

154183

**YILDIZ TEKNİK ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

**SIÇAN KARACİĞER İSKEMİK REPERFÜZYON
HASARINDA HİPERBARİK OKSİJEN UYGULAMASININ
VE İSKEMİK ÖN KOŞULLANMANIN ETKİSİ**

Biyoloji öğretmeni Mehmet Çiçek

**F.B.E. Kimya Anabilim Dalı Biyokimya Programında
Hazırlanan**

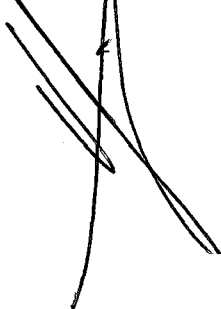
YÜKSEK LİSANS TEZİ

Doç. Dr. İnci Akar

Tez Danışmanı : Yrd. Doç. Dr. Volkan Sözer



Yrd. Doç. Volkan Sözer



İSTANBUL, 2004

Prof. Dr. Refiye Yanırdag



İÇİNDEKİLER

Sayfa

KISALTMA LİSTESİ.....	iv
ŞEKİL LİSTESİ	vi
ÇİZELGE LİSTESİ	vii
ÖNSÖZ.....	viii
ÖZET	ix
ABSTRACT	x
1 GİRİŞ.....	1
2 KAYNAK TARAMASI	2
2.1 İskemik Reperfüzyon Hasarının Temeli.....	2
2.1.1 İskemi	5
2.1.2 Reperfüzyon	6
2.2 Reperfüzyonda Serbest Radikal Üreten Kaynaklar	7
2.3 İskemi-Reperfüzyonda Meydana Gelen Başlıca Hasarlar	9
2.3.1 Lipid Peroksidasyon Hasarı	9
2.3.1.1 Başlangıç Basamağı.....	10
2.3.1.2 İlerleme Basamağı	10
2.3.1.3 Sonlanma Basamağı	11
2.3.2 Lipid Karboksilasyonu hasarı.....	12
2.3.3 Nötrofil Kaynaklı Hücre Hasarı.....	13
2.4 Hiperbarik Oksijen Tedavisi.....	18
2.4.1 Hiperbarik Oksijen Uygulamasında Biyokimyasal, Hücresel Fizyolojik Etkiler.....	18
2.4.2 Kan Oksijen İçeriğinin Artması.....	18
2.4.3 Antibakteriyel etki	18
2.4.4 Vazokonstriksiyon.....	19
2.4.5 Akut Travmatik İskemi Hasar.....	19
2.4.6 Hiperbarik oksijenin yararlı mekanizmaları.....	21
2.5 İskemik Önkoşullaşma.....	22
3. DENEYSEL ÇALIŞMALAR.....	26
3.1 Deneydeki gruplar.....	26
3.2 Materyaller ve Metotlar.....	26
3.2.1.1 Materyaller.....	26
3.2.1.2 PMN'nin hazırlanışı.....	26
3.2.1.3 Dokunun hazırlanışı	27
3.2.1.4 Myeloperoksidaz Aktivitesinin Ölçümü	27
3.2.1.4.1.1 Geliştirilmiş TMB Metodu (imp-TMB)	27
3.2.1.4.1.2 Orijinal TMB metodu	27
3.2.1.5 Lipid Peroksidasyonun Ölçümü	27
3.2.1.5.1 Tiyobarbiturik asit analizi	27
4. SONUÇLAR	28

4.1.	Serum Myeloperoksidaz Aktivitesinin Ölçümü Sonuçları.....	28
4.2	Doku Myeloperoksidaz Aktivitesinin Ölçümü Sonuçları.....	29
4.3	Serum Lipid Peroksidasyon Seviyesinin Ölçü Sonuçları.....	29
4.4	Doku Lipid peroksidasyon Seviyesi Ölçüm Sonuçları.....	30
5.	SONUÇLAR VE TARTIŞMA.....	32
KAYNAKLAR.....		33
İNTERNET KAYNAKLARI.....		35
ÖZGEÇMİŞ.....		36



KISALTMA LİSTESİ

DMB	3-3 dimetoksi benzidin
ET-1	Endotelin-1,
GTP	Glutamat piruvat transaminaz
GSSG	Glutatyon;
GSH	Glutatyon (indirgenmiş form);
GR	Glutatyon redüktaz
HBO ₂	Hiperbarik oksijen
HBOT	Hiperbarik oksijen tedavisi
HCL	Hidroklorik asit
H ₂ O ₂	Hidroperoksil
HOCL	Hipokloröz asit
I/R	İskemi/reperfüzyon
ICAM-1	Hücreler arası adhezyon molekülü
İÖK	İskemik önkoşullama
KC	Kupfer hücreleri
K _{ATP}	Potasyum duyarlı ATP kanalı
LPO	Lipid peroksidasyon
LOO ₂	Lipid peroksid radikali
LCOO ₂	Lipid karboloksil Radikali
METZ	Mitokondrial Elektron Transport Zincirinden
MDA	Malondialdehid
MPO	Myeloperoksidaz
MNG	N ₂ -Merkapto Propiyanol Glisin
NG	Nötrofil gronülosit,
PAF	Trombosit aktive eden faktör
NO	Nitrit oksit
O ₂ ⁻	Süper Oksit Anyonu
ONOO ⁻	Peroksinitrit
OH ⁻	Hidroksil Anyonu
PBS	Fosfat tampon tuzu
PKC	Protein Kinaz C
PML	Polimorfonükleer lökositler
RO ₂	Alkoloksil
ROO ₂	Peroksil
ROS	Reaktif oksijen radikelleri,

SEC	Sinusendotel hücre,
TF	Transkripsiyon faktörleri
TBA	Tiyobabutirik asit,
TCA	Triklorik asetik asit
TBARS	Tiyobarbitürik asid ile reaksiyon veren maddeler
TNF- α	Tümör nekroz faktor alfa
TMB	Tetrametoksi benzin
XOD	Ksantin oksidaz
XDH	Ksantin dehidrogenaz



ŞEKİL LİSTESİ

Sayfa

Şekil 2.1 İskemik reperfüzyon hasarının patofizyolojisi.....	5
Şekil 2.2 İskemi reperfüzyon hasarının patomekanizması.....	7
Şekil 2.3 Lipid radikaller.....	11
Şekil 2.4 Lökosit'in endotele adhezyonu.....	14
Şekil 2.5 Nötrofil fagositozu, oksijen bağımlı myeloperoksidaz sistemi.....	17



ÇİZELGE LİSTESİ

Sayfa no

Çizelge 4.1.1 Serum myeloperoksidaz başlangıç hızı sonuçları (ΔA_{655} dk/ml homejenat)...28	
Çizelge 4.2.1 Doku myeloperoksidaz başlangıç hızı sonuçları (ΔA_{655} dk/ml homejenat).....29	
Çizelge 4.3.1 Serum LPO (nM / ml) Sonuçları.....29	
Çizelge 4.4.1 Doku LPO (nM / gram yaş doku).....30	



ÖNSÖZ

Yıldız Teknik Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Kimya Anabilim Dalı Biyokimya Programında Yüksek Lisans Tezi olarak sunduğum bu çalışmamın başından itibaren bana her türlü yardım ve desteği sağlayıp değerli önerileriyle yol gösteren tez yöneticim ve değerli hocam Sn. Yrd. Doç. Dr. Volkan Sözer'e,

Laboratuvar çalışmaları ve dokuların temininde katkıda bulunan Cerrahpaşa Tıp Fakültesindeki öğretim görevlilerine ve çalışanlarına, özellikle Prof. Dr Rafet Yiğitbaşı ve Prof. Dr Ezel Usta'ya,

Her zaman maddi manevi desteklerini gördüğüm değerli Anneme ve Sevgili Eşime ve yaşamı boyunca bana ışık tutup yol gösteren saygıdeğer Babama;

En içten saygı ve teşekkürlerimi sunarım.



ÖZET

Bu deneysel çalışmada, hiperbarik oksijen uygulamanın ve iskemik önkoşullamanın sıçan karaciğeri hasarında, ayrı ve birlikte, lipid ve myeloperoksidaz seviyelerini inceleyerek etkisini araştırