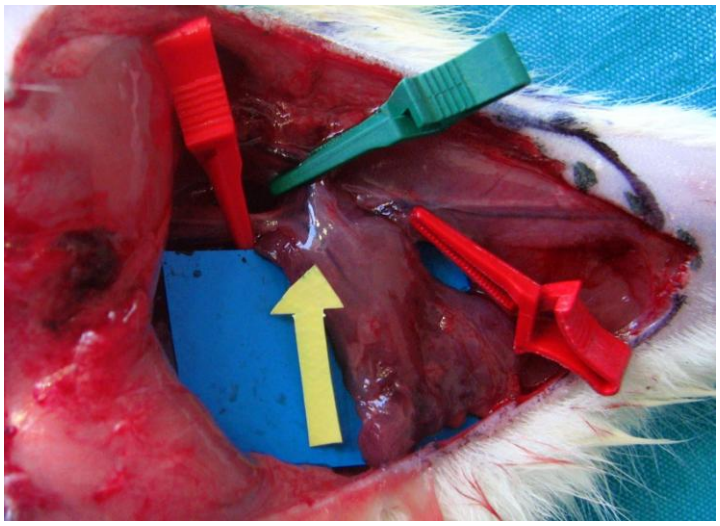
Şekil 3.3. Grasilis kas flebinin planlanması ve planlanan yapıların ortaya konması. Kırmızı ok: Femoral damar, Sarı ok: Grasilis kasının muskuler dalı.

Grasilis kası sadece muskuler dal üzerinden beslenecek şekilde ve muskuler dala zarar vermeden dikkatlice diseke edildi (Şekil 3.4).



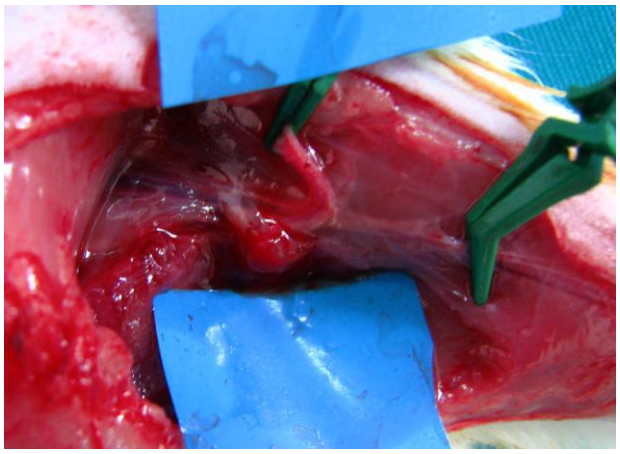
Şekil 3.4. Diseke edilmiş grasilis kasının üstten ve alttan görünümü.

Kontrol ve deney grubunda iskemi yaratmak için femoral artere bir adet mikroklemp yerleştirildi. Daha sonra geri akımla grasilisin perfüze olmasını engellemek için birer adet mikroklemp de safen ve epigastrik artere yerleştirildi (Şekil 3.5). Bu aşamada iskemi süresi başlamış oldu. Dijital fotoğraf makinesi ile fotoğraf çekildi.



Şekil 3.5. Diseke edilmiş grasilis kasında iskemi yaratmak için mikroklemp yerleştirilmiş. Sarı ok: Grasilis kasının muskuler dalı.

Flepteki iskemiyi doğrulamak için kasın distalinden küçük bir parça kesilerek kanayıp kanamadığı kontrol edildi. Kanama olmadığı gözlendi. Bu işlem dijital fotoğraf makinası ile videoya alındı. Dört saat sonra iskemi süresi dolunca femoral arterdeki mikroklemp açılarak reperfüzyon sağlandı. Reperfüzyonun sağlandığını görmek amacıyla yine kas flebinin distal ucundan ufak bir parça kesildi. Kanama olduğu görüldü. Bu işlem de videoya alındı. Kasın proksimal kısmından histolojik ve biyokimyasal örnekleme için üç saatlik reperfüzyon sonrası biyopsi alındı (Şekil 3.6). Şam grubuna iskemi/reperfüzyon uygulanmadı. Şam grubundan da aynı amaçla yedi saat sonra biyopsi alındı.



Şekil 3.6. İ/R süresi sonunda doku inceleme için alınmış.

Deney protokolü sona erince sıçanlar yüksek doz eter inhalasyonu ile sakrifiye edildiler. Histoloji için alınan parçalar %10'luk formol içine konuldu. Biyokimyasal inceleme için alınan biyopsi materyalleri de dış etkenlerden teması önlemek amacıyla alüminyum folyoya sarılarak bekletilmeden biyokimya laboratuvarındaki -80°C'deki buzdolabına yerleştirildi.

3.4. Değerlendirme Yöntemleri

3.4.1. Histolopatolojik Değerlendirme

Şam grubu (grup 3), İ/R uygulanan grup (grup 1) ve İ/R öncesi Carnosol uygulanan grupların (grup 2) her biri için 6'şar sıçan kullanıldı. Grasilis kaslarından alınan 1x1 cm boyutlarındaki örnekler histolojik inceleme için %10'luk tamponlu formaldehite konularak tespit edildi. Dereceli alkollerden geçirilerek dehidratasyon uygulanan dokular ksilene alınarak şeffaflanmaları tamamlanana kadar bekletildi. Şeffaflaşma sonrası 60°C etüvde 4 saat sıvı parafin infiltrasyonundan sonra dokular sert parafin bloklara gömüldü. Bloklar buzdolabında +4°C'de bekletildi. Kesim işlemine başlamadan önce -18°C'ye alınan bloklardan mikrotom (Leica RM 2125RT, Germany) ile 5 μm'lik kesitler alındı. Her denekten alınan 5 adet seri kesit histolojik değerlendirme amacıyla Hematoksilen- Eozin (H-E) ile ve 2 adet kesit Mallory Azan (M-A) boyaları ile boyandı. Hazırlanan preparatlar Nikon Eclipse E600 marka ışık mikroskobuyla incelendi ve fotoğraflandı.

Her denekten alınan beşer adet seri kesitteki tüm alanlar dejeneratif bulgular açısından ışık mikroskobu ile incelenerek 0-4 arası değerlerle puanlandırıldı. Daha sonra bu 5 seri kesitin her birinde X40 objektif büyütmesinde rastgele seçilen beşer alanda polimorfonükleer lökositler (PMNL) sayılıp toplandı ve toplam sayı beşe bölünerek her bir denek için ortalama PMNL sayısı hesaplandı. Her bulgu için verilen puanlar istatistiksel olarak değerlendirildi.

Histolojik olarak değerlendirilen dejeneratif bulgular:

- ekstravaze eritrosit varlığı,
- enine çizgilenme kaybı,
- çekirdeğin merkeze göçü,
- kas liflerinde ayrılma,
- bağ dokusu artışı,

- interselüler ve interfasiküler ödem varlığı
- inflamatuar hücre sayısı (PMNL)

Dejeneratif bulguların değerlendirilmesinde kullanılan skorlama:

0 = dejeneratif bulgu yok

1 = az düzeyde dejeneratif bulgu

2 = orta düzeyde dejeneratif bulgu

3 = orta-çok düzeyde dejeneratif bulgu

4 = yüksek düzeyde dejeneratif bulgu

Dejeneratif bulgular ve skorlama için aşağıdaki Tablo 3.1 oluşturuldu.

Tablo 3.1. Dejeneratif bulguların değerlendirmesinde kullanılan puan tablosu.

	Bulgu yok	Az	Orta	Orta-çok	Yüksek
Ekstravaze eritrosit varlığı	0	+1	+2	+3	+4
Enine çizgilenme kaybı	0	+1	+2	+3	+4
Çekirdeğin merkeze göçü	0	+1	+2	+3	+4
Kas liflerinde ayrılma	0	+1	+2	+3	+4
Bağ doku artışı	0	+1	+2	+3	+4
İnterselüler ve interfasiküler ödem varlığı	0	+1	+2	+3	+4

Çekirdeklerin merkeze göçünün değerlendirilmesinde (Tablo 3.2) her hayvana ait beşer adet preparatta tüm alanlar incelendi. Merkeze göç eden kas hücresi çekirdeği hiç görülmediyse 0 (bulgu yok), 1-3 arası çekirdek görüldüyse +1 (az) , 4-7 arası çekirdek görüldüyse +2 (orta), 8-10 arası çekirdek görüldüyse +3 (orta-çok), 10'dan daha fazla sayıda çekirdek görüldüyse +4 (yüksek) olarak puanlandırıldı.

Tablo 3.2. Çekirdeğin merkeze göçünün değerlendirmesini gösteren tablo.

	Bulgu yok (0)	Az (+ 1)	Orta (+ 2)	Orta- Çok (+ 3)	Yüksek (+ 4)
Merkeze göç eden kas hücresi çekirdeği sayısı	0	1-3	4-7	8-10	>10

Tüm değerlendirme ve sayım işlemleri tek taraflı kör araştırmacılar tarafından yapıldı.

3.4.2. Biyokimyasal Değerlendirme

Sakrifiye hayvanlardan çıkarılan dokular -80°C sıcaklıkta derin dondurucuda saklandıktan sonra çalışma gününde dondurucudan alınarak ağırlıklarının 10 katı hacimde (% 10 w/v) serum fizyolojik içinde homojenize edildi. Doku homojenatları 4000 devirde 20 dakika süreyle santrifüj edildikten sonra elde edilen süpernatanlarda protein konsantrasyonlari Lowry yöntemiyle belirlendi ve uygun seyreltmelerle aynı doku türü için tüm süpernatanların protein konsantrasyonları eşitlendi. Bu supernatanlarda oksidan ve antioksidan parametreler (Katalaz, MDA düzeyi, KO ve NO aktiviteleri) ölçüldü.

3.4.2.1. Katalaz Aktivitesinin Belirlenmesi:

Aebi yöntemine göre, deney ortamına ilave edilen hidrojen peroksit, katalaz tarafından su ve oksijene parçalanır, bu sıradaki absorbans azalması 240 nm'de ölçülerek enzim aktivitesi belirlenir. Sonuçlar "IU/mg protein(mg/ml)" olarak belirlendi (64).

3.4.2.2. Malonildialdehit (MDA) Seviyesinin Belirlenmesi:

Dahle'nin spektrofotometrik yönteminin temeli MDA ile tiyobarbitürik asitin (TBA) oluşturduğu pembe renkli kompleksin 532 nm dalga boyunda verdiği absorbansın ölçülmesine dayanır. Sonuçlar standart solüsyonla (tetraetoksipropan (TEP)) yapılan ölçümlerden hazırlanan standart grafiğe göre "nmol/mg protein(mg/ml)" cinsinden belirlendi (65).

3.4.2.3 Ksantin Oksidaz (KO) Aktivitesinin Belirlenmesi:

Bu yöntemin ilkesi ksantinden ürik asit oluşumunun 293 nm dalga boyunda spektrofotometrik olarak ölçülmesidir. Sonuçlar "mIU/mg protein(mg/ml)" olarak belirlendi (66).

3.4.2.4 Nitrik Oksit (NO) Seviyesinin belirlenmesi:

Griess reaksiyonu ve modifiye cadmiyum reaksiyonu ile nitrik oksitin asidik ortamda sırasıyla sülfanilik asit ve naftilendiamin çözeltisi ile reaksiyona girmesiyle oluşan rengin 540 nm dalga boyunda spektrofotometrik olarak ölçülmesidir. Sonuçlar "µM/ml homojenat" cinsinden tanımlandı (67).

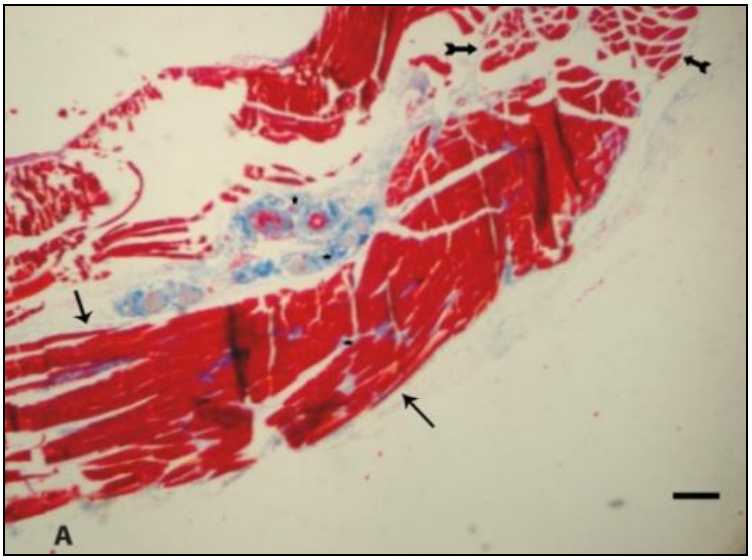
3.4.3 İstatistiksel Değerlendirme

Verilerin istatistiksel değerlendirmesi ‘SPSS for Windows 14.0’ paket programında yapıldı. Değerlendirmelerde Kruskal Wallis ve Mann-Whitney U testi kullanıldı. İstatistiksel anlamlılık sınırı $p<0,05$ olarak kabul edildi.

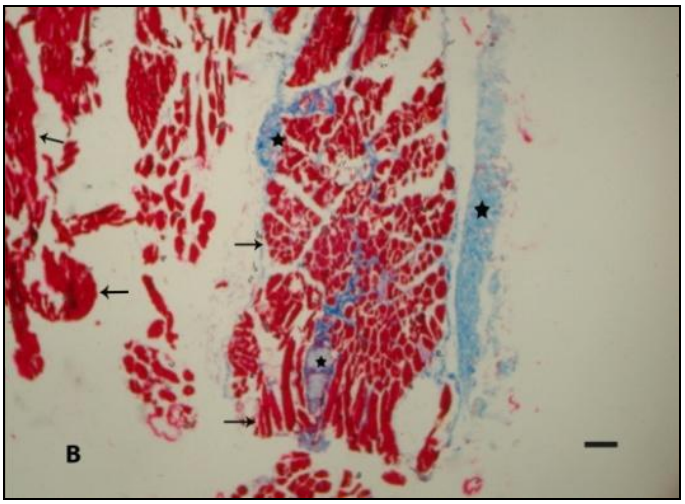
4. BULGULAR

4.1. Histopatolojik Bulgular

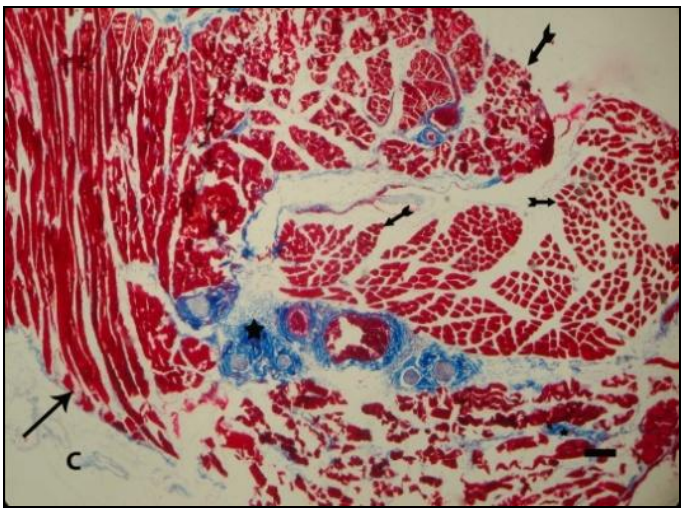
Çizgili kasın enine ve boyuna olan kesitlerine baktığımızda İ/R grubunda (grup 1) kas dokusunda yer yer kayıplar ve dökülmeler izlenmektedir (Şekil 4.1.A). Carnosol grubunda da (grup 2) belirgin bir fark olmaksızın aynı bulgular görülmektedir (Şekil 4.1.B). Şam grubuna (grup 3) baktığımızda ise kas dokusu bütünlüğünün korunduğu görülmektedir (Şekil 4.1.C).



Şekil 4.1.A. İ/R grubuna (grup 1) ait M-A boyası. X4 büyütme. Bar= 2 μm Çizgili kasa ait enine ve boyuna kesitler kırmızı renk, bağ dokusu ise mavi renk gözlenmektedir. İnce ok: Çizgili kas boyuna kesitleri, kalın kuyruklu ok: Çizgili kas enine kesitleri, yıldız: Bağ dokusu.

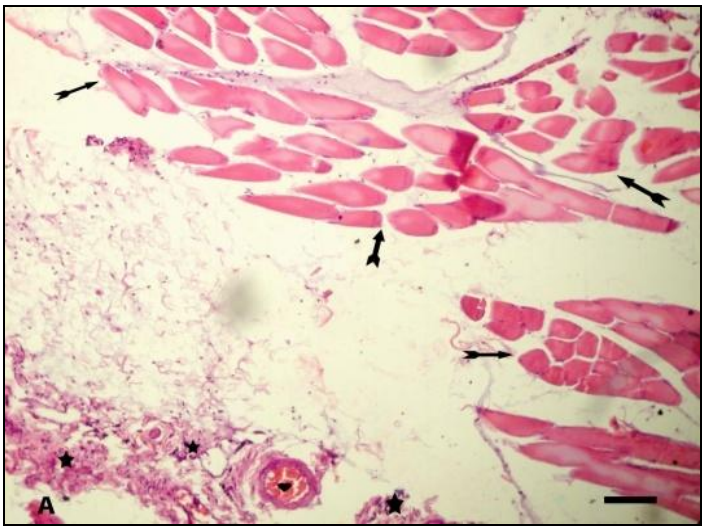


Şekil 4.1.B. Carnosol grubuna (grup 2) ait M-A boyası. X4 büyütme. Bar= 2 µm Çizgili kasa ait enine ve boyuna kesitler kırmızı renk, bağ dokusu ise mavi renk gözlenmektedir. İnce ok: Çizgili kas boyuna kesitleri, kalın kuyruklu ok: Çizgili kas enine kesitleri, yıldız: Bağ dokusu.

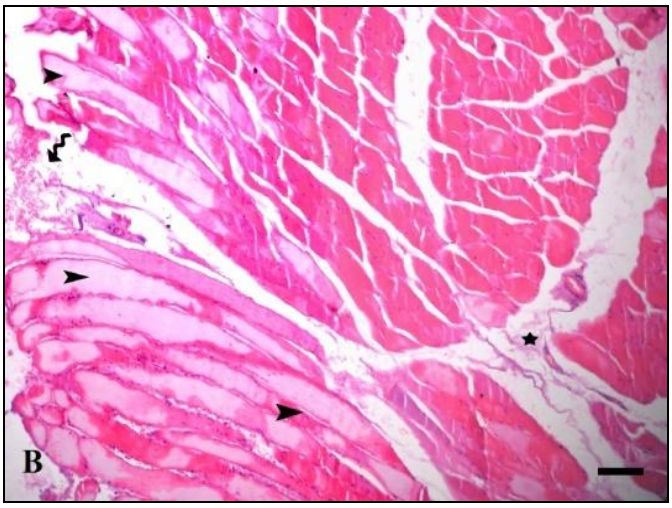


Şekil 4.1.C. Şam grubuna (grup 3) ait M-A boyası. X4 büyütme. Bar= 2 µm Çizgili kasa ait enine ve boyuna kesitler kırmızı renk, bağ dokusu ise mavi renk gözlenmektedir. İnce ok: Çizgili kas boyuna kesitleri, kalın kuyruklu ok: Çizgili kas enine kesitleri, yıldız: Bağ dokusu.

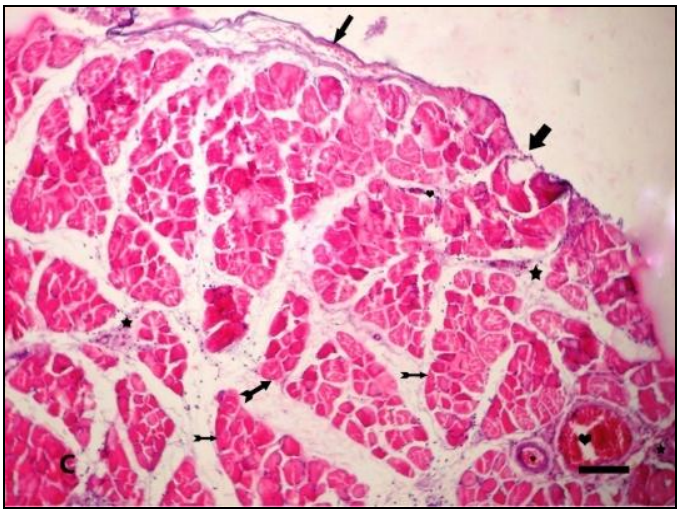
Her üç gruba ait H-E boyanmış kesitlere 10'luk büyütme ile baktığımızda İ/R grubunda (grup 1) çizgili kas kesitlerinde ödemli görünüm dikkati çekmektedir **(**Şekil 4.2.A). Carnosol grubuna (grup 2) ait kesitte ödemli çizgili kas yapıları ve damar dışına çıkmış eritrositler dikkat çekmektedir **(**Şekil 4.2.B). Şam grubuna (grup 3) ait kesitlerde ödemin az olduğu ve buna bağlı olarak kas lifleri arasında fazla ayrılma olmadığı gözlenmiştir **(**Şekil 4.2.C).



Şekil 4.2.A. İ/R grubuna (grup 1) ait kesit. Çizgili kasların enine kesitleri, bağ dokusu ve damar yapısı komşuluğu izlenmektedir. Kalın kuyruklu ok: çizgili kas enine kesitleri, yıldız: bağ dokusu, kalp: damar ve içinde staz oluşturmuş eritrositler. Bar = 1 μm

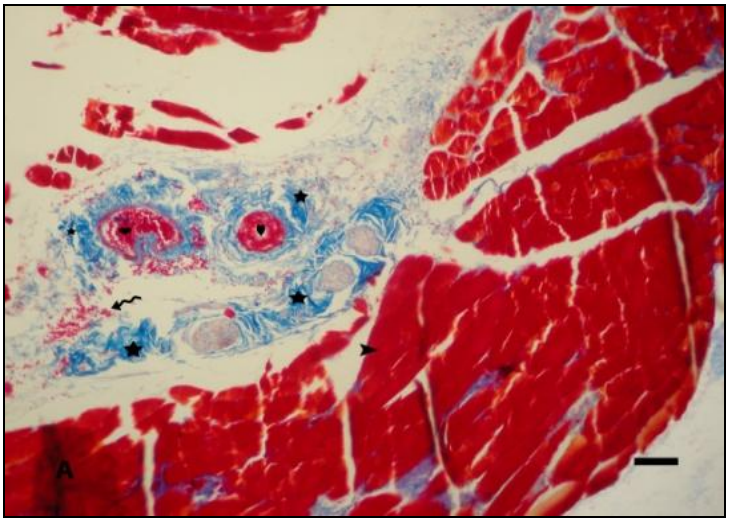


Şekil 4.2.B. Carnosol grubuna (grup 2) ait kesit. Yıldız: bağ dokusu, kıvrımlı ok: ekstravaze eritrosit, ok başı: ödemli çizgili kas lifleri. Bar = 1 µm

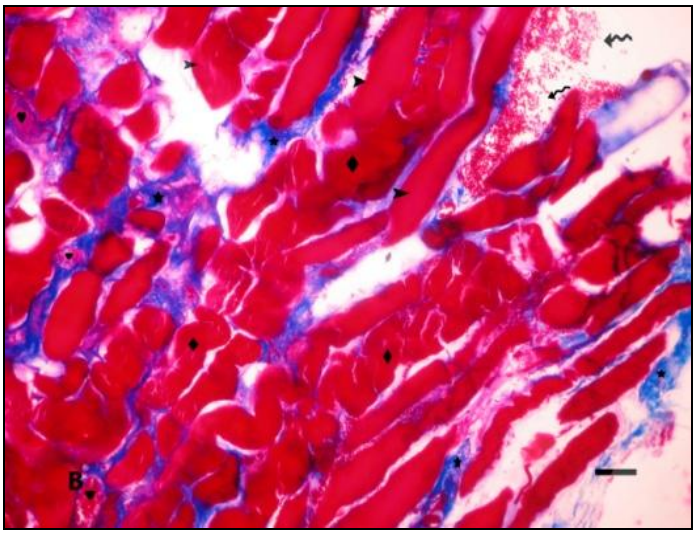


Şekil 4.2.C. Şam grubuna (grup 3) ait kesit. Kalın kuyruklu ok: çizgili kas enine kesitleri, yıldız: bağ dokusu, kalp: vaskuler staz yapmış eritrositler, kuyruksuz ok: epimisyum. Bar = 1 µm

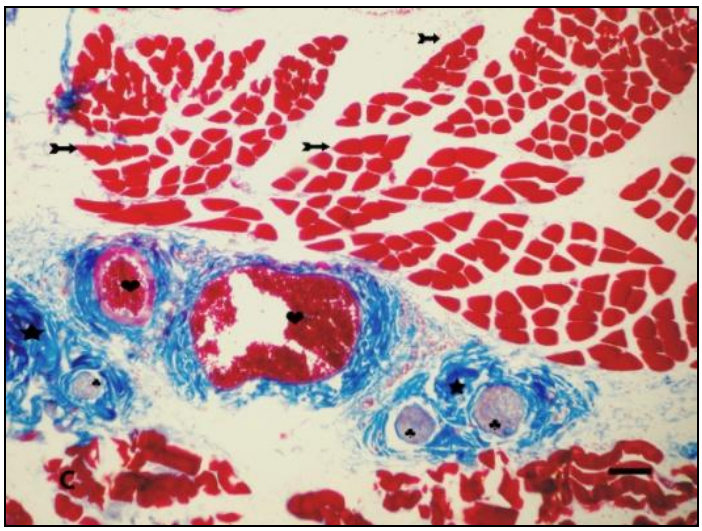
Her üç gruba ait H-E boyanmış kesitlere 10'luk büyütme ile baktığımızda İ/R grubunda (grup 1) çizgili kasların boyuna kesitlerinde ödemli görünüm izlenmektedir **(**Şekil 4.3.A**).** Damar lümeninde staz yapmış ve damar dışına çıkmış eritrositler dikkat çekmektedir. Carnosol grubuna (grup 2) ait kesitte ondulasyon gösteren kas lifleri ve kas liflerinin arasında çoğalmış bağ dokusu (mavi renk) görülmektedir **(**Şekil 4.3.B**).** Şam grubuna (grup 3) ait kesitlerde arter-ven yapıları ve komşuluğundaki periferik sinir kesitleri izlenmektedir. Çizgili kasların enine kesitlerinin düzgün yerleşimli oldukları görülmektedir **(**Şekil 4.3.C**).**



Şekil 4.3.A. İ/R grubuna (grup 1) ait kesit. Bar= 1 µm Ok başı: ödemli kas lifi, yıldız: bağ dokusu, kalp: vaskuler staz yapmış eritrositler, kıvrımlı ok: ekstravaze eritrositler.

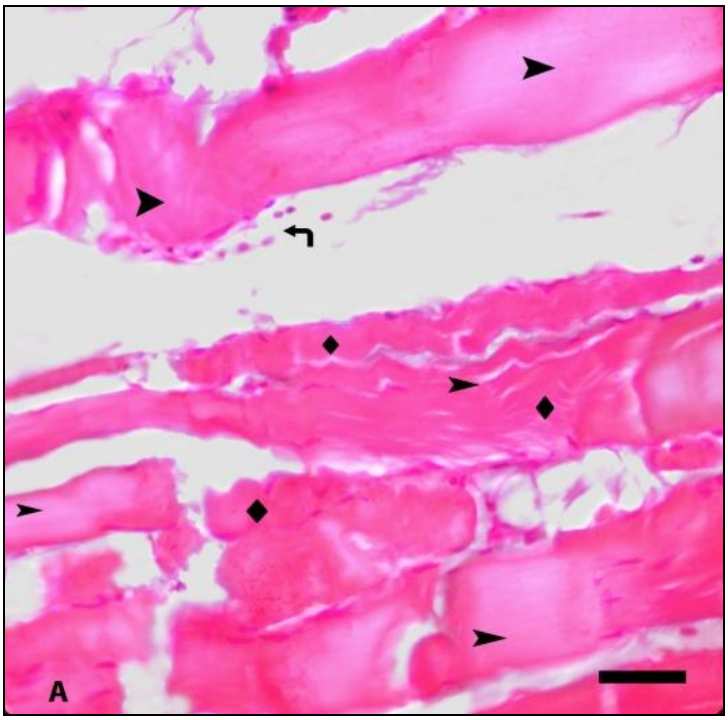


Şekil 4.3.B. Carnosol grubuna (grup 2) ait kesit. Bar= 1 µm Karo: ondüle kas lifleri, ok başı: ödemli kas lifi, yıldız: bağ dokusu, kalp: vaskuler staz yapmış eritrositler, kıvrımlı ok: ekstravaze eritrositler.

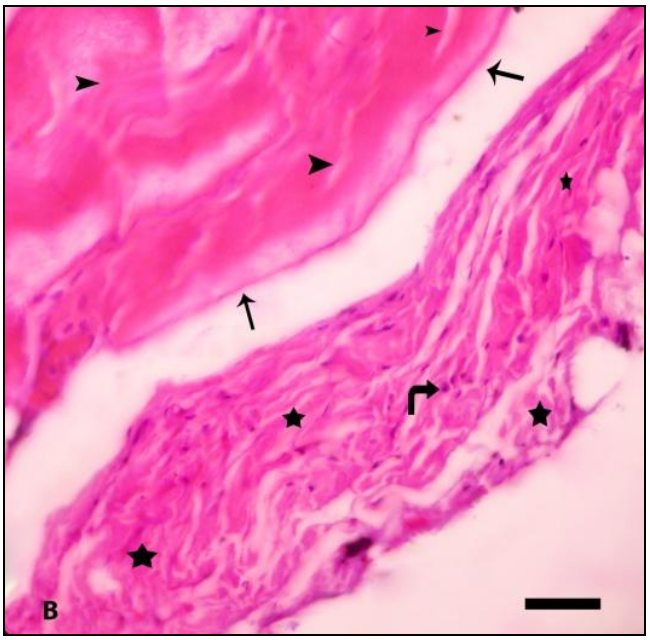


Şekil 4.3.C. Şam grubuna (grup 3) ait kesit. Bar= 1 µm. Kalın kuyruklu ok: çizgili kas enine kesitleri, kalp: vaskuler staz yapmış eritrositler, yonca: periferik sinir kesiti.

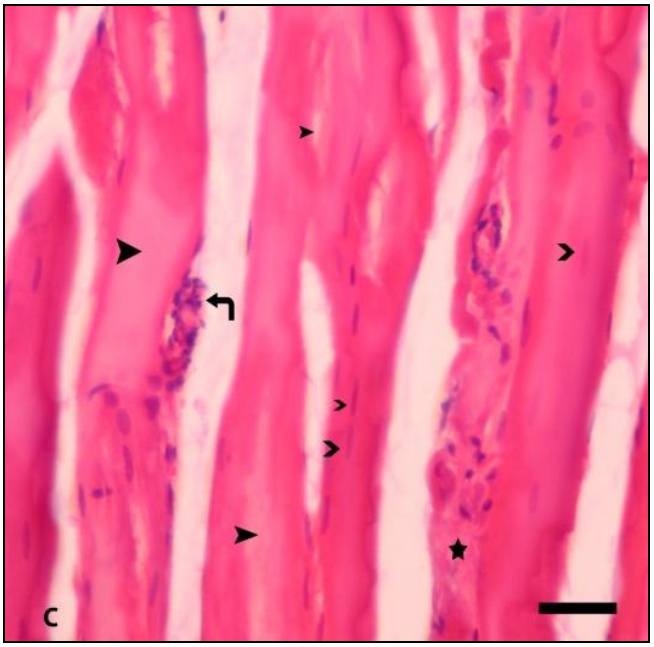
Her üç gruba ait H-E boyanmış kesitlere 40'lık büyütme ile baktığımızda İ/R grubunda (grup 1) çizgili kasların boyuna kesitlerinde ödem ve interfasiküler ödeme bağlı kas liflerinde ondüle görünüm izlenmektedir (Şekil 4.4.A). Carnosol grubuna (grup 2) ait kesitte kas liflerinde ödem varlığı gözlenmektedir. Bir bölgede bağ dokusu artışı izlenmektedir, bağ dokusundaki bu artışın hücre artışından ziyade kollajen lif artışından kaynaklandığı görülmektedir (Şekil 4.4.B). Şam grubuna (grup 3) ait kesitlerde çizgili iskelet kasında ödem ve çevre bağ dokusu izlenmektedir. Bazı çizgili kas boyuna kesitlerinde orta yerleşimli kas hücresi çekirdeği dikkati çekmektedir (Şekil 4.4.C).



Şekil 4.4.A. İ/R grubuna (grup 1) ait kesit. Bar= 0,5 µm Ok başı: ödemli kas lifi, dönen ok: inflamatuar hücreler (PMNL) , karo: ondülasyon yapan kas lifleri.

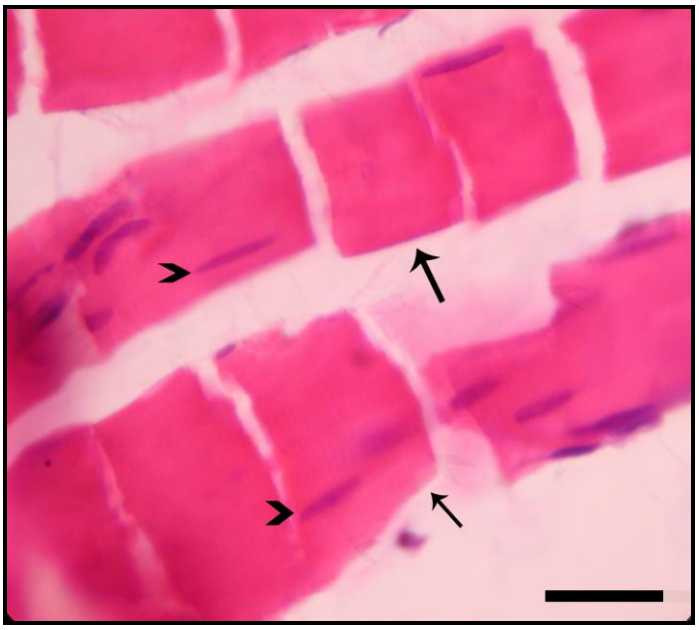


Şekil 4.4.B. Carnosol grubuna (grup 2) ait kesit. Bar= 0,5 µm Ok başı: ödemli kas lifi, yıldız: bağ dokusu, ince ok: çizgili kas boyuna kesiti, dönen ok: PMNL.



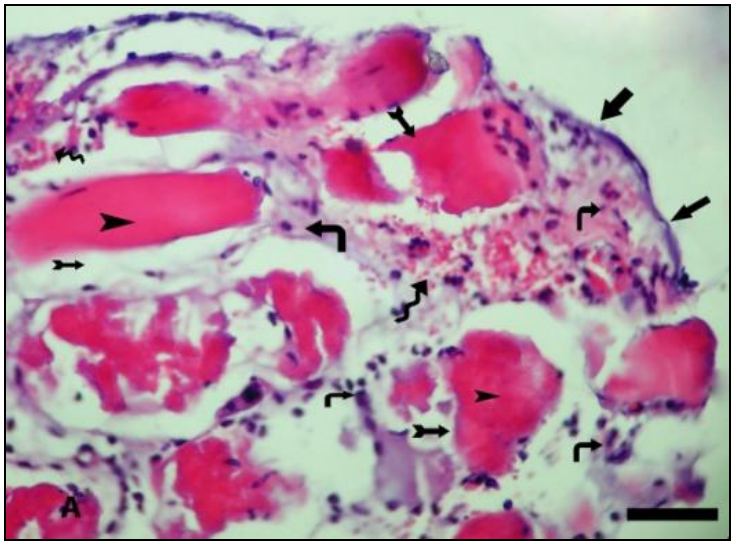
Şekil 4.4.C. Şam grubuna (grup 3) ait kesit. Bar= 0,5 µm Ok başı: ödemli kas lifi, dönen ok: PMNL, yıldız: bağ dokusu, ince ok başı: merkeze göç eden kas hücresi çekirdeği.

İ/R grubuna (grup 1) ait H-E ile boyanmış bir preperatta çizgili kas boyuna kesitlerinde kas liflerinin kenarlarında yerleşmesi gereken kas hücresi çekirdeklerinin yer yer merkeze doğru göç ettikleri dikkati çekmektedir (Şekil 4.5). Bu görünüm kas liflerinde meydana gelen dejenerasyon bulgularından birisidir.

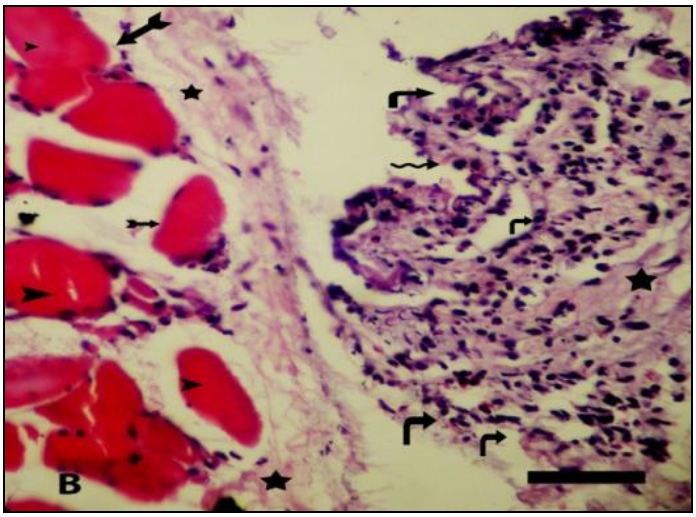


Şekil 4.5. İ/R grubuna ait H-E ile boyanmış bir kesit. İnce ok: çizgili kas boyuna kesiti, ok başı: merkeze göç eden kas hücresi çekirdeği. X100 büyütme. Bar= 0,25 µm

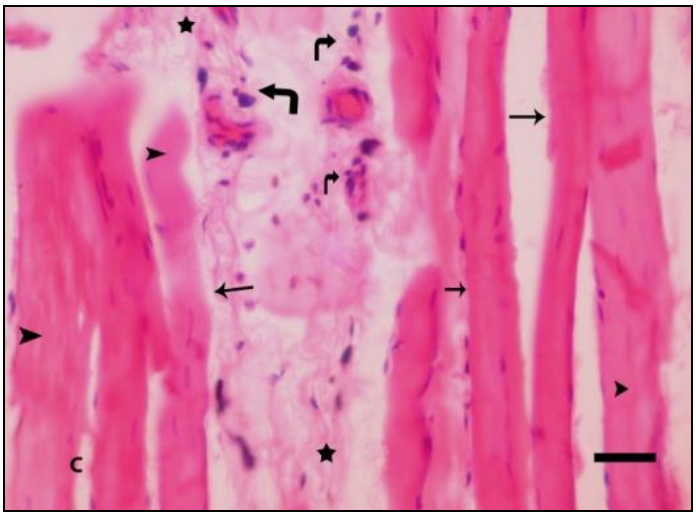
Her üç gruba ait H-E boyanmış kesitlere 40'lık büyütme ile baktığımızda İ/R grubunda (grup 1) inflamatuar hücreler fazla sayıda ve bağ dokusu içerisinde dağılmış halde gözlenmektedir. Çizgili kas enine kesitlerinde ödem varlığı dikkat çekmektedir (Şekil 4.6.A). Carnosol grubuna (grup 2) ait kesitte PMNL hücreleri bağ dokusu içerisinde kas lifleri arasına yayılmış şekilde ve ayrıca bir bölgede yoğunlaşmış olarak izlenmektedirler. Bağ dokusunun bu bölgede artmış olduğu ve çizgili kas enine kesitlerinde de ödem varlığı dikkat çekmektedir (Şekil 4.6.B).Şam grubuna (grup 3) ait kesitlerde boyuna çizgili kas lifleri daha düzenli bir seyir izlemekle birlikte yer yer ödem varlığı gözlenmektedir. PMNL hücreleri diğer gruplara kıyasla daha az sayıda ve daha dağınık yerleşimlidirler (Şekil 4.6.C).



Şekil 4.6.A. İ/R grubuna (grup 1) ait kesit. Bar= 0,5 µm Ok başı: ödemli kas lifi, kıvrımlı ok: ekstravaze eritrosit, kalın ok: epimisyum, kuyruklu ok: çizgili kas enine kesiti, dönen ok: inflamatuar hücreler (PMNL).

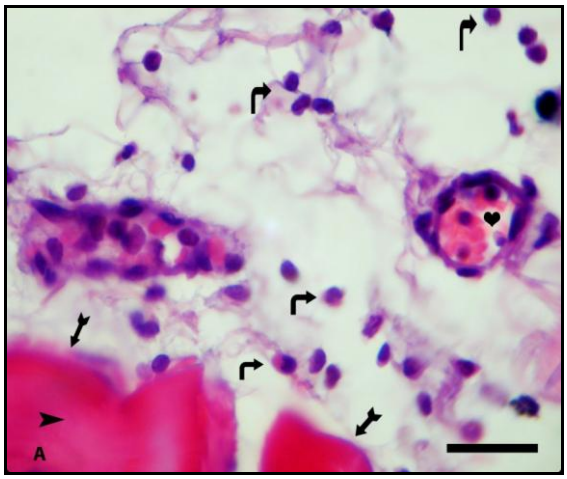


Şekil 4.6.B. Carnosol grubuna (grup 2) ait kesit. Bar= 0,5 µm Ok başı: ödemli kas lifi, yıldız: bağ dokusu, kuyruklu ok: çizgili kas enine kesiti, dönen ok: PMNL.

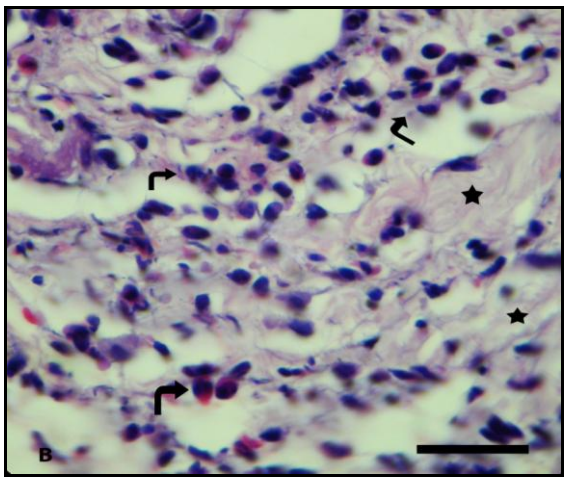


Şekil 4.6.C. Şam grubuna (grup 3) ait kesit. Bar= 0,5 µm Ok başı: ödemli kas lifi, yıldız: bağ dokusu, ince ok: çizgili kas boyuna kesiti, dönen ok: PMNL.

İ/R grubu (grup 1) ve Carnosol grubuna (grup 2) ait H-E ile boyanmış kesitlere. Yüzlük büyütme ile baktığımızda, İ/R grubunda bağ dokusu içerisinde dağınık yerleşimli bulunan PMNL hücreleri izlenmektedir. Damar içinde ve damar dışında çok çekirdekli nötrofiller, eozinofiller ve lenfositler dikkati çekmektedir (Şekil 4.7.A). Carnosol grubunda (grup 2) ise PMNL'ler yoğun ve sıkışık bir yerleşim göstermektedirler (Şekil 4.7.B).



Şekil 4.7.A. İ/R grubuna (grup 1) ait kesit. Bar= 0,25 µm. Şekil 4.6.A'daki alanın bir kısmının X100 büyütmedeki görünümüdür. Ok başı: ödemli kas lifi, kalp: vaskuler staz yapmış eritrositler, kuyruklu ok: çizgili kas enine kesiti, dönen ok: PMNL.



Şekil 4.7.B. Carnosol grubuna (grup 2) ait kesit. Bar= 0,25 µm. Şekil 4.6.B'deki bağ dokusu alanındaki PMNL hücreleri X100 büyütme ile görüntülenmiştir. Yıldız: bağ dokusu, dönen ok: PMNL.

Her dejeneratif bulgu için verilen skorlar ayrı ayrı toplanıp beşe bölünerek (bir hayvanda bakılan toplam kesit sayısı) her hayvan için dejeneratif bulgu skoru belirlendi (Tablo 4.1).

Tablo 4.1. Her üç grubun aldığı histolojik skorlar.

Dejeneratif Histolojik Bulgular	A Grubu (Grup 1) (İ/R grubu)						B Grubu (Grup 2) (Carnosol grubu)						C Grubu (Grup 3) (Şam grubu)					
Ekstravaze Eritrosit	A1	A2	A3	A4	A5	A6	B1	B2	B3	B4	B5	B6	C1	C2	C3	C4	C5	C6
	2,6	0,2	1,4	1,8	2,4	4	2,6	2,2	1,8	2,8	1	1,4	1,8	0,4	3	2,6	2,8	0,8
Enine Çizgilenme Kaybı	A1	A2	A3	A4	A5	A6	B1	B2	B3	B4	B5	B6	C1	C2	C3	C4	C5	C6
	2,6	1,8	1,4	1,4	1,2	2,6	2,2	3,4	0,4	1,4	1	1,8	1	1,4	0,6	1	1,4	0,6
Çekirdeğin Merkeze Göçü	A1	A2	A3	A4	A5	A6	B1	B2	B3	B4	B5	B6	C1	C2	C3	C4	C5	C6
	1,2	0,2	2,6	1,6	2,6	1,4	0,2	0,4	0,6	0,8	0,6	2	1,2	0,2	0,6	1,2	1,2	0,6
Kas Liflerinde Ayrılma	A1	A2	A3	A4	A5	A6	B1	B2	B3	B4	B5	B6	C1	C2	C3	C4	C5	C6
	1,4	1,6	3	2,4	2,4	2	0,4	1,2	2	1,6	2	2,2	1,8	1,4	0,8	2,4	2,4	1,2
Bağ Dokusu Artışı	A1	A2	A3	A4	A5	A6	B1	B2	B3	B4	B5	B6	C1	C2	C3	C4	C5	C6
	2,4	1,4	1,8	3	3	3,2	1,6	2,2	3,8	2,2	2,4	2,8	1,6	1	0,6	3	1,2	1,6
Ödem(interselüler/ interfasiküler)	A1	A2	A3	A4	A5	A6	B1	B2	B3	B4	B5	B6	C1	C2	C3	C4	C5	C6
	3,6	2	3,8	4	3	3,2	3	2,8	2,8	2,4	2,6	2,8	2,8	1,8	1,6	2,8	3	2,4

PMNL sayısı hesaplanırken her bir deneğe ait beş seri kesitte X40 büyütmede, rastgele seçilen beşer alandaki tüm PMNL hücreleri sayılarak beşe bölünmüş ve her bir hayvan için ortalama PMNL sayısı elde edilmiştir. Daha sonra her bir gruba ait tüm hayvanların PMNL hücre sayısı toplanıp altıya bölünerek gruplara ait ortalama PMNL hücre sayısı hesaplanmıştır (Tablo 4.2).

Tablo 4.2. Her bir gruba ait deneklerde PMNL sayısı ve grupların ortalamalarının gösterildiği tablodur.

	A grubu (Grup 1) (İ/R grubu)						B Grubu (Grup 2) (Carnosol grubu)						C Grubu (Grup 3) (Şam grubu)					
PMNL sayısı	A1	A2	A3	A4	A5	A6	B1	B2	B3	B4	B5	B6	C1	C2	C3	CC4	C5	C6
	50	57	62	70	90	90	31	65	155	34	27	28	60	20	15	23	42	9
Ortalama	69,8						56,7						28,1					

Bu bulgular içinde ‘‘bağ dokusu artışı’’ haricindeki diğer tüm histolojik parametrelerde İ/R + Carnosol grubu (grup 2) İ/R grubuna (grup 1) göre sayısal ortalama değer olarak daha az histolojik bulgu skorunu içerse de bu fark istatistiksel olarak anlamlı bulunmadı.

4.2. Biyokimyasal Bulgular

Biyokimyasal incelemede; katalaz, malonildialdehid (MDA), ksantin oksidaz (KO) ve nitrik oksit (NO) aktivitesi araştırıldı. Her bir deneğin bu dört parametre için aldığı değerler Tablo 4.3'de verilmiştir. Daha sonra deneklerin aldığı bu değerlerin ortalamaları grup halinde gösterilmiştir (Tablo 4.4). Gruplar arasında bu dört paremetrede istatistiksel olarak anlamlı olacak şekilde herhangi bir fark bulunmadı.

Tablo 4.3. Her bir deneğin aldığı doku biyokimyasal değerler.

	Katalaz (IU/mg)	MDA (nmol/mg)	KO (mIU/mg)	NO (μM/ml)
A1	25,58	4,54	0,074	71,5
A2	19,90	1,64	0,061	116,5
A3	18,48	1,64	0,054	117,5
A4	15,63	5,25	0,123	47
A5	17,06	1,80	0,102	39,5
A6	25,58	1,49	0,056	73,5
B1	27,01	2,27	0,038	55
B2	17,06	4,54	0,089	49
B3	18,48	1,41	0,089	41,5
B4	18,48	1,64	0,074	41
B5	31,27	2,04	0,092	55
B6	12,79	1,49	0,074	54,5
C1	21,32	1,57	0,084	51,5
C2	17,06	6,26	0,095	37,5
C3	41,22	Ölçülemedi	0,112	46,5
C4	21,32	5,72	0,087	33,5
C5	14,21	7,91	0,089	31
C6	18,48	4,23	0,074	56,5

Tablo 4.4. Grupların aldığı biyokimyasal değerlerin ortalamaları ve standart sapmaları.

	İ/R Grubu (Grup 1) Ortalama-SS	İ/R+Carnosol Grubu (Grup 2) Ortalama-SS	Şam Grubu (Grup 3) Ortalama-SS
Katalaz	20,37 4,28	20,85 6,89	22,27 9,67
MDA	2,73 1,70	2,23 1,18	5,14 2,39
KO	0,078 0,028	0,076 0,020	0,090 0,013
NO	77,58 33,31	49,33 6,66	42,75 10,30

5. TARTIŞMA

İ/R hasarının azaltılmasında kuşkusuz en etkili önlem iskemi süresinin olabildiğince kısa tutulmasıdır. Ancak alınan tüm önlemlere rağmen bu süre yeteri kadar kısalmayabilir tam aksine bazı durumlarda uzayabilir. Bu durumlarda kas flebinin iskemiye olan toleransı arttırılabilir ya da İ/R hasarında rol alan faktörler düzenlenebilir.

İskelet kasında İ/R hasarını azaltmak için birçok klinik çalışma yapılmış fakat hiçbiri tam bir başarı sağlamamıştır. Bu çalışmalarda en sık; farmakolojik ajanlar, hiperbarik oksijen, hipotermi ve hasar öncesi ve sonrası koşullandırma kullanılmıştır (68).

İ/R hasarında oksidatif stresin önemi açığa çıkınca kullanılan farmakolojik ajanlardan antioksidan maddeler giderek araştırmalardaki yerini arttırmıştır.

Carnosol biberiye bitkisinde (Rosmarinus officinalis) bol bulunan fenolik yapıda bir moleküldür. Antioksidan olduğu uzun yıllardır bilinen biberiyenin bu antioksidan özelliğinin %90'ı içeriğinde bulunan Carnosol'e aittir (56). Carnosol'un kuvvetli antioksidan olmasının yanında; antiinflamatuar, antimikrobiyal ve antitümöral özellikleri de mevcuttur (57,58,59).

Carnosol lipid peroksidasyonunu azaltarak güçlü antioksidan özellik gösterir. İyi bir elektron verici özelliği sayesinde hücre zarı stabilizasyonunu sağlar ve radikal oluşumuna engel olarak lipid membranı oksidatif hasardan korur (60).

Aruoma ve arkadaşlarının 1992 yılında in vitro oksidatif stres modellerinde Carnosol'un peroksil radikallerine karşı iyi bir süpürücü olduğunu ve hidroksil radikallerinin oluşumunu engellediğini göstermiştir (61).

Yaptığımız literatür taramalarında Carnosol'ün iskelet kasında İ/R hasarına olan etkisini inceleyen herhangi bir çalışmaya rastlamadık. Plastik cerrahide sık kullanılan kas fleplerinin İ/R modeli olarak sıçanın grasilis kasını kullandık. Çalışmamızda altışar sıçandan oluşan üç gruptan toplamda 18 sıçan kullanıldı. İ/R+Carnosol grubundaki deneklere iskemiden 1 saat önce Sotelo-felix ve arkadaşlarının (69) kullandığı doz olan 5mg/kg Carnosol intraperitoneal olarak verildi. İ/R süresinin sonunda hayvanlar sakrifiye edilerek biyokimyasal ve histolojik inceleme yapılmak üzere kas dokusundan biyopsi alındı.

Sotelo-Felix ve arkadaşları (69) yaptığı çalışmada sıçanlara karbon tetra klorür (CCl_4) verilerek oluşturulan akut karaciğer hasarında Carnosol'ün koruyucu etkilerini araştırmıştır. Carnosol'ün artmış plasma bilirubin ve ALT değerlerini düşürdüğü gösterilmiştir. Carnosol'ün artmış olan MDA seviyelerini anlamlı ölçüde düşürerek lipid peroksidasyonunu inhibe ettiği belirtilmiştir. Yine aynı çalışmada Carnosol' ün histolojik olarak hepatik dejenerasyonu ve inflamatuar hücre infiltrasyonunu azalttığı gösterilmiştir.

Sıçanlarda superior mesenterik arter klemplenerek yaratılan intestinal İ/R'nin, karaciğer ve akciğerde neden olduğu hasara Carnosol'ün etkisinin araştırıldığı çalışmalarda İ/R sonrası karaciğer ve akciğer dokusunda azalan süperoksit dismutaz (SOD) seviyeleri Carnosol' ün kullanıldığı grupta anlamlı ölçüde yükselmiştir. Lökositlerin aktive olmasını sağlayan proinflamatuar faktör olan İL-6 ve lökositlerin migrasyonunda ve adhezyonunda önemli bir molekül olan İCAM-1'de de azalma gösterilmiştir. Nötrofil infiltrasyonunun bir göstergesi olan MPO aktivitesini azaltarak antiinflamatuar etkisi gösterilmiştir. Karaciğer ve akciğerdeki İ/R sonrası oluşan hasarın histolojik olarak da azaldığı gösterilmiştir (70,71).

Histolojik olarak dejeneratif bulguları değerlendirmek için; ekstravaze eritrosit varlığı, enine çizgilenme kaybı, çekirdeğin merkeze göçü, kas liflerinde ayrılma, bağ dokusu artışı, interselüler ve interfasiküler ödem varlığı, inflamatuar hücre sayısı (PMNL) araştırıldı. Bu bulgular içinde tüm parametrelerde şam grubundaki (grup 3) doku hasarının minimal olduğu, inflamatuar hücre (PMNL) sayısının da daha az olduğu görüldü.

İ/R grubu (grup 1) ve Carnosol grubuna (grup 2) baktığımızda ise dokulardaki hasar dikkat çekiciydi. Özellikle ekstravaze eritrosit sayısında artış, ödem ve bağ dokusunda artış, kasın enine çizgilenmesinde ve inflamatuar hücre sayında artış belirgindi. Fakat bu iki grup arasında (grup 1 ve 2) kesitlerde makroskopik olarak bir fark görülmedi.

Yapılan histolojik hasar skorlaması ile dokulardaki hasarı objektif değerlendirmek mümkün oldu. Bu skorlamaya göre şam grubu (grup 3) ekstravaze eritrosit varlığı, enine çizgilenme kaybı, bağ dokusu artışı, ödem, inflamatuar hücre

varlığı paremetrelerinde en düşük ortalama histolojik hasar skoru elde etti. Bu grupta (Şam grubu) İ/R hasarı yaratılmadığından bu bulgular beklenen bulgulardı.

İ/R grubu (grup 1) ve Carnosol grubuna (grup 2) baktığımızda Carnosol grubu ‘‘bağ dokusu artışı’’ dışındaki tüm parametrelerde daha az ortalama histolojik hasar skoru elde etti. Fakat İ/R grubu (grup 1) ile Carnosol grubu (grup 2) arasındaki bu fark istatistiksel olarak anlamlı ($p< 0,05$) bulunmadı.

Elde edilen bulgular Carnosol’ün İ/R hasarını azalttığını düşündürse de bunu objektif olarak ortaya koyamamaktadır. Bunun çeşitli nedenleri olabilir. Bu nedenlerden biri Carnosol’ün tek doz olarak verilmesi olabilir. İ/R’un hemen sonrasında da Carnosol uygulaması daha anlamlı değişikliklere neden olabilir. Ancak etik kurallar gereği hayvan sayısının fazla tutulamaması ve tekrarlayan invaziv girişimlerden kaçınılmak zorunda olunması bu çalışmayı kısıtlayıcı önemli faktörlerden biridir.

Bir diğer neden de çalışılan dokunun kas olmasıdır. Çünkü literatürde kas dokusu ile ilgili yapılmış çalışma yoktur. Bu çalışma bunun ilk örneğidir. Carnosol’ün kas üzerindeki İ/R hasarını önleyici etkisi üzerine temel parametreler yoktur. Daha önceki çalışmalar karaciğer ve akciğer gibi metabolizması hızlı olan dokularda yapılmıştır (70,71). Kas dokusu da metabolizması hızlı bir doku olduğu için bu çalışmada tercih edilmiştir. Her ne kadar bu üç dokunun ortak yönü hızlı metabolizmaları nedeniyle iskemiye duyarlılıkları olsa da sonuçta histolojik yapıları tamamen farklı dokulardır. Carnosol’ün karaciğer ve akciğerde İ/R hasarı sonrası ne gibi histolojik değişiklikler yaptığı bu çalışmalarda ayrıntılı olarak ortaya konmuştur (70,71). Ancak kas dokusu için böyle bir bilgi olmaması öncelikle temel parametrelerin elde edilmesine yönelik çalışma yapılmasını mecbur kılmıştır. Bu sayede temel bilgiye önemli bir katkı sağlanmıştır. Daha ileri bilgiler elektron mikroskobik çalışmalarla desteklenerek sağlanabilir. Ayrıca kas dokusu için çok önemli olan mitokondrial enzimler de değerlendirilerek daha anlamlı sonuçlara ulaşılabilir. Histolojik sonuçların istatistiksel olarak anlamlı çıkmamasında denek sayısının kısıtlı olması da önemli bir faktördür. Daha çok denekle çalışılması duyarlılığı arttırabilir. Ancak etik kısıtlamalar nedeniyle bunun çözümü zordur.

Carnosol’ün kas dokusunda İ/R hasarını önleyememesinin bir nedeni de kas dokusunun kendine özgü metabolizması olabilir. Carnosol için ileri sürülen önleyici

mekanizmalar kas dokusunda kasın özgün metabolizması yüzünden etkili olmayabilir. Çünkü kas dokusu karaciğer ve akciğerden tamamen farklı bir fonksiyona sahiptir. Kas dokusunun herhangi bir metabolizma veya solunum fonksiyonu yoktur. Karaciğer ve akciğerdeki iskemik sorunlar sadece bu organların fonksiyon kaybına bağlı sorunlara neden olurken kas dokusunda durum daha farklıdır. Kas dokusundaki yaygın nekroz hiperpotasemi, myoglobinüri gibi sistemik sorunlara neden olabilmektedir (72). Bu da Carnosol karaciğer ve akciğerde İ/R hasarını azaltır ya da önlerken kas dokusunda aynı etkiyi oluşturmamasının araştırılması gereken nedenlerinden biri olarak yorumlanabilir.

Kas dokusu aktif fonksiyonu olan bir dokudur. Kastaki histolojik ve biyokimyasal değişiklikler Carnosol'ün İ/R hasarı için bir fikir verebilir. Ancak unutulmaması gereken önemli bir nokta kasın işlevi yani kontraksiyon özelliğidir. Histolojik ve biyokimyasal incelemeler kasın fonksiyonel özelliğini değerlendiremez. Bunun için kasın kontraktilitesinin değerlendirilmesi veya yürüme analizi gerekir (73).Deneysel çalışmaların gerçek klinik sorunun bire bir modeli olmaması sadece temel bilgi sağlamasının nedenlerinden biri de budur. Her konuda olduğu gibi Carnosol'ün de kas dokusunda İ/R hasarı üzerine etkisi ancak tam olarak klinik çalışmalarla ortaya konabilir.

Biyokimyasal incelemede; katalaz, malonildialdehid (MDA), ksantin oksidaz (KO) ve nitrik oksit (NO) düzeyleri araştırıldı. Antioksidan bir enzim olan Katalaz İ/R sırasında hidrojen peroksit ile tepkimeye gireceğinden katalaz seviyeleri ortamda azalır. İ/R sırasında oksidatif strese bağlı lipid peroksidasyonu artacağından ortamdaki MDA seviyeleri de artar. Nitrik oksit ve KO seviyeleri de İ/R'da artış gösterir.

Bu çalışmada biyokimyasal değerlerde gruplara ait değerlerin birbirine çok yakın olduğunu saptandı. Gruplar arasında bu dört paremetrede istatistiksel olarak anlamlı ($p< 0,05$) olacak şekilde herhangi bir fark bulunmadı. Çalışmada kullanılan dört parametre; Carnosol'ün İ/R hasarına etkisini araştıran daha önceki çalışmalarda değerlendirilmemiştir. Sıçanlarda İ/R sonrası Yao ve arkadaşları karaciğerde, Tian ve arkadaşları ise akciğerde, katalaz gibi antioksidan bir enzim olan SOD seviyelerine bakılmış ve her iki yayında da İ/R grubunda azalan SOD seviyelerinin İ/R+Carnosol grubunda arttığı gösterilmiştir (70,71). Buradan yola çıkacak olursak bu çalışmada

değerlerden en azından SOD ile benzer etki mekanizması olan katalaz seviyelerinin gruplar arası farklılık göstermesi beklenilebilirdi. Bu farklılığın görülmemesinde bu çalışmada kas dokusunun metabolizması çok daha yüksek olan karaciğer ve akciğere göreceli olarak İ/R hasarına daha dayanıklı olması etkili olabilir.

Sotelo-Felix ve arkadaşlarının yaptığı çalışmada ise sıçanda İ/R hasarı yerine CCl_4 (karbontetraklorür) verilerek karaciğer hasarı oluşturulmuş ve artan MDA düzeylerinin CCl_4+Carnosol grubunda azaldığı gösterilmiştir (69). Çalışma grupları arasında MDA seviyelerinde bir fark görülmemesi iki farklı şekilde açıklanabilir. Birincisi çalışılan dokuların farklı olması (karaciğer yerine kas), ikincisi ise dokularda oluşturulan hasar mekanizmalarının (CCl_4 yerine İ/R) farklı olması.

Çalışmada Carnosol'ün kas dokusu üzerinde İ/R hasarını önleyici bir etkisi bulunamamıştır. Bu temel bilgi klinik bir soruna ışık tutmaktadır. Bu çalışma ile Carnosol'ün karaciğer ve akciğer gibi metabolizması hızlı olan dokulardakine benzer etkisinin kasta olmadığı ortaya kondu. Çalışma ile Carnosol'ün kas dokusundaki İ/R hasarına etkisinin literatürde olmayan temel parametrelerini ortaya konmuştur. Kasın fonksiyonel ve elektron mikroskobik olarak değerlendirilmemesi çalışmanın eksik yönleridir.

6. SONUÇLAR

Carnosol'ün rat grasilis kasında İ/R hasarına etkisinin araştırıldığı çalışmada elde edilen sonuçlar şu şekilde özetlenebilir:

1- İ/R hasarını biyokimyasal olarak değerlendiren parametreler yönünden Carnosol'ün kas dokusunda İ/R hasarını önlemediğini göstermiştir.

2- Carnosol kas dokusunda İ/R hasarını histolojik olarak engellediğini düşündürse de istatiksel olarak anlamlı değildir. Ancak denek sayısının kısıtlı olması göz önünde tutulması gereken önemli bir faktördür. Ayrıca elektron mikroskobik incelemeler ile bu doğrulanmalıdır.

3- Bu çalışmanın en önemli bulgularından biri; Carnosol'ün nötrofil infiltrasyonunu anlamlı olarak azaltmamasıdır. Bu bulgu Carnosol'ün İ/R hasarını önlemesindeki önemli mekanizmalarından biri olan antiinflamatuar özelliğinin kas dokusu için doğru olmadığını düşündürmektedir.

Literatür taramalarında Carnosol ile ilgili yapılan araştırmalar kısıtlıdır. Bu çalışmaların çoğu in-vitro çalışmalar olup pek azı in-vivo çalışmalardır. Bu çalışma bugünkü bilgilerimize göre Carnosol'ün kastaki İ/R hasarı üzerine etkisini değerlendiren ilk çalışmadır. Elde ettiğimiz bulgular Carnosol'ün İ/R hasarı oluşturulmuş rat grasilis kasında herhangi bir koruyucu antioksidan ya da antiinflamatuar etkisi olmadığını gösterse de denek sayısının arttırılması, elektrofizyolojik çalışmalarla desteklenmesi ile daha doğru sonuçlara ulaşılabilir.

Sonuç olarak; Carnosol rat grasilis kasında İ/R hasarını önlemede histolojik ve biyokimyasal değerlendirmelerle etkili değildir. Bu çalışma Carnosolün kas dokusunda İ/R hasarına etkisini değerlendiren ilk çalışma olması nedeniyle temel bilgiye önemli bir katkı sağlamıştır. Yine bu çalışmada Carnosol'ün İ/R hasarını önleyici mekanizmalarından biri olan antiinflamatuar özelliğinin kas dokusu için geçerli olmadığını kesin olarak ortaya konmuştur. Carnosol'ün kas dokusunda İ/R hasarını önlemedeki etkisinin; elektrofizyolojik ve elektron mikroskobik çalışmalar ile desteklenmesi klinik çalışmalara geçmeden daha sağlam bilgiler sağlayacaktır. Her deneysel çalışmada olduğu gibi klinik çalışmalarla anlam kazanacak ve uygulamaya geçirilebilecektir.

ÖZET

Carnosol'ün Rat Grasilis Kasında İskemi Reperfüzyon (İ/R) Hasarına Etkisinin Araştırılması

Amaç: Günümüzde çok popüler olan ve kullanımı giderek yaygınlaşan antioksidanlar serbest radikalleri ortadan kaldırarak İ/R hasarını azaltırlar. Carnosol biberiye bitkisinin (Rosmarinus officinalis) ana bileşenidir ve kuvvetli bir antioksidan etkiye sahiptir. Bu çalışmanın amacı Carnosol'ün rat grasilis kasında iskemi reperfüzyon (İ/R) hasarına etkisinin araştırılmasıdır.

Yöntem: Hayvanlar her grupta 6 hayvan olacak şekilde randomizasyon yöntemi ile 3 gruba ayrıldı. Gruplar İ/R grubu (grup1), İ/R+Carnosol grubu (grup 2) ve şam grubu (grup 3) olarak adlandırıldı. İ/R+Carnosol grubundaki hayvanlara operasyondan 1 saat önce 5 mg/kg dozunda olacak şekilde etanol ile sulandırılmış Carnosol intraperitoneal yolla verildi. İ/R grubundaki hayvanlara da aynı stresi yaşatmak için aynı hacimde etanol enjeksiyonu operasyondan 1 saat önce intraperitoneal olarak uygulandı. Üç gruptaki hayvanın grasilis kası sadece pedikülü olan muskuler dalı besleyecek şekilde diseke edildi. Kontrol ve deney grubunda mikroklemp ile 4 saat iskemi ve sonrasında mikroklempi açarak 3 saat reperfüzyon uygulandı. Şam grubuna bu işlemler yapılmadı. Yedi saat sonra her üç gruptan da biyokimyasal ve histolojik incelemeler için örnekler alınarak hayvanlar yüksek doz etanol ile sakrifiye edildi.

Bulgular: Biyokimyasal incelemede; katalaz, malonildialdehid (MDA), ksantin oksidaz (KO), ve nitrik oksit (NO) aktivitesi araştırıldı. Histolojik incelemelerde ise dejeneratif bulguları değerlendirmek için; ekstravaze eritrosit varlığı, enine çizgilenme kaybı, çekirdeğin merkeze göçü, kas liflerinde ayrılma, bağ dokusu artışı, interselüler ve interfasiküler ödem varlığı, inflamatuar hücre sayısı (PMNL) araştırıldı.

Sonuç: Sıçanlarda grasilis kasında oluşturulmuş İ/R hasarında Carnosol'ün antioksidan ve antiinflamatuar etkisi saptanmamıştır.

Anahtar Sözcükler: İskemi reperfüzyon, Antioksidan, Carnosol

SUMMARY

Study of the Effect of Carnosol on Ischemia Reperfusion (I/R) Injury of the Rat Gracilis Muscle

Aim: Antioxidants recently become very popular and their consumption is getting higher. Antioxidants reduce I/R injury by scavenging the free radicals. Carnosol is a constent constituent of Rosmarinus officinalis and has a powerful antioksidant effect. The aim of this study is to determine the effect of Carnosol on I/R injury of the rat gracilis muscle.

Methods: Rats were divided into 3 groups with 6 animals in each group within randomisation method. The groups are named as; I/R group (group 1), I/R+Carnosol group (group 2) and sham group (group 3). In the I/R+Carnosol group, 5 mg/kg of carnosol that's diluted with ethanol was given intraperitoneally before one hour the operation. To make the same stress on the I/R group, they were given the same volume of ethanol intraperitoneally. The gracilis muscles of three group were dissected until the only muscular pedicle rise up to nourish the muscle flap. In I/R and I/R+Carnosol group 4 hours of ischemia and 3 hours of reperfusion is mediated with a microclamp. This procedure is not applied to the sham group. After seven hours from each group tissue samples were taken for the histological and biochemical analysis and then animals are sacrified by high dose of ethanol inhalation.

Results: In biochemical analysis; catalase, malonyldialdehyde (MDA), xanthine oxidase (XO) and nitric oxide (NO) activities are researched. In histological analysis to determine degenerative signs; extravasation of erythrocytes, loss of striated lines, nuclear centralization, dearrangement of muscle fibers, increment of connective tissue, intercellular and interfasicular edema and polymorphonuclear leucocyte (PMNL) counts are researched.

Conclusion: The antioxidant and antiinflammatory effect of Carnosol is not determined in I/R injury mediated rat gracilis muscle.

Keywords: Ischemia reperfusion, Antioxidant, Carnosol

KAYNAKLAR

1. Mathru M, Dries DJ, Barnes L, Herbert ME, Chaljub G, Goodacre B et al. Tourniquet-inducedexsanguination in patients requiring lower limb surgery. An ischemia-reperfusion model of oxidant and antioxidant metabolism. Anesthesiology 1996; 84: 14-22.
2. Poeckel D, Greiner C, Verhoff M, Rau O, Tausch L, Hörnig C, Steinhilber D, Schubert-Zsilavecz M, Werz O. Carnosic acid and carnosol potently inhibit human 5-lipoxygenase and suppress pro-inflammatory responses of stimulated human polymorphonuclear leukocytes. *Biochem Pharmacol* 2008; 76: 91-97
3. Huang SC, Ho CT, Lin-Shiau SY, Lin JK. Carnosol inhibits the invasion of B16/F10 mouse melanoma cells by suppressing metalloproteinase-9 through down-regulating nuclear factor-kappa B and c-Jun. *Biochem Pharmacol* 2005; 69: 221-232
4. Haris K, Walker P, et al. Metabolic response of skeletal muscle to ischemia. Am J Physiol1986; 250(19):H213-H220
5. İşlekel H, İşlekel S, Güner G: Biochemical mechanism tissue injury of cerebral ischemia and reperfusion. Part 1:Biochemical mechanism. Norol BilD,2000. 17:2
6. Reilly PM, Schiller HJ, Bulkey GB: Pharmacologic approach to tissue injury mediated by free radicals and other reactive oxygen metabolites. Am J Surg. 1991; 161: 488-502.
7. ChafinB,BelmontMJ,QuraishiH, et al. Effect of clamp versus an astomotic-induced ischemia on critical ischemic time and survival of rat epigastric fasciocutaneous flap. Head Neck 1999;21:198–203.
8. Brooks, B. Pathologic changes in muscle as the result of disturbances of circulation. Arch Surg, 1922, 5, 188–216
9. Strock, P. E. and Manjo, G. Microvascular changes in acutely ischemic rat muscle. Surg Gynecol Obstet, 1969, 129, 1213–1224
10. Makitie, J. and Teravainen, H. Histochemical studies of striated muscle after temporary ischemia in the rat. Acta Neuropathol, 1977, 37, 101–109.

11. Giannoudis PV.Current concepts of the inflammatory response after major trauma: anupdate. Injury 2003;34:397–404.
12. Hansch GM, SeitzM, BetzM .Effect of the late complement components C5b-9 on human monocytes: release of prostanoids, oxygen radicals and of a factor in ducing cell proliferation. Int Arch Allergy Appl Immunol 1987;82: 317–20.
13. Hansch GM, SeitzM, Martinotti G, et al. Macrophages release arachidonic acid, prostaglandin E2,and thromboxane in response to late complement components. J Immunol 1984;133:2145–50.
14. Morgan BP. Regulation of the complement membrane attack pathway. Crit Rev Immunol 1999;19:173–98.
15. Toyokuni S. Reactive oxygen species-induced molecular damage and its application in pathology. Pathol Int 1999;49:91–102.
16. Ascer E, Gennaro M, Cupo S, Mohan C .Do cytokines play a role in skeletal muscle ischemia and reperfusion? J Cardiovasc Surg(Torino) 1992;33:588–92.
17. AscerE, MohanC, GennaroM, CupoS. Interleukin-1andthromboxane release after skeletal muscle ischemia and reperfusion. Ann Vasc Surg 1992; 6: 69–73.
18. Seekamp A, WarrenJS, RemickDG, et al. Requirements for tumor necrosis factor-alpha and interleukin-1 in limb ischemia/reperfusion injury and associated lung injury. Am J Pathol 1993; 143: 453–63.
19. YiE S, Ulich TR. Endotoxin, interleukin-1, and tumor necrosis factor cause neutrophil-dependent microvascular leakage in postcapillary venules. Am J Pathol 1992; 140: 659–63.
20. Zhang F,HuE C, Topp S, et al. Proinflammatory cytokines gene expression in skin flaps with arterial and venous ischemia in rats. J Reconstr Microsurg 2006; 22: 641–7.
21. Türegün M, Güdemez E, Newman P, Zins J, Siemionow M: Blockade of platelet endothelial cell adhesion molecule-1 (PECAM-1) protects against ischemia-reperfusion injury in muscle flaps at microcirculatory level. Plast Reconstr Surg 104: 1033-1040, 1999
22. De La Ossa JC, Malago M, Gewertz BL: Neutrophil-endothelial cell binding in neutrophil-mediated tissue injury. J Surg Res 53: 103-107, 1992

23. Mathes SJ, Nahai F: Reconstructive Surgery : Principles, Anatomy and Technique . Volume 11997, 39-46.
24. Okada Y, Copeland BR, Fitridge R, Koziol JA, Zoppo DGJ. Fibrin contributes to microvascular obstructions and parenchymal changes during early focal cerebral ischemia and reperfusion. Stroke 1994; 25: 1847-54.
25. Korthuis RJ, Grisham MB, Granger DN: Leukocyte depletion attenuates vascular injury in postischemic skeletal muscle. Am J Physiol 1998; 254: 823 - 827.
26. Schlag MG, Harris KA, Potter RF: Role of leukocyte accumulation and oxygen radicals in ischemia-reperfusion-induced injury in skeletal muscle. Am J Physiol Heart Circ phsiol. 2001; 280(4): 1716-1721.
27. Franzoni F, Quinones-Galvan A, Regoli F, Ferrannini E, Galeta F. A comparative study of the in vitro antioxidant activity of statins. Int J Cardiol. 2003;90(2 3):317-321.
28. Marnett LJ. Lipit peroxidation-DNA damage by malondialdehyde. Mutat Res. 1999 Mar 8;424(1-2):83-95. Review
29. Filiz Sezen Bircan, Endotoksemi oluşturulan kobayların dalak dokusunda 3-Nitrotirozin oluşmu ve Taurinin antioksidan etkisinin incelenmesi, Yüksek Lisans Tezi Biyoloji Gazi Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Aralık 2007 Ankara.
30. Moncada,S., Palmer, R.M., and Higgs, E.A. (1991) Nitric oxide: phsiology, pathophsiology, and pharmacology. Pharmacol. Rev., 43, 109-142.
31. Lowenstein, C.J., Alley, E.W., Raval,P., Snyder,S.H., Russel,S.W and Murphy,W.J. (1993) Macrophage nitric oxide synthase gene: two upstrea regions mediate induction by interferon gamma and lipopolysaccharide. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 90. 9730-9734
32. Lowenstein, C.J. and Snyder, S.H. (1992) Nitric oxcide, a novel biologic messenger. Cell, 70, 705-707.
33. Liu, R.H. and Hotchkiss, J.H (1995) Potential genotoxicity of chronically elevated nitric oxide: a review. Mutat. Res., 339, 73-89.

34. Wink,D.A., Kasprzak,K.S., Maragos,C.M., Elespuru,R.K., Misra,M., Dunams,T.M., Cebula,T.A., Koch,W.H., Andrews,A.W and Allen,J.S. (1991) DNA deaminating ability and genotoxicity of nitric oxide and its progenitors. Science. 254, 1001-1003.
35. Nguyen,T., Brunson,D., Crespi,C.L., Peninan,B.W., Wishnok,F.S. and Tannenbaum,S.R. (1992) DNA damage and mutation in human cells exposed to nitric oxide in vitro. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 89. 3030-3034.
36. Kilbourn, R.G., Gross, S.S., Jubran,A., Adams,J.,Griftith,O.W., Levi,R. and Lodato,R.F. (1990) NG-methyl-L-arginine inhibits tumor necrosis factor induced hypotension: implications for the involvement of nitric oxide. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 87, 3629-3632.
37. Miller, M.J., Sadowska-Krowicka,H., Chotinaruemol,S., Kakkis,J.L. and Clark,D.A. (1993) Amelioration of chronic ileitis by nitric oxide synthase inhibition. J. Pharmocol. Exp. Ther., 264, 11-16.
38. Nakazawa H, Fukuyama N, Takizawa S, Tsuji C, Yoshitake M, Ishida H: Nitrotyrosine formation and its role in various pathological conditions. Free Rad. Res. 2000, 33: 771-784.
39. Çakatay U, Telci A, Kayalı R, Tekeli F, Akçay T, Sivas A: Relation of aging with oxidative protein damage parameters in rat skeletal muscle. Clin Biochem. 2003; 36: 51-55.
40. Chen HY, Hung YC, Lee EJ, Chen TY, Chuang IC, Wu TS. The protective efficacy of magnolol in hind limb ischemia-reperfusion injury. Phytomedicine. 2009 Jul 3. [Epub head of print] PubMed PMID: 19577912
41. Arnhold J.Properties, functions, and secretion o fhuman myeloperoxidase. Biochemistry (Moscow) 2004; 69: 4–9.
42. Hampton MB ,KettleAJ, WinterbournCC. Inside the neutrophil phagosome: oxidants, myeloperoxidase,and bacterial killing. Blood 1998; 92: 3007–17.
43. Klebanoff SJ. Myeloperoxidase: friend and foe. J Leukoc Biol 2005; 77: 598–625.
44. Cobelens PM, van Putte BP, Kavelaars A, Heijnen CJ, Kesecioglu J. Inflammatory consequences of lung ischemia-reperfusion injury and low-pressure ventilation. *J Surg Res.* 2009;153:295–301.

45. Ernest L, Dallner G.: Bioehemieal, physiologieal and medical aspeets of ubiquinone function. Bioehim Biophys Aeta, 1995; 127.1: 195-204.
46. Kavas GÖ: Serbest radikaller ve organizma üzerine etkileri. Türkiye klinikleri 1989;1: 1-8.
47. Mc Cord JM: Oxygen derived free radicals in postischemic tissue injury. N Engl J Med. 1985; 312: 159-163.
48. Kılınç K. , Kılınç A: Oksijen toksisitesinin aracı molekülleri olarak oksijen radikalleri. Hacettepe Tıp Dergisi, 2002; 33: 110-118.
49. Greenstock C.L: Radiation and aging: Free radical damage, biological response and possible antioxidant intervention. Med. Hypotheses, 1993;41: 473-482.
50. Halliwell B: Free radicals, antioxidants, and human disease: curiosity, cause, or consequence? Lancet, 1994; 344: 721-724.
51. Yalçın AS: Antioksidanlar. Klinik Gelişim, 1998; ll: 342-346.
52. Reiter RJ. Oxidative processes and antioxidant defense mechanisms in the aging brain. FASEB J 1995; 9: 526-533.
53. Allegra M, Reiter RJ, Tan DX, Gentile C, Tesoriere L, Livrea MA. The chemistry of melatonin's interaction with reactive species. J Pineal Res 2003;34: 1-10.
54. Wang WZ, Fang XH, Stephenson LL, Baynosa RC, Khiabani KT, Zamboni WA. Microcirculatory effects of melatonin in rat skeletal muscle after prolonged ischemia. J Pineal Res 2005;39: 57-65.
55. Frei B. Reactive oxygen species and antioxidant vitamins: mechanisms of action. Am J Med 1994; 97: 5-13.
56. Ho.T., Ferraro,T., Chen,Q., Rosen,R.T. and Huang,M.T. (1994) Phytochemicals in teas and rosemary and their cancer preventive properties. In Ho.C.T., Osawa, T., Huang,M.T. and Rosen,R.T., (eds) Food Phytochemicals for Cancer Prevention 2. American Chemical Society Symposium Series.547. American Chemical Society, Washington. DC, pp. 2-19.
57. Wijeratne SS, Cuppett SL. Potential of rosemary (*Rosemarinus offi cinalis* L.) diterpenes in preventing lipid hydroperoxidemediated oxidative stress in Caco-2 cell. J Agric Food Chem 2007; 55: 1193–9.

58. Sotelo-Felix JI, Martinez-Fong D, Muriel De la Torre P. Protective effect of carnosol on CCl(4)-induced acute liver damage in rats. Eur J Gastroenterol Hepatol 2002; 14: 1001–6.
59. Huang SC, Ho CT, Lin-Shiau SY, Lin JK. Carnosol inhibits the invasion of B16/F10 mouse melanoma cells by suppressing metalloproteinase-9 through down-regulating nuclear factor-kappaB and c-Jun. Biochem Pharmacol 2005; 69: 221–32.
60. Fons LP., Garzon MT. and MicoL V. Relationship between the Antioxidant Capacity and Effect of Rosemary (Rosmarinus officinalis L.) Polyphenols on Membrane Phospholipid Order. J. Agric. Food Chem. 2010; 58: 161–171.
61. Sotelo-Felix J.I , Martinez-Fong D., Muriel P., Santillan R.L., Castillo D. and Yahuaca P. Evaluation of the effectiveness of Rosmarinus officinalis (Lamiaceae) in the alleviation of carbon tetrachloride-induced acute hepatotoxicity in the rat. Journal of Ethnopharmacology 2002; 81: 145-/154
62. Lo AH., Liang YC., Lin-Shiau SY., Ho CT., Lin JK. Carnosol, an antioxidant in rosemary, suppresses inducible nitric oxide synthase through down-regulating nuclear factor –KB in mouse macrophages. Carcinogenesis. 2002; 23: 983-991.
63. Poeckel D., Greiner C., Verhoff M., Rau O., Tausch L., Hornig C., Steinhilber D., Schubert-Zsilavecz M., Werz O. Carnosic acid and carnosol potently inhibit human 5-lipoxygenase and suppress pro-inflammatory responses of stimulated human polymorphonuclear leukocytes. Biochemical pharmacology 2008; 76: 91– 97.
64. Aebi H. Catalase. In: Bergmeyer HU (ed) Methods of Enzymatic Analysis. New York: Academic Press 1974;673
65. Dahle LK, Hill EG, Hollman RT (1962) The thiobarbituric acid reaction and the autoxidations of polyunsaturated fatty acid methyl esters. Arc Biochem Biophys 98: 253-261
66. Corrocher R, Carasil M, Bellisola G. Severe impairment of antioxidant system in human hepatoma. Cancer 1986;58:1658–62.

67. Ridnour LA, Sim JE, Hayward MA, Wink DA, Martin SM, Buettner GR, Spitz DR (2000) A spectrophotometric method for the direct detection and quantitation of nitric oxide, nitrite, and nitrate in cell culture media. Anal Biochem 281:223–229.
68. Gillani S., Cao J., Suzuki T., Hak DJ. The effect of ischemia reperfusion injury on skeletal muscle. Injury, Int. J. Care Injure. Accepted 7 March 2011.
69. Sotelo-Felix J., Martinez-Fong D. and Dela Torrec PM. Protective effect of carnosol on CCl_4-induced acute liver damage in rats. European Journal of Gastroenterology & Hepatology 2002; 14: 1001–1006.
70. Yao JH., Zhang XS., Zheng SS., Li YH., WangLM., Wang ZZ., Chu L., Hu XW., Liu KX., Tian XF. Prophylaxis with carnosol attenuates liver injury induced by intestinal ischemia/reperfusion. *World J Gastroenterol* 2009; 26: 3240-3245.
71. Tian XF., Yao JH., Zhang XS., Zheng SS., Guo XH., Wanglm., Wang ZZ. and Lıu KX. Protective Effect of Carnosol on Lung Injury Induced by Intestinal Ischemia/Reperfusion. Surg Today 2010; 40: 858–865.
72. Perry MO, Fantini G. Ischemia -profile of an enemy- reperfusion injury of skeletal-muscle. J Vasc Surg 1987; 6: 231-234.
73. LoMonaco M, Milone M, Valente EM, Padua L, Tonali P. Low-rate nerve stimulation during regional ischemia in the diagnosis of muscle glycogenosis. Muscle Nerve 1996; 19: 1523-1529.