T.C.
ANKARA ÜNİVERSİTESİ
TIP FAKÜLTESİ

İSKEMİ - REPERFÜZYON HASARI İLOPROST VE PROANTOSİYANİDİN İLE ÖNLENEBİLİR Mİ? HAYVAN MODELİNDE BİR ALT EKSTREMİTE İSKEMİ ÇALIŞMASI

Dr. Cihan AYDIN

GENEL CERRAHİ ANABİLİM DALI
TIPTA UZMANLIK TEZİ

DANIŞMAN
Prof. Dr. Hakan UNCU

ANKARA
2012

T.C.
ANKARA ÜNİVERSİTESİ
TIP FAKÜLTESİ

İSKEMİ - REPERFÜZYON HASARI İLOPROST VE PROANTOSİYANİDİN İLE ÖNLENEBİLİR Mİ? HAYVAN MODELİNDE BİR ALT EKSTREMİTE İSKEMİ ÇALIŞMASI

Dr. Cihan AYDIN

GENEL CERRAHİ ANABİLİM DALI
TIPTA UZMANLIK TEZİ

DANIŞMAN
Prof. Dr. Hakan UNCU

ANKARA
2012

KABUL VE ONAY

Ankara Üniversitesi Tıp Fakültesi

Genel Cerrahi Anabilim Dalı

Tıpta Uzmanlık eğitimi çerçevesinde yürütülmüş olan

İSKEMİ - REPERFÜZYON HASARI İLOPROST VE PROANTOSİYANİDİN İLE ÖNLENEBİLİR Mİ?
HAYVAN MODELİNDE BİR
ALT EKSTREMİTE İSKEMİ ÇALIŞMASI

başlıklı,

Dr. Cihan AYDIN 'a ait bu çalışma aşağıdaki jüri tarafından
Tıpta Uzmanlık Tezi olarak kabul edilmiştir.

Tez Savunma Tarihi: 05.10.2012

Prof. Dr. Semih BASKAN
Ankara Üniversitesi Tıp Fakültesi
Genel Cerrahi Anabilim Dalı
Jüri Başkanı

Prof. Dr. Uğur BENGİSUN
Ankara Üniversitesi Tıp Fakültesi
Genel Cerrahi Anabilim Dalı
Üye

Prof. Dr. Hakan UNCU
Ankara Üniversitesi Tıp Fakültesi
Genel Cerrahi Anabilim Dalı
Üye / Tez Danışmanı

TEŞEKKÜR

Her konuda yakın ilgi ve desteğini gördüğüm, bilgi ve deneyimlerinden yararlandığım, tezimin gerçekleşmesinde emeği olan değerli hocam Prof. Dr. Hakan Uncu'ya,

Bilgi ve deneyimlerinden yararlandığımız, kliniğimizi kalkındırmayı ve bizim eğitimimizi en ön planda tutan Ankara Üniversitesi Tıp Fakültesi Genel Cerrahi Anabilim Dalı Başkanı değerli hocamız Prof. Dr.Semih Baskan'a,

Eğitimime katkılarından dolayı Ankara Üniversitesi Tıp Fakültesi Genel Cerrahi Anabilim Dalı'ndaki tüm hocalarıma,

Asistanlık sürem boyunca her konuda yardımlarını gördüğüm ve yetişmemde büyük katkıları olan Doç. Dr. Atıl Çakmak, Doç. Dr. Volkan Genç, Op. Dr. Cihangir Akyol, Op. Dr. Erkinbek Orazakunov ve Op. Dr. Bülent Aksel'e,

Beş yıllık asistanlık süremde birlikte çalışmaktan zevk aldığım tüm asistan arkadaşlarıma,

Uzmanlık tezimin hazırlanmasında emeği geçen Biyokimya Anabilim Dalı'ndan Dr. Oğuzhan Edebal'a, araştırma laboratuarı elemanı Hasan Ferah'a,

Beni bu günlere taşıyan sevgili babam ve anneme, en yakın dostum olan kardeşime ,

En içten teşekkürlerimle.

Dr. Cihan Aydın

İÇİNDEKİLER

ONAY SAYFASI **iii**

TEŞEKKÜR **iv**

İÇİNDEKİLER **v**

SİMGELER VE KISALTMALAR **vii**

TABLOLAR DİZİ **ix**

ŞEKİLLER VE GRAFİKLER DİZİ **x**

1.GİRİŞ **1**

2.GENEL BİLGİLER **5**

2.1.İskemi 5

2.2.Reperfüzyon 8

2.3.İskemi Reperfüzyon Hasarı Mekanizmaları 10

2.3.1.Serbest Oksijen Radikalleri (SOR) ve Etkileri 10

2.3.2.Kompleman, Endotel ve Lokositlerin Rolü 17

2.3.3.Mikrodolaşım(“no reflow” fenomeni) 20

2.3.4.Trombositler 20

2.3.5.Nitrik Oksit 21

2.4.İskemi Reperfüzyon Sonrası Oluşan Vasküler Disfonksiyon 21

2.5.İskemi Reperfüzyon Sonrası Oluşan İskelet Kası Hasarı 24

2.6.İskemi Reperfüzyona Bağlı Oluşan Uzak Organ Hasarı 27

2.7.İskemi Reperfüzyon Hasarını Önlemek İçin Tedavi Stratejileri 29

2.8. Antioksidan - Proantosiyanidin (Üzüm çekirdeği ekstresi) 33

2.8.1. Proantosiyanidinlerin Farmakolojik Özellikleri 34

2.8.2.Proantosiyanidinlerin Antioksidan ve Diğer Özellikleri 45

2.9.İlaç – İloprost 38

2.9.1.İloprostun Farmakolojik Özellikleri 38

2.9.2.Periferik Vasküler Hastalıkta İloprost Kullanımı 43

2.10. D-Dimer 47

3.MATERYAL METOD **49**

3.1. Deneysel Çalışma 49

3.2. İskemi Reperfüzyon Oluşturma Modeli 49

3.3. Çalışma Grupları 50

3.4. Biyokimyasal İşlemler 55

3.5. İstatistiksel Analiz 60

4. BULGULAR **61**

5. TARTIŞMA **68**

6. SONUÇ VE ÖNERİLER **74**

ÖZET **75**

SUMMARY **77**

KAYNAKLAR **79**

SİMGELER VE KISALTMALAR

ATP:	Adenozin trifosfat
AA:	Araşidonik asit
C5a:	Kompleman faktor 5a
GSH:	Glutatyon
GSH-Px :	Glutatyon peroksidaz
GR:	Glutatyon redüktaz
GSPE:	Grape seed proanthocyanidin extract=Üzüm çekirdeği proantosiyanidin ekstresi
HBP:	Heparin binding protein
HIF-1:	Hipoksi ile uyarılabilir faktör-1
IL:	İnterlökin
İAA:	İnfrarenal abdominal aorta
İCAM-1:	İnterselüler adhezyon molekülü -1
İR:	İskemi reperfüzyon
KAT:	Katalaz
LOO-:	Lipid peroksit radikali
LT:	Lökotrien
MDA:	Malondialdehit
MODS:	Multiple organ disfonksiyon sendromu
NO:	Nitrik oksit
NOS:	Nitrik oksit sentaz
NF-κB:	Nükleer faktör-kappa B
$O2^{-}$:	Süperoksit radikali
OH^{-}:	Hidroksil radikali
PAF:	Platelet activeting factor = Trombosit aktive edici faktör
PECAM-1:	Platelet endothelial cell adhesion molecule-1= Trombosit endotel hücre adhezyon molekülü-1
PMNL:	Polimorf nüveli lökositler
PG:	Prostaglandin

ROOH:	Hidroperoksit
ROT:	Reaktif oksijen türevleri
PSGL-1:	P-selektin glikoprotein 1
SIRS:	Sistemik inflamatuar yanıt sendromu
SRT:	Serbest radikal toplama
SOD:	Süperoksit dismutaz
SOR:	Serbest oksijen radikalleri
TNF-α:	Tümör Nekrozis Faktör-alfa
VCAM-1:	Vasküler adhezyon molekülü-1
XO:	Ksantin oksidaz

TABLOLAR DİZİNİ

Tablo 1: Gruplara göre biyokimyasal sonuçların ortalama ve standart sapma değerleri. 61

ŞEKİLLER VE GRAFİKLER DİZİNİ

Şekil 1: İskemik hasarda olayların varsayılan dizisi. (ER; endoplazmik retikulum, CK; Kreatin kinaz, LDH; laktik dehidrogenaz, RNP; ribonükleoprotein. 8

Şekil 2: Lökositlerin damar endoteli ile etkileşim mekanizması. 18

Grafik 1: MDA(kas)'nın gruplar arası değerlerinin grafiksel analizi. 62

Grafik 2: MDA (serum)'ın gruplar arası değerlerinin grafiksel analizi. 63

Grafik 3: GSH-Px (kas)'ın gruplar arası değerlerinin grafiksel analizi. 63

Grafik 4: XO (kas)'ın gruplar arası değerlerinin grafiksel analizi. 64

Grafik 5: CAT (kas)'ın gruplar arası değerlerinin grafiksel analizi. 65

Grafik 6: SOD (kas)'ın gruplar arası değerlerinin grafiksel analizi. 65

Grafik 7: GSH (serum)'ın gruplar arası değerlerinin grafiksel analizi. 66

Grafik 8: CPK (serum)'ın gruplar arası değerlerinin grafiksel analizi. 66

Grafik 9: D-Dimer (plazma)'ın gruplar arası değerlerinin grafiksel analizi. 67

1.GİRİŞ

İskemi, perfüzyon yetersizliğine bağlı olarak, dokuya gerekli olan oksijen ve diğer metabolitlerin dolaşım tarafından karşılanamaması ve meydana gelen artık ürünlerin yine dolaşım ile dokudan uzaklaştırılamaması olarak tanımlanır. Dokuya yetersiz oksijen sunumu ise ‘‘hipoksi’’ olarak tarif edilebilir. Her iki durum da iskemi reperfüzyon hasarının ilk kısmını oluşturur ve metabolizmanın anaerobik yöne doğru kayar (1).

İskemi sonucunda oluşan hasarın şiddeti, hipoperfüzyonun süresi ve miktarı ile orantılı olup, hücrenin tipi, yaralanmaya karşı hassasiyeti, diferansiasyonu, kan ihtiyacı ve metabolizmasına göre farklılık göstermektedir. Dokuların iskemiye olan duyarlılıkları da farklıdırs. Kemik, deri gibi dokular iskemiye dirençliyken, iskelet kası ve barsak mukozası ise hassastır. Bununla birlikte uzun süreli iskemi sonucunda hücrelerde şişme, asidoz, iyon dağılım değişiklikleri (hücre içi kalsiyum/sodyum oranında artış) meydana gelmektedir. Ayrıca, hipoksantin seviyesinde artma, adenozin trifosfat (ATP)/fosfokreatin ve glutatyon düzeylerinde azalma, adenozin sinyal aktivitesinde artma, membran potansiyel değişiklikleri, iskelet bütünlüğü kaybı ve nükleotid fosfohidrolizi gibi hücre metabolizması ve iskelet yapısını ilgilendiren birçok değişime neden olur (2,3). Hücre zarı hasarının şiddeti ve mitokondrial disfonksiyon, reperfüzyon sonrası iskemik doku hasarının geri dönüşümlü veya geri dönüşümsüz olduğunu belirler (4). Sonuç olarak uzun süreli iskemi reperfüzyonla şiddetlenen ciddi hücre hasarına neden olarak hücre ölümüyle sonuçlanır (5,6).

İskemiye bağlı hasarın geri döndürülebilmesinde doku reperfüzyonu mutlak olmakla birlikte paradoksik olarak, reperfüzyon sonrası sağlanan oksijen ve metabolitler doku hasarının artışına neden olur. Hücresel şişme, hücre iskeleti değişiklikleri ve seçici mikrovasküler geçirgenlik kaybı reperfüzyona bağlı hasarın karakteristik özelliklerindendir.

İskemi reperfüzyon (İR) hasarı; serebrovasküler olay, şok, travma gibi birçok hastalık sonrası veya trombolitik tedavi, koroner anjioplasti, transplantasyon, kardiyopulmoner bypass, anevrizma cerrahisi, periferik arter cerrahisi gibi medikal ya da cerrahi girişim sonucunda gelişebilen ortak bir klinik tablodur. İR; artmış

oksidan oluşumu, kompleman aktivasyonu, lökosit-endotel- trombosit adhezyon ve etkileşimi, mikrovasküler geçirgenlik artışı, endotel bağımlı vazodilatasyon disfonksiyonu ve proinflamatuar moleküllerin artışı ile karakterizedir (1,7). İR hasarı sırasında lökosit, endotel, T lenfosit, monosit ve trombosit aktivasyon ve hücreler arası etkileşimleri gerçekleşmekte olup, hasarın genişlemesinde lökosit-endotel ve lökosit trombosit etkileşimleri merkezi rol oynar (8).

Reperfüzyon sonrası iskemik doku lökosit göçü ve lökosit endotel adhezyonu; tümör nekrozis faktör-α (TNF-α), interlökin (IL) - 1β, platelet aktive edici faktör (PAF), kompleman sistem ve serbest oksijen radikalleri (SOR) aracılığıyla gerçekleşir. Aktive olmuş lökositlerin endotele yapışıp intersitisyel alana geçişleri; lökosit yuvarlanma, adhezyon ve diapedez süreçlerini içerir ve düzenli bir şekilde gerçekleşir. Aynı zamanda makrofaj kaynaklı TNF-α ve IL-1'in endotel hücresi ile etkileşimi, bu süreci hızlandırır (6).

Reperfüzyon sonrası iskemik dokuya olan sürekli lökosit göçü, İR'a bağlı doku hasarının devamını ve genişlemesini sağlar. Lökositler, proteolitik enzim ve SOR sentezi, ayrıca kapiller seviyede mikrodolaşım tıkanıklığı ile hasara katkıda blunurlar. Nitrik oksit (NO), prostasiklin, adenozin ve reaktif oksijen türevleri (ROT) trombosit aktivasyonu ve tombosit aracılı hasarı kontrol eder(8,9).

Alt ekstremite İR hasarı sonucunda lokal ve sistemik etkiler gözlenmektedir. İskelet kası ve damar endotelinde lokal etkiler gözlenirken, sistemik etkiler başlıca akciğer, kalp, beyin ve böbrekler olmak üzere tüm organlarda gözlenebilir(10).

İskelet kasının büyük bir kütleye sahip olması ve iskemik hasara hassas bir doku olması nedeniyle alt ekstremite İR'nda önemli rol oynar. Alt ekstremite İR'nda mikrovasküler disfonksiyon ve kas değişiklikleri birbiriyle paralel seyretmekte olup, prognoz kas hasarı miktarına bağlıdır. Reperfüzyonla oluşmuş inflamatuar yanıt, geri dönüşümlü hasar miktarı ile doğru, nekrotik kas miktarı ile ters orantılıdır. Fasyatomi, antitrombotik, antiinflamatuar ve antioksidan tedavi ile geri dönüşümlü zedelenmiş bölgedeki mikrovasküler disfonksiyon hedeflenir (10).

İR'a bağlı mikrovasküler disfonksiyonda; endotel bariyer disfonksiyonu, vasküler tonus değişikliği ve artmış sitokin/adhezyon molekül ifadesi görülür. Özellikle reperfüzyon periyoduyla birlikte; arteriolar vazodilatasyon bozukluğu, inflamatuar ve adhezyon molekülleri artışına bağlı arteriel kılcallarda kapanma ve

lökosit birikimi ile artmış oksidatif hasara bağlı venöz kapillerlerde geçirgenlik artışı ve doku ödemi görülmektedir.

Reperfüzyonla birlikte sistemik dolaşıma yayılan inflamatuar mediatörler, uzak organ endotel hücre aktivasyonu ve mikrovasküler disfonksiyona neden olurlar. İR'a bağlı uzak organ hasarında, ksantin oksidaz, lökosit-endotel etkileşimi ve inflamatuar mediatörler önemli rol oynar. Yaygın uzak organ hasarı durumunda multiple organ disfonksiyon sendromu (MODS) veya sistemik inflamatuar yanıt sendromu (SIRS) gelişebilir (5).

Çalışmamızda alt ekstremite iskemi reperfüzyon hasarında kas dokusunda ve periferik kanda meydana gelen oksidan ve antioksidan parametreleri değerlendirdik. Hücre koruyucu etkileri bilinen iloprost ve antioksidan olan proantisiyanidinin bu parametreler üzerindeki etkisini inceledik.

İloprost, primer olarak endotel hücresi tarafından araşidonik asitten sentezlenen epoprostenol [Prostaglandin I2 (PG I2), prostasiklin]'un sentetik karboksilin analoğudur. İloprostun vazodilatatör, antitrombosit ve hücre koruyucu etkileri mevcuttur. Ayrıca fibrinolitik aktivite ve kırmızı küre elastikiyetinde artış, damar düz kas proliferasyonu, lökosit-endotel adhezyon molekül yüzey ifadesi ve sitokin oluşumunda azalma oluşturarak mikrodolaşım fonksiyonunda koruma sağlar (11).

İloprostun lokal ve uzak organ hasarındaki koruyucu etkinliği klinik ve deneysel olarak gösterilmiş olup, alt ekstremite İR hasarında iskelet kası üzerinde henüz yeterince araştırılmamıştır.

Proantosiyanidinler; kuruyemişler, tohumlar, sebzeler, meyveler ve ağaç kabuğunda doğal olarak bulunan birleşimlerdir. Üzüm çekirdeği, özellikle proantosiyanidinler için hem nicelik ve hem de nitelik açısından zengin bir kaynaktır. Proantosiyanidinler, polifenolik bileşikler olan Flavonoidler'in spesifik bir grubudur. Proantosiyanidinler, serbest radikal toplayıcı ve antioksdandırlar ayrıca vazodilatatör, antikarsinojenik, antiallerjik, antiinflamatuvar, antibakteriyel, kardioprotektiv, antiviral etkileri mevcuttur. Siklooksijenaz, fosfolipaz A2 ile lipooksijenaz inhibisyonu da yaparlar. Proantosiyanidinlerin de İR hasarını azalttığına yönelik çalışmalar mevcuttur (12).

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

2.GENEL BİLGİLER

2.1İskemi

İskemi, perfüzyon yetersizliğine bağlı olarak, dokuya gerekli olan oksijen ve diğer metabolitlerin dolaşım tarafından karşılanamaması ve meydana gelen artık ürünlerin yine dolaşım ile buradan uzaklaştırılamaması olarak tanımlanır. Hipoksi ise dokuya yetersiz oksijen ulaşması şeklinde tarif edilebilir. Hipoksinin en sık görülen nedeni iskemidir(1). Ancak iskemide, hem metabolit yetersizliği hem de atık ürün birikimi nedeniyle, glikoliz metabolizması hipoksiye oranla daha erken sonlanır ve hasar çok daha erken oluşur (3). Oksijen hemostazı insan fizyolojisinde hayati önem taşır. Oksidatif fosforilasyon sırasında ATP sentezi için kullanılan oksijen aynı zamanda hücresel lipid, nükleik asit ve proteinlerdeki oksidatif hasar mekanizmalarında da rol oynar (13).

İskemiye bağlı hasarın şiddeti, hipoperfüzyonun süresi ve miktarı ile orantılı olup, hücrenin tipi, yaralanmaya karşı hassasiyeti, differansiyasyonu, kan ihtiyacı ve metabolizmasına göre farklılık gösterir (3). Sonuç olarak, hücresel enerji depolarındaki azalma ve toksik metabolit birikimi hücre ölümüne yol açar (5,6).

Uzun süreli doku iskemisinde; hücresel şişme, asidoz, hücre içi kalsiyum/sodyum oranında artış, hipoksantin seviyesi artışı, adenozin trifosfat (ATP) / fosfokreatin ve glutation düzeyi azalması, adenozin sinyal aktivitesi artışı, membran potansiyel değişiklikleri, iskelet bütünlüğü kaybı ve nükleotid fosfohidrolizi gibi hücre metabolizması ve iskelet yapısını ilgilendiren birçok değişim meydana gelir (2,3).

Hipoksi, öncelikle mitokondrilerdeki oksidatif fosforilasyonu etkileyerek, ATP ve fosfokreatin depolarında azalmaya neden olur. Sonuç olarak ATP bağımlı hücre zarı pompalarında fonksiyon bozukluğu meydana gelir. Bu da hücresel şişmeyle sonuçlanır. Sonrasında, ribozomların granüllü endoplazmik retikulumdan ayrılması ve polizomlardan monozomların oluşumu ile protein sentezinde azalma oluşur. Hipoksi düzelmez ise mitokondri fonksiyonunda kötüleşme ve membran geçirgenliğinde artışa bağlı hücresel şişme ve fosfolipidden zengin dansiteler ile karakterize morfolojik bozulma görülür.

Doku iskemisi sırasında başka birçok mekanizma daha aktive olur. İltihabi aracıların ve adhezyon moleküllerinin sentezinde artış olur. Adhezyon moleküllerindeki bu artış, iskemik alan lökosit adhezyonunu arttırır. Endotel tarafından sentezlenen NO inaktivasyonu vazokonstriksiyona neden olur. Araşidonik asit kaskadında dengenin prostasiklin aleyhine dönmesi ise hem vazokonstriksiyon hem de trombosit aktivasyonuyla sonuçlanır. Oksijen NO sentezi için de gerekli olup, iskemik dokuda NO seviyesinde azalma görülür. Bunlara ek olarak kompleman sistem aktivasyonu ve PAF sentez artışı gerçekleşir. Dolayısıyla iskemi, dokuyu reperfüzyon hasarına karşı daha hassas bir duruma getirir. Eğer doku perfüzyonu düzelirse tüm bu değişimler geri dönüşümlü olup iskeminin devamı durumunda geri dönüşümsüz hasar ile sonuçlanır (14).

Kritik iskemi zamanı, doku canlılığının sürdürebildiği maksimum iskemi süresi olarak tarif edilir. Hücrenin metabolik aktivitesi ve adaptasyon mekanizmalarına göre kritik iskemi süresi farklılık göstermekle birlikte uzun süreli iskemide geri dönüşümsüz hasar ve nekroz kaçınılmazdır (1,2). Hipoksi sonucunda gelişen mitokondri fonksiyon bozukluğu ve hücre zarı hasarının doku oksijenasyonunun yeniden sağlanmasına rağmen düzeltilememesi geri dönüşümsüz hasarın en önemli göstergesidir (4, 15).

Geri Dönüşümsüz Hasar Mekanizmaları

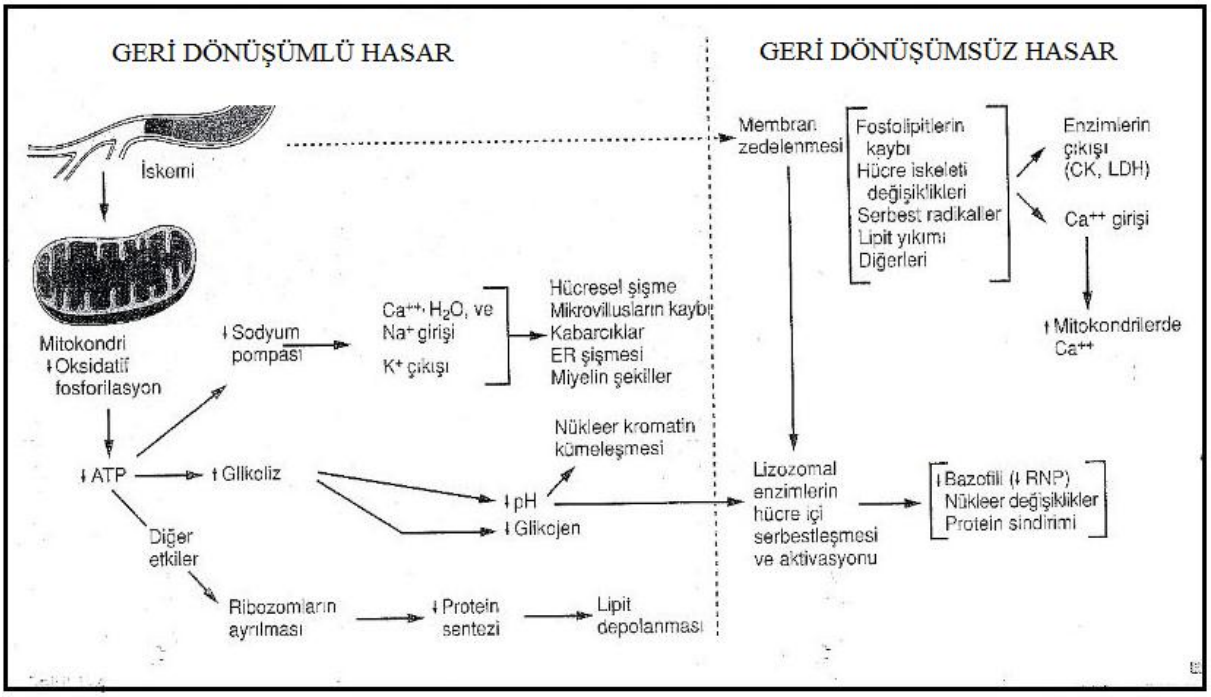
i) Membran fosfolipid kaybı: Hücre zarı membran fosfolipidleri, hem yıkım artışı hem de sentez azalması sonucunda azalır.
ii) Hücre iskelet anormallikleri: Hücre zarının iskeletden ayrılıp yırtılması, artmış hücre içi kalsiyum ile aktifleşen proteazlar ve hücre şişmesi sonucu oluşur.
iii) Toksik oksijen radikalleri
iv) Lipid yıkım ürünleri

Bu hasar mekanizmalarıyla 4 ana sistem olan hücre zarı bütünlüğü, oksidatif fosforilasyon, protein sentezi ve hücrenin genetik yapısı etkilenir.

Geri dönüşümsüz hücre hasarının en önemli unsuru artmış hücre zarı geçirgenliği olup hacim regülasyon bozukluğu, hücre içi ve dışına makromoleküllerin artmış hareketi ve hücre zarı yapısal bozukluğuna neden olur (16). Fosfolipid yıkım ürünleri membran üzerinde deterjan etkisi yaparlar. Bozulmuş oksidatif fosforilasyon ve azalmış hücre içi ATP depolarına bağlı gelişen membran iyon pompa disfonksiyonu hücre içi kalsiyum miktarında ani yükselişe neden olur. Bu yükselişe organellerden salınan kalsiyum da katkıda bulunur. Artmış hücre içi kalsiyum birçok enzimatik sistemde aktivasyon oluşturur (17).

Özet olarak geri dönüşümsüz hasar

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



Şekil 1: İskemik hasarda olayların varsayılan dizisi. (ER; endoplazmik retikulum, CK; Kreatin kinaz, LDH; laktik dehidrogenaz, RNP; ribonükleoprotein.

2.2. Reperfüzyon

İskemik dokuda, hem hücrenin rejenerasyonu, hem de toksik metabolitlerin temizlenmesi için, yeniden kan akımının sağlanması gerekir. Ancak iskemik dokunun reperfüzyonu bir dizi olayın başlaması ile paradoksal olarak doku hasarına yol açar. Birçok çalışmada, İR hasarının iskemik hasara göre çok daha fazla toksik ürün oluşturduğu gözlenmiştir (18). Reperfüzyon sırasında oluşan reaktif oksijen türevlerinin endotel üzerindeki hasarlayıcı etkisi, endotel kaynaklı endotelin sentezinde artış ve NO sentezinde azalma gibi faktörler ciddi endotel disfonksiyonuna neden olur (19). Reperfüzyon döneminde dokuda nötrofil infiltrasyonu, kompleman sisteminin aktivasyonu, kalsiyum aracılı proteazların aktivasyonu, araşidonik asit (AA) metabolizması gibi pek çok sistem, SOR oluşumunu artırarak, hasara neden olmaktadır (20). Şok, yanık, sepsis, pankreatit gibi olgularda ortaya çıkan hipovolemi ile iskemi ve bu durumların düzeltilmesi ile de reperfüzyon hasarı ortaya çıkmaktadır (20, 21). Serebrovaskuler olaylarda, miyokard

enfarktüsünde uygulanan trombolitik tedavi veya revaskülarizasyon ameliyatları da yine reperfüzyon hasarına neden olmaktadır (20). Travmalarda ve travma cerrahilerinde hipovolemi ya da kanama kontrolü nedeniyle yapılan klemp, tampon uygulamaları iskemiye neden olur iken, resusitasyon sonrası mutlak bir reperfüzyon ile yine İR hasarı gündeme gelmektedir (20, 21). Damar cerrahisinde aort ya da periferik arter klemp uygulaması sonrası ortaya çıkan tablo İR hasarı ile karakterizedir. Transplantasyon cerrahisinde kaçınılmaz olarak transplante edilecek organın iskemi ve reperfüzyonu söz konusu olup, oluşan hasar greft fonksiyonlarını etkilemektedir. Özetle neredeyse bütün cerrahi işlemler sırasında dokuların iskemisi ve sıklıkla bunu takip eden bir reperfüzyon periyodu vardır (20).

İskemik dokuların reperfüzyonu, toksik SOR oluşumuna yol açar. Bunlar süperoksit anyonlar (O^{-}), hidroksil radikalleri (OH^{-}), hipoklorik asit (HOCl), hidrojen peroksit (H2O2) ve nitrik oksitten derive peroksinitrittir (21). Oksijen kökenli serbest radikal aracılığı ile oluşan hasarda ilk basamak, ksantin oksidaz kökenli ($O2^{-}$) anyonlarının üretilmesidir (22). İskemi sırasında hücresel ATP, hipoksantin oluşturmak üzere indirgenir. Normal koşullarda hipoksantin, ksantin dehidrogenaz yardımıyla ksantine oksidize edilir. Ancak iskemi sırasında ksantin dehidrogenaz, ksantin oksidaza dönüştürülür. Substrat olarak nikotinamid adenin dinükleotid kullanan ksantin dehidrogenazın tersine, ksantin oksidaz oksijeni kullanır ve bundan dolayı iskemi sırasında hipoksantinin ksantine dönüşümünü katalize edemez ve buda hipoksantinin dokuda aşırı seviyelere çıkmasına yol açar. Reperfüzyonla oksijen tekrar sunulduğunda, fazla miktardaki hipoksantinin ksantin oksidaz ile dönüştürülmesi toksik SOR oluşumu ile sonuçlanır (21). Sellüler ve subsellüler membranların lipid peroksidasyonu da, oksijen kökenli SOR' nin artırdığı hücre hasarında önemli bir mekanizmadır (23). Hücre membranları içerisinde poliansatüre yağ asitlerinin lipid peroksidasyonu, hücresel bütünlük ve fonksiyon kaybı ile sonuçlanabilir. Bu durum tek basına OH^{-} radikalleri ile başlatılabileceği gibi, uygun bir şelatör varlığında $O2^{-}$ ile de başlatılabilir (24).

PMNL ve endotel hücrelerinin aktivasyon ve birbirleriyle olan etkileşimleri reperfüzyon hasarı fizyopatolojisinde önemli rol oynar. Dolaşımdaki PMNL'in, LT-B4, C5a ve sitokinler ile aktive olması sonucu PMNL yüzey adhezyon molekülü ifadesi artar. Lökositler, diapedez öncesi endotel yüzeyi adhezyon molekülleri ile

etkileşime girerek, güçlü endotel-lökosit adhezyonu oluştururlar. Sonrasında, PMNL'den NADPH bağımlı oksidaz sistemleri ile serbest kalan oksijen radikalleri ve proteaz enzimler doku hasarını arttırır. Aktif hale gelmiş nötrofiller, İR hasarının en önemli SOR kaynaklarındandır. Nötrofil hareketleri ve marjinasyonu mikrovasküler endotel tarafından kontrol edilir. Normal fizyolojik şartlarda endotel hücresinin PMNL'ye olan ilgisi düşüktür ancak direkt veya indirekt hasarlayıcı etkiyle, endotelden iltihabi aracı maddelerin salınımı ve endotel yüzeyinde adhezyon molekülü ifadesi artar. Oluşan adhezyon moleküllerinin monoklonal antikorlarla blokajı ile reperfüzyon hasarında azalma sağlanmıştır (25).

Reperfüzyona bağlı hücre hasarının karakteristik özellikleri, hücresel geçirgenlik artışı ve şişme ile hücre iskelet değişiklikleri olup bu durum doku ödemi ve kapiller kan akımı azalmasıyla sonuçlanır (26).

2.3.İskemi Reperfüzyon Hasarı Mekanizmaları

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

2.3.1 Serbest Oksijen Radikalleri ve Etkileri

Serbest radikaller, en dış yörüngesinde tek sayıda elektron içeren, ileri derecede reaktif, kısa ömürlü, ve stabil olmayan moleküllerdir. Moleküler oksijenin indirgenmesi ve eksitasyonu ile çok değişik oksijen serbest radikalleri üretilebilirler (27).

Serbest oksijen radikalleri şu yollarla oluşmaktadır (28).

1- Radyan enerji absorbsiyonu (ultraviyole, X ışını).
2- Hücrenin normal metabolizması sırasında gerçekleşen oksidasyon-redüksiyon reaksiyonları (örneğin: solunum, ksantin oksidaz, fenton reaksiyonu). Özellikle demir ve bakır metabolizması hücre için büyük bir oksidatif hasardır.

3- Dış kaynaklı kimyasal maddelerin ve ilaçların enzimatik metabolizasyonu.
4- Nitrik oksid (NO); endotel, makrofaj ve nöronlarda önemli bir kimyasal mediyatördür ve serbest radikale dönüşebilir.
5- İskemik hasarlı bölgenin reperfüzyonu ve oksijen tedavisi sırasında.
6- İnflamasyonda polimorf lökositler ve makrofajlar yolu ile.

Hücreler serbest oksijen radikallerinin hasarına bağışık değildir. Ancak genellikle glutatyon ve katalaz ile oksijen hasarına karşı korunmuşlardır. İskemik dokularda, serbest oksijen radikali üreten intraselüler mekanizmalar tam aktive edilmiş durumdadır. Ancak oksijen sağlanmasındaki eksiklikten dolayı fonksiyon görmezler. Kan akımı ve oksijen sağlanmasının restorasyonu ile büyük miktarlardaki serbest oksijen radikali üretilerek reperfüzyon hasarı indüklenir (27).

Organizmada serbest oksijen radikalleri ortaya çıktıktan sonra radikal reaksiyon dizileri başlar. Eğer bir serbest radikal, radikal olmayan bir molekülle reaksiyona girerse, binlerce reaksiyondan oluşan reaksiyon zincirlerini başlatır. Serbest oksijen radikalleri paylaşılmamış elektronlarından dolayı lipid, protein, karbonhidrat, nükleik asit gibi çeşitli makromoleküllerin oksidatif hasarına neden olurlar (29). Bu hasarlanma özetle şu mekanizmalarla olur.

a-)Lipid Peroksidasyonu: Serbest radikallerin hücrede başlattığı en önemli ve zararlı etki lipid peroksidasyonudur. Çoklu doymamış yağ asitlerinin serbest radikaller ile oksidasyonu lipid peroksidasyonu olarak tanımlanır.

Lipid peroksidasyonu biyolojik membranlarda akıcılığın kaybına, membran potansiyelinde azalmaya, hidrojen ve diğer iyonlara karşı geçirgenliğin artışı neticesinde hücrenin hasarına ve içeriğinin serbestleşmesine neden olur. Ek olarak lipid peroksidasyonunun ürünlerinden biri olan malondialdehit (MDA) membran bileşenlerinin polimerizasyonuna ve çapraz bağ yapmalarına yol açar. Bu da, hücre yüzeyinin durumunu, enzim aktivitesini, iyon transportunu etkileyebilir MDA, poliansatüre yağ asitlerinin peroksidasyonu sonucu oluşan stabil bir son üründür. İR hasarındaki lipid peroksidasyonun derecesinin belirlenmesinde doku MDA düzeyleri ölçülmektedir. (29, 30).

b-)Protein oksidasyonu: Serbest radikaller ile oluşan protein oksidasyonunun kimyasal sonucu olarak metiyonin sülfokside, histidin oksihistidin ve aspargin, tirozin ditirozin ve sistein disülfitlere dönüşür. Bu değişiklikler proteinlerin bağlanma özelliklerinde ve enzim aktivitelerinde farklılaşmaya neden olarak hücre fonksiyonlarında bozulmalara yol açabilir (29, 30).

c-) DNA hasarı: Serbest oksijen radikalleri adenin ve piridin nükleotid durumlarının sürdürülebilmesi için gerekli yollara engel olabilirler. Serbest oksijen radikalleri DNA ile tepkimeye girerek mutajenik olan 8-Hidroksiguanin'in ortaya çıkmasına neden olurlar (31).

d-) Kovalen bağlanma: Serbest radikaller polisiklik hidrokarbonlar, aromatik aminler ve nitrozaminler gibi ksenobiyotiklerin çeşitli biyomoleküllere kovalen bağlanmasına neden olabilir. Bu da doğrudan hücre hasarına yol açabilir (31).

e-) Kalsiyum salınımı: Hücre yaralanması ile ilgili olduğu düşünülen bir elementtir. Kalsiyumun transportunu engelleyen herhangi bir durum hücre fonksiyonlarını olumsuz etkiler. Kalsiyum ATPaz enzimleri önemli sülfidril gruplarına sahiptir ve serbest oksijen radikalleri (SOR) tarafından inaktive edilebilir. Sitokinler, hipoksi, endotoksin gibi faktörler SOR aracılı yol kullanarak, hücre enerjisini azaltabilirler (32).

Özetle SOR hasarı, İR hasarı temel mekanizması olup, hemen hemen tüm hasar mekanizmalarında etkin rol oynamaktadır.

i- Sarkoplazmik retikulum kalsiyum ATP'az sistemini ve hücre zarı sodyumpotasyum ATP'az sistemini inhibe ederek hücre kalsiyum yükünü arttırır.

ii- Hücre zarı fosfolipid yapısında peroksidasyon oluşturarak hücre zarı bütünlüğünün bozulması ve hücrenin şişmesine neden olur.

iii- Lökositler için kemotaktik olup lökosit birikimi ve aktivasyonunu sağlar.

iv- "No reflow" fenomeninde aracı olarak görev yapar.

v- NO ile reaksiyon sonucu oluşan peroksinitrit aracılığıyla doku hasarını arttırır.

vi- Protein ve enzimlerde, yapısal bozulmaya ve parçalanmaya neden olur.

vii- Genetik yapıda hasarlanma oluşturur.

Serbest radikallerin zararlı etkilerine karşı organizmada koruyucu mekanizmalar vardır. Bu mekanizmaların bir kısmı serbest radikal oluşumunu, bir kısmı ise oluşmuş serbest radikallerin zararlı etkilerini önlemektedir. Bu işlevi yapan maddelerin tümüne birden genel olarak ‘‘**antioksidanlar**’’ denir.

Etkilerini lokal oksijen konsantrasyonunu azaltarak, hidroksil radikallerini temizleyip lipid peroksidasyonunun başlamasını önleyerek, geçiş metal iyonlarını bağlayıp etkisizleştirerek, peroksitlerin alkol gibi nonradikal ürünlere dönüşümünde etkin rol oynayarak ve zincir reaksiyonlarına neden olan tüm radikallerle reaksiyona girip zinciri kırarak gösteren antioksidanlar intraselüler ve ekstraselüler olmak üzere iki grupta incelenir. En belirgin özellikleri okside olan substratlara oranla çok daha az konsantrasyonlarda bile, substratın oksidasyonunu geciktirmeleri ve inhibe etmeleridir.

Oksidan moleküller belirli düzeyde kaldıkları sürece, organizmanın yabancı maddelere ve enfeksiyon ajanlarına karşı önemli savunma molekülleridir. Ancak belirli düzeyin üzerinde oluştuklarında veya antioksidan sistemin yetersizliğinde serbest radikal molekülleri, organizmanın yapı elemanları olan protein, lipid, karbonhidrat, nükleik asitler ve enzimleri bozarak zararlı etkilere yol açarlar (33).

Yukarıda bahsedildiği gibi İR hasarı oluşumunda serbest oksijen radikalleri önemli bir yer tutmaktadır. İskemik dokuların reperfüzyonu toksik/reaktif oksijen türleri oluşumuna yol açar. Bunlar süperoksit anyonlar, hidroksil radikalleri, hipoklorik asit, hidrojen peroksit ve nitrik oksitten derive peroksinitrittir (21). Serbest radikal temizleyicileri, reaktif oksijen parçaları ile reaksiyona girerek, bunları zararsız maddeler haline dönüştüren antioksidan ajanlardır. Antioksidanlar, endojen kaynaklı veya eksojen kaynaklı olabilirler.

Eksojen Antioksidanlar

Eksojen antioksidanlar, vitaminler, ilaçlar ve gıda antioksidanları olmak üzere sınıflandırılabilirler.

A-Vitamin olan eksojen antioksidanlar

1) α-tokoferol (vitamin E),
2) β-karoten (vitamin A),
3) Askorbik asit (vitamin C),
4) Folik asit (folat).

B-İlaç olarak kullanılan eksojen antioksidanlar

1) Ksantin oksidaz inhibitörleri (allopürinol, oksipürinol, pterin aldehit, tungsten),
2) NADPH oksidaz inhibitörleri (adenozin, lokal anestezikler, kalsiyum kanal blokerleri, nonsteroid antiinflamatuvar ilaçlar, diphenyline iodonium),
3) Rekombinant süperoksit dismutaz,
4) Trolox-C (vitamin E analoğu),
5) Endojen antioksidan aktiviteyi artıranlar (GSH-Px aktivitesini artıran ebselen ve asetilsistein),
6) Nonenzimatik serbest radikal toplayıcılar (mannitol, albümin),
7) Demir redoks döngüsü inhibitörleri (desferroksamin),
8) Nötrofil adhezyon inhibitörleri,
9) Sitokinler (TNF ve IL-1),
10) Barbitüratlar,
11) Demir şelatörleri.

C-Gıdalardaki eksojen antioksidanlar

1) Butylated hydroxytoluene (BHT),
2) Butylated hydroxyanisole (BHA),

3) Sodium benzoate,
4) Ethoxyquin,
5) Propylgalate,
6) Fe-superoxyde dismutase.

Endojen Antioksidanlar

Endojen antioksidanlar, enzim ve enzim olmayanlar olmak üzere iki sınıfa ayrılırlar.

A-Enzim olan endojen antioksidanlar

1) Süperoksit dismutaz (SOD),
2) Glutatyon peroksidaz (GSH-Px),
3) Glutatyon S-Transferazlar (GST),
4) Katalaz (CAT),
5) Mitokondriyal sitokrom oksidaz sistemi,
6) Hidroperoksidaz.

B-Enzim olmayan endojen antioksidanlar

1) Melatonin,
2) Seruloplazmin,
3) Transferin,
4) Miyoglobin,
5) Hemoglobin,
6) Ferritin,
7) Bilirubin,
8) Glutatyon,
9) Sistein,
10) Metiyonin,
11) Ürat,
12) Laktoferrin,
13) Albümin.

Süperoksit Dismutaz (SOD)

SOD, bir metalloenzimdir. Oksijeni metabolize eden bütün hücrelerde bulunur. SOD, süperoksidin hidrojen perokside dönüşümü reaksiyonunu katalizler.

$$O_2^- + O_2^- + 2H_2 \xrightarrow[SOD]{} H_2O_2 + O^2$$

Oksijen radikalleriyle oluşan hasara karşı SOD; katalaz ve glutatyon enzim sistemiyle birlikte çalışan bir savunma mekanizmasıdır. Böylece oluşan hidrojen peroksit, katalaz veya glutatyon peroksidaz enzimleri tarafından su ve oksijene indirgenmektedir. SOD'ın görevinin aerobik organizmaları, süperoksidin zararlı etkilerine karşı korumak olduğu sanılmaktadır (34).

Glutatyon Peroksidaz (GSH-Px)

Eritrositlerde ve diğer dokularda, prostetik grup olarak selenyum içeren glutatyon peroksidaz enzimi, indirgenmiş glutatyon tarafından hidrojen peroksit ve lipid peroksitlerinin parçalanmasını katalize eder; böylece membran lipitlerini ve hemoglobini, peroksitlerin oksidasyonuna karsı korur. Spesifik hidrojen verici olarak glutatyonu kullanır. Peroksit radikallerine afinitesi katalazdan daha fazladır (34).

$$2GSH + H_2O_2 \longrightarrow GSSG + 2H_2O$$

Katalaz (CAT)

Katalaz, dört hem proteini içeren bir hemoproteindir. Kan, kemik iliği, karaciğer, böbrek ve müköz membranlarda bol miktarda bulunmaktadır. Katalaz, iki hidrojen peroksit molekülünden birini elektron vericisi, diğerini de elektron alıcısı olarak kullanarak su ve oksijen meydana getirir (34).

$$2\ H_2O_2 \longrightarrow 2H_2O + O_2$$

2.3.2.Kompleman, Endotel ve Lokositlerin Rolü

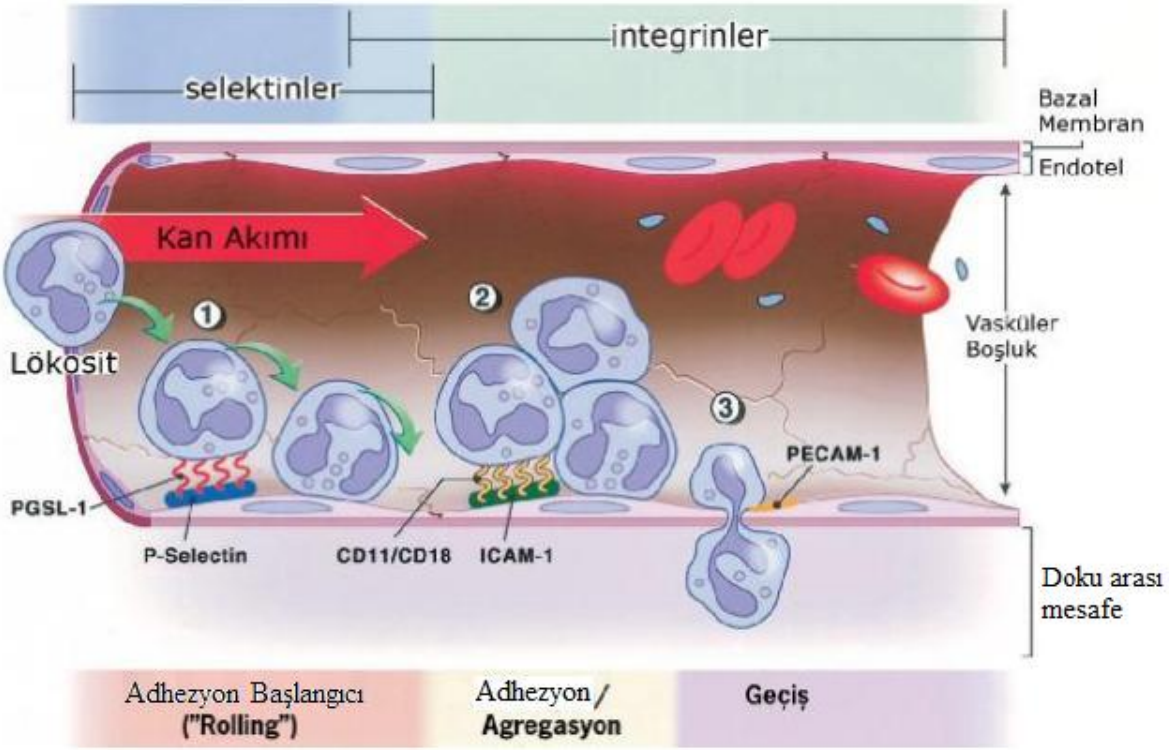
İR'a bağlı kompleman aktivasyonu, damarsal hemostazı etkileyen inflamatuar aracı maddelerin oluşumuyla sonuçlanır. Bu aracı maddelerden en önemlileri; Kompleman 3a ve Kompleman 5a gibi anafilotoksinler ile inaktif Kompleman3b ve Kompleman 5b-9 gibi kompleman sistem unsurlarıdır (2). Kompleman 5a; Kompleman 3a'ya oranla 20 kat daha güçlü olup, hem lökosit aktivasyon ve kemotaksisini hem de IL-1, IL-6 ve TNFα gibi inflamatuar aracıların sentezini arttırır. Kompleman 5b-9 ve inaktif Kompleman 3b, endotel fonksiyon değişikliklerine neden olurlar. İR'a bağlı kompleman sistem aktivasyonu, vasküler hemostaz değişiklikleri ve lökosit-endotel adhezyon eğilimi oluşturarak, doku iskemisini derinleştirir (35).

Sitokinler, doğal ve spesifik immunütenin bir protein mediyatör grubudur. Genelde sitokinler bir inflamatuvar veya antijenik etkileşime yanıt olarak sentezlenir. Sitokinler lenfositlerin olgunlaşıp diferansiye olmalarını sağlarlar. Dokuya zarar verebilirler, hatta dokunun ölüme kadar götürebilirler. Travma veya inflamasyonlu bölgede makrofaj ve monositlerden salınan bir sitokin olan IL-1 isimli polipeptid cerrahiden sonra gelişen birçok değişiklikten sorumlu bulunmuştur. Bu maddenin başta immün yanıt ve doku tamiri üzerinde etkili olduğu düşünülmektedir. IL-1 ve Tümör Nekrozis Faktör-alfa (TNF-α), akut ve kronik inflamasyonun birçok lokal ve sistemik özelliklerinin oluşumunda rol oynamaktadır. Düşük dozlarda lokal inflamasyonun mediatörleri iken, yüksek miktarlarda salgılandıklarında dolaşıma geçerek endokrin etkiler oluştururlar. İR, kompleman sistemini aktive eder. Kompleman sisteminin aktivasyonuyla da sitokin salınımının düzenlendiği düşünülmekle birlikte bu konu halen tam olarak açıklığa kavuşmamıştır. Kompleman aktivasyonu sonucu oluşan, proinflamatuar komponentler bir yandan lokositleri aktive ederken, diğer yandan TNF-α, IL-1 ve IL-6 oluşumunu uyararak inflamatuar cevabı güçlendirir (36).

İyon ve organik moleküllere geçirgenlikte bariyer oluşturması, prostoglandinlerin dolaşımdan kısmen uzaklaştırılması ve koagülasyondaki rolü, endotel hücresinin bilinen klasik görevlerindendir. Endotel hücresinin yukarda sayılan işlevlerine ek olarak, vazomotor etkinlikleri düzenlemesi ve hasara cevap

olarak salgıladığı mediyatörler nedeniyle giderek daha fazla ilgi çekmeye başlamıştır. Endotel hücrelerin oksidatif stresi sonucu kompleman aktive edilir, lökosit adhezyon moleküllerinin üretimi artar. ROT etkisi ile endotelden salınan trombosit aktive edici faktör lökositleri aktive eder. Lökosit endotel hücre etkileşimi sonucu lökositler endotele yapışır ve göç gerçekleşir (37).

Lökositlerin damar endoteli ile etkileşim mekanizması Şekil 2'de sunulmuştur (38).



Şekil 2: Lökositlerin damar endoteli ile etkileşim mekanizması.

İR lökosit aktivasyonu, kemotaksis ve lökosit endotel hücre adhezyonuna yol açar. Polimorf nüveli lökositler (PMNL) de, endotel hücreleri gibi ROR üretme kapasitesine sahiptir. İR hasarında PMNL'in rolü ile ilgili bazı mekanizmalar ileri sürülmüştür. Bu mekanizmalar şöyle sıralanmaktadır.

1. Mikrovasküler oklüzyon,
2. SOR salınması,

3. Sitotoksik enzim salınması,
4. Vasküler permeablite artışı,
5. Sitokin salınımında artış.

Polimorf nüveli lökositlerin başlangıçtaki biokimyasal reaksiyonları endotel hücreleri ve ksantin oksidaz aracılığı ile olur. Aktivasyon ve migrasyonları ise endotel hücrelerde ve lökositlerde bulunan adhezyon molekülleri aracılığı ile olur. Lökosit adhezyon molekülleri, lökositlerde ve diğer başka hücrelerde de bulunan ve gelişme, haberleşme, inflamasyon ve apoptozis (programlı hücre ölümü) gibi pek çok biyolojik olaylarda rol alan yapılardır. Selektin grubu adhezyon molekülleri, doku hasarı olan bölgede aktive olmuş endotele, PMNL'lerin başlangıçtaki adhezyonunda rol alırlar. L, P ve E selektin olmak üzere bilinen üç üyesi vardır. İR, endotelde P-selektin ekspresyonunu arttırır. Bu molekül, PMNL'lerde bulunan P-selektin glikoprotein 1(PSGL-1) adlı reseptörü ile etkileşerek düşük afiniteli lökosit endotel bağlantısını oluşturur. İkinci aşamada lökosit Beta-2 integrinler ile endotelyal ICAM-1 arasında etkileşim ile lökosit adhezyon ve agregasyonu gelişir. Üçüncü aşamada trombosit endotelyal hücre adhezyon molekülü-l ile endotel hücre bağlantıları arasındaki etkileşim ile lökosit transmigrasyonu gelişir. Aktive lökositler ekstravasküler kompartmana ulaşınca hasar bölgesine doğru göç etmeye başlarlar. Burada aktive lökosit cevabı şu mekanizmalarca gerçekleştirilir.

1. Fosfolipaz A2 aktivasyonu sonucu araşidonik asit metabolitleri (prostoglandinler ve lökotrienler) üretilir,
2. Degranülasyon sonucu lizozomal enzimler salınır,
3. ROR üretimi gerçekleşir (37, 39).

Bu ürünler endotel hasarı ve doku hasarının güçlü mediyatörleridir ve başlangıçtaki inflamatuar uyaranın etkisini güçlendirir. Bazı durumlarda lizozomal enzimler hücre dışına salınabilir. Hasar yapıcı etkeni ortadan kaldırmaya veya dilue etmeye yönelik bu inflamatuar cevap sonucu mikrovasküler permiablite artışı, ödem, tromboz ve parankim hücre ölümü de gerçekleşir. Görevini tamamlayan lökositler

apoptotik hücre ölümüne uğrarlar ve lenfatik dolaşım ile ortamdan uzaklaştırılırlar (37, 39).

2.3.3.Mikrodolaşım(“no reflow” fenomeni)

Mikrodolaşım, en uç kan dolaşımı sistemidir. Arteriol, venül, arteryel ve venöz kılcalların boyutu 7-100 μm arasında değişir. İskemi sonrası reperfüzyon sağlandığında lökosit aktivasyonu ve iltihabi cevap gelişir. Aktive olmuş lökositler mikrodolaşımda birikerek kollaps ve tıkanıklığa neden olurlar. Dolayısıyla lökosit ile trombosit ve lökosit ile endotel arasındaki hücre etkileşimleri ana mekanizma olup, interstisyel sıvı birikimi ve azalmış endotel bağımlı vazodilatasyon bu duruma katkıda bulunur. Bu durum ilk kez 1967 yılında Majno tarafından **“no reflow”** fenomeni olarak tanımlanmıştır (40).

Lökosit-endotel adhezyonu, endotelde şişme ve daha fazla lökosit adhezyonuyla sonuçlanır. Lökosit-trombosit adhezyonu ise trombositlerin subendotel alanda birikerek, endotel ayrılmasına neden olur. Bu yapışmış trombositler, selektin ve integrinler yoluyla, daha fazla lökositin trombositlere yapışmasını sağlarlar (41). Nötropeni ve trombositopeni modellerinde “no reflow” oluşumunun azaldığı gözlenmiştir (42). Sonuç olarak endotel lökosit- trombosit etkileşimleriyle, fibrin birikimini takiben, trombüs oluşumu gözlenir.

2.3.4. Trombositler

Trombositler, trombotik etkileri dışında kemotaktik fonksiyonlarıyla da inflamatuar cevapta kritik rol oynarlar. Adhezyon sonrası aktive olmuş trombositler, hem salgıladıkları kemotaktik faktörlerle direkt olarak etki ederler hem de bağlandıkları hücrelerin (endotel / lökosit) kemotaktik özelliklerini değiştirerek etki ederler (43).

Hücre zarı fosfolipidlerinin peroksidasyonu sonucu; hücre zarı bütünlüğü, geçirgenliği ve hücre yüzey reseptör fonksiyonları etkilenir. Reperfüzyon periyoduyla birlikte şiddetli trombosit aktivasyonu oluşur. Artmış bu aktivite, reperfüzyon döneminde artmış trombojenite ve yeniden tıkanıklık risklerinide

beraberinde getirir. Trombosit aktivasyonun primer etkeni tam olarak bilinmemekle birlikte, reperfüzyonla birlikte oluşan SOR patlaması suçlanmaktadır (44).

2.3.5. Nitrik Oksit

Bir serbest radikal olan NO, L-arginine guanidinium grubundan olan nitrik oksit sentaz (NOS) aktivitesiyle endotel mitokondrisinde sentezlenir. NO'in doku koruyucu özellikleri; vasküler tonus kontrolü, trombosit agregasyonunun engellenmesi, lökosit ile endotel etkileşiminin azaltılması, dolaşımdan serbest radikallerin temizlenmesi, seçici damarsal geçirgenliğin düzenlenmesi, düz kas hücre proliferasyonunun engellenmesi, bağışıklık sisteminin aktivasyonu ve endotel hücre rejenerasyonunun uyarılmasıdır. Aynı zamanda iskemik dokularda SOD aktivitesini etkileyerek hidrojen peroksit birikimini azaltır (45).

İR hasarına bağlı gelişen endotel hücre disfonksiyonunda, NO sentezinde azalma oluşarak İR hasarı derinleşir. Endotel disfonksiyonuna bağlı NO azalma mekanizması hala tam olarak gösterilememiştir (6). Doku reperfüzyonuyla birlikte; SOR oluşumunda patlama, NO seviyesinde azalma gerçekleşir. Böylelikle, süperoksit ve NO arasındaki denge superoksit lehine kayar. Bu denge kaybı; NO bağımlı vazodilatasyonda azalma ve nötrofil-endotel adhezyonu ile trombosit agregesyonunda artışa ikincil "no reflow" fenomenine eğilim oluşturur. Sonuç olarak NO azalması endotel disfonksiyonu ve nötrofil aracılı doku hasarıyla birliktelik gösterir (6).

2.4.İskemi Reperfüzyon Sonrası Oluşan Vasküler Disfonksiyon

Endotel hücreleri, damarsal hemostazın sağlanmasında hayati ve dinamik bir görev üstlenir. Bu hücreler hem iskemi hem de reperfüzyona çok hassastırlar. Uzun süreli hipoksi; hücre zarı potansiyel değişiklikleri, iyon dağılımı bozuklukları ve akışkanlıkta azalma ile hücre içi hacim artışı ve hücre iskeleti organizasyon bozuklukları oluşturur (5). Hipoksi, endotel hücresi bazı genlerinde aktivasyon, bazılarında ise baskılanmaya neden olur. Doku reperfüzyonu ile birlikte, iskemik

endotel değişiklikleri belirginleşerek, İR alanına lokalize endotel disfonksiyonu gelişir (46).

Uzun süren iskemi ve sonrasındaki reperfüzyonu takiben oluşan morfolojik değişimler; hücresel şişme, membran depolarizasyonu, pinositotik vezikül kaybı, endotel hücre bazal membran ayrılması ve aktive olmuş lökositlerin endotel hücre yüzeyine yapışmalarıdır (47). Hücresel şişme, etkenden bağımsız tüm hücresel hasar modellerinin ortak patolojik görüntüsü olup, İR sonrası tüm endotel hücrelerinde gelişir. Fizyopatolojisinde; oksidatif hücre zarı hasarı, iyon hemostaz bozukluğu ve osmotik stres suçlanmaktadır. İR hasarına bağlı gözlenen bir diğer öncelikli değişiklik hücre zarı depolarizasyonu olup, etiyolojisinde ATP bağımlı sodyum-potasyum kanal inaktivasyonu sorumlu tutulmaktadır (48). Dolayısıyla, hücre zarı ve iskeleti değişikliklerinde ROT'un ATP yetersizliğine göre daha etkin rol oynadığı düşünülmektedir (7). ROT ile oluşan İR hasarı; etkilenen dokuya, antioksidan mekanizmaların etkinliğine ve İR'un süre-şiddetine göre farklılık gösterir.

a)İR'un arteriol üzerine etkisi

İR hasarının arteriollerdeki primer göstergesi endotel bağımlı vazodilatasyonda bozulma ve hiperreaktivitedir. Endotel bağımlı vazodilatasyon NO aracılığıyla oluşur. İR hasarında NO sentezinde azalma meydana gelir. İR erken döneminde, direkt düz kas üzerinden etki eden endotelden bağımsız vazodilatasyon sistemleri etkilenmez. Endotel bağımlı vazodilatasyon azalmasının en çok reperfüzyon döneminde gerçekleşmesi, ROT'un önemli bir faktör olduğunu gösterir. Dolayısıyla antioksidan tedavi, arteriol vazodilatasyon cevabın korunmasında önemli rol oynar. Lökositler, arteriol fonksiyon bozukluğunda, venöz kapiller hasarında olduğu kadar önemli rol oynamazlar. Ancak süreğen lökosit aktivasyon ve birikimi, ROT oluşumuna katkıda bulunarak, arteriol hasarı artışına neden olur. İR'a olan arteriol cevabı aynı zamanda dokudan dokuya da değişiklik gösterir, örneğin; sinir sistemi çok hassas iken böbrek dokusu arteriolleri oldukça dirençlidir (7).

b)İR'un arteryel kılcallar üzerine etkisi

Arteryel kılcal endotelinde İR hasarının klinik yansıması; interstisyel dokuya artmış sıvı filtrasyonu ve doku perfüzyonunu sağlayan kılcal damar sayısında azalma şeklinde olur (7).

Doku reperfüzyonu sonrası, tıkanmaya bağlı, arteryel kılcallardaki azalma, doku perfüzyonunu daha da bozarak İR hasarı artışına neden olur. Bu arteryel kılcal tıkanıklıklar; karaciğer İR hasarında olduğu gibi, lökosit-endotel etkileşimi sonrası gelişen hücresel şişme, iskelet değişiklikleri, bazal membran ayrılması ve lökosit rijiditesi ile karakterize intraluminal konjesyon sonucu oluşur. Diğer dokulardaki arteryel kılcal tıkanıklıklarından ise; venöz kılcallardaki geçirgenlik artışına ikincil gelişmiş interstisyel ödem ve hidrostatik basınç artışı ile oluşmuş arteryel kılcal mekanik basısı (intersitisyel ödem ve vasküler kompresyon) sorumludur. Her iki mikrovasküler disfonksiyon mekanizması lökosit-endotel adhezyonu temelinde gerçekleşir. Aynı zamanda lökosit kaynaklı ROT da bu disfonksiyona katkıda bulunur. Dolayısıyla lökosit-endotel adhezyonunun engellenmesi ve antioksidan tedaviyle mikrovasküler disfonksiyonda azalma sağlanabilir (48).

İR hasarına bağlı artmış kapiller endotel geçirgenliği, moleküler seviyede, kavşak adhezyon molekülleri disfonksiyonu ve hücre iskelet değişikliklerine bağlıdır. Reperfüzyon periyoduyla birlikte belirginleşen lökosit-endotel etkileşimi ve sonrasında gerçekleşen lökosit diapedezi, kavşak adhezyon moleküllerinde çözülme ve endotel bariyer disfonksiyonu oluşturur (49). Akciğer İR hasarında, endotel bariyer disfonksiyonuna bağlı pulmoner ödem gelişir. PG E2, PG I2 ve antikompleman tedaviyle İR'a bağlı endotel bariyer disfonksiyonu azaltılabilmiştir (50).

Doku iskemisi sırasında birçok endojen koruyucu mekanizma endotel bariyerini onarmaya çalışır. Aktive olmuş nötrofillerden salgılanan glutamat ve adenin nükleotidler damarsal geçirgenliği kontrol eder. Adenozin endotel hücreleri arasındaki bağı kuvvetlendirip geçirgenliği azaltır. Dolayısıyla nötrofil kaynaklı koruyucu adenozin salınımı ve hipoksiyle indüklenmiş ekstraselüler ATP metabolizma ve transkripsiyonu ekstraselüler adenozin miktarını arttırarak, hipoksik hasara karşı hücre geçirgenliğinde kontrollü bir koruma sağlar (2).

c)İR'un venöz kılcallar üzerine etkisi

İR hasarına bağlı venöz kapiller değişiklikleri; genel olarak, lökosit lokalizasyon, adhezyon, diapedez ve ROT salınımıyla ilgilidir. Venöz kılcalların iskemiye olan cevabında nötrofiller baskın lökosit sınıfı olup, hasarı direkt etkileri ve diğer hücrelerle olan etkileşimlerine ikincil indirekt etkileri aracılığıyla oluştururlar. Bu etkiler sonucunda hücre zarı makromolekül geçirgenliği artar. Artmış endotel geçirgenliği ve azalmış intravasküler hacim, yaygın doku ödemi ve hemodinamik instabilite gibi lokal/sistemik sonuçlar doğurur (7). Dokuda biriken lökositler aynı zamanda trombosit adhezyonu oluşturarak, mikrodolaşımda trombosit birikimi ve konjesyona neden olurlar. Bu sırada oluşan trombüs de İR hasarına katkıda bulunur dolayısıyla antitrombotik ajanlar terapötik etkinliğe sahiptirler (51).

İR'da NO oluşumundaki azalma, lökosit adhezyon ve hücre zarı makromolekül geçirgenliğini arttırır. Venöz kılcallar, eklenmiş nötrofil ROT oluşumu nedeniyle, oksidan stresin en yoğun görüldüğü vasküler kompartmandır. Venöz kılcallardaki endotel, lökosit ve trombositlere bağlı oksidan hasar hücre zarı geçirgenliğini maksimum hale çıkartır (7).

2.5.İskemi Reperfüzyon Sonrası Oluşan İskelet Kası Hasarı

İskemiye karşı olan tolerans dokunun türüne ve kollateral dolaşım varlığına göre değişir. Normotermik doku iskemisinde geri dönüşümsüz hasar; kasta 4 saatte, sinirde 8 saatte, yağ dokusunda 24 saatte ve kemikte yaklaşık 4 günde oluşur (10).

a)Kas değişiklikleri

İskelet kası, ekstremiteyi oluşturan primer kütle olup aynı zamanda iskemik hasara en hassas dokudur. Dolayısıyla iskelet kası hasarı ekstremite reperfüzyon hasarının en önemli bölümünü oluşturur (10). Kas ölümü sonrası makroskopik ve mikroskopik değişiklikler minimal olduğundan kas ölüm zamanını belirtmek zordur. İskemiyi takiben yaklaşık üçüncü saatte ciddi kas hasarı ve altıncı saatte yaklaşık %97'lik fonksiyonel doku kaybı oluştuğu spektrofotometrik (triphenyltetrazolium chloride) yöntemlerle gösterilmiştir. Dolayısıyla geri dönüşümsüz hasar zamanının tayininde spektrofotometre önemlidir (52). Kas nekrozu ve ATP deposu azalması

arasında yakın ilişki saptanmıştır. İskemik kas dokusunda öncelikle glikojen ve kreatin fosfat azalırken bu safhada çok fazla myonekroz oluşmaz. Sonrasında, ATP azalmasıyla birlikte, kas nekrozu hızla artar. 6 saatlik kas iskemisi sonucu, normal kas dokusu ATP deposunda %80 azalma ve kas dokusunun tümünde nekroz oluşur (53).

Kas fiberleri, içerdikleri myoglobin miktarına bağlı olarak, kırmızı (tip 1) ve beyaz (tip 2) olarak sınıflandırılır. Çoğu kas her iki türü de içermekteyse de bir tip daha baskın bulunur. Örneğin bacağın ön kompartmanında daha çok tip 1 veya yavaş kasılan fiberler baskın olup, enerji üretiminde aerobik metabolizmayı kullanmaları bu kas grubunu iskemiye daha hassas kılar. Bacağın arka kompartmanında ise tip 2 veya hızlı kasılan fiberler baskın olup, enerji üretiminde anaerobik metabolizma ön plandadır (10). İskeminin süresi ve etkilenen fiber tipi iskemik hasarda önemli olmakla birliktedokunun vücuttaki konumu da önemlidir. Örneğin, çabuk soğuma nedeniyle, distal ekstremite kas dokusu proksimal kas dokusuna göre iskemiye daha dirençlidir (10).

b)Mikrodolaşım Değişiklikleri

Mikrodolaşım değişiklikleri, iskemik dönemde gerçekleşir ve iskemi süresi ile uyum gösterir. İskemi, ilk olarak kapiller endotel hücreleri etkileyerek, hem lümen hem de sitoplazmaya doğru uzanan parmaksı çıkıntılar oluşturur. İskeminin devamıyla birlikte endotel veziküllerinde artış oluşur. Bu arada, hücreler arası bağlar zayıflar ve geçit genişler. Heterojen dağılımlı endotel hücre ödemi oluşarak kırmızı küre sıkışmasını arttırır. İskeminin dördüncü saatinden sonra mikrosirkülasyonda hücresel etkileşimler (eristrositik, trombositik ve lökositik) başlar. Venöz ve arteryel kılcallar, reperfüzyon öncesinde, sıkışmış eritrositlerle kapanmış görünümdedirler. Rulo halindeki eritrosit kümeleri, erken reperfüzyon döneminde, endotel yüzeyde hasarlanma oluştururlar. Endotel hücre sitoplazmasındaki parçalanma sonucu hücreler arası büyük geçitler oluşur. Reperfüzyonla birlikte, özellikle venöz kılcallarda, lümen içi trombosit ve fibrin kümeleri ile karekterize trombotik komplikasyonlar oluşur. Bu trombosit kümeleri, endotel yüzde olan geniş defektleri kapatır. Venlerde lökosit diapedezi oluşurken, venöz kılcallarda lökositlerin lenfosit

ve monositlerle olan kümeleşmesi oluşur (10). İskemi süresi uzadıkça damarsal geçirgenlik artışı ve ilerleyici intersitisyel ödem oluşur.

c)"No reflow" fenomeni

İlk kez Brooks ve arkadaşları tarafından 1922'de, hayvan deneyinde, bu durum gözlenmiş ve patofizyolojik olarak tarif edilmiştir. Ancak, "no reflow" teriminin ilk kez kullanımı, Ames tarafından, 1968'de iskemik beyin hasarında olmuştur (54). Kas iskemisi ilerlediğinde kası besleyen damarda kalıcı tıkanıklık oluşur. Dolayısıyla "no reflow" fenomeninin myonekroza ikincil mi oluştuğu, yoksa "no reflow" fenomeni sonucunda mı myonekroz oluştuğu çelişkili bir konu olup, ilk durumun geçerli olduğu düşünülmektedir. Çünkü miyosit ve endotel hücrelerin iskemiye karşı toleransları farklıdır. Dört saatlik iskemi ciddi kas hasarı oluşturabilirken, bu durum endotelde 6 saatte oluşur. Bu nedenle, dokunun iskemiye karşı olan toleransını endotel değil doku hücresi belirler (10). "No reflow" fenomeni patofizyolojisinde, hemokonsantrasyon ve tromboz, kapiller endotel hücrelerde şişme, kapillerlerde lökosit kümeleşmesi ve doku ödemine ikincil artmış ekstravasküler doku basıncı vardır. Kapiller endotel şişmesi enerji depolarındaki azalmaya bağlıdır. Bu şişme erken reperfüzyon döneminde maksimum düzeyde olup kapiller kan akımına karşı rezistansı arttırır. Lökositler, kapiller endotelle adhezyon oluşturmadan lümen içerisinde kümeleşerek "no reflow" oluşumunda önemli rol oynarlar. Dolayısıyla kümeleşmiş lökosit hareketi endotel hasarını arttırır (10).

d)Lokal inflamatuar cevap

İskemik doku reperfüzyonu inflamatuar bir cevap doğurur. Ancak doku nekrozundan reperfüzyon döneminden çok iskemik dönem sorumludur (10). Damar tıkanıklıklarında, hayvan turnike modellerinin aksine, tıkanıklığın bir miktar distaline kadar, kollateral dolaşıma bağlı, normal doku izlenir. Dolayısıyla reperfüzyonla amaç, distaldeki nekrotik alanın değil bu alanın kanlandırılmasıdır. Bu bölge; nekrotik ve ciddi hasarlanmış hücrelerin iç içe olduğu ve inflamatuar aracıların sentezlendiği yerdir. Dolayısıyla, reperfüzyon sağlanmış hasarlı veya nekrotik alan miktarı morbiditeyi belirler. İnflamatuar cevabın tetikleyicileri; asit fosfataz, inorganik fosfat, laktik asit, myoglobin, nükleotidler, potasyum, proteolitik enzimler

ve pürin bazları gibi kas yıkım ürünleridir. Bu yıkım ürünleri; prokoagulan özellikte olup, intrensek pıhtılaşma sistemini aktive ederek venöz kılcal trombozu ve kollateral arteriollerde vazospasm oluştururlar. İnflamatuar cevabın en belirgin olduğu geçiş alanındaki bu tarz bir aktivite, nekrotik alanda genişlemeye neden olur. Dolayısıyla, antitrombotik ve antitrombosit tedaviyle geri dönüşümlü hasar bölgelerine olan kollateral akım ve mikrodolaşım korunarak nekrotik genişleme engellenebilir (10).

2.6. İR'a Bağlı Gelişen Uzak Organ Hasarı

İskemi reperfüzyonun önemli sonuçlarından biri uzak organ hasarı olup, yüksek mortaliteyle seyreden MODS'la sonuçlanabilir. Barsak, karaciğer, iskelet kası ve aortik iskemi reperfüzyon modellerinde MODS gelişimi gözlenmiştir (5).

MODS oluşumunda, hayati organların kanlandırılması amaçlı, refleksif gelişen mezenterik vazokonstriksiyon ve relatif mezenterik iskemi rol oynar. Bu kısa dönemli mezenterik iskemi, barsak mukozal bütünlüğü ve bariyer fonksiyonunda bozulma ve bakteri/lipopolisakkarit translokasyonuyla sonuçlanır. Mezenterik lenf nodları ve karaciğer makrofajlarının bu etkenlerle aktivasyonu, inflamatuar sitokinlerin dolaşımda artışına neden olur. Dolayısıyla, sistemik olarak, lökosit ve endotel aktivasyonu gerçekleşir (5).

MODS'da oluşan sistemik inflamasyon hemen her organda hasar oluştururken ilk gözlenen, genelde 24-72 saat içinde oluşan, akciğer yetmezliğidir. MODS'a bağlı oluşan akciğer hasarı, hafiften (akut akciğer hasarı) şiddetliye (erişkin respiratuar distres sendromu) doğru seyreden bir klinik spektruma sahip olup, patogenezinde mikrovasküler geçirgenlik artışı ve alveol sıvısı nötrofil birikimi suçlanmaktadır. MODS'a bağlı aynı zamanda karaciğer, böbrek, santral sinir sistemi, gastrointestinal sistem ve miyokard disfonksiyonu görülebilir (5).

Ksantin oksidaz (XO), süperoksit ve hidrojen peroksit oluşumunda önemli rol oynar. Tüm iskemi reperfüzyon modellerinde, plazma XO artışı ile uzak organ hasarı arasında korelasyon saptanmıştır. Artmış sistemik XO enzim aktivitesi ile vasküler sistemin tümünde ROT maruziyeti ve yaygın endotel aktivasyonu oluşur. Aynı zamanda XO, endotel hücre yüzeyi glikozaminoglikanlarına bağlanarak hücre yüzeyinde yoğunlaşır ve sitotoksik etkide bulunur. Dolayısıyla XO, hem direkt

sitotoksik etki hem de ROT oluşumuna ikincil endotel ve lökosit aktivasyonuyla, uzak organ hasarına katkıda bulunur (5).

Lökositlerden, ROT ve myeloperoksidaz enzim sentezi gerçekleşir. Aynı zamanda, aktif lökosit kaynaklı proteazlar, endotel bazal membran ve kavşak proteinlerinin yıkımında rol oynarlar. İskemik dokuda biriken aktif lökositler ancak reperfüzyon periyoduyla birlikte sistemik dolaşıma geçip uzak organ hasarında rol oynarlar. Reperfüzyonla oluşmuş sistemik lökosit aktivasyonu ve uzak organ hasarı, endotel hücresi adhezyon molekülü (ECAMs) kontrolüyle azaltılabilir. Reperfüzyon aynı zamanda, iskemik doku kaynaklı inflamatuar sitokinler ve adhezyon moleküllerinin sistemik artışına da neden olur. Dolayısıyla reperfüzyon döneminde, aktif lökositlerde ve adhezyon molekülleri yüzey ifadelerinde sistemik bir artış söz konusudur (5).

Septik şok ve MODS/SIRS klinikleri birbirlerine çok benzemekte olup, hepsi inflamatuar aracılar yoluyla gerçekleşir. Herhangi bir dokudaki İR, inflamatuar aracıların sistemik düzeylerinde artış ve lökosit-endotel-trombosit etkileşimine neden olarak uzak organ vasküler disfonksiyonuyla sonuçlanır. Reperfüzyon, aynı zamanda kompleman sistem aktivasyonuna ikincil uzak organda artmış lökosit trafiği ve vasküler disfonksiyon oluşturur. NO biyoyararlanımındaki sistemik azalma ve PAF, İR'a bağlı uzak organ hasarının diğer aracılarıdır (5).

2.7. İskemi Reperfüzyon Hasarını Önlemek İçin Tedavi Stratejileri

1-Lökosit tedavisi

Lökosit aracılı İR hasarı azaltılmasında; inflamatuar aracı maddeler, adhezyon molekülleri ve lökosit-endotel adhezyonuna yönelik tedavi yaklaşımları kullanılmaktadır (2). PAF, histamin, LT-B4 ve TNF-α gibi aracı inflamatuar maddelerin sentez veya reseptör etkileşimlerinin engellenmesi ile İR hasarında fayda sağlanmıştır (25). Ek olarak, aspirin kullanımıyla bir grup biyoaktif eikosanoid sentezinin indüklendiği gözlenmiştir. Lipoksinler; inflamatuar sistemlere karşı bir çeşit doğal koruyucu sistem olup, lökotrienler ve diğer inflamatuar aracı maddelerle oluşan lökosit kemotoksisi, adhezyon ve göçünü engellerler (55).

2-Antioksidan Tedavi

Koenzim Q10 (Ubiquinon) bir antioksidan molekül olup, etki mekanizması hala tam olarak anlaşılamamıştır. Ancak yapılan son çalışmalarda, reperfüzyon dönemi serbest oksijen radikali patlamasını direkt antioksidan etkiyle engellediği ve endotel bağımlı vazodilatasyon üzerinde olumlu etkilerde bulunduğu bildirilmiştir (56).

L-2-oxothiazolidine-4-carboxylate (OTC); doku GSH seviyelerinde artış oluşturarak, asetaminofen ile oluşmuş karaciğer hasarı ve hidrojen peroksite bağlı endotel hasarında azalma sağlar (57). Aynı şekilde, malik asit diethyl ester veya LButhionine-sulfoximine ile glutatyondan fakir hale getirilmiş dokuların İR hasarı etkilerine daha hassas oldukları gözlenmiştir. Dolayısıyla, doku GSH seviyelerinde artış oluşturan moleküller İR hasarı için koruyucudurlar. Ancak glutatyon metabolizmasının bizzat kendisi de toksik moleküller oluşturabilmektedir (58).

E vitamini, en önemli serbest oksijen radikali temizleyicilerindendir. Bu işlem sırasında kendi de bir serbest radikal haline gelir ancak askorbik asit (vitamin C) gibi moleküllerin yardımıyla yeniden stabil hale dönüştürülür (58). İR sürecinde doku Vit E seviyesinin düştüğü, Vit E verilmesiyle ROT ve lipid peroksitlerin oluşumunun azaltılabildiği gözlenmiştir (59). A, C ve E vitaminlerinin birlikte veya diğer farmakolojik ajanlarla (mannitol) kullanımı ile elde edilen antioksidan etki, tekli tedavileri sırasında elde edilen antioksidan etkiye göre daha güçlüdür (60). Vitamin

E ve ilopost'un birlikte kullanımı ile, lipid peroksidasyonunda azalmaya bağlı, İR hasarında düzelme saptanmıştır (61).

Allopurinol (XO inhibitörü), SOD, katalaz ve dimetil sulfoksit, İR hasarında düzelme sağlar. Aynı zamanda, bu moleküllerin birlikte kullanımları tek tek kullanımlarına göre daha etkindir (62).

Bunların dışında; nikaravan, α lipoik asit, thioredoxin, N asetilsistenin, angiotensin converting enzyme inhibitor ve kalsiyum kanal blokörleri ile İR hasarında azalma tespit edilmiştir (63).

3-İskemik Önkoşullanma

İskemik önkoşullanma dokunun, ciddi İR hasarı öncesi, kısa süreli İR periyodlarına maruz bırakılmasıdır. Böylelikle doku, uzun süreli İR'a daha dirençli hale gelir. İskemik önkoşullanma sikluslarının sayısı ve süresi arttıkça koruyuculuğu da artar (64).

İskemik önkoşullanmanın iki öğesi mevcuttur. Akut(erken) önkoşullanmada etki reperfüzyonun ilk dakikalarında başlayıp 2-3 saat sürerken, gecikmiş önkoşullanmada etki reperfüzyonun 12-24'ncü saatinde başlar ve 2-3 gün devam eder (65).

Uzun süreli düşük-orta doz etanol maruziyetinin, iskemik önkoşullanma yoluyla, İR hasarına karşı kardiyoprotektif etki sağladığı belirtilmiştir. Etanolün her iki safhada inflamasyona karşı koruyucu olduğu, geç safha koruyuculuğunun adenozin A2 reseptör bağımlı NOS aktivasyonuyla gerçekleştiği gözlenmiştir (66, 67).

4-Antitrombotik ve Fibrinolitik Tedavi

Heparin antitrombotik etkinliğinin yanısıra antiinflamatuar etkinliğe de sahiptir. Anti-inflamatuar etkileri; P ve L selektine bağlanarak lökosit-endotel etkileşiminin engellenmesi, NF-κB inhibisyonu sağlayarak inflamatuar kaskadın bozulması ve lökositlerden ROT oluşumunun engellenmesidir. Venöz kılcallarda endotel-lökosit etkileşimi, trombosit kümeleşmesi ve mikrotrombüs oluşumunu engelleyerek "no reflow" fenomeni etkinliğini azaltır (68).

Etkin bir fibrinolitik olan tissue plasminogen activator (tPA)'ün İR'da uygulanımı sonrası, lökosit adhezyon ve diapedezinde azalmaya bağlı, doku inflamasyon ve ödeminde azalma saptanmıştır (68). Trombosit-lökosit ve trombosit-endotel adhezyonu sağlayan moleküllerin monoklonal antikorlarla bloklanması reperfüzyon hasarına karşı bir diğer tedavi modalitesidir. Sonuç olarak, trombosit aktivasyonunun kontrolü; trombüs oluşumu, vasküler tonus kontrolü, anjiogenez ve inflamasyon patogenezinde önemli rol oynar (43).

5-Nitrik Oksit Tedavisi

İnhaler veya serum fizyolojikte çözünmüş olarak tatbik edilen NO gazın, hayvan deneylerinde, İR hasarını ve lökosit adhezyonunu azalttığı saptanmıştır (69). Nitrik oksit donörleri olan organik nitratların; birçok İR modelinde, lökosit-endotel adhezyonu, lökosit- trombosit adhezyonu, mast hücresi degranülasyonu ve artmış vasküler geçirgenliği azalttığı gösterilmiştir (70). Aynı zamanda, hayvan İR modellerinde, doku hasarında azalma sağlamıştır (6). NOS inhibitörü kullanımı bir başka yaklaşım şeklidir. Ancak, selektif olmayan bir NOS inhibitör kullanımı veya eNOS geni yokluğunda reperfüzyon hasarı artarken, selektif iNOS inhibisyonu ile İR hasarında azalma elde edilmiştir (71).

6-Hipotermi ve İntraarteryel İnfüzyon

Hipotermi, reperfüzyon sürecine eşlik eden doku lökosit infiltrasyonu ve artmış ROT oluşumunu azaltır. Hızlı ve etkin hipotermiyle, ampute olmuş ekstremite korunması ve reimplantasyon sonrası canlılığı arttırılabilmiştir (72). Birçok hayvan modelinde, lokal hipoterminin donör organ canlılığını arttırdığı gözlenmiştir. Bu tarz bir koruma sadece kas fleplerinde uygulanabilmekte olup deri dokusu içeren fleplerde, soğukta deri perfüzyonu bozulacağı için, kullanılamaz (68). Ampute ekstremiteler için 4 oC'lik lokal hipotermi koruma amaçlı yeterlidir. Bununla birlikte, soğukta saklanmış iskelet kası soğuk İR hasarına yatkındır ancak dokunun öncesinde University of Wisconsin solüsyonu ile reperfüzyonu bu durumu engeller. İntraarteryel infüzyon, İR hasarını azaltmada kullanılan bir diğer tedavi modalitesidir. Birçok solüsyon ve farmakolojik ajan tek tek veya birlikte uygulanmıştır. University of Wisconsin ve Euro-collins solüsyonları, en fazla

incelemeye tabi tutulmuş olanlarıdır. University of Wisconsin solüsyonu; modifiye edilerek, reperfüzyon periyodunu da içine alacak şekilde, lipid peroksidasyon inhibitörleri, serbest oksijen radikali temizleyicileri, anti-inflamatuar düzenleyiciler ve nitrik oksit donörleri ile zenginleştirilmiştir. Hayvan deneylerinden anlaşıldığı kadarıyla, soğuk solüsyonların intraarteryel infüzyonu dokuda daha muntazam bir soğuma sağlar. Bu amaçla modifiye University of Wisconsin solüsyon infüzyonu, organ transplantasyonları öncesi kullanılmaktadır (68).

7-Kompleman Tedavisi

Kompleman sistem aktivasyonu engellenmesi ile İR hasarının azaldığı birçok hayvan modelinde gösterilmiştir (35). Kompleman sistem blokajı; lektin yol inhibisyonu, lektin ve klasik yol inhibisyonu ve her üç yolun birlikte inhibisyonu ile sağlanabilir.Kompleman1 inhibisyonu, Kompleman 3 inhibisyonu oluşturarak alternatif yolu kontrol eder (1).

Kompleman 3 konvertaz inhibitörü olan rekombinan kompleman reseptör-1'in hayvan İR modellerinde doku hasarını ciddi düzeyde azalttığı saptanmıştır (73). Kompleman inhibisyonunun bir başka yolu Kompleman 1 esteraz inhibitörü olup, miyokard İR hasarında endotel hücre adhezyon molekül ifadesini azalttığı gösterilmiştir. Kompleman 5a ve Kompleman 5'in antikor aracılı bloklanması ile nekroz, apoptoz ve nötrofil infiltrasyonunda belirgin azalma sağlanmıştır (74).

Sonuç olarak, kompleman yollar birbirleriyle içiçe olup, sistemin herhangi bir bölgesindeki blokaj İR hasarında fayda sağlar ancak tüm bu antikompleman sistemlerin insanlarda kullanımı konusunda yeterli klinik veri yoktur.

2.8. Proantosiyanidin

Proantosiyanidinler; kuruyemişler, tohumlar, sebzeler, meyveler ve ağaç kabuğunda doğal olarak bulunan birleşimlerdir. Üzüm çekirdeği, özellikle proantosiyanidinler için hem nicelik ve hem de nitelik açısından zengin bir kaynaktır. Yirminci yüzyılın sonlarında ilk defa 1979'da ve daha sonra da 1992'de "Fransız paradoksu"olarak tanımlanmıştır. Fransızların diyetlerinde tereyağı gibi yüksek oranda doymuş yağdan zengin besinleri kullanmaları, sigara tüketiminin fazla olması, yeterli egzersiz yapmamalarına rağmen kardiyovasküler hastalıklardan ölüm risklerinin diğer ülkelerle karşılaştırıldığında daha az olduğu gözlenmiştir. Yapılan epidemiyolojik çalışmalarda ortaya çıkan paradoksun nedeni olarak Fransızların içinde yüksek konsantrasyonda proantosiyanidinleri bulunduran kırmızı şarabı fazla tüketmeleri olduğu gösterilmiştir. Proantosiyanidinlerin ise alkolde değil üzüm çekirdeğinden kaynaklandığı bulunmuştur. Proantosiyanidinler aynı zamanda bitkilerdeki mavi-mor ve kırmızı pigmentlerin ana maddesi olarak da bilinir (75, 76).

Proantosiyanidinler, polifenolik birleşikler olan flavonoidler'in spesifik bir grubudur. Flavonoidler, subgruplara göre katagorize edilirler. Proantosiyanidinler yoğunlaştırılmış taninler grubundadırlar. Tanin'ler hidroksile yapıda olup, karbonhidratlar ve proteinler ile çözünmeyip kompleksler oluştururlar ve bu özellikleri ile bağ dokusu korunmasında önemli görevler üstlenirler. Dimer, trimer ve tetramerik proantosiyanidinler düşük molekül ağırlıklı olup, su ve etanolde çözünürler, barsaklardan emilerek tüm dokulara ve plazmaya dağılırlar, bunun ötesinde diğer suda eriyen antioksidan moleküllerden farklı olarak plazma ve dokuda 7-10 gün boyunca mevcudiyetlerini devam ettirerek güçlü antioksidan özelliklerinin ortaya çıkmasını sağlarlar (75, 77).

1990 yılında yapılan "Uluslararası Sağlık ve Bioteknolojide serbest radikaller" sempozyumunda prosiyanidinlerde gallat esterifikasyonu arttıkça serbest radikal toplayıcı özelliğinin de arttığı rapor edilmiştir. Oligomerik proantosiyanidinler bu özelliğinden dolayı polimer olanlara göre vucutta proteinlere daha az bağlanır, serumda daha çok çözünür ve vucutta daha çok dağılım gösterirler (75).

2.8.1. Proantosiyanidinlerin Farmakolojik Özellikleri

IH636 GSPE (ActiVin, InterHealth Nutraceuticals Incorporated, Benicia, Kanada) su alkol Karışımı ile standartize edilerek kırmızı üzüm çekirdeklerinden elde edilmiştir. Bu ekstrenin %89,3'ü proantosiyanidinlerden oluşmaktadır. Proantosiyanidinler ise dimer (%66), trimer (%5), tetramer (%2.9), polimer, monomerik flavanoidler, su ve proteinden oluşmaktadır(77).

Oral alınabilen flavonoidler ve GSPE barsak hücrelerinde glukronid ile bağlanıp serumda karaciğere kadar albümin ile taşınır. Midenin asidik ortamında tam parçalanamadığından üst gastrointestinal sistemden emilimi daha azdır. Vucuda dağılımı alkol ve suda çözülüp oral alındığı zaman daha iyidir. Oligoproantosiyanidinler, polimerlere göre vucutta glikolizasyonu daha fazla olduğu için 7-10 gün plazmada kalabilir. Diğer suda çözünen antioksidan vitaminlere göre de bu belirgin bir avantajdır. Proantosiyanidinler karaciğerde metilasyon, dehidroksilasyon, oksidasyon, glukronik asitle veya sülfatla konjügasyon gibi biyotransformasyon reaksiyonları ile metabolitlerine ayrılırlar. Maksimum konsantrasyona ulaşma süresi 45 dakikadır ve yarılanma ömürleri 5 saattir (77, 78).

Bilinen bir ilaç reaksiyonu yoktur. Yapılan in vitro çalışmalarda trombosit agregasyonunu inhibe ettiği bulunmuştur. Bu nedenle antiagregan ilaçlarla alınacaksa dikkatli olunmalıdır. Rat çalışmalarında, proantosiyanidinlerin yüksek dozlarda (1400-1500 mg/kg/gün) bile toksik ve mutajenik etkisine rastlanmamıştır. (79)

Önerilen oral alım dozu 50-150 mg /gün yada 1 mg/kg/gün olup, günlük 300 mg önerenler de vardır. Doz aralığı geniş ve güvenlidir. Metabolitler temel olarak idrar ve feçes ile az oranda CO ile elimine edilirler. GSPE bileşikleri tek doz oral uygulama sonrasında hızlı şekilde plazmada görülürler. Oral uygulamadan sonra; uygulanan dozun %70'i ilk 24 saat içinde idrar ve %45'i feçes ile atılır. Temel idrar metabolitleri; hippürik asit, etikkatekol ve m-hidroksifenilpropionik asittir. Gayta metaboliti, etikkatekol'dür (77, 79).

2.8.2. Proantosiyanidinlerin Antioksidan ve Diğer Özellikleri

Proantosiyanidinlerin antioksidatif özelliği, oksidatif stresle karakterize hastalıklardaki tedavi edici etkiniğiyle ölçülmüştür. Serbest radikal toplayıcı özelliği ise doza bağımlı olarak değişir (80). Farelerde yapılan çalışmalarda oligomerik proantosiyanidinlerin kimyasal olarak indüklenmiş lipid peroksidasyonunu, oksidatif hasarla oluşturulmuş beyin ve karaciğerdeki apopitozisi inhibe ettiği gösterilmiştir.

Serbest radikallerle ilgili yapılan bir araştırmada güvenli bir antioksidan maddede şu özelliklerin önemli olduğunu vurgulanmıştır (81, 82).

1. Absorbsiyon ve vucuda uyumu,
2. Efektif doz, kullanım kolaylığı ve toksisite,
3. Hücreler, dokular ve ekstraselüler dokuya dağılımı,
4. Serbest radikal toplama kabiliyeti,
5. Metalle şelasyon aktivitesi,
6. Gen ekspresyonu üzerine etkisi,
7. Hücresel antioksidanlar ve antioksidan enzimlerle etkileşim,
8. Karsinojenik metabolitlerin detoksifikasyonu.

Proantosiyanidinler serbest radikal toplayıcı ve antioksdan etkinliğini; vazodiladatör, antikarsinojenik, antiallerjik, antiinflamatuvar, antibakteriyel, kardioprotektiv, immünostimülan, antiviral, östrojenik etki ve siklooksijenaz, fosfolipaz A2 ile lipooksijenaz inhibisyonu yaparak gösterirler (12).

İn vitro deneylerde serbest radikal (süperoksit anyonu ve hiroksil iyonu) toplama (SRT) açısndan GSPE (Grape seed proanthocyanidin extract=Üzüm çekirdeği proantosiyanidin ekstresi) ile vitamin C ve E çeşitli konsantrasyonlarda karşılaştırılmıştır. Bunu ölçmek içinde sitokrom c redüksiyon sonucu oluşan kimyasal değerler kullanılmıştır. GSPE ile vitamin E karşılaştırıldığında; süperoksit anyonu için %84, hiroksil iyonu için %98 GSPE'nin daha fazla SRT etkinliğinin olduğu saptanmıştır. GSPE ile vitamin C karşılaştırıldığında; süperoksit anyonu için % 439, hiroksil iyonu için % 575 GSPE 'nin daha fazla SRT etkinliğinin olduğu saptanmıştır (80). Sato ve arkadaşları, benzer bir çalışmayla; peroksil iyonu

için GSPE'nin kardioprotektif etkisini gösterirken, GSPE'nin bu etkisini özellikle vurgulamışlardır (83).

Ray ve ark'nın gen ekspresyonu üzerine GSPE'nin etkisi araştırılmıştır. Farelere 3-7gün GSPE oral olarak 100 mg/kg'dan verildikten sonra, aşırı doz asetoaminofen verilen farelerde karaciğer toksisitesi meydana getirlip serum alaninaminotransferaz (ALT) seviyelerindeki değişikliğe ve hepatik hücre DNA hasarına bakılmıştır. Ayrıca histopatolojik olarak apopitotik ve nekrotik değişiklikler incelenmiştir. Asetoaminofen; bcl gen ailesine ait pozitif düzenleyici, hücre ölümü ve apopitozisi engelleyici rolü olan bcl XL geninin fosforillenmesiyle tam tersi etki yapmış, yani apopitozisi indüklemiştir. Oysa, GSPE alan deneklerde bcl-XL gen ekspresyonu bariz artmış ve apopitozis dramatik olarak azalmıştı. Aynı zamanda, ALT seviyelerinin yükselmeyişi ve DNA hasarının azalması da GSPE'nin asetoaminofen verilen farelerde karaciğer toksisitesine karşı koruyucu etkisini destekliyordu (86).

GSPE; sistemik lupusda antioksidan olarak, pankreatitte antiemetik olarak ,insülin rezistansında niasin ve çinko-metioninle kombine olarak dikkat defisit bozukluğu gibi kognitif hastalıklarda da başarılı klinik sonuçlar alınarak kullanılmıştır (85, 86).

Balu ve ark'nın, yaşlanmaya bağlı oksidatif stresin oluşturduğu nöronal hasarla ilgili ratlarla yapılan bir çalışmada GSPE'nin etkisi araştırılmıştır. Sonuç olarak, spinal kord ve beynin; örneğin; hipokampus, korpus striatum ve serebral korteksinde yaşlanmaya bağlı oksidatif DNA hasarının birikimini inhibe ettiği gösterilmiştir (87).

Avrupa'da, proantosiyanidinler daha çok venöz yetmezlik, varisler ve retinopati, kapiller frajilite gibi mikrovasküler problemleri içeren vasküler hastalıklarda kullanılmaktadır. Fransa'da primer olarak mikrovasküler hastalıklarında kullanılmaktadır. Deneysel olarak da, mikrovasküler hastalıklarla ilgili yapılan araştırmaların sonucunda proantosiyanidinlerin şu özellikleri gösterilmiştir (77).

1. Hidroksil serbest radikallerine karşı spesifiktir,
2. Lipid peroksit ürünleri ve serbest radikalleri toplayabilmektedir,
3. Örneğin, demirle indüklenmiş lipit peroksidasyonunu inhibe ettiği gibi, serbest demire karşı şelasyon (birleşip toplama) görevi yapar,

4. Serbest radikal oluşumuna neden olan ksantine oksidaz enzimini nonkompetatif inhibe eder,
5. Hiyaluronidaz, elastaz ve kollajenaz enzimlerini inhibe ederek; yumuşak doku yapısının bozulması ve permeabilite artışını engellerler.

Bu anlatılanlara paralel olarak, proantosiyanidinlerin biyolojik aktivitelerinden faydalanarak kullanılan alanlar; ödemin azaltılması, periferal dolaşımın arttırılması, görme keskinliğinin arttırılması, kardiovasküler hastalıklardan koruma, hiperkolestrolemi tedavisi, yumuşak dokunun stabilizasyonu, allerjik ve inflmatuvar cevabın azaltılması ile immün sistemin düzenli çalışması ve son olarak sağlıklı yaşamın devamıdır (77).

.

2.9. İlaç – İloprost

İloprost; araşidonik asitten sentezlenen, endojen bir prostaglandin olan epoprostenol (PG I2, prostasiklin)'ün sentetik karboksilin analoğudur. Epoprostenol, en fazla damar endoteli tarafından sentezlenir.

2.9.1. Farmakolojik Özellikler

Farkodinamik Özellikler

a) Trombosit üzerine etkileri

1-İn vitro antitrombosit etkinlik

Trombosit kümeleşme ve degranülasyonunu arttıran adenindinükleotid, araşidonik asit, kollajen, epinefrin ve U 46619 gibi maddelerin etkilerini, dozla orantılı olarak, engellediği in vitro olarak gösterilmiştir (11). Diabet, hiperlipidemi ve periferik arter hastalığında artmış trombosit aktivitesi ve azalmış iloprost cevabı gözlenmiştir (88).

2-İn vivo antitrombosit etkinlik

İntravenöz iloprost'un, trombosit hiperaktivitesi ve travma sonrası hemostazda antitrombosit etkinliğinin doz bağımlı olduğu hayvan deneylerinde gösterilmiştir (89). İloprost'un klnik kullanımında, antitrombosit etkinin yine doz bağımlı (0,5-2 ng/kg/dk) olduğu görülmüş, yaklaşık 2 ng/kg/dk dozda yan etkilerinin belirginleştiği ve infüzyonun kesilmesini takiben 1 saat içinde antitrombosit etkilerinin yok olduğu gösterilmiştir (90). Akut anterior miyokard infarktüsü tanısı ile izlenen erken dönemdeki 14 hastalık bir grupta ve Fontaine evre II tıkayıcı periferik arter hastalarında, iloprost tedavisi ile trombosit aktivitesinin düştüğü ancak tedavi bitiminde bu etkinin normale döndüğü gözlenmiştir. İloprost tedavisi sonrasında aterosklerotik alanlardaki trombosit kümeleşme azalması gama kamera ile gösterilmiştir (91).

3-**Trombosit salınım reaksiyonları**

Trombosit aktivasyonunun son safhası olan degranülasyon da, aynı kümeleşmede olduğu gibi, iloprost tarafından benzer dozlarda engellenir (92).

Heparinizasyon sonrası trombosit aktivasyonuna bağlı spesifik protein yükselişi iloprost ile engellenememiştir. Dolayısıyla fizyolojik olarak aktive olmuş trombosit salınım reaksiyonları iloprost ile azaltılamamaktadır (93).

b) Kan akımı üzerine etkisi

Kan akışkanlığı artışı ve kırmızı hücre deformasyonuna 1-2 ng/kg/dk dozunda neden olmadığı, ancak doz aralığı yükseltildiğinde (2-4 ng/kg/dk) akışkanlığı ve ekstravazasyonu arttırdığı bildirilmiştir (90). Ancak, periferik arter hastalarında yapılan klinik bir çalışmada; 6 saat 0,5-2 ng/kg/dk iloprost infüzyonuyla, mikrodolaşım fonsiyonlarında düzelme saptanmıştır (94).

c) Fibrinolitik aktivite üzerine etkisi

İloprost tedavisiyle; fibrinolitik aktivitede artış, pıhtı lizis süresinde azalma, değişik oranlarda doku plazminojen aktivatörü düzeyi artışı saptanmış ancak fibrinojen ve plasminojen düzeylerinde değişiklik saptanmamıştır (95). Bertek ve arkadaşları; iloprost infüzyonuyla, fibrinolitik aktivitesi baskılanmış bir grupta aktivitenin normale döndüğünü gözlemlemişlerdir (96). Doku plazminojen aktivatörü (tPA) düzeylerindeki artış istatistiksel olarak anlamlı olmayıp bu durum, iloprost'un hem endotel tissue plasminogen activator sentezini hem de trombosit doku plazminojen aktivatörü inhibitör oluşumunu arttırmasına bağlanmıştır (95).

d) Nötrofiller üzerine etkisi

İn vitro ortamda, kalsiyum ionofor A23187 veya N-formyl-L-methionyl-L-phenylalanine karşı olan nötropenik cevabı engellediği gösterilmiştir (97). Aktive olmuş PMNL'lerin kordon veni endoteline adhezyonu da iloprost infüzyonuyla azaltılabilmiştir (98). Hayvan deneylerinde, 100 ng/kg/dk iloprost infüzyonuyla, iltihabi veya hasarlanmış dokulardaki nötrofil birikimi azaltılabilmiştir (99).

e) Hemodinamik Etkiler

1-İn vitro ortamda damar üzerine etkileri

İn vitro olarak, İloprost'un, cAMP aracılı arteryel vazodilatasyon oluşturduğu gösterilmiştir (100). Ancak, venöz dilatasyon konusundaki veriler

yetersizdir. Her iki ajan, in vitro olarak, safen ven ve pulmoner ven de vazodilatasyon yapar. Koroner venlerde, epoprostenol doz bağımlı kontraksiyon oluştururken, iloprost tek başına yetersizdir. Ancak, birlikte kullanıldıklarında, iloprost epoprostenolün etkisini yok eder. İloprost'a ait arteryel vazodilatör etki özellikle sağlam endotelde daha belirgindir. İloprost; araşidonik asit TxA2 analoğu U46619 ve angiotensin II gibi vazokonstriktör maddelerin etkilerini yok eder. Bunun dışında, TxA2-epoprostenol arasındaki dengeye etki ederek, arteryel dilatasyon sağlar (101,102).

2-İn vivo ortamda damar üzerine etkileri

Hayvan deneylerinde, iloprost'un antitrombosit etkinliğinin hipotansif etkisine göre 2-7 kat fazla olduğu gösterilmiştir (103). Buna benzer sonuçlar insanlar üzerinde de saptanmıştır (104). İloprost'un doz bağımlı ve geri dönüşümlü hipotansif etkisi hayvan deneylerinde gösterilmiştir (105). Hipotansiyon veya taşikardiye neden olmayan düşük dozlarda bile mezenterik / alt ekstremite vasküler rezistansında azalma ve kan akımında artış saptanmıştır (105). Arteryel dilatasyon etkisi, teorik olarak iloprost'un koroner arter hastalığı, primer pulmoner hipertansiyon ve serebrovasküler hastalıkda kullanılabilirliğini destekler. Buna yönelik hayvan deneylerinde, iloprost'un, 60 dakikalık bilateral karotis arter oklüzyonu sonrasında, ödem, kalsiyum birikimi ve öğrenme kapasitesi verileri açısından kontrol grubuna göre etkin olduğu gösterilmiştir (106). Yine hayvan pulmoner hipertansiyon modelinde 0,4 μg/kg/dk iloprost infüzyonuyla, pulmoner arter basıncı ve pulmoner vasküler rezistans da, kardiak indeks ve kan gazı değişikliği yapmaksızın, belirgin düzelme sağlar (107).

3-Klinik kullanımında saptanan hemodinamik etkiler

0,5-4 ng/kg/dk iloprost infüzyonuyla; vazodilatasyona bağlı, periferik vasküler rezistans ve ortalama kan basıncında doz bağımlı azalma olurken, kalp hızı ve kardiak indekste artış oluşur (108). Primer pulmoner hipertansiyonlu hastalarda; iloprost infüzyonuyla, pulmoner vasküler rezistansda doz bağımlı azalma, kardiak indeks ve pulmoner arter oksijen saturasyonunda ise artış gözlenmiştir (109). Tüm hasta gruplarında, iloprost infüzyonu; böbrek kan akımında doz bağımlı artış ve diüretik etki sağlamıştır (110).

f)Hücre koruyucu etki:

Doku perfüzyon artışı ve antitrombosit etkiyle, direkt sitoprotektif etkinlik sağlar.

1-Kardiyak koruma

Birçok in vitro miyokard İR modelinde, iloprost'un miyokard fonksiyonunu koruduğu gösterilmiştir (111). İloprost'un 0,1 μg/kg/dk infüzyonuyla; hayvan miyokardiyal iskemi modelinde, hücre zarı fosfolipid kaybının ve dolayısıyla hücre zarı hasarının azaldığı gösterilmiştir (112). Deneysel koroner arter trombozu ve mikroemboli modellerinde; iloprost'un, tıkanma süresini %50 uzattığı, ST segment değişiklikleri ve iskemik alanlardan inosine salınımını azalttığı gösterilmiştir (113). İloprost infüzyonuyla, TxA2 ile indüklenmiş infarkt alanında küçülme gözlenmiştir (93). İloprost'un düşük dozlarıyla da miyokardiyal korunma sağlanması, bu etkinin hipotansif etkiden bağımsız olduğunu gösterir. İloprost infüzyonu sonrası, infarkt alanı küçültücü etki ile nötrofil birikimini azaltıcı etki arasında korelasyon saptanmıştır (114).

2-Antiaritmik etki

Reperfüzyon aritmilerinde epoprostenol-TxA2 oranının önemli olduğu, iloprost'un bu oranı epoprostenol lehine çevirdiği bildirilmiştir (115). In vitro olarak, iloprost'un, aritmojenik maddelerle oluşturulmuş ektopik atım ve fibrilasyonu durdurduğu ancak yüksek dozlarda kendisinin de aritmojenik olduğu gözlenmiştir (116). İloprost'a bağlı atrial ve ventriküler transmembran aksiyon potansiyel değişikliği saptanmamış olup antiaritmik etkinin elektrofizyolojik temeli çözülememiştir. Reperfüzyon aritmisinde, iloprost'un düşük doz (0,1 μg/kg/dk) infüzyonu yüsek doz (1 μg/kg/dk) infüzyon'a göre daha etkindir. Yüksek dozla oluşan hipotansiyon aritmiye katkıda bulunur (115).

3-Diğer doku hasarı modelleri

Bromobenzen ve karbon tetraklorid ile oluşturulmuş hepatoselüler hasar ve LDH artışının iloprost infüzyonuyla önlendiği gösterilmiştir. İloprost bu etkiyi, lipid peroksidasyonunu azaltıp aldehid eliminasyonunu arttırarak gerçekleştirir (117). İloprost'un, hayvan travmatik şok modellerinde, plasma Katepsin D aktivitesinde azalma ve hücre zarı stabilizasyonu sağladığı bildirilmiştir (118).

g) Cerrahi uygulamalar

1-Transplantasyon

İloprost, donör organ nakli sırasında oluşabilecek doku hasarını antitrombosit ve sitoprotektif etkiler aracılığıyla azaltır. Donör akciğer korunmasında etkinliği belirgin olmayıp, Eurocollins solüsyonu öncesi ek olarak iloprost tatbiki ile postoperatif 1'inci saat oksijenasyonun iyileştiği ancak hemodinami, tidal hacim, geç dönem oksijenasyon ve doku ödemi açılarından kontrol grubu ile fark oluşturmadığı gözlenmiştir (119). İloprost'un, transplantasyon cerrahisinde kullanımı konusu tam netlik kazanmamıştır (93). Siklosporin ve iloprost tekli tedavilerinin her ikisi de yaşam beklentisinde uzama sağlar ancak birlikte kullanımlarının tekli tedaviye göre üstün olduğu gözlenmiştir. Bununla birlikte azothioprine ve iloprost kombine tedavisinin azothioprine tekli tedavisine üstün olmadığı görülmüştür (119).

2-Anastomoz açıklığına etkisi

Çapı 0,5 mm'den küçük damarlarda, vazospasm ve tromboz nedeniyle, anastomoz açıklık oranı düşüktür. Hayvan arteryel rekonstrüksiyon modelinde, anastomoz açıklığının topikal 25 µg/cm iloprost ile belirgin arttığı ancak i.v. iloprost ile değişiklik oluşmadığı bildirilmiştir (120).

Farmakokinetik Özellikler

a) Emilim ve dağılım

iloprost,;1, 2 ve 3 ng/kg/dk i.v. infüzyon dozlarıyla sırasıyla 46, 85 ve 135 ng/L sabit plasma konsantrasyonlarına ulaşılır . Oral alındığında, çok hızlı emilime uğrayarak maksimum plazma konsantrasyonuna 10 dakika içinde ulaşır ancak karaciğer ve barsaklarda çok fazla biyotransformasyona uğrayarak sadece %20'si sistemik dolaşıma geçer (oral 1µg/kg iloprost › 251 ng/L maksimum plazma konsantrasyonu). İntravenöz uygulanım sonrası, son safha dağılım hacmi; yaklaşık 0,7 L/kg'dır. Hayvan deneylerinde maksimum santral sinir sistemi seviyesine yaklaşık 5 dakikada ulaşır (121).

b)Metabolizma ve eliminasyon

Tamamı ß oksidasyon ile tetranor türev ve onun bileşiklerine metabolize olur ve metabolitlerin yaklaşık % 70'i ilaç alımını takiben ilk 14 saat içinde böbreklerden atılır. Uygulanan ilaç dozunun %12 – 17'si ise feçesle atılır (93).

Eliminasyonu bifazik olup; önce organ doku dağılımı (t1/2: 4dk), sonrasında ise biyotransformasyon ve eliminasyon [t1/2: sağlıklı kişilerde 30 dakika, kritik bacak iskemili kişilerde 37 dakika] safhalarını içerir (122). Epoprostenol için bu ikinci safha yarılanma ömrü yaklaşık 3 dk'dır. Böbreklerden temizleme hızı; normal populasyonda 20 ml/dk/kg, kritik bacak iskemili hastalarda 16 ml/dk/kg, ciddi karaciğer yetmezliğinde ise 10 ml/dk/kg'dır. Dolayısıyla karaciğer yetmezliğinde, aynı dozla, iki kat yüksek plasma konsantrasyonlarına ulaşılır. Böbrek yetmezliğinde ise, ilginç olarak, diyaliz gereksinimi olan grupta temizlenme hızı normalin üçte biriyken, diyaliz gerektirmeyen grupta bu normale yakındır. Her iki grupta yarılanma ömrü aynıdır ancak maksimal plasma konsantrasyonu; diyaliz ihtiyacı olan grupta yaklaşık 2-2,5 kattır (122).

2.9.2 Periferik Vasküler Hastalıkta İloprost Kullanımı

Periferik dokuların besin ihtiyaçları mikrosirkülasyon ile sağlanır. Epoprostenol; mikrovasküler kan akımı hacim ve dağılımının kontrolünde ve mikrovasküler defans sistemi aktivasyonunun sınırlandırılmasında rol oynar. Özellikle ülsere aterom plakları, kümeleşme ve hücresel salınımı tetikleyerek, şiddetli mikrovasküler defans reaksiyonları oluşturabilir. Çoğu mikrodolaşım tıkanıklığı geri dönüşümsüz olmakla birlikte, iloprost infüzyonuyla; aktive olmuş trombosit - lökosit ve hasarlı endotel arasındaki kısır döngü geçici olarak kırılabilmekte ancak kronik semptomatik rahatlama sağlanamamaktadır. İloprost bu kısır döngüde; dengeyi epoprostenol lehine çevirerek, hücresel aktivasyon ve salınımı engeller. İlomedin® antiagregan, vazodilatör, trombosit inhibisyonu yapıcı etkisi, lökosit adhezyonu inhibisyonu ve mikrovasküler kan akımında artış nedeniyle periferik tıkayıcı damar hastalıklarında terapötik etki gösterir (99).

Terapötik Endikasyonlar

i)Arteriosklerozis obliterans Diyabetik (123)
Diyabetik olmayan (124)

Temelinde arter tıkayıcı hastalık bulunan, kritik ekstremite iskemisi olgularında; cerrahi ve kateter müdahalesinden(vasküler rekonstrüksiyon açısından) sonuç alınamadığında ya da yararsız oldukları kanıtlandığında, iloprost tedavisi denenir. Fontaine III. ve IV. evredeki tıkayıcı arter hastalığı olan hastaların katıldığı randomize, plasebo kontrollü çalışmalarda intravenöz
iloprost kullanımında, ağrının azalması, ülser iyileşmesi ve ampütasyon oranlarında plaseboyla karşılaştırıldığında belirgin bir üstünlük elde edilmiştir (124, 125). Oniki uluslararası uzmanlar birliğinden (Tıkayıcı Arter Hastalığı Tedavisinde Trans-Atlantik Dernekler-Arası Görüş Birliği) oluşan TASC çalışma grubunun açıkladığı aşağıdaki bildiri iloprost'un terapötik sınıflandırılması konusunda oluşturdukları görüş birliği belgesidir: "İloprost kontrollü, randomize çalışmalarda bugüne kadar en fazla sayıdaki, ilerlemiş kronik ekstremite iskemili hastada incelenmiş olan prostanoiddir. Eldeki veriler damarlarının yeniden açma girişimleri için uygun olmadığı ya da revaskülarizasyon girişimlerinin başarısız kaldığı kritik ekstremite iskemili hastalarda iloprost kullanımını haklı çıkarmaktadır. Tedaviye yanıt verecek hastaları öngörmek açısından herhangi bir teknik geliştirilmiş değildir, ancak ilacın oldukça yüksek düzeydeki terapötik güvenilirliği; erken bir amputasyon endikasyonunun kaçınılmaz olması dışında, bütün bu hastalarda iloprost'un denenmesini gündeme getirmektedir." (126).

ii)Buerger hastalığı (Tromboanjitis obliterans) (127)

iii)Bağ dokusu hastalıkları (Raynaud fenomeni): Çocuk (128)
Erişkin (129,130)

iv)Akut arter tıkanıklığı (131)

v)Perioperatif greft açıklığını arttırmak için kullanımı (132,133)

vi)Deneysel çalışmalar Greft iç yüzüne kaplanması (134)
Medulla spinalis korunması (135
İskemi/reperfüzyon hasarı önlenmesi (61,136)

İloprostun akut arter tıkanıklığındaki etkinliğini araştırdıkları 300 hasta ile gerçekleştirilen bir çalışmada, iloprostun bolus ve devam eden dozlarda intraarteryel uygulanması ile amputasyon insidansında anlamlı azalma saptamışlardır. Mortalite oranları da kontrol grubu ile karşılaştırıldığında istatistiksel olarak düşük bulunmuştur (131). Akut arter tıkanıklığında, cerrahi tedaviye ek olarak iloprost tedavisinin uygulanabilirliği için yeni klinik çalışmalara ihtiyaç vardır.

İloprost'un İskemi Reperfüzyon Hasarı'ndaki Klinik Kullanımı

İloprost'un, iskemi reperfüzyonla oluşmuş lokal organ hasarında etkin olduğu; böbrek (137) akciğer (138), kalp (111), spinal kord (135), mezenterik (139), karaciğer (140) ve iskelet kası (61) iskemi reperfüzyon modellerinde gösterilmiştir. Aynı zamanda, iskemi reperfüzyona bağlı gelişen böbrek ve akciğer uzak organ hasarlarında da; iloprost'un hasarı azaltmada etkin olduğu gösterilmiştir(141,142). Dolayısıyla iloprost; İR'a bağlı lokal ve uzak organ hasarlarında etkin bir tedavi modalitesidir.

Dozaj ve Uygulama Şekli

Periferik vasküler hastalık ve diyabetik anjiopati'de, 14-28 gün boyunca, günde 6 saat 2 ng/kg/dk dozunda infüzyon tedavisi önerilmektedir. Diabetik anjiopatide bu protokolün ikinci bir kere tekrar edilmesiyle klinik başarının arttığı görülmüştür. Raynaud hastalarında ise 3 günlük, günde 5-8 saat, 0,5-3 ng/kg/dk infüzyon tedavisi uygulanmakta ve 6-8 hafta klinik rahatlama sağlanabilmektedir (93). 3-36 ng/kg/dk i.v. iloprost tedavisiyle heparine bağlı trombositopenide kardiyovasküler cerrahi prosedürlerin uygulanmasına olanak sağlamıştır (143). Gebelik, laktasyon, aktif kanama veya kanama diyatezi, ciddi koroner arter hastalığı veya son 6 ay içinde geçirilmiş miyokard infarktüsü durumlarında kullanımı kontraendikedir. Antihipertansifler (beta blokörler, kalsiyum kanal blokörler, anjiotensin dönüştürücü enzim inhibitörleri) ve kanama eğilimini arttıran (heparin, coumadin, asetil salisilik asit) ilaçlar ile etkileşime girerek sinerjik etkide bulunabilir.

Hamilelerde kullanımında C kategorisinde bir ilaç olarak sınıflandırılabilir. Özellikle diyalize giren kronik böbrek yetmezliği hastaları ve karaciğer fonksiyon bozukluğunda dozaj ayarlaması yapılmalıdır. İntoksikasyonunda antidotu yoktur, ilaç kesilmesi yeterlidir (93).

Tolerans

Hastalar arasında toleransta belirgin deşiklik olup, kişinin iloprost'a olan toleransı dozun kademeli olarak arttırılmasıyla sağlanabilir. İlaca bağlı yan etkiler, doz yükseldikçe artar, ilaç kesildiğinde ise kaybolur (93). Yüzde kızarma ve baş ağrısı en sık görülen yan etki olup; % 70 oranında rastlanır, sonrasında sırasıyla bulantı (%30) ve kusma (%16) gelir. Gastrointestinal yan etkiler (kramp, diyare) kullanılan dozlar yükseldikçe artış gösterir. Bu rahatsız edici gastrointestinal yan etkilerden iloprost dozu kademeli olarak arttırılarak kurtulabilinir. Ciddi koroner arter hastalarında, iloprost infüzyonu sonrası anjina oluştuğu gözlenmiştir. Bu durum, artmış adenozin seviyesine ikincil gelişin taşikardi veya azalmış aortik / poststenotik kan basıncına bağlı gelişmiş olabilir. Tedavisinde iloprost infüzyonu kesilir, adenozin antagonisti olan aminofilin uygulanır. Periferik arter hastalığı tedavisinde, $\leq$ 2 ng/kg/dk aralıklı iloprost infüzyonu sırasında ciddi hipotansiyon nadir olup, az da olsa postural hipotansiyon bildirilmiştir. Hemodiyaliz sırasında 2 ng/kg/dk iloprost tedavisi birçok hastada semptomatik hipotansiyon yapmıştır. Bu durum hemodiyalize bağlı yükselmiş prostanoidlerin iloprost'a olan artmış hassasiyetine bağlanmıştır. Ekstrakorporeal dolaşımda, heparinle indüklenmiş trombosit aktivasyonunu engellemek amaçlı yüksek doz ($\approx$24 ng/kg/dk) iloprost kullanımı da ciddi hipotansiyona neden olabilir. Bu durum ilacın kesilip norepinefrin uygulanmasıyla düzeltilebilir (143). Diğer nadir yan etkiler; huzursuzluk, sedasyon, halsizlik, uykusuzluk, ani terleme, lokal eritem, kas ağrıları ve krampları, ağız kuruluğu ve iştahta azalmadır (93).

2.10. D-Dimer

Pıhtılaşma olayı sonucunda fibrin plazminojen gibi bazı enzimlerce parçalanır ve fibrin yıkım ürünleri oluşur. D-dimer faktör 13 tarafından stabilize edilen fibrin ağının yıkım ürünüdür.

D-dimer normal yara iyileşme süreci ve kan pıhtı oluşumunun bir parçası olarak üretilir. Bununla birlikte pıhtılaşma patolojik olarak oluştuğunda veya altta yatan bazı hastalıkların sonucu olarak meydana geldiğinde, D-dimer istenmeyen trombotik olayların varlığını gösteren bir belirteç haline gelir (144).

D-dimerin Arttığı Durumlar

a) Patolojik olmayan

- Yaş (özellikle >65)
- Irk (siyah ırkta)
- Sigara içenler
- Gebelik
- Kısa zaman önce geçirilmiş travma ve operasyon
- Hematom

b) Patolojik olanlar

- Arteryel-venöz tromboemboli
- Yaygın damar içi koagülopati (DİC)
- Malignite
- Enfeksiyon
- Orak hücreli anemi
- Atrial fibrilasyon
- Böbrek ve karaciğer yetmezlikleri
- Abruptio plasenta, preeklepsi ve eklempsi, intrauterin fetal ölüm

Trombotik bozukluk şüphesi olan hastalarda D-dimer düzeylerinin ölçülmesi 1990'lardan itibaren önem kazanmıştır. Pratikte negatif sonuç trombozu ekarte ederken, pozitif sonuç trombozu ve aynı zamanda olası diğer sebepleri gösterir. Bu

yüzden esas kullanımı, olasılığın düşük olduğu durumlarda tromboembolik hastalığı ekarte etmektir. D-dimer testi özellikle derin ven trombozu ve pulmoner embolide kullanılır. DİC şüphesi olan hastalarda, D-dimer teşhise yardımcı olabilir. D-dimerin trombotik hastalığın teşhisinde duyarlılığı %93-95, özgüllüğü % 50'dir (144).

İR hasarında da koagülasyon sisteminin aktivasyonu olmaktadır. No-reflow fenomenine bağlı mikrovasküler düzeyde trombüs oluşumu gerçekleşmektedir. İR hasarında plazma D-dimer düzeylerini inceleyen yeterli çalışma olmaması nedeniyle çalışmamızda plazma D-dimer düzeylerini de inceledik.

3. MATERYAL METOD

3.1 Deneysel Çalışma

Çalışmamızda, Ankara Üniversitesi Deney Hayvanları Üretim ve Araştırma Laboratuvarı'ndan temin edilen, erkek ve ortalama ağırlıkları 200-250 gr olan 50 adet Wistar-Albino cinsi rat kullanıldı. Ratlar rastgele ve eşit sayıda (n = 10) olarak beş gruba ayrıldı. Ratlar deney öncesi bir hafta süre ile, polikarbon kafeslerde, 12 saat gece 12 saat gündüz sirkadiyan ritmde, ortam sıcaklığı 24-26 °C ve nem oranı %50-60 olacak şekilde tutuldu. Ratların beslenmesinde standart ticari pellet yemi ve şehir içme suyu kullanıldı. Çalışmada 20 adet rata işlem öncesi 10 gün süreyle proanthocyanidin, (GNC preventive nutrition) oral yoldan (orogastrik gavajla, **resim 1**) 100mg/kg/gün dozunda verildi. Tüm ratların bakımları; Tıbbi Araştırmalar Ulusal Derneği tarafından biçimlendirilen 'Deney Hayvanlarının Bakım Prensipleri'ne ve Laboratuar Hayvanı Kaynakları Enstitüsü tarafından hazırlanıp Ulusal Sağlık Enstitüsü tarafından yayınlanan (NIH basım no. 85 – 23 , 1985 revize edildi) 'Laboratuar Hayvanlarının Bakım ve Kullanımı için Kılavuz'una uygun olarak yapıldı (20). Çalışma protokolü ve deneysel metod Ankara Üniversitesi Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu tarafından onaylandı. (20.10.2010 tarih ve B.30.2.ANK.0.70.00.00/ sayılı Etik Kurul kararı)

3.2 İR Modeli

Yapılan deneyde; anestezi için, 50 mg/kg dozda ketamin hidroklorür (Ketalar, Pfizer İlaç) ve 5 mg/kg xylazin hidroklorür (Rompun, Bayer İlaç) intramuskuler uygulandı **(Resim 2)**. İşlem, bir ısıtma lambası altında, ratlar supin pozisyonda iken gerçekleştirildi. Ciltleri aseptik olarak hazırlanan ratlara orta hat laparotomi yapıldı **(Resim 3).** Barsakların ıslak gazlı bez yardımıyla uzaklaştırılması ardından, infrarenal abdominal aorta (İAA), dikkatli bir şekilde explore edildi **(Resim 4).** İAA'ya, travmatik olmayan bir mikrovasküler kros-klemp (Micro Clip, Straight, 0.8x6mm GerMedUSA inc.) konuldu **(Resim 5-6).** 60 dakika sonra İAA' daki mikrovasküler klemp kaldırıldı ve 120 dakika süreyle reperfüzyon sağlandı. Aortik

iskemi; klempleme işlemi sırasında distal aortada pulsasyonun kaybolmasıyla, aortik reperfüzyon ise; klempin kaldırılması sonrası distal aortada pulsasyonun geri gelmesiyle onaylandı (20).

SHAM grubunu oluşturacak ratlarda laparotomi ve abdominal aort diseksiyonu eşit sürede (180 dakika) uygulandı ancak bu grupta İR oluşturulmadı. İR dönemlerinde peritoneal boşluktan ısı ve sıvı kaybını en az miktara indirmek için; İAA'ya klemp konulması ve kaldırılması sonrası dönemlerinde, peritoneal boşluğa serum fizyolojik uygulanıp, batın insizyonu geçici olarak ıslak gazlı bez ile sarılarak kapatıldı. Reperfüzyon süresi sonunda; tüm ratlardan, inferior vena cavadan 5 cc'lik enjektör yardımıyla kan alındı **(Resim 7)**. Aynı şekilde, median laparotomi kesisi sağ ve sol inguinal alan distaline ilerletilip, her iki m. adductor magnus ve m. gastroknemius kas doku örnekleri alındı **(Resim 8-9-10).**

Ratlardan alınan kanlar, oda sıcaklığında yarım saat bekletildikten sonra, 5000 rpm'de 10 dakika santrifüj edildi. Rat serum ve plazma örnekleri -70 derecede saklandı. Kas dokusu örnekleri ise alüminyum folyoya sarılarak -70 derecede saklandı.

3.3 Çalışma Grupları

Ratlar her biri 10'arlı 5 gruba ayrıldı ve şu yöntem izlendi.

Grup I **(Sham grubu)**: Diğer gruplara uygulanan cerrahi işlemin stresi ve süresi eşit olacak şekilde laparotomi ve abdominal aort diseksiyonu işlemi uygulandı.

Grup II **(Kontrol grubu)**: Cerrahi işlem olan laparotomi ve abdominal aort diseksiyonu ardından infrarenal aortaya 60 dakika süre ile atravmatik mikrovasküler klemp ile oklüzyonu takiben 120 dakikalık reperfüzyon işlemi uygulandı.

Grup III **(İR + Proantosiyanidin)**: İR'a ek olarak İR öncesi 10 gün boyunca oral yoldan gavaj ile 100mg/kg/gün (1 ml volümde) proantosiyanidin verildi. Son doz deneyden 1 saat önce uygulandı.

Grup IV **(İR + İloprost)**: İR'a ek olarak iloprost (İlomedin®, Bayer Schering Pharma AG, Berlin, Germany) infüzyonu yapıldı. İloprost intravenöz infüzyonu

reperfüzyondan 10 dk. önce başlandı ve reperfüzyon süresince, 100 ng/kg/dk dozunda devam etti.

Grup V **(İR + Proantosiyanidin + İloprost)** : Bu gruba İR'a ek olarak hem proantosiyanidin işlem öncesi oral yoldan verildi, hem de reperfüzyon süresince iloprost infüzyonu yapıldı.

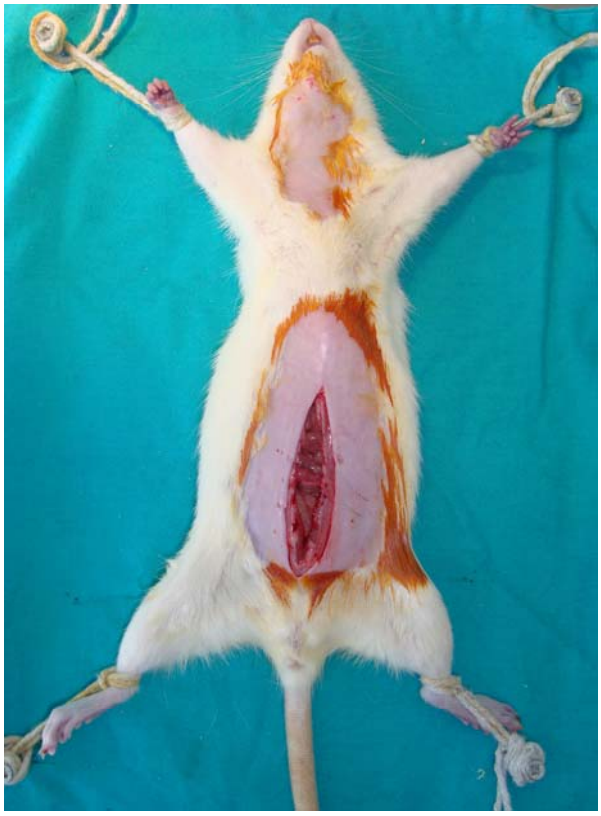
İlaç infüzyonu için; uygun antisepsi sonrası, sağ taraf boyun insizyonu ile cut-down metoduyla, internal juguler vene sarı renkli branül yerleştirildi. **(Resim 11-12)** Her bir rat için 120 dakika içinde verilmesi gereken toplam iloprost miktarı 2 cc serum fizyolojik içerisinde dilue edilip, infüzyon (compact perfusator®, Braun, Germany) internal juguler venden 24 G İV sarı branül yardımıyla yapıldı **(Resim 13)**. Tüm ratlardan; biyokimyasal değerlendirme için iki taraflı gastroknemius, adduktor magnus kas ve venöz kan örneği alındı. Doku ve kan örnekleri alınan ratlar cerrahi sırasında ekssanguinasyon (kanatma veya yüksek miktarda kan alma) yöntemiyle sakrifiye edildi.



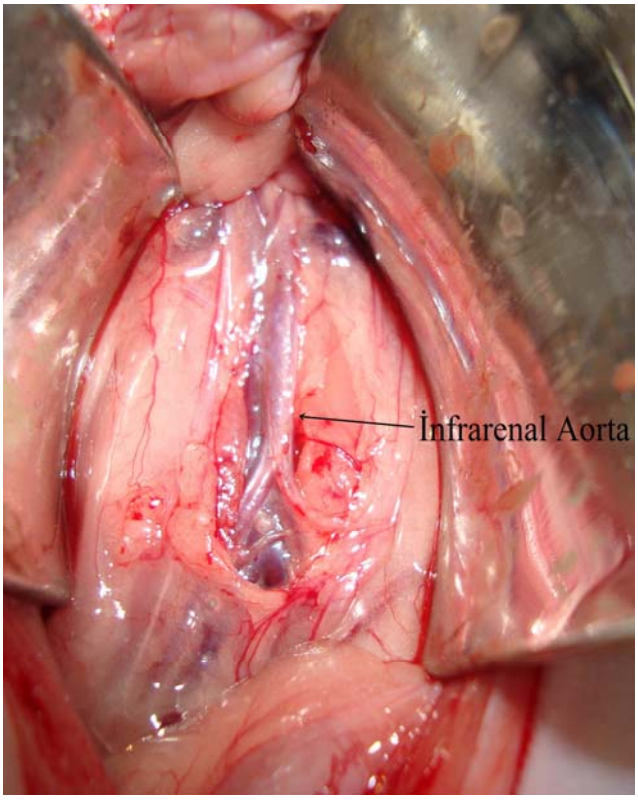
Resim 1



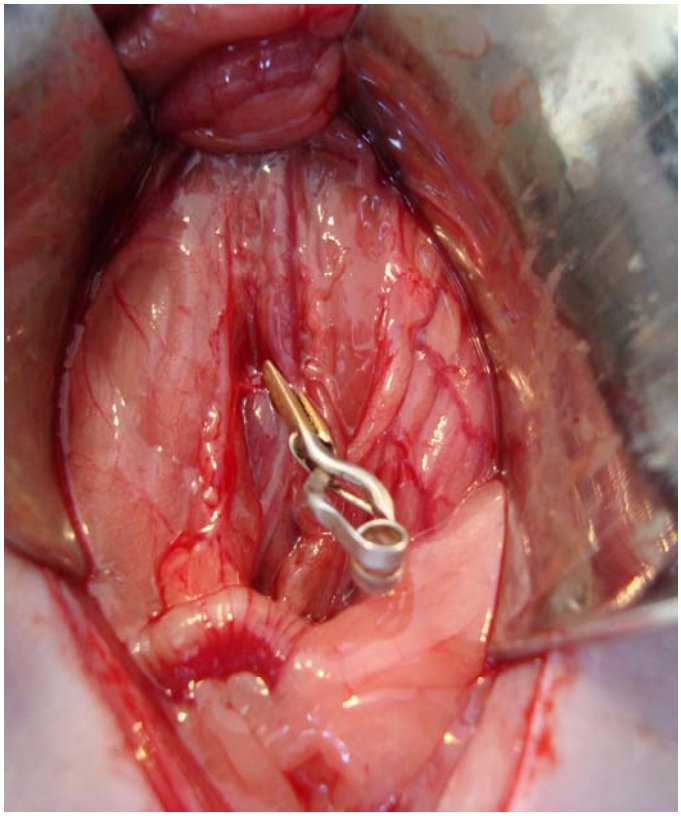
Resim 2



Resim 3



Resim4



Resim 5



Resim 6



Resim 7



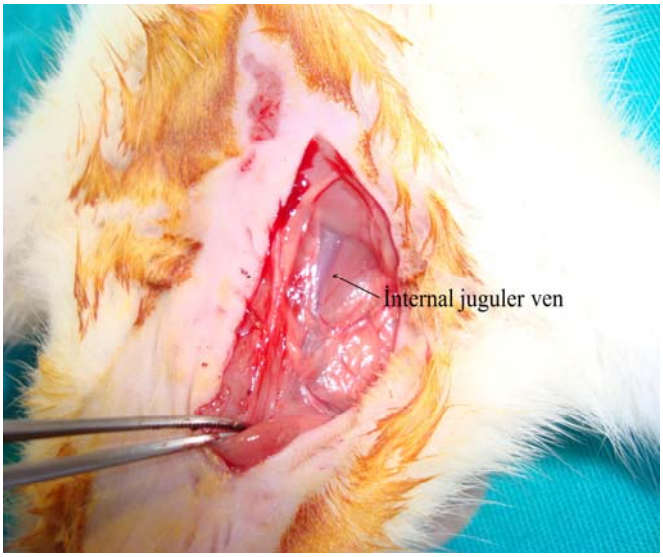
Resim 8



Resim 9



Resim 10



Resim 11



Resim 12



Resim 13

3.4. Biyokimyasal İşlemler

Ratlardan alınan kanlar oda sıcaklığında yarım saat bekletildikten sonra 5000 rpm' de 10 dakika çevrilip plazma ve serumlarına ayrıldıktan sonra -70 derecede saklandı. Kas dokuları da çıkarıldıktan sonra alüminyum folyoya sarılarak -70 derecede saklandı. Sonrasında saklanmış serum, plazma ve doku örnekleri oda sıcaklığına getirilerek, aşağıda belirtilen iskemi reperfüzyon hasarı göstergeleri esas alınarak Biyokimya Anabilim Dalı tarafından ölçüldü.

Ölçülen Parametreler

Kas dokusunda; malondialdehit, glutatyon peroksidaz, ksantin oksidaz, süperoksitdismutaz ve katalaz, venöz kanda ise malondialdehit, glutatyon peroksidaz, kreatinfosfokinaz, D-dimer idi.

Kas dokusu örnekleri Heidolp DiAXX 900 marka homojenizatör ile homojenize edildi (145).

Malondialdehit (MDA) Düzeyi Ölçüm Yöntemi

MDA lipit peroksidasyonunun son ürünlerindendir ve bir oksidasyon belirteci olarak kullanılmaktadır. MDA ile tiyobarbiturik asitin (TBA) oluşturduğu pembe renkli kompleksin 532 nm dalga boyunda verdiği absorbansın ölçülmesi Dahle'nin spektrofotometrik yönteminin temelini oluşturmaktadır. MDA dışındaki bazı maddeler de aynı reaksiyonu verebildiklerinden bunlara TBA ile reaksiyon veren maddeler manasında TBARS denmektedir (145). Ölçümde kullanılan reaktifler:
Fosfat tamponu (pH 6; 100 mM) 2,13 gr Na2 HPO4 (Fischer)ile 11,56 gr KH2PO4 (Merck) tartılıp distile suda çözülüp hacim 1 litreye tamamlanarak hazırlandı. TBA çözeltisi (% 2 w/v) hazırlamak için 200 mg katı TBA (Sigma) 10 ml distile suda çözüldü. Trikloroasetik asit-TCA, % 20 w/v (Merck) 100 gr katı TCA'nın 500 ml 0,6 N HCl'de (Merck) çözülmesiyle hazırlandı. Etil alkol, % 95'lik v/v (Merck).
Ölçüm yönteminde kullanılan protokol aşağıdaki gibidir (145).

	NUMUNE	KÖR
SÜPERNATAN	100 µl	100 µl
ETİL ALKOL (% 95)	1 ml	1 ml

FOSFAT TAMPONU	1 ml	1 ml
TCA	1 ml	1 ml
TBA	1 ml	---

30 dakika kaynar suda inkübe edilen deney tüpleri daha sonra 20 dakika süreyle 6000 x g santrifüj edildi. Spektrofotometrik ölçüm esnasında kör tüplerine 1 ml TBA çözeltisi konuldu, tüm numune ve kör tüplerindeki çözeltilerin absorbansları 532 nm dalga boyunda distile suya karşı ölçüldü. Hesaplamada MDA standardının verdiği absorbanstan yararlanıldı (145). Tetraetoksipropan MA: 220,3; d=0,92; % 96 (Fluka) MDA standardı olarak kullanıldı.Tetraetoksipropan (TEP) molaritesinin hesaplanması: Yoğunluğu (d) 0,92 olduğundan 1 litresi 920 gr dır , % 96'lık bir çözelti olmasından dolayı 883,2 gramı TEP'dır. MA 220,3 olduğu için 1 litre TEP stok çözeltisinde 4 mol TEP mevcuttur, bu durumda molaritesi 4 M'dir. Stok çözelti etil alkolle 400.000 kat seyreltilip 10 μM MDA standardı elde edildi daha sonra bu standart kullanılarak deney protokolü uygulandı. Standardın OD'si 0,152 ve standart körünün OD'si de 0,090 ölçüldü. Sonuçta ΔOD(St) 0,062 bulundu. Numunenin OD'sinden körün OD'si çıkarılarak ΔOD(Nm) hesaplandıktan sonra aşağıdaki formül yardımıyla MDA konsantrasyonu hesaplandı (145).

ΔOD(Standart) / ΔOD(Numune) = C(Standart) / C(Numune)

C(Numune) = ΔOD(Numune) x C(Standart) / ΔOD(Standart)

C(Numune) = ΔOD(Numune) x 10 μM (MDA) / 0,062

C(Numune) = ΔOD(Numune) x 161,3 μM (MDA) x 50 (Seyreltme faktörü) = nmol/ml (MDA)

Ksantin Oksidaz (XO) Aktivitesi Ölçüm Yöntemi

Bu yöntemin esası ksantinden ksantin oksidaz enzimi yardımıyla ürik asit oluşumu ve oluşan ürik asitin 293 nm dalga boyunda spektrofotometrik olarak ölçülmesidir. Oluşan ürik asitin absorbansı XO aktivitesiyle doğru orantılıdır (146). Reaktifler aşağıdaki gibidir:

Fosfat tamponu (pH 7,5; 50 mM fosfat; 0,5 mM EDTA) 0,5 gr KH2 PO4, 3 gr Na2 HPO4 ve 93 mg EDTA (Disodyum tuzu, dihidrat) tartılıp distile suda çözüldükten sonra toplam hacim 500 ml'ye tamamlandı. Ksantin çözeltisi (2 mM) 7,6 mg katı ksantin 25 ml fosfat tamponunda çözülerek hazırlandı (146).

FOSFAT TAMPONU 2,8 ml
KSANTİN ÇÖZELTİSİ 0,1 ml
SÜPERNATAN 0,1 ml

Çözeltinin absorbansı kuartz küvet kullanılarak 293 nm de distile suya karşı ölçüldü. Çözeltiler oda sıcaklığında inkübe edilip 1 ve 24 saat sonra tekrar ölçüm yapıldı. Enzim aktivitesi, ürik asitin molar absorpsiyon katsayısı ve ölçüm değerleri arasındaki fark (ΔOD) kullanılarak hesaplandı. XO aktivitesi aşağıdaki formül yardımıyla hesaplandı (146).

XO aktivitesi (mIU/ml) = (ΔOD/dakika) x F x 50 (Seyreltme faktörü)

Bu çalışmadaki F değeri 3000 alındı.

Glutatyon Peroksidaz (GSH-Px) Aktivitesi Ölçüm Yöntemi

Bu yöntem GSH (indirgenmiş glutatyon) ile H2O'in GSH-Px enziminin etkisiyle su ve GSSG'e (yükseltgenmiş glutatyon) çevrilmesini takiben GSH redüktaz enziminin GSSG miktarına bağlı olarak NADPH yi okside etmesi temeline dayanır. Reaksiyonda GSSG oluştuğu sürece NADPH yükseltgenip NADP'ye dönüşür. 340 nm dalga boyundametrik olarak NADPH absorbansının düşmesinin takibiyle GSHPx aktivitesi belirlenir (147).

Analizde kullanılan reaktiflerin hazırlanışı:

Fosfat Tamponu (pH 7; 50 mM fosfat; 5,6 mM EDTA) 4,2 gr Na H2PO4 ile 2,72 gr KH2PO4 ve 2,08 gr EDTA (Disodyum tuzu, dihidrat) 1 litre distile suda çözülerek hazırlandı. GSH çözeltisi 250 mg katı GSH (Sigma) 5 ml fosfat tamponunda çözülerek elde edildi. NADPH (Sigma) 15 mg tartılıp 2,5 ml fosfat tamponunda çözüldü. GSH Redüktaz çözeltisinden (Sigma) 10 µl alınıp 1 ml 3,2 M amonyum sülfatta seyreltildi. 5 ml fosfat tamponunda 65 mg sodyum azid (Merck) tartılıp çözüldü. H2O stok çözeltisinden ,% 30 w/w (Merck) 15 µl alınıp 5 ml fosfat tamponunda çözüldü (147).

Deney protokolü şöyledir:

FOSFAT TAMPONU 2,5 ml
GSH 100 µl
NADPH 50 µl
GSH REDÜKTAZ 100 µl

SODYUM AZİD 100 µl

SÜPERNATAN 100 µl

340 nm dalga boyunda fosfat tamponuyla spektrofotometre sıfırlandı, maddeler kuartz küvete konulur ve sonra 1 dakika süreyle absorbans izlendi. Çıkan sonuç kör değeriydi. Aynı küvete 100 µl H2O eklenip 1 dakika daha izlenir, elde edilen sonuç numune değeri oldu. İki değer arasındaki fark (ΔOD) GSH-Px aktivitesiyle doğru orantılıdır. Enzimin aktivitesinin hesaplanmasında ΔOD ve NADPH'ın molar absorpsiyon katsayısı kullanıldı. GSH-Px aktivitesinin hesaplanmasında aşağıdaki formül kullanılarak ve F değeri 4800 alındı (147).

GSH-Px aktivitesi (mIU/ml)=(ΔOD/dk.) x F x 50 (Seyreltme Faktörü)

Katalaz (CAT) Aktivitesi Ölçüm Yöntemi

Yöntem, CAT enzimi tarafından kataliz edilen reaksiyon sırasında hidrojen peroksitin 240 nm dalga boyunda verdiği absorbansın azalması ve bu azalmanın spektrofotometrik olarak takip edilmesine dayanır (148). Absorbans değerindeki dakikalık azalma hızı enzimin aktivitesiyle doğru orantılıdır.

Reaktifler aşağıdaki şekilde hazırlandı:

Fosfat tamponu (pH 7; 50 mM) Na2HPO4 ve KH2 PO4 kullanılarak hazırlandı. H2O2 (Merck) stok çözeltisinden (% 30 v/v) 0,2 ml alınıp 100 ml fosfat tamponu (pH 7; 50 mM) ile seyreltilerek çalışmada kullanılan H2O çözeltisi elde edilmiştir. Kuartz küvete 0,01 ml fosfat tamponu (pH 7; 50 mM); 2,99 ml H2O2 çözeltisi ve 0,01 ml süpernatan konularak distile suya karşı 240 nm dalga boyunda absorbansın dakika izlenmesi protokolü uygulanmıştır (148). H2O2'in molar absorbsiyon katsayısı ve sürenin sonundaki absorbans farkı (ΔOD) kullanılarak CAT aktivitesi hesaplanmıştır. CAT enzim aktivitesi aşağıdaki formülle hesaplanmıştır.

Süperoksit Dismutaz (SOD) Aktivitesi Ölçüm Yöntemi

Yöntem, ksantin-ksantin oksidaz sistemi tarafından meydana getirilen süperoksit radikalinin SOD enzimi tarafından ortadan kaldırılamadığında reaksiyon ortamında bulunan nitroblue tetrazolium (NBT) bileşiğinin indirgenmesi temeline dayanır (149). İndirgenmiş NBT 560 nm dalga boyunda en uygun absorbansı veren menekşe rengi oluşumuna yol açar. Ortamda SOD aktivitesi mevcutsa bu rengin

oluşumu önlenecektir. Buna göre SOD enzim aktivitesi (1 U), NBT'nin indirgenmesini % 50 inhibe eden enzim miktarıdır.

Analizde kullanılan reaktifler:

Reaktif 1 (Toplam hacim 490 ml): Ksantin (Sigma) 9,1 mg alınıp toplam hacim 200 ml olacak biçimde distile suda birkaç damla 1 N NaOH ile çözüldü. NBT (Sigma) 12,3 mg alınıp distile su ile 100 ml ye tamamlandı. EDTA -Disodyum tuzu, dihidrat (Merck) 25 mg alınıp distile suyla 100 ml ye tamamlandı. Na2CO3 (Merck) 2,54 gr alınıp distile suyla 60 ml ye tamamlandı. Bovin (sığır) albümin (Sigma) 30 mg alınıp distile suyla 30 ml ye tamamlanıp çözüldü. Ksantin oksidaz –XO (Sigma) çözeltisi için 10 µl XO 1 ml 3,2 M amonyum sülfatta (Merck) çözülür. CuCl2 (Merck) çözeltisi 108 mg CuCl tartıldıktan sonra 100 ml distile suda çözülerek hazırlandı (149).

	NUMUNE	KÖR
REAKTİF 1	2,75 ml	2,75 ml
SÜPERNATAN	100 µl	--
XO	50 µl	50 µl

Oda sıcaklığında 20 dakika inkübe edilir. Aşağıdaki şekilde devam edildi.

CuCl2	100 µl	100 µl
SÜPERNATAN	---	100 µl

Kör ve numunenin absorbansları 560 nm dalga boyunda distile suya karşı okundu. Elde edilen absorbans değerleri aşağıdaki formülde yerine konularak SOD aktivitesi hesaplandı (149).

SOD aktivitesi (U/ml)=[(KörOD-NumuneOD)/Kör] x F x 50 (Seyreltme faktörü) Bu çalışmadaki hesaplamalarda F değeri 20 alınmıştır.

Kreatin fosfokinaz (CPK) ölçümü (serum)

CPK ölçümleri İbni Sina Hastanesi Merkez Biyokimya Laboratuarları'nda Beckman Coulter Unicel DxC 800 marka cihaz ile, 340 nm dalga boyunda, NAC Activated ölçüm yöntemi ile spektrofotometrik olarak yapıldı (148).

D-Dimer ölçümü (plazma)

D-Dimer ölçümleri İbni Sina Hastanesi Merkez Biyokimya Laboratuarları' nda ACL TOP 500 marka cihaz ile latex enhanced immunoassay tekniği ile kantitatif olarak yapıldı (144).

3.5. İstatistiksel Analiz

İstatistiksel analiz Biyoistatistik Bilim Dalı tarafından yapıldı. İstatistiksel analizin yapılmasında bilgisayar programı olarak SPSS15 kullanıldı. Sayısal değişkenler 'ortalama +/- standart sapma şeklinde sunuldu. P değerinin 0.05'den küçük olması istatistiksel olarak anlamlı kabul edildi. Biyokimyasal bulguların istatistiksel değerlendirilmesinde gruplar arasındaki anlamlı farkların belirlenmesinde Kruskal-Wallis testi kullanıldı.

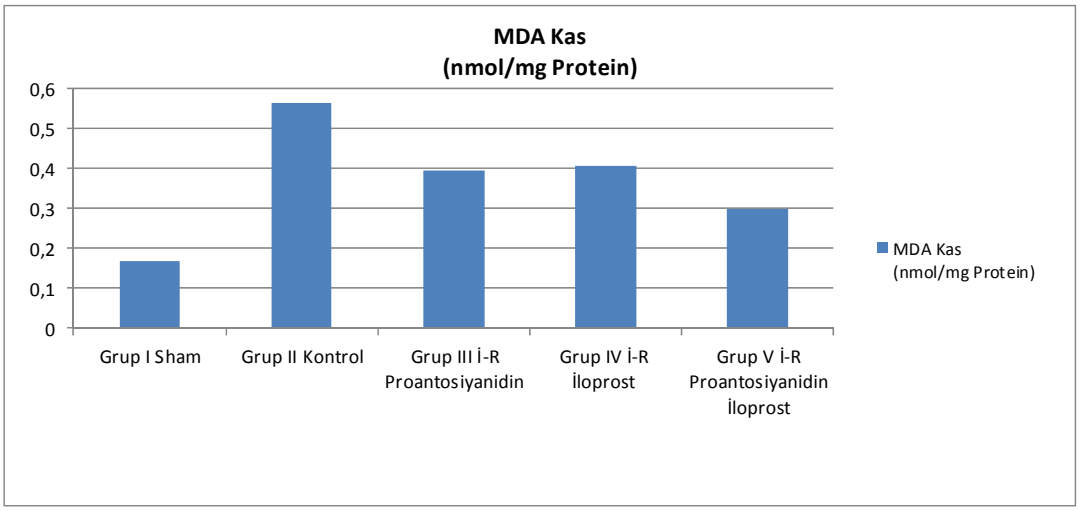
4. BULGULAR

Tablo 1: Gruplara göre biyokimyasal sonuçların ortalama ve standart sapma değerleri.

	Grup I	Grup II	Grup III	Grup IV	Grup V
MDA Kas (nmol/mg Protein)	0.170 ± 0.056	0.564 ± 0.062	0.396 ± 0.057	0.405 ± 0.061	0.299 ± 0.067
MDA Serum (nmol/mL)	1.371 ± 0.689	3.750 ± 0.461	2.976 ± 0.633	2.994 ± 0.607	2.121 ± 0.346
XO Kas (microIU/mg Protein)	29.454 ± 3.612	45.330 ± 2.305	40.037 ± 2.888	40.203 ± 4.420	34.528 ± 2.751
CAT Kas (IU/mg Protein)	3.880 ± 0.482	7.820 ± 0.553	7.860 ± 0.481	5.340 ± 0.353	4.940 ± 0.422
SOD Kas (U/mg Protein)	8.092 ± 1.985	17.345 ± 1.258	14.311 ± 0.761	15.642 ± 0.564	10.916 ± 1.015
GSH-Px Kas (mIU/mg Protein)	6.950 ± 2.276	17.909 ± 1.85	12.773 ± 1.263	13.811 ± 2.023	9.809 ± 2.474
GSH-Px Serum (mIU/mL)	268.320 ± 47.054	521.600 ± 42.369	471.360 ± 35.519	396.240 ± 37.759	410.400 ± 68.342
Kreatin Kinaz Serum (IU/L)	389.20 ± 180.50	2074.29 ± 1128.08	2171.57 ± 882.71	2400.00 ± 1579.61	2433.22 ± 901.385
D-Dimer Plazma (ng/mL)	40.00 ± 22.49	233.40 ± 40.70	217.20 ± 31.745	228.60 ± 36.345	248.00 ± 45.453

Grup II (kontrol) ile grup I (sham) karşılaştırıldığında MDA düzeylerinin anlamlı düzeyde arttığı görüldü ($p<0,05$). Grup III ve grup IV'ün grup II ile karşılaştırılmasında ise MDA düzeylerinde azalma saptanmasına rağmen bu fark istatistiksel olarak anlamlı değildi ($p>0,05$). Fakat grup V'te kontrol grubuna göre anlamlı azalma saptandı ($p<0,05$). Grup V ve grupIII-IV arasındaki fark istatistiksel olarak anlamlı değildi ($p>0,05$). (Grafik 1)

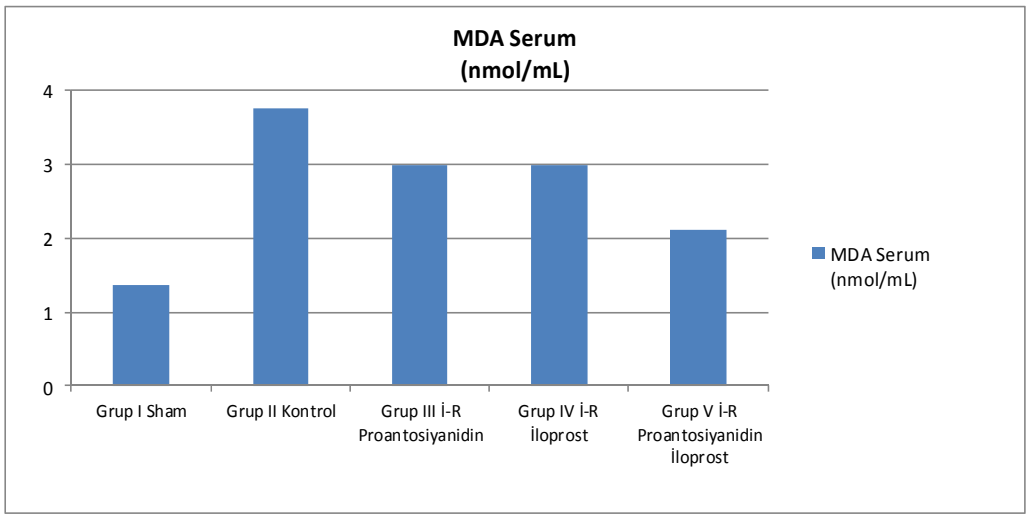
a) MDA (kas):



Grafik 1: MDA(kas)'nın gruplar arası değerlerinin grafiksel analizi.

Grup I ile karşılaştırıldığında grup II'de MDA (serum) düzeylerinde istatistiksel olarak anlamlı bir artış mevcuttu ($p<0,05$). Grup II ile karşılaştırıldığında grup III ve grup IV'te MDA (serum) düzeylerinde azalma olmasına rağmen her iki grupta da istatistiksel olarak anlamlı değildi ($p>0,05$). Grup V'teki değerler, grup III ve grup IV'e göre daha düşüktü fakat anlamlı değildi ($p>0,05$). Grup V'te ise grup II'ye göre istatistiksel olarak anlamlı bir azalma saptandı ($p<0,05$).
(Grafik 2)

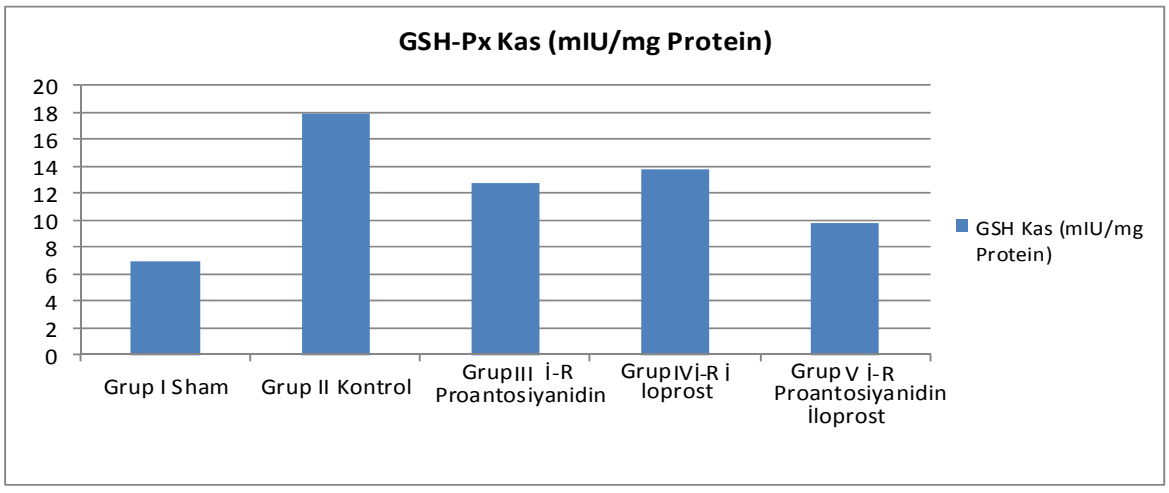
b) MDA (serum)



Grafik 2: MDA (serum)'ın gruplar arası değerlerinin grafiksel analizi.

Grup I ile karşılaştırıldığında grup II'de GSH-Px düzeylerinde istatistiksel olarak anlamlı bir artış mevcuttu ($p<0,05$). Grup III ve grup IV'ün grup II ile karşılaştırılmasında ise GSH-Px düzeylerinde azalma saptanmasına rağmen bu fark istatistiksel olarak anlamlı değildi ($p>0,05$). Grup V'te ise grup II'ye göre istatistiksel olarak anlamlı bir azalma saptandı ($p<0,05$). Grup V'teki değerler, grup III ve grup IV'e göre daha düşüktü fakat anlamlı değildi ($p>0,05$). (Grafik 3)

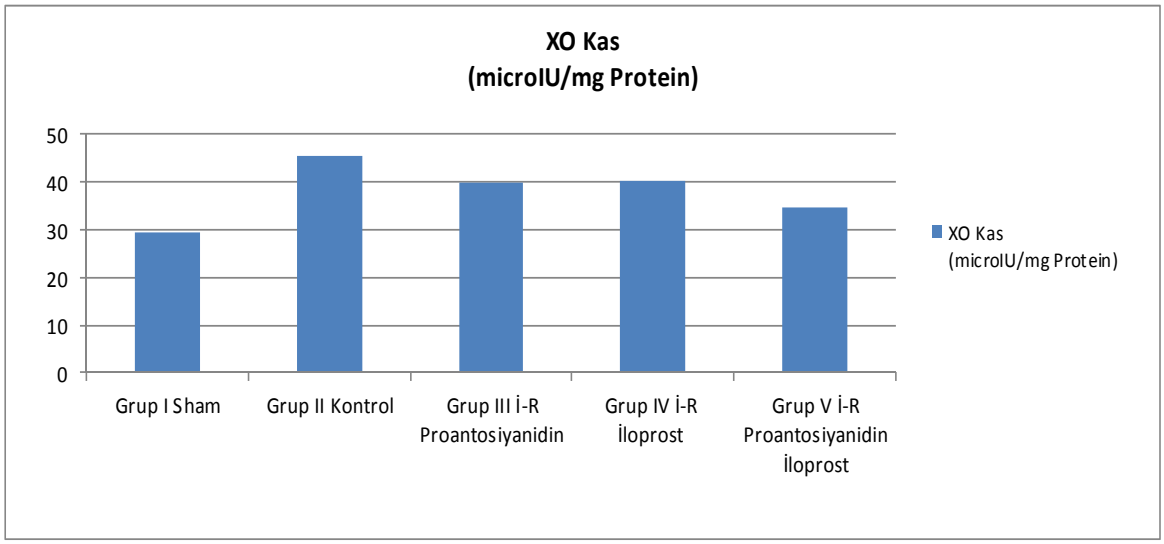
c) GSH-Px (kas)



Grafik 3: GSH-Px (kas)'ın gruplar arası değerlerinin grafiksel analizi.

Grup I ile karşılaştırıldığında grup II'de XO düzeylerinde istatistiksel olarak anlamlı bir artış mevcuttu ($p<0,05$). Grup III ve grup IV'ün grup II ile karşılaştırılmasında ise XO düzeylerinde azalma saptanmasına rağmen bu fark her iki grupta da istatistiksel olarak anlamlı değildi ($p>0,05$). Grup V'te ise grup II'ye göre istatistiksel olarak anlamlı bir azalma saptandı ($p<0,05$). Grup V'teki değerler, grup III ve grup IV'e göre daha düşüktü fakat anlamlı değildi ($p>0,05$). (Grafik 4)

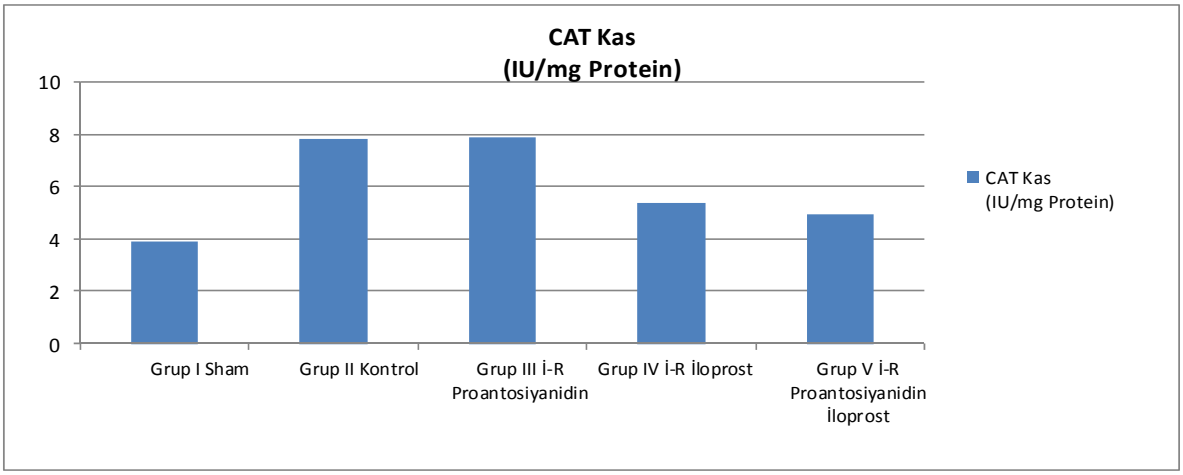
d) XO(kas)



Grafik 4: XO (kas)'ın gruplar arası değerlerinin grafiksel analizi.

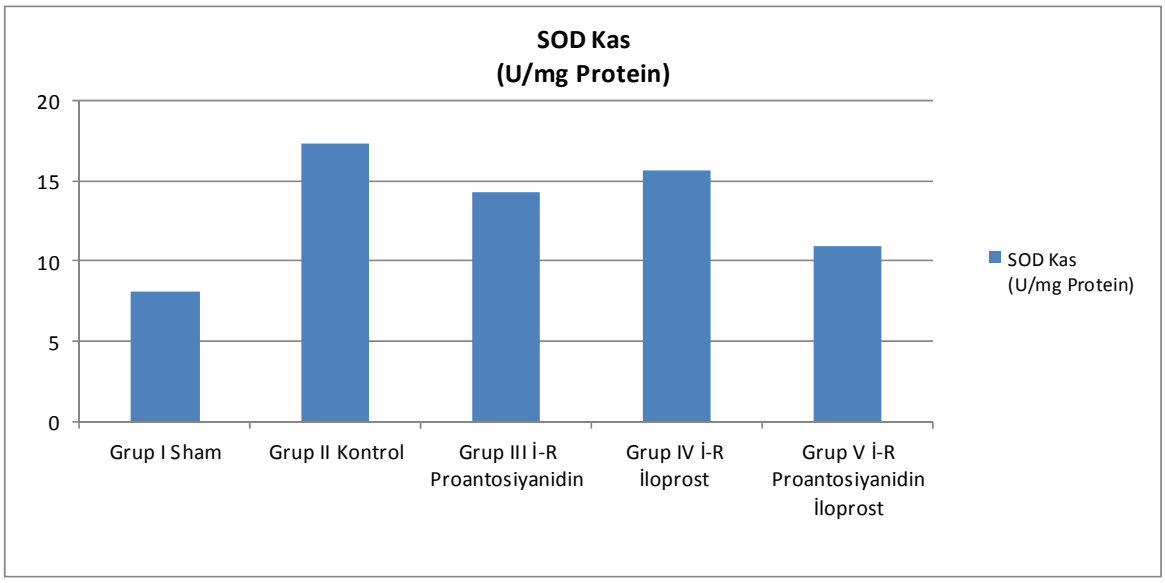
Grup I ile karşılaştırıldığında grup II'de CAT düzeylerinde istatistiksel olarak anlamlı bir artış mevcuttu ($p<0,05$). Grup II ile karşılaştırıldığında grup III'ün değerleri grup II'ye benzerdi. Grup IV'te ise grup II ile karşılaştırıldığında CAT düzeylerinde azalma olmasına rağmen bu istatistiksel olarak anlamlı değildi ($p>0,05$). Grup V'teki azalma ise grup II ve grup III'e göre anlamlıydı ($p<0,05$). Grup IV ile grup V arasındaki fark ise anlamlı değildi ($p>0,05$). (Grafik 5)

e) CAT (kas)



Grafik 5: CAT (kas)'ın gruplar arası değerlerinin grafiksel analizi.

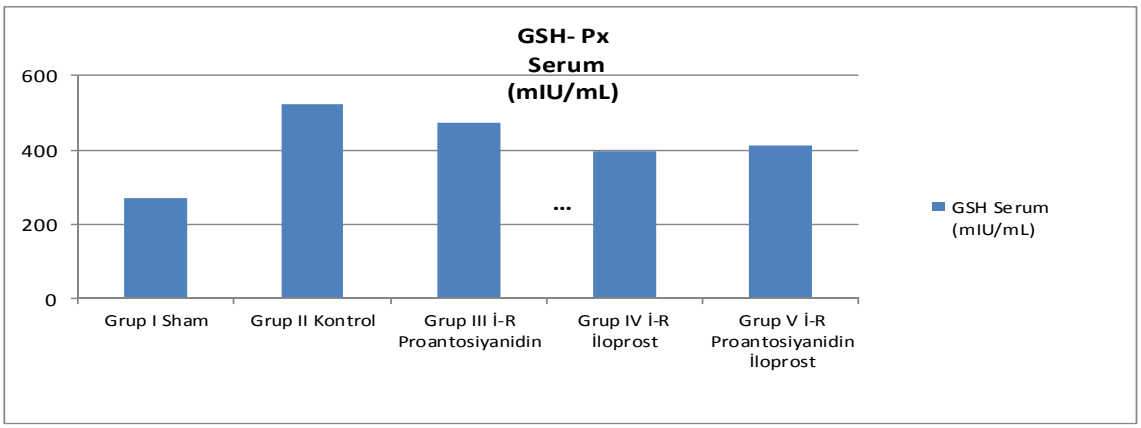
f) SOD (kas)



Grafik 6: SOD (kas)'ın gruplar arası değerlerinin grafiksel analizi.

Grup I ile karşılaştırıldığında grup II'de SOD düzeylerinde istatistiksel olarak anlamlı bir artış mevcuttu ($p<0,05$). Grup II ile karşılaştırıldığında grup III ve grup IV'te SOD düzeylerinde azalma olmasına rağmen her iki grupta da istatistiksel olarak anlamlı değildi ($p>0,05$). Grup V'teki azalma ise hem grup II, hem de grup IV'ten istatistiksel olarak anlamlıydı ($p<0,05$). (Grafik 6)

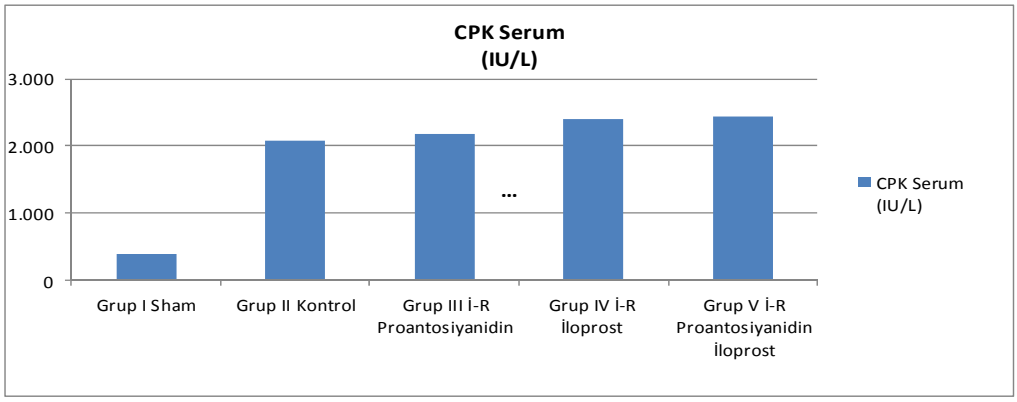
g) GSH –Px (serum)



Grafik 7: GSH (serum)'ın gruplar arası değerlerinin grafiksel analizi.

Grup I ile karşılaştırıldığında grup II'de GSH -Px(serum) düzeylerinde istatistiksel olarak anlamlı bir artış mevcuttu ($p<0,05$). Grup II ile karşılaştırıldığında grup III ve grup V'te GSH-Px (serum) düzeylerinde azalma olmasına rağmen her iki grupta da istatistiksel olarak anlamlı değildi ($p>0,05$). Sadece iloprostun kullanıldığı grup IV'te ise kontrol grubuna göre anlamlı bir azalma saptandı ($p<0,05$). (Grafik 7)

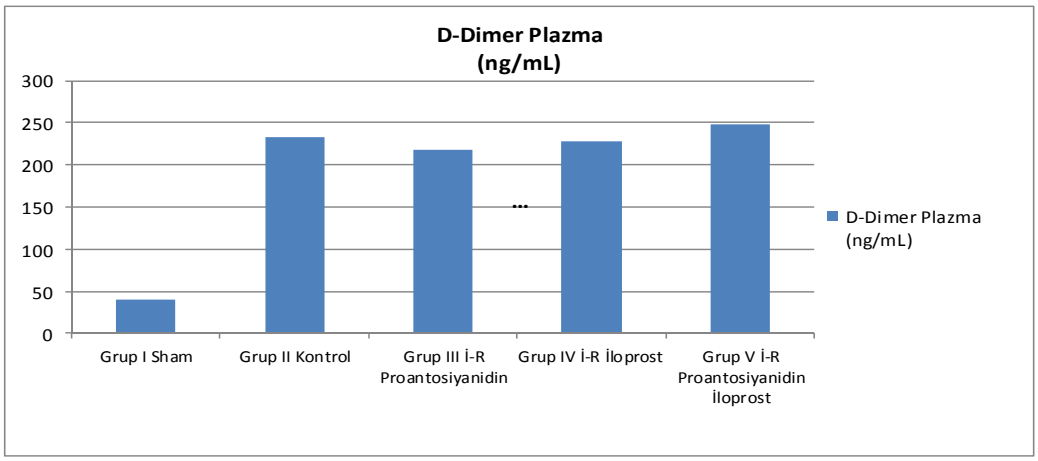
h) CPK (serum)



Grafik 8: CPK (serum)'ın gruplar arası değerlerinin grafiksel analizi.

Grup I ile karşılaştırıldığında grup II'de CPK (serum) düzeylerinde istatistiksel olarak anlamlı bir artış mevcuttu ($p<0,05$). Grup III, grup IV ve grup V'de ise CPK (serum) düzeyleri yüksekti ve grup II'ye benzerdi ayrıca istatisitksel olarak fark yoktu ($p>0,05$).

i) D-Dimer (plazma)



Grafik 9: D-Dimer (plazma)'ın gruplar arası değerlerinin grafiksel analizi.

Grup I ile karşılaştırıldığında grup II'de D-Dimer (plazma) düzeylerinde istatistiksel olarak anlamlı bir artış mevcuttu ($p<0,05$). Grup III, grup IV ve grup V'de ise D-Dimer (plazma) düzeyleri yüksekti ve grup II'ye benzerdi ayrıca istatisitksel olarak fark yoktu ($p>0,05$).

5. TARTIŞMA

Çalışmamızda; ratlarda infrarenal abdominal aorta oklüzyonu ile deneysel İR modeli oluşturuldu ve oluşan İR hasarına karşı iloprost ve proantosiyanidin'in etkisi araştırıldı. Çalışmada oksidan ürünler (MDA, XO), antioksidan enzim seviyeleri (CAT, SOD, GSH-Px) ve doku yıkım ürünleri (CPK, D-Dimer) değerlendirildi.

MDA, poliansatüre yağ asitlerinin peroksidasyonu sonucu oluşan stabil bir sonüründür. Doku İR hasarında, XO enzimi, mitokondriyal oksidasyon, siklooksijenaz aracılı doymamış yağ asidi oksidasyonu, katekolamin oksidasyonu, sitokrom p 450 aracılı oksidasyon, lökosit NADPH oksidaz aktivasyonu, demir salınımı ve redoks siklusu lokal ve sistemik serbest oksijen radikal oluşumuna katkıda bulunur (1, 3). Bununla birlikte her doku için baskın sistem farklıdır. Artmış serbest oksijen radikalleri (özellikle hidroksil radikali), hücre zarı fosfolipidlerinin (araşidonik asit, linoleik asit ve linolenik asit gibi çoklu doymamış yağ asitleri) peroksidasyonuna neden olarak hücre zarı bütünlüğünde bozulma, hücre şişmesi ve araşidonik asit / lipidperoksil salınımına neden olur. Bu süreçte, zincirleme bir serbest oksijen ve yağ asidi radikali oluşumu ile ilerleyici hücre zarı hasarı gerçekleşir (1, 3). Dolayısıyla, bu kısır döngü sırasında meydana gelen ve stabil bir molekül olan MDA düzeyi ölçümü ile reaktif oksijen türevleri ve membran hasarı derecesi hakkında fikir sahibi olunabilinir (150).

XO, canlı sistemde SOR oluşturan başlıca enzimatik kaynaklardan biridir. XO, pürin katabolizmasında bir ara bileşik olan hipoksantini önce ksantine daha sonra da ürik aside okside ederken NAD 'ye elektron transferini gerçekleştiren bir dehidrogenaz enzimi olmasına karşın, dokuda belli stres koşulları altında tiyol gruplarını okside eden ve proteolizise neden olan bir oksidaz enzimine dönüşür. XO'ın faaliyeti sonucunda süperoksit anyonu ve hidroperoksit radikalleri oluşmaktadır. XO'ın doku ödemi, iskemi, damar geçirgenliğinde değişkenlik gibi oksidatif hasarlara neden olduğu bilinmektedir. Tüm iskemi reperfüzyon modellerinde, plazma XO artışı ile uzak organ hasarı arasında korelasyon saptanmıştır. Yine XO düzeyi ölçümünün İR sonrası oksidatif hasarın derecesinin saptanmasında yardımcı olacağı düşünülmektedir. (150).

Çalışmamızda, İR sonrası kas dokusu ve serumda MDA, kas dokusunda XO değerlerinin anlamlı derecede yükseldiği görüldü. Benzer şekilde, I-R sonrası MDA düzeylerinin yükseldiğini gösteren deneysel çalışmalar vardır (142,61,151,152). İR+proantosiyanidin ve İR+iloprost grubundaki MDA (kas , serum) düzeylerinin, kontrol grubundaki düzeye göre düşük olduğunu bulduk. İR+ proantosiyanidin+iloprost grubunda ise kontrol grubuna göre anlamlı bir azalma mevcuttu. Benzer şekilde, iloprost ve vitamin C'nin rat alt ekstremite İR sonrası akciğer hasarına olan etkisinin araştırıldığı bir çalışmada, İR+iloprost grubunda MDA düzeylerinin kontrol grubundaki düzeylere göre anlamlı derecede azaldığını bulunmuştur. (142). İloprost'un deneysel aortik İR modelinde iskelet kası hasarına olan etkisinin araştırıldığı bir çalışmada ise, İR+iloprost grubuna ait MDA değerlerinin kontrol grubundaki değerlere göre anlamlı düzeyde azaldığı bulunmuştur (61). Köpeklerde deneysel kardiyopulmoner bypass modelinde kardiyoplejik solüsyon ile birlikte iloprost verilmesinin miyokard performansına olan etkisinin araştırıldığı çalışmada da iloprost grubunda kontrol grubuna göre plazma MDA düzeyinde anlamlı düşüş saptanmıştır (151). Alt ekstremite iskemi reperfüzyonunun böbrekler üzerindeki uzak organ hasarında iloprost ve vitamin C'nin etkisinin araştırıldığı bir çalışmada, İR+ iloprost grubunda, serum ve böbrek dokusu MDA ve XO düzeylerinin anlamlı olarak azaldığı saptanmıştır (152). Tavşan alt ekstremite İR hasarında iloprost ve pentoksifilinin etkisinin değerlendirildiği bir çalışmada, iloprost ile MDA düzeylerinde anlamlı azalma saptanmıştır (139). Başka bir çalışmada ise İR'nun rat overleri üzerindeki hasarında iloprost verilen grupta kontrol grubuna göre doku MDA seviyelerinde azalma şaptamışlar (153). Bunun yanında, Köksel ve ark, rat İR modelinde, serum MDA düzeyleri bakımından İR ve İR+iloprost grupları arasında anlamlı fark saptamamışlardır (154).

Wei ve ark.'nın böbrek dokusundaki İR hasarında proantosiyanidinin etkisini değerlendirdikleri çalışmada doku MDA düzeylerinde kontrol grubuna göre anlamlı azalma saptanmıştır (155). Başka bir çalışmada yine renal İR hasarında proantosiyanidinin etkisi değerlendirilmiş ve proantosiyanidin verilen grupta doku MDA düzeyleri anlamlı olarak düşük bulunmuştur (156). Hepatik İR hasarında proantosiyanidinin etkisinin araştırıldığı bir çalışmada da kontrol grubu ile karşılaştırıldığında, tedavi grubundaki MDA düzeylerinde anlamlı azalma

saptanmıştır (157). Mezenterik İR'un uzak organ hasarı üzerine proantosiyanidinin etkisinin araştırıldığı başka bir çalışmada ise, intestinal, pulmoner, hepatik, renal dokularda MDA düzeylerini, tedavi grubunda kontrol grubuna göre anlamlı olarak düşük bulunmuştur (158). Proantosiyanidinin İR hasarında kardiyak koruyucu etkisinin araştırıldığı başka bir çalışmada proantosiyanidin verilen grupta MDA düzeylerinin anlamlı olarak azaldığı saptanmıştır (83).

Çalışmamızda, İR+iloprost ve İR+proantosiyanidin grubundaki kas dokusu ve serumda MDA, kas dokusunda XO değerinin İR grubuna göre düşük olmasının benzer çalışmaların sonuçları ile paralellik içinde olduğu görülmektedir. Ayrıca her iki ilacın beraber kullanıldığı İR+proantosiyanidin +iloprost grubundaki değerler, İR grubuna göre anlamlı olarak düşük saptanmıştır. MDA ve XO değerlerinin kontrol grubuna göre düşük olması, iloprostun ve proantosiyanidinin İR sonrası lipid peroksidasyonu miktarını ve SOR oluşumunu azalttığını düşündürmektedir.

İR hasarı oluşumunda serbest oksijen radikalleri önemli bir yer tutar.
İskemik dokuların reperfüzyonu, toksik SOR oluşumuna yol açar. Bunlar süperoksit anyonlar, hidroksil radikalleri, hipoklorik asit, hidrojen peroksit ve nitrik oksitten derive peroksinitrittir. Oksijen kökenli serbest radikaller aracılığı ile oluşan hasarda başlangıç olay ksantin oksidaz kökenli süperoksitanyonlarının üretilmesidir (22). Serbest radikal temizleyicileri, reaktif oksijen parçaları ile reaksiyona girerek bunları zararsız maddeler haline dönüştüren ajanlardır. Bu ajanlar SOD, CAT ve GSH-Px olarak sıralanabilir. İnsanlarda SOD' ın Cu-Zn ve Mn kapsayan iki izoenzimi vardır. Cu-Zn içeren tipi sitozolde, Mn içeren tipi mitokondride yerleşmiştir. SOD, süperoksitin hidrojen perokside dönüşümünü
Katalizler. Katalaz enzimi; SOD tarafından oluşturulan hidrojen peroksiti peroksizomlarda su ve oksijene çevirir. CAT vücutta doğal olarak oluşan bir metalloproteindir. İn vivo olarak süperoksit dismutaz ile kombine bir şekilde etki eder. GSH-Px; hidrojen peroksit varlığında, redükte glutatyonun okside glutatyona yükseltgenmesini katalize eder. Ayrıca SOD tarafından oluşturulan hidrojen peroksiti mitokondri ve sitoplazmada su ve oksijene indirger (159).

Çalışmamızda, İR sonrası kas dokusunda SOD, CAT, GSH-Px ve serumda GSH-Px antioksidan enzim seviyelerinin anlamlı düzeyde yükseldiği saptandı.

Ancak İR+proantosiyanidin ve İR+iloprost grubunda, kas dokusu SOD, GSH-Px ve serum GSH-Px düzeyleri kontrol (İR) grubundaki düzeylere göre düşüktü. Bununla birlikte İR+proantosiyanidin grubundaki kas dokusu CAT düzeyleri ise kontrol grubuna benzer sonuçlandı. İR+ proantosiyanidin+iloprost grubunda ise kas dokusu SOD, CAT, GSH-Px değerlerinde kontrol grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı bir azalma görüldü. Bu gruptaki serum GSH-Px değerleri ise İR+ iloprost grubu ile benzerdi. Çalışmamızda kas dokusundaki İR hasarında iloprost ve pronantosiyanidin ile antioksidan enzimlerde bir azalma meydana geldiği saptandı.

Alt ekstremite İR hasarının böbrek üzerindeki uzak organ hasarında iloprostun etkisinin araştırıldığı bir çalışmada, İR grubuna göre, İR+iloprost grubunda doku SOD düzeylerinde anlamlı azalma saptamışlardır (160). Başka bir çalışmada, mezenterik İR'un uzak organ hasarı üzerine proantosiyanidinin etkisi araştırılmış, İR grubu ile karşılaştırıldığında, İR+ proantosiyanidin grubunda intestinal, pulmoner, hepatik, renal dokularda SOD ve GSH-Px değerlerinde anlamlı azalma saptanmıştır (158). Buna karşılık, başka bir çalışmada hepatik İR hasarında, kontrol grubu ile karşılaştırıldığında İR+iloprost grubunda doku SOD, CAT, GSH-Px değerlerini yüksek olarak saptanmıştır (161). Wei ve ark.'nın böbrek dokusundaki İR hasarında proantosiyanidinin etkisini değerlendirdikleri çalışmalarında sham grubu ile karşılaştırıldığında İR grubunda doku SOD, CAT, GSH-Px değerlerinde azalma mevcuttu. İR+proantosiyanidin grubunda ise İR grubuna göre bahsedilen antioksidan enzim düzeylerinde artış olduğu görülmüştür (156). Nakagawa ve ark. da çalışmalarında böbrek İR hasarında proantosiyanidin ile antioksidan enzim düzeylerinde artış tespit etmişlerdir (162).

Çalışmamızda iloprost ve proantosiyanidin verilen gruplarda antioksidan enzim düzeyleri daha düşük saptanmıştır. Yapılan çalışmalarda farklı sonuçlar elde edilmektedir. Sonuçta antioksidan enzim düzeylerinde azalmanın, iloprost ve proantosiyanidinin kas dokusunda oksidan yanıtı ve SOR oluşumunu azaltmasıyla ilişkili olabileceği düşünülmektedir.

Kas hasarının belirlenmesinde görüntüleme yöntemleri ve kas içi enzim plazma düzeylerinin ölçümü kullanılır. Fizyolojik şartlarda, enzim molekülleri büyük moleküler yapıları nedeniyle plazma zarından sınırlı miktarda geçebilirler. Ancak herhangi bir nedenle hücre zarı hasar gördüğünde seçici geçirgenlik özelliği bozulur

ve hasarın derecesi, hücre zarı yüzey komşuluğu, sitoplazmik konsantrasyonu ve molekül büyüklüğüne bağlı olarak seruma sızarlar. İskelet kası hasarını tespitinde kullanılan moleküller arasında, kreatin fosfokinaz (CPK), myoglobin, aspartat aminotransferaz, laktat dehidrogenaz beyin natriüretik peptit , atrial natriüretik peptit, karbonik anhidraz, troponin ve kas yapı proteinleri yer alır. Bunların arasında kas hasarına duyarlılığı en yüksek olan ve klinik olarak en çok çok kullanılan enzim CPK'dır (163).

Çalışmamızda, İR sonrası plazma CPK düzeyleri tüm gruplarda anlamlı derecede arttı. Bu bulgu, aortik okluzyon-reperfüzyon sonrası alt ekstremitede oluşan İR hasarını yansıtmaktadır. İR sonrası plazma CPK düzeylerinin arttığını gösteren birçok deneysel ve klinik çalışma vardır (61,111,112). Çalışmamızda sham grubu hariç tüm gruplarda CPK değerleri yüksekti. İR+proantosiyanidin, İR+ iloprost ve İR+ iloprost+ proantosiyanidin gruplarındaki serum CPK değerleri İR grubuna benzerdi ve aralarında anlamlı fark yoktu. Bununla birlikte , iloprost'un İR sonrası iskelet kası hasarına olan etkisinin araştırıldığı bir çalışmada İR+iloprost grubunda CPK değerlerinin İR grubundaki değerlere göre anlamlı düzeyde azaldığı görülmüştür (61). Miyokardial İR hasarında da iloprost uygulanan grupta, İR grubuna göre serum CPK değerlerinde anlamlı düşüş oluştuğu bildirilmiştir (111,112).

Fibrin yıkım ürünü olan, tromboz, iskemi, inflamasyon gibi patolojilerde seviyeleri yükselebilen D-Dimer düzeyleri de İR hasarını yansıtabileceği düşünülerek çalışmamızda değerlendirildi. İR uygulanan tüm gruplarda yüksek saptandı ve tedavi grupları arasında anlamlı fark bulunamadı.

İR hasarının fizyopatolojisini açıklamak ve bu hasarı önlemede yeni tedavi modaliteleri oluşturmak için bir çok çalışma yapılmaktadır.

Renal İR hasarında, bir XO inhibitörü olan febuxostat'ın oksidan düzeyi anlamlı ölçüde azalttığı saptanmıştır (164). Renal İR hasarını önlmede esansiyel yağ asitlerinin kullanıldığı bir çalışmada, doku MDA düzeylerinde anlamlı azalma, antioksidan enzim düzeylerinde artış saptanmıştır (165). Fosfodiesteraz III inhibitörü olan milrinon'un da renal İR hasarını azalttığı ortaya çıkmıştır (166). Alt ekstremite İR'unda, renal uzak organ hasarını önlemede N – asetilsistein'in doku hasarını azalttığı gösterilmiştir (167). Başka bir çalışmada da Potent bir antioksidan

olan platonin'in alt ekstremite İR'unda renal hasarı azalttığı gösterilmiştir (168). Yine alt ekstremite İR'unda antitrombin III'ün kalp ve akciğer hasarını azalttığı ortaya çıkmıştır (169). Antioksidan ve antiinflamatuar etkileri bilinen magnezyum sülfatın, İR sonucu gelişen akciğer hasarını azalttığı saptanmıştır (170).

Görüldüğü gibi çalışmalarda hücre koruyucu moleküller ve antioksidan ajanlar kullanılmakta olup, oksidatif stres ve doku hasarının azaltılması amaçlanmaktadır.

Bizim bulgularımız da hücre koruyucu ve antioksidan özellikleri bilinen iloprost ve proantosiyanidin'in alt ekstremite iskemi reperfüzyon hasarında oksidan oluşumunu ve antioksidan enzim düzeyini azalttığı yönündedir. Ayrıca bu iki ilaç beraber kullanıldığında bu etki daha fazla ortaya çıkmaktadır. Birbirlerine üstünlükleri saptanmamıştır. Bu nedenle iskelet kası hasarını azaltmada iloprost ve proantosiyanidinin birlikte etkili olabileceği görüşüne varılmıştır.

6. SONUÇ VE ÖNERİLER

İskemi reperfüzyon hasarı mekanizmasının tam olarak anlaşılması, hasarın çabuk ve en uygun bir şekilde önlenmesini sağlayacaktır. Çalışmamızın sonucunda iloprost ve proantosiyanidin'in alt ekstremite iskemi reperfüzyon hasarında oksidan oluşumunu ve antioksidan enzim düzeyini azalttığı ortaya çıkmıştır. İloprost ve proantosiyanidin'in beraber kullanımında ise bu etkinin istatistiksel olarak anlamlı olduğu saptanmıştır. İskelet kası hasarını azaltmada iloprost ve proantosiyanidinin etkili olabileceği sonucuna varılmıştır. Bunun yanında bu yararlı etkinin hangi mekanizmalar aracılığı ile oluştuğunu tam olarak aydınlatabilmek için yeni deneysel çalışmalara gereksinim vardır. Bu konuda yapılacak daha geniş ölçekli çalışmaların sonuçları bizim çalışmamızı destekler ise, günlük klinik kullanımda çok önemli fayda sağlayacaktır.

ÖZET

Amaç: Bu çalışmanın amacı infrarenal abdominal aortanın (İAA) klemplenmesi ve reperfüzyonu sonrası gelişen alt ekstremite iskemi reperfüzyon (İR) hasarına iloprost ve proantosiyanidin'in ayrı ayrı ve birlikte etkisini araştırmaktır.

Materyal ve Metod: Elli adet erkekWistar-Albino rat rastgele ve eşit sayıda (n = 10) olarak beş gruba ayrıldı. SHAM grubunda (grup I) laparotomi ve İAA diseksiyonu uygulandı ancak bu grupta İR oluşturulmadı. Kontrol grubunda (grup II) ise İAA diseksiyonu sonrası İAA'ya kros-klemp konularak 60 dakika iskemi ve kros-klemp kaldırılarak 120 dakika reperfüzyon uygulandı. İR+ Proantosiyanidin grubunda (grup III) İR işlemine ek olarak, İR öncesi 10 gün boyunca oral yoldan gavaj ile 100mg/kg/gün (1 ml volümde) proantosiyanidin (GNC preventive nutrition) verildi. Son doz deneyden 1 saat önce uygulandı. İR + İloprost grubunda (Grup IV) İR'a ek olarak 120 dakikalık reperfüzyon süresince, sağ internal juguler ven kullanılarak ve infüzyona reperfüzyondan 10 dk. önce başlanarak i.v 100 ng/kg/dk dozda iloprost (İlomedin®, Bayer Schering Pharma AG, Berlin, Germany) infüzyonu yapıldı. İR + Proantosiyanidin + İloprost grubunda ise (Grup V) İR'a ek olarak yukarıda tarif edildiği gibi hem proantosiyanidin işlem öncesi oral yoldan verildi, hem de reperfüzyon süresince iloprost infüzyonu yapıldı. Deney sonunda tüm ratlardan, biyokimyasal analizler için kan örneği ve adductor magnus, gastroknemius kas doku örnekleri alındı. Kas dokusunda malondialdehit (MDA), ksantin oksidaz (XO), glutatyon peroksidaz (GSH-Px), süperoksitdismutaz (SOD) ve katalaz (CAT) düzeyleri ölçüldü. Venöz kanda ise serum malondialdehit (MDA), glutatyon peroksidaz (GSH-Px), kreatinfosfokinaz (CPK), plazma D-dimer düzeyleri ölçüldü.

Sonuçlar: Biyokimyasal inceleme sonuçlarına göre İR grubunda (grup II) kas dokusu ve serumda MDA, kas dokusunda XO, SOD, CAT, GSH-Px ve serumda GSH-Px düzeyleri sham grubuna (grupII) göre anlamlı derecede yüksekti ($p<0,05$). İR+proantosiyanidin (grup III) ve İR+iloprost grubunda, kas dokusu ve serumda MDA, kas dokusunda XO , SOD, GSH-Px ve serum GSH-Px düzeyleri, İR (grup II) grubundaki düzeylere göre düşüktü ve bu fark anlamlı değildi ($p>0,05$). İR+proantosiyanidin (grup III) grubundaki kas dokusu CAT düzeyleri ise İR grubuna benzer sonuçlandı. İR+ proantosiyanidin+iloprost grubunda (grup V) ise kas

dokusu ve serumda MDA, kas dokusunda XO, SOD, CAT, GSH-Px değerlerinde kontrol grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı bir azalma görüldü ($p<0,05$). Bu gruptaki serum GSH-Px değerleri ise İR+ iloprost grubu ile benzerdi. Serum CPK ve plazma D-Dimer düzeyleri ise sham grubu hariç tüm gruplarda yüksekti. Proantosiyanidin ve iloprost verilen gruplarla (grup III, grup IV ve grup V) İR grubu (grup II) arasında anlamlı fark yoktu ($p>0,05$).

Tartışma: Bu çalışmanın sonuçları, iloprost ve proantosiyanidin'in alt ekstremite iskemi reperfüzyon hasarında oksidan oluşumunu ve antioksidan enzim düzeyini azalttığını göstermektedir. İloprost ve proantosiyanidin beraber kullanıldığında bu etki daha fazla ortaya çıkmaktadır. Bu nedenle iskelet kası iskemi reperfüzyon hasarını azaltmada, iloprost ve proantosiyanidinin etkili olabileceği sonucuna varılmıştır. Bu konuda yapılacak daha geniş ölçekli çalışmaların sonuçları bizim çalışmamızı destekler ise, günlük klinik kullanımda çok önemli fayda sağlayacaktır.

SUMMARY

Purpose: The purpose of the present study was to investigate the effect of iloprost and proanthocyanidin separately and together on ischemia-reperfusion (IR) injury at the lower extremities after clamping and reperfusion of infrarenal abdominal aorta (IAA).

Material and Methods: Fifty male Wistar-Albino rats were randomized in equal numbers (ten per group) into five groups. Sham group underwent laparotomy and dissection of the IAA without IR. Control group (group II) underwent dissection of the IAA and then ischemia and reperfusion performed by clamping of the IAA for 60 minutes and declamping of the IAA for 120 minutes respectively. In IR+ proanthocyanidin group (group III), in addition to IR, rats received orally proanthocyanidin (GNC preventive nutrition) with a gavage at a dosage of 100mg/kg/day (1 ml volume) for ten days before the experiment. The last dose was given one hour before the experiment . In IR+iloprost group (group IV), in addition to IR, rats received intravenous infusion of iloprost (İlomedin®, Bayer Schering Pharma AG, Berlin, Germany), with a dosage of 100 μg/kg/min via right internal juguler vein starting ten minutes before declamping and during 120 min of reperfusion. In IR+ proanthocyanidin+ iloprost group (group V) in addition to IR, as described above was given orally proanthocyanidin before the experiment and received infusion of iloprost during reperfusion. At the end of the experiment, blood samples and adductor magnus, gastroknemius muscle tissues samples were taken from all rats for biochemical analysis. In muscle samples, tissues levels of malondialdehyde (MDA), xantine oxidase (XO), glutathione peroxidase (GSH-Px), superoxide dismutase (SOD) and catalase (CAT) were measured. In blood samples, serum levels of malondialdehyde (MDA), glutathione peroxidase (GSH-Px), creatine phosphokinase (CPK) and plasma levels of D-Dimer were measured.

Results: Biochemical analysis showed that, in the IR group (group II), muscle tissues and serum levels of MDA, muscle tissues levels of XO, SOD, CAT, GSH-Px and serum levels of GSH-Px were significantly higher than the levels in the sham group (group I) ($p<0.05$). In the IR+ proanthocyanidin group (group III) and IR+iloprost group (group IV), muscle tissues and serum levels of MDA, muscle

tissues levels of XO, SOD, GSH-Px and serum levels of GSH-Px were lower than the levels in the I-R group (group II) and statistically not significant ($p>0,05$). In the IR+ proanthocyanidin group (group III), muscle tissues levels of CAT were similar to the levels in the IR group (group II). In the IR+ proanthocyanidin+ iloprost group (group V), muscle tissues and serum levels of MDA, muscle tissues levels of XO, SOD, CAT, GSH-Px were significantly lower than the levels in the IR group (group II) ($p<0.05$). But, in this group, serum levels of GSH-Px were similar to the levels in the IR+ iloprost group (group IV). Serum levels of CPK and plasma levels of D-Dimer were higher in all groups, except the sham group. There was no difference between IR group with the groups that given proanthocyanidin or iloprost (group III, group IV and group V) ($p>0,05$).

Conclusion: The results of this study show that, iloprost and proanthocyanidin attenuates oxidant formation and antioxidant enzyme levels on ischemia reperfusion injury. When iloprost and proanthocyanidin used together, this effect appears more. Therefore, reducing ischemia-reperfusion injury in skeletal muscle, proanthocyanidine and iloprost and may be effective. In case results of our study will be supported by future larger scale studies, it would be an important contribuiton to daily clinical practice.

KAYNAKLAR

1. Siemionow M, Arslan E. Ischemia/reperfusion injury: a review in relation to free tissue transfers. Microsurgery. 2004;24:468-75.
2. Eltzschig HK, Collard CD. Vascular ischaemia and reperfusion injury. Br Med Bull. 2005; 139: 73-74.
3. Cell Injury, Cell Death and Adaptations. In Kumar V, Abbas AK, Fausto N (eds) Robbins and Cotran Pathologic Basis of Disease, 8th Edition, Philadelphia: Elsevier Saunders, 2007: 1-29
4. Hensley K, Robinson KA, Gabbita SP, Salsman S, Floyd RA. Reactive oxygen species, cell signaling, and cell injury. Free Radic Biol Med. 2000; 15: 1456-62.
5. Carden DL, Granger DN. Pathophysiology of ischeamia-reperfusion injury. J Pathol, 2000; 190:255-66.
6. Anaya-Prado R, Toledo-Pereyra LH, Lentsch AB, Ward PA Ischemia/reperfusion injury. J Surg Res.2002; 15;105:248-58.
7. Seal JB, Gewertz BL. Vascular dysfunction in ischemia-reperfusion injury. Ann Vasc Surg. 2005;19: 572-84.
8. Xu Y, Huo Y, Toufektsian MC, Ramos SI, Ma Y, Tejani AD, French BA, Yang Z. Activated platelets contribute importantly to myocardial reperfusion injury. Am J Physiol Heart Circ Physiol. 2006; 290: 92-9.
9. Florian Krötz, Hae-Young Sohn, Ulrich Pohl. Reactive Oxygen Species: Players in the Platelet Game. Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology. 2004; 24:1988-96.
10. Blaisdell FW: The pathophysiology of skeletal muscle ischemia and the reperfusion syndrome: a review. Cardiovasc Surg 2002; 10: 620-630
11. Fisher CA, Kappa JR, Sinha AK, Cottrell ED, Reiser HJ, Addonizio VP. Comparison of equimolar concentrations of iloprost, prostacyclin, and prostaglandin E1 on human platelet function. J Lab Clin Med. 1987;109:184-90.

12. Rice-Evans CA, Miller NJ, Paganda G. Structureantioxidant activity relationships of flavonoids and phenolic acids. Free Rad Biol Med 1996;20: 933-56.
13. Semenza GL. Perspectives on oxygen sensing. Cell. 1999; 6;98: 281-4.
14. Newmeyer DD, Ferguson-Miller S. Mitochondria: releasing power for life and unleashing the machineries of death. Cell. 2003;21: 481-90.
15. Anaya-Prado R, Toledo-Pereyra LH. The molecular events underlying ischemia/reperfusion injury. Transplant Proc. 2002;34: 2518-9.
16. Droge W. Free radicals in the physiological control of cell function Physiol Rev. 2002; 82: 47-95.
17. Paschen W. Role of calcium in neuronal cell injury: which subcellular compartment is involved? Brain Res Bull. 2000;53: 409-13.
18. Mangino MJ, Anderson CB, Murphy MK, et al. Mucosal arachidonate metabolism and intestinal ischemia–reperfusion injury. Am J Physiol. 1989; 257:299–307.
19. Granger DN. Ischemia–reperfusion: mechanisms of microvascular dysfunction and the influence of risk factors for cardiovascular disease. Microcirculation. 1999; 6: 167–178.
20. Köksoy C. İskemi Reperfüzyon Modelleri. Cantürk Z, Sayek İ, (yazarlar) . Cerrahi Araştırma. Ankara: Nobel Tıp Kitabevleri, 2005: 357-67.
21. Toyokuni S: Reactive oxygen species-induced molecular damage and its application in pathology. Pathol int 1999; 49: 91-102.
22. Granger DN. Role of xanthine oxidase and granulocytes in ischaemia-reperfusion injury. Am L Physiol 1988; 25: 269-75.
23. Ernster L. Biochemistry of reoxygenation injury. Crit Care Med 1988;16: 947-53
24. Collard CD, Gelman S. Pathophysiology , clinical manifestations and prevention of ischemiareperfusion injury. Anesthesiology, 2001; 94: 1133-8.
25. Panes J, Perry M, Granger DN. Leukocyte–endothelial cell adhesion: avenues for therapeutic intervention. Br J Pharmacol 1999; 126: 537–50.
26. Homer S, Crinnion JN, Gough MJ: Post-ischaemic organ dysfunction: a review. Eur J Vasc Endovasc Surg, 1997; 14: 195-203.

27. Grace PA. Ischaemia-reperfusion injury. British J of Surgery 1994; 81: 637-47.
28. White MJ, Heckler FR. Oxygen free radicals and wound healing. Clin Plast Surg. 1990; 17: 473-84.
29. Ertan T, Soran A, Kılıç M, Aşlar AK, Koç M, Cengiz Ö. Kan Malondialdehid ve total antioksidan seviyesinin(TAS) önemi. Cerrahi Tıp Bülteni 2001; 4:154-67.
30. Girotti AW. Lipid hydroperoxide generation, turnover, and effector action in biological systems. J Lipid Res. 2000; 39: 1529-42
31. Marnett LJ. Oxyradicals and DNA damage. Carcinogenesis 2000; 21: 361-70
32. Unno N, Fink MP.Nutritional, physiologic, and pathophysiologic considerations of the gastrointestinal tract. Intestinal epithelial hyperpermeability. Mechanisms and relevance to disease. Gastroenterology Clinics 1998; 2: 289-307
33. Halliwell B, Gutteridge JM. The antioxidants of human extracellular fluids. Arch Biochem Biophys. 1990; 280: 1-8.
34. Spitz DR, Oberley LW. An assay for superoxide dismutase activity in mammalian tissue homogenates. Anal Biochem 1989; 179: 8-18.
35. Collard CD, Lekowski R, Jordan JE, Agah A, Stahl GL. Complement activation following oxidative stress. Mol Immunol 1999; 36: 941–48.
36. Evans CAR, Diplock A.T, Symons M.C.R. Introduction to free radicals andMechanisms of radical production .Techniques in free radical research volume 22, Elsevier, London, New York, Tokyo, 1991; 4:1-49.
37. Derwesh IH, Novick AC. Mechanism of renal ischaemic injury and their clinical impact. BJU İnternational 2005;95: 948-50.
38. David J, Rosario S, Barry C. Peroxynitrite Inhibits Leukocyte–Endothelial Cell Interactions and Protects Against Ischemia-Reperfusion Injury in Rats J Clin Invest 1997; 99: 684–91.
39. Hoffman JN, Vollmar B, Laschke MW, Fertmann JM, Jauch KW, Menger MD. Microcirculatory alterations in ischemia-reperfusion injury and sepsis of activated protein C and thrombin inhibition. Critical Care 2005; 9: 33-7

40. Majno G, Ames A III, Chiang J, et al. No reflow after cerebral ischemia. Lancet 1967; 2: 569–70.
41. Kuijper PH, Gallardo Torres HI, van der Linden JA, et al. Platelet-dependent primary hemostasis promotes selectinand integrin-mediated neutrophil adhesion to damaged endothelium under flow conditions. Blood 1996; 87: 3271–81.
42. Barroso-Aranda J, Schmid-Schonbein GW, Zweifach BW, et al. Granulocytes and no-reflow phenomenon in irreversible hemorrhagic shock. Circ Res 1988; 63: 437–47.
43. Gawaz M. Role of platelets in coronary thrombosis and reperfusion of ischemic myocardium. Cardiovasc Res. 2004; 15: 498-511.
44. Leo R, Pratico D, Iuliano L, Pulcinelli FM, Ghiselli A, Pignatelli P, Colavita AR, FitzGerald GA, Violi F. Platelet activation by superoxide anion and hydroxyl radicals intrinsically generated by platelets that had undergone anoxia and then reoxygenated. Circulation. 1997; 18: 885-91.
45. Wink DA, Mitchell JB. Chemical biology of nitric oxide: Insights into regulatory cytotoxic, and cytoprotective mechanisms of nitric oxide. Free Radicals Biol. Med. 1998; 25: 434-38.
46. Davies MG, Huynh TTT, Hagen PO. Endothelial Physiology in Ischemia Reperfusion. Edited by R.Mathie and P. Grace, Blackwell Science Ltd, Oxford 1999; 15:157-79.
47. Parvums DV. The pathology of ischemia-reperfusion. In: Grace PA, and Mathie RT, editors. Ischemia-reperfusion injury. London: Blackwell Science,1999;12: 3–19.
48. Al-Mehdi AB, Zhao G, Fisher AB. ATP-independent membrane depolarization with ischemia in the oxygenventilated isolated rat lung. Am. J. Respir. Cell Mol. Biol. 1998; 18: 653-61.
49. Gute DC, Ishida T, Yarimizu K, Korthuis RJ. Inflammatory responses to ischemia and reperfusion in skeletal muscle. Mol. Cell. Biochem. 1998; 179: 169-87.

50. Schutte H, Lockinger A, Seeger W, Grimminger F. Aerosolized PGE1, PGI2 and nitroprusside protect against vascular leakage in lung ischaemia-reperfusion. Eur. Respir. J. 2001; 18: 15-22.
51. Ostrovsky L, Woodman RC, Payne D, Teoh D, Kubes P. Antithrombin III prevents and rapidly reverses leukocyte recruitment in ischemia/reperfusion. Circulation 1997; 96: 2302-10.
52. Belkin M, Brown RD, Wright JG et al. A new quantitative spectrophotometric assay of ischemia reperfusion injury in skeletal muscle. Am J Surg, 1988; 156: 83–6.
53. Hayes G, Liauw S, Romaschin AD, Walker PM. Separation of reperfusion injury from ischemiainduced necrosis. Surg Forum, 1988; 39: 306–8.
54. Ames A Jr, Wright RL, Kowada M. Cerebral ischemia II. The no-reflow phenomenon. Am J Pathol, 1968, 52: 437–53.
55. Chiang N, Gronert K, Clish CB, O'Brien JA, Freeman MW, Serhan CN. Leukotriene B4 receptor transgenic mice reveal novel protective roles for lipoxins and aspirin-triggered lipoxins in reperfusion. J Clin Invest 1999; 104: 309–16.
56. Yokoyama H, Lingle DM, Crestanello JA, Kamelgard J, Kott BR, Momeni R, et al. Coenzyme Q10 protects coronary endothelial function from ischemia reperfusion injury via an antioxidant effect. Surgery 1996; 120: 189-96.
57. Scuito AM. Antioxidant properties of glutathione and its role in tissue protection, in oxidants, antioxidants and free radicals. Taylor and Francis Publishers. 1997; 2: 171-91.
58. Jarrod Wall. Antioxidants In Prevention Of Reperfusion Damage Of Vascular Endothelium. TSMJ, 2000 May; Volume 1: 67-71.
59. Massey KD, Burton KP Alpha-tocopherol attenuates myocardial membrane-related alterations
resulting from ischemia and reperfusion. Am J Physiol 1989; 256: 1192-99.
60. Bilgin-Karabulut A, Ademoglu E, Aydin I, Erer M, Gokkusu C. Protective effects of vitamins A and E pretreatment in venous ischemia/reperfusion injury. J Reconstr Microsurg. 2001;17: 425-9.

61. Bozkurt AK. Alpha-tocopherol (Vitamin E) and iloprost attenuate reperfusion injury in skeletal muscle ischemia/reperfusion injury. J Cardiovasc Surg. 2002; 45: 693-95
62. Korthuis RJ, Granger DN, Townsley MI, Taylor AE. The role of oxygen-derived free radicals in ischemia-induced increases in canine skeletal muscle vascular permeability. Circ Res. 1985 ;57:599-609.
63. Maxwell SR, Lip GY. Reperfusion injury: a review of the pathophysiology, clinical manifestations and therapeutic options. Int J Cardiol. 1997; 58:95-117.
64. Cutrn JC, Perrelli MG, Cavalieri B, Peralta C, Rosell Catafau J, Poli G. Microvascular dysfunction induced by reperfusion injury and protective effect of ischemic preconditioning. Free Radic Biol Med 2002; 33: 1200-8.
65. Adanali G, Ozer K, Siemionow M. Early and late effects of ischemic preconditioning on microcirculation of skeletal muscle flaps. Plast Reconstr Surg 2002; 109: 1344-51.
66. Jerome SN, Akimitsu T, Gute DC, Korthuis RJ. Ischemic preconditioning attenuates capillary noreflow İnduced by prolonged ischemia and reperfusion. Am J Physiol, 1995; 268: 2063–67.
67. Yamaguchi T, Dayton C, Shigematsu T, Carter P, Yoshikawa T, Gute DC, Korthuis RJ. Preconditioning with ethanol prevents postischemic leukocyte-endothelial cell adhesive interactions. Am J Physiol Heart Circ Physiol 2002; 283: 1019-30.
68. Khalil AA, Aziz FA, Hall JC. Reperfusion injury. Plast Reconstr Surg. 2006;117:1024-33
69. Frostell C, Fratacci MD, Wain JC, et al. Inhaled nitric oxide: A selective pulmonary vasodilator reversing pulmonary vasoconstriction. Circulation 1991; 83: 2038-9.
70. Kurose I, Wolf R, Grisham MB, and Granger DN. Modulation of ischemia/reperfusion-induced microvascular dysfunction by nitric oxide. Circ. Res. 1994; 74: 376.
71. Rivera-Chavez FA, Toledo-Pereyra LH, Dean RE et al. Exogenous and endogenous nitric oxide but not iNOS inhibition improve function and survival os ischemically injured livers. J. Invest. Surg. 2001; 14: 267-73.

72. Mowlavi A, Neumeister MW, Wilhelmi BJ, Song YH, Suchy H, Russell RC. Local hypothermia during early reperfusion protects skeletal muscle from ischemia-reperfusion injury. Plast Reconstr Surg. 2003; 111: 242-50.
73. Zacharowski K, Otto M, Hafner G, Marsh HC Jr, Thiemermann C. Reduction of myocardial infarct
size with sCR1sLe(x), an alternatively glycosylated form of human soluble complement receptor type 1 (sCR1), possessing sialyl Lewis x. Br J Pharmacol 1999; 128: 945-52.
74. Arumugam TV, Shiels IA, Woodruff TM, Reid RC, Fairlie DP, Taylor SM. Protective effect of a new C5a receptor antagonist against ischemia-reperfusion injury in the rat small intestine. J Surg Res 2002; 103: 260-67.
75. Fine MA. Oligomeric Proanthocyanidin Complexes: History, Structure, and Phytopharmaceutical Applications. Altern Med Rev 2000; 5: 144-51.
76. Leigh MJ. Health Benefits of Grape Seed Proanthocyanidin Extract (GSPE). Nutrition Noteworthy 2003; 6: 1-5.
77. Bagchi D, Bagchi M, Stohs SJ, Das DK, Ray SD, Kuzynski CA, Joshi SS, Pruess HG. Free radicals and grape seed and proanthocyanidin extract:importance in human health and disease prevention .Toxicology 2000; 128: 187-97.
78. Nijveldt RJ. Flavonoids: a review of probable mechanisms of action and potential applications. Am J Clin Nutr 2001; 74: 418–25.
79. Chang WC, Hsu FL. Inhibition of platelet aggregation and arachidonate metabolism in platelets by procyanidins. Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids 1989; 38: 181-88.
80. Bagchi D, Garg A, Krohn RL. Oxygen free radical scavenging abilities of vitamins C and E, and a grape seed proanthocyanidin extract in vitro. Res Commun Mol Pathol Pharmacol 1997; 95: 179-89.
81. Bagchi D, Garg A, Krohn RL. Protective effects of grape seed proanthocyanidins and selected antioxidants against TPA-induced hepatic and brain lipid peroxidation and DNA fragmentation, and peritoneal macrophage activation in mice. Gen Pharmacol 1998; 30: 771-76.

82. Halliwell B, Gutteridge JMC, Cross CE. Free radicals, antioxidants, and human disease: where are we now? Lab Clin Med 1992; 99: 598-620.
83. Sato M, Maulik G, Ray PS, Bagshi D, Das DK. Cardioprotective effects of grape seed proanthocyanidin against ischemic reperfusion injury. J Mol Cell Cardiol 1999;.31:1289-97.
84. Ray SD, Patel D, Wong V, Rinkovsky A, Fu K, Bagchi D. Effect of a novel IH636 grape seed proanthocyanidin extract on acetaminophen-induced nephrotoxicity. J Am Coll Nutr 1998; 17: 508.
85. Preuss HG, Bagchi D, Bagchi M. Protective effects of a novel niacin-bound chromium complex and a grape seed proanthocyanidin extract on advancing age and various aspects of syndrome X. Ann N Y Acad Sci 2002; 957: 250-59.
86. Liu FJ, Zhang YX, Lau BH. Pycnogenol enhances immune and haemopoietic functions in senescence-accelerated mice. Cell Mol Life Sci 1998; 54:1168-72.
87. Balu M, Sangeetha P, Murali G, Panneerselvam C. Modulatory role of grape seed extract on age-related oxidative DNA damage in central nervous system of rats. Brain Research Bulletin 2005; 68: 469-73.
88. Zahavi J, Zahavi M. Enhanced platelet release reaction, shortened platelet survival time and increased platelet aggregation and plasma thromboxane B2 in chronic obstructive arterial disease.Thromb Haemost 1985; 53: 105-9.
89. Casals-Stenzel J, Buse M, Losert W. Comparison of the vasodepressor action of ZK36-374, a stable prostacyclin derivative, PGI2 and PGE1 with their effect on platelet aggregation and bleeding time in rats. Prostaglandins Leukot Med. 1983;10:197-212.
90. Cowley AJ, Heptinstall S, Hampton JR. Effects of prostacyclin and of the stable prostacyclin analogue ZK 36374 on forearm blood flow and blood platelet behaviour in man. Thromb Haemost.1985; 53: 90-4.
91. Fitscha P, Tiso B, Krais T, Sinzinger H. Effect of iloprost on in vivo and in vitro platelet function in patients with peripheral vascular disease (PVD). Advences in Prostaglandin, Thromboxane and Leukotriene Research. 1987; 450-54.

92. Sturzebecher CS, Losert W. Effects of Iloprost on platelet activation in vitro. In: Gryglewski RJ & Stock G, eds. Prostacyclin and its Stable Analogue Iloprost. Berlin: Springer-Verlag, 1987; 3: 39-45
93. Grant SM, Goa KL. Iloprost. A review of its pharmacodynamic and pharmacokinetic properties, and
therapeutic potential in peripheral vascular disease, myocardial ischaemia and extracorporeal circulation procedures. Drugs. 1992; 43: 889-924.
94. Ciuffetti G, Sokola E, Lombardini R, Pasqualini L, Pirro M, Mannarino E. The influence of iloprost on blood rheology and tissue perfusion in patients with intermittent claudication. Kardiol Pol. 2003; 59: 197-204
95. Musial J, Wilczynska M, Sladek K, Cierniewski CS, Nizankowski R, Szczeklik A. Fibrinolytic activity of prostacyclin and iloprost in patients with peripheral arterial disease. Prostaglandins. 1986; 31: 61-70.
96. Bertele V, Mussoni L, del Rosso G, Pintucci G, Carriero MR, Merati MG, Libretti A, de Gaetano G. Defective fibrinolytic response in atherosclerotic patients--effect of iloprost and its possible
mechanism of action. Thromb Haemost. 1988; 60: 141-4.
97. Belch JJ, Saniabadi AR, Forbes CD. Whole blood white cell aggregation: a novel technique.Thromb Res. 1987; 48: 631-9.
98. Wadenvik H, Kutti J. Effect of Iloprost, a novel prostacyclin analogue, on ADP-induced platelet aggregation. Acta Haematol. 1985;73: 224-7.
99. Dormand JA. The pathophysiology of critical limb ischeamia and pharmacological intervention with a stable prostacyclin analogue, iloprost. Royal Society of Medicine Services . 1989; 45: 123-48.
100. Lye RH, Parsons AA, Whalley ET. Effect of iloprost (ZK36374) and prostacyclin on in vitro human cerebral arteries. Br J Pharmacol 1986; 89: 691.
101. Ioannou P, Talesnik J. Platelet antiaggregatory substances inhibit arachidonic acid induced coronary constriction. Can J Physiol Pharmacol. 1986; 64: 398-405.

102. Groom TM, Gautieri RF. Influence of a stable prostacyclin analogue (iloprost) and cyclooxygenase inhibition on angiotensin-II in the perfused human placenta. Res Commun Chem Pathol Pharmacol. 1989; 66: 21-32.
103. Herman F, Hadhazy P, Magyar K. Critical evaluation of the in vivo selectivity between hypotensive and platelet antiaggregating actions of iloprost and prostacyclin in beagle dogs. Arch Int Pharmacodyn Ther. 1989 Jul-Aug;300:281-91.
104. Bergman G, Kiff PS, Atkinson L et al: Dissociation of platelet aggregation and vasodilatation with iloprost, a stable, orally active prostacyclin derivative. Circulation 1983; 68: 398.
105. Steinberg H, Medvedev OS, Luft FC, Unger T. Effect of a prostacyclin derivative (iloprost) on regional blood flow, sympathetic nerve activity, and baroreceptor reflex in the conscious rat. 1: J Cardiovasc Pharmacol. 1988;11: 84-9.
106. Borzeix MG, Cahn R, Cahn J. Effects of new chemically and metabolically stable prostacyclin analogues (iloprost and ZK 96480) on early consequences of a transient cerebral oligemia, in the rat. Prostaglandins. 1988; 35: 653-64.
107. Archer SL, Chesler E, Cohn JN, Weir EK. ZK 36-374, a stable analog of prostacyclin, prevents acute hypoxic pulmonary hypertension in the dog. J Am Coll Cardiol. 1986; 8: 1189-94.
108. Kaukinen S, Ylitalo P, Pessi T, Vapaatalo H. Hemodynamic effects of iloprost, a prostacyclin analog. Clin Pharmacol Ther. 1984; 36: 464-9.
109. Scott JP, Higenbottam T, Wallwork J. The acute effect of the synthetic prostacyclin analogue iloprost in primary pulmonary hypertension. Br J Clin Pract. 1990; 44: 231-4.
110. Arzilli F, Giovannetti R, Lenzi M, Salvetti A. Acute hemodynamic (systemic and renal) and humoral effects of three increasing doses of iloprost in essential hypertensives. Am J Hypertens. 1989; 2: 856-60.
111. Ferrari R, Cargnoni A, Curello S, Boffa GM, Ceconi C. Effects of iloprost (ZK 36374) on glutathione status during ischaemia and reperfusion of rabbit isolated hearts. Br J Pharmacol. 1989; 98: 678-84.

112. Darius H, Osborne JA, Reibel DK, Lefer AM. Protective actions of a stable prostacyclin analog in İschemia induced membrane damage in rat myocardium. J Mol Cell Cardiol. 1987;19: 243-50.
113. de Langen CD, van Gilst WH, Wesseling H. Sustained protection by iloprost of the porcine heart in the acute and chronic phases of myocardial infarction. J Cardiovasc Pharmacol.1985; 7: 924-8.
114. Simpson PJ, Fantone JC, Mickelson JK, Gallagher KP, Lucchesi BR. Identification of a time window for therapy to reduce experimental canine myocardial injury: suppression of neutrophil activation during 72 hours of reperfusion. Circ Res. 1988; 63: 1070-9.
115. Parratt JR, Coker SJ, Wainwright CL. Eicosanoids and susceptibility to ventricular arrhythmias during myocardial ischaemia and reperfusion. J Mol Cell Cardiol. 1987; 5: 55-66.
116. Aksulu HE, Ercan ZS, Turker RK. Further studies on the antiarrhythmic effect of iloprost. Arch Int Pharmacodyn Ther. 1985; 277: 223-34.
117. Bursch W, Taper HS, Somer MP, Meyer S, Putz B, Schulte-Hermann R. Histochemical and biochemical studies on the effect of the prostacyclin derivative iloprost on CCl4-induced lipid peroxidation in rat liver and its significance for hepatoprotection. Hepatology. 1989; 9: 830-8.
118. Levitt MA, Lefer AM. Anti-shock properties of the prostacyclin analog, iloprost, in traumatic shock. Prostaglandins Leukot Med. 1986; 25: 175-85.
119. Foegh ML, Rowles JR, Khirabadi BS, Ramwell PW. Allograft survival with iloprost. In Gryglewski RJ and Stock G (Eds) Prostacyclin and its stable analogue iloprost, Springer-Verlag, Berlin, 1987: 243-46.
120. Kort WJ, de Kam J, Westbroek DL. Per-operative topical administration of ZK 36 374 (Iloprost) acts favorably on patency of small artery anastomoses in rats. Microsurgery. 1987; 8: 17-21.
121. Krause W, Krais T. Pharmacokinetics and pharmacodynamics of the prostacyclin analogue iloprost in man. Eur J Clin Pharmacol 1986; 30: 61-8.
122. Hildebrand M, Krause W, Oberender HA, Zurdel-Dillinger S, Junger M, Bodenburg H. Pharmacokinetics of iloprost in patients with severe peripheral arterial occlusive disease. Eicosanoids. 1990; 3: 145-8.

123. Duthois S et al. Tolerance of Iloprost and results of treatment of chronic severe lower limb ischaemia in diabetic patients.A retrospective study of 64 consecutive cases. Diabetes Metab. 2003 Feb;29(1):36-43

124. Staben P, Albring M. Treatment of patients with peripheral arterial occlusive disease Fontaine stage III and IV with intravenous iloprost: an open study in 900 patients.Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids. 1996; 54: 327-33.

125. Altstaedt HO, Berzewski B, Breddin HK, Brockhaus W, Bruhn HD, Cachovan M, Diehm C, Dorrler J, Franke CS, Gruss JD, et al. Treatment of patients with peripheral arterial occlusive disease Fontaine stage IV with intravenous iloprost and PGE1: a randomized open controlled study. Erratum in: Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids 1993; 49: 973.

126. TASC, Supplement to J of Vasc Surgery 2000; 31: 456-68

127. Bozkurt AK, Koksal C, Demirbas MY, Erdogan A, Rahman A, Demirkilic U, Ustunsoy H, Metin G, Yillik L, Onol H, Cinar B, Karacelik M, Erdinc I, Bolcal C, Sayin AG; Turkish Buerger's Disease Research Group.A randomized trial of intravenous iloprost (a stable prostacyclin analogue) versus Lumbar sympathectomy in the management of Buerger's disease. Int Angiol. 2006; 25: 162-8.

128. Zulian F, Corona F, Gerloni V, Falcini F, Buoncompagni A, Scarazatti M, Martini G, Zacchello F Safety and efficacy of iloprost for the treatment of ischaemic digits in paediatric connective tissue diseases. Rheumatology (Oxford). 2004; 43: 229-33.

129. Scorza R, Caronni M, Mascagni B, Berruti V, Bazzi S, Micallef E, Arpaia G, Sardina M, Origgi L,Vanoli M.Effects of long-term cyclic iloprost therapy in systemic sclerosis with Raynaud's phenomenon. A randomized, controlled study. Clin Exp Rheumatol. 2001; 19: 503-8.

130. Wigley FM, Wise RA, Seibold JR, McCloskey DA, Kujala G, Medsger TA Jr, Steen VD, Varga J, Jimenez S, Mayes M, Clements PJ, Weiner SR, Porter J, Ellman M, Wise C, Kaufman LD, Williams J, Dole W. Intravenous iloprost infusion in patients with Raynaud phenomenon secondary tsystemic sclerosis. A multicenter, placebo-controlled, double-blind study. Ann Intern Med. 1994; 120: 199-206.

131. de Donato, et al. The ILAILL study: iloprost as adjuvant to surgery for acute ischemia of lower limbs: a randomized, placebo-controlled, double-blind study by the Italian society for vascular and endovascular surgery. Ann Surg. 2006; 244: 185-93.
132. The Iloprost Bypass International Study Group. Effects of perioperative iloprost on patency of femorodistal bypass grafts. Eur J Vasc Endovasc Surg. 1996; 12: 363-71
133. Hickey NC, Shearman CP, Crowson MC, Simms MH, Watson HR. Iloprost improves femoro-distal graft flow after a single bolus injection. Eur J Vasc Surg. 1991; 5: 19-22.
134. Heise M, Schmidmaier G, Husmann I et al. PEG-hirudin/iloprost Coating of Small Diameter ePTFE Grafts Effectively Prevents Pseudointima and Intimal Hyperplasia Development. Eur J Vasc Endovasc Surg. 2006; 32: 418-24.
135. Boga M, Discigil B, Ozkisacik EA et al. The combined effect of iloprost and N-acetylcysteine in preventing spinal cord ischemia in rabbits. Eur J Vasc Endovasc Surg. 2006; 31: 366-72.
136. Ustundag N,Bozkurt AK, Demirkaya A, Koksal C, Mayda AS. Histopathological and immunohistochemical detection of protective effects of University of Wisconsin solution supplemented with iloprost on donor lung damage. Transplant Proc. 2004; 36: 1271-4.
137. Emrecan B, Tulukoğlu E, Bozok S, Aksun M, Yağdı S. iloprost and pentoxifylline attenuate ischemia-reperfusion injury in skeletal muscle in rabbit model. Ulus Travma Acil Cerrahi Derg 2008; 14: 182-87.
138. Kawashima M, Nakamura T, Schneider S, Vollmar B, Lausberg HF, Bauer M, Menger MD, Schafers HJ. Iloprost ameliorates post-ischemic lung reperfusion injury and maintains an appropriate pulmonary ET-1 balance. J Heart Lung Transplant. 2003; 22: 794-801.
139. Yegen C, Aktan AO, Buyukgebiz O, Haklar G, Yalcin AS, Yalin R, Ercan S. Effect of verapamil and iloprost (ZK 36374) on endothelin release after mesenteric ischemia reperfusion injury. Eur Surg Res. 1994; 26: 69-75.

140. Okboy N, Yegen C, Aktan AO, Dosluoglu HH, Sav A, Yalin R, Ercan S. The effect of iloprost and NDGA in ischemia reperfusion injury in rat liver. Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids. 1992; 47: 291-5.

141. Aytacoglu BN, Sucu N, Tamer L, Polat A, Gul A, Degirmenci U, Mavioglu I, Dikmengil M. Iloprost for the attenuation of ischaemia/reperfusion injury in a distant organ. Cell Biochem Funct. 2006; 24: 341-6.

142. Baltalarli A, Ozcan V, Bir F, Aybek H, Sacar M, Onem G, Goksin I, Demir S, Teke Z. Ascorbic acid (vitamin C) and iloprost attenuate the lung injury caused by ischemia/reperfusion of the lower extremities of rats. Ann Vasc Surg. 2006; 20: 49-55.

143. Addonizio VP Jr, Fisher CA, Kappa JR, Ellison N. Prevention of heparin-induced thrombocytopenia during open heart surgery with iloprost (ZK36374). Surgery. 1987; 102: 796-807.

144. Di Nisio M,Sqiazatto A, Rutjes AV, Buller HR, Zwinderman AH. Diagnostic accuracy of D-dimer test for exclusion of venous thromboembolism : a systematic review. J Thromb. 2007; 5: 296-304.

145. Dahle LK, Hill EG, Hollmann RT. The thiobarbituric acid reaction and the autoxidations of polyunsaturated fatty acid methyl esters. Arch Biochem Biophys. 1062; 98: 253-61.

146. Hashimato S. A new spectrophotometric assay method of xanthine oxidase in crude tissue homogenate. Anal Biochem. 1974; 62: 425-35.

147. Paglia DE, Valentine WN. Studies on the quantitative and qualitative characterization of erythrocyte glutathione peroxidase. J Lab Clin Med. 1967; 70: 158-69.

148. Aebi H. In: Bergmayer HU. Methods of Enzymatic Analysis. New York and London : Academic Pres Inc, 1974; 4: 673-77.

149. Durak İ, Canbolat O, Kavutçu M, Öztürk HS, Yurtaslanı Z. Activities of total cytoplasmic and mitochondrial superoxide dismutase enzymes in sera and pleural fluids from patients with lung cancer. J Clin Lab. 1996; 10: 17-20.

150. Kingston R, Kelly CJ, Murray P. The therapeutic role of taurine in ischaemia-reperfusion injury. Curr Pharm Des. 2004;10: 2401-10.

151. Katircioğlu SF, Saritas Z, Ulus AT, Yamak B, Yücel D, Ayaz S. Iloprost added to the cardioplegic solutions improves myocardial performance. Prostaglandins other Lipid Mediators. 1998; 55: 51-65.

152. Ozcan V, Sacar M, Aybek H, Bir F, Demir S, Önem G. The effects of iloprost and vitamin C on kidney as a remote organ after ischemia/reperfusion of lower extremities. J Surg 2007;140: 20-6

153. Ozat M, Gungor T, Barun S, Demirogulları B, Karakoc L. The effects of iloprost, a prostacyclin analogue, in experimental ischemia/reperfusion injury in rat ovaries. Exp Tox Pathology 2009; 61: 519-27

154. Koksel O, Ozdulger A, Aytacoglu B, Tamer L, Polat A, Sucu N, Yildirim C, Degirmenci U, Kanik A. The influence of iloprost on acute lung injury induced by hind limb ischemia-reperfusion in rats. Pulm Pharmacol Ther. 2005;18: 235-41.

155. Wei R, Ding R, Wang Y, Tang L. Grape seed proanthocyanidin extract reduces renalk ischemia/reperfusion injuries in rats. Am J Med Sci. 2012; 343: 452-7.

156. Yanarates O, Guven A, Sizlan A, Uysal B, Akgul O, Atim A, Ozcan A, Korkmaz A, Kurt E. Ameliorative effects of proanthocyanidin on renal ischemia/reperfusion injury. Ren Fail. 2008; 30: 931-8.

157. Sehirli O, Ozel Y, Dulundu E, Topaloglu U, Ercan F, Sener G. Grape seed extract treatment reduces hepatic ischemia-reperfusion injury in rats. Phytother Res. 2008; 22: 43-8.

158. Sizlan A, Guven A, Uysal B, Yanarates O, Atim A, Oztas E, Cosar A, Korkmaz Proanthocyanidin protects intestine and remote organs against mesenteric ischemia/reperfusioninjury. World J Surg. 2009; 33:1384-91.

159. Jaeschke H. Mechanism oxidant stress induced acute tissue injury PSEBM. 1995; 209:104-11

160. Canacankatan N, Sucu N, Aytacoglu B, Gul OE, Gorur A, Korkmaz B, Sahan-Firat S, Antmen ES, Tamer L, Ayaz L, Vezir O, Kanik A, Tunctan B. Affirmative effects of iloprost on apoptosis during ischemia-reperfusion injury in kidney as a distant organ. Ren Fail. 2012; 34: 111-8.

161. Gedik E, Girgin S, Obay BD, Ozturk H, Ozturk H, Buyukbayram H. Iloprost, a prostacyclin (PGI2) analogue, reduces liver injury in hepatic ischemia-reperfusion in rats. Acta Cir Bras. 2009; 24: 226-32.

162. Nakagawa T, Yokozawa T, Satoh A, Kim HY. Attenuation of renal ischemia-reperfusion injury by proanthocyanidin-rich extract from grape seeds. J Nutr Sci Vitaminol. 2005; 51: 283-6.

163. Rodwel V.W. Enzim Sistemleri. Murray R.K, Granger D.K, Mayes P.A, Rodwel V.W. Harper'ın Biyokimyası, 24.Baskı, Barış Kitabevi, İstanbul 1998: 24-68

164. Tsuda H, Kawada N, Kaimori JY, Kitamura H, Rakugi H, Takahara S, Isaka Y. Febuxostat suppressed renal ischemia-reperfusion injury via reduced oxidative stress. Biochem Biophys Res Commun. 2012; 45: 34-8.

165. Ajami M, Davoodi SH, Habibey R, Namazi N, Soleimani M, Pazoki-Toroudi H. Effect of DHA+EPA on oxidative stress and apoptosis induced by ischemia-reperfusion in rat kidneys. Fundam Clin Pharmacol. 2012; 21: 78-82.

166. Nishiki T, Kitada H, Okabe Y, Miura Y, Kurihara K, Kawanami S, Tanaka M. Effect of milrinone on ischemia-reperfusion injury in the rat kidney. Transplant Proc. 2011 Jun;43(5):1489-94.

167. Takhtfooladi MA, Jahanshahi A, Jahanshahi G, Sotoudeh A, Takhtfooladi HA, Khansari M. Protective effect of N-acetylcysteine on kidney as a remote organ after skeletal muscle ischemia-reperfusion. Acta Cir Bras. 2012; 27: 611-5.

168. Hsu KY, Chen CH, Shih PC, Huang CJ. Adverse effects of bilateral lower limb ischemia- reperfusion on inducing kidney injuries in rats could be ameliorated by platonin. Acta Anaesthesiol Taiwan. 2012; 50: 63-8.

169. Zambas NA, Karkos CD, Kambaroudis AG, Karamanos DG, Spyridis CT. Protective effect of antithrombin III against lung and myocardial injury in lower-limb ischemia-reperfusion syndrome. Gerassimidis TS. Ann Vasc Surg. 2012; 26: 566-70.

170. Kao MC, Jan WC, Tsai PS, Wang TY, Huang CJ.Magnesium sulfate mitigates lung injury induced by bilateral lower limb ischemia-reperfusion in rats. J Surg Res. 2011; 89: 123-46.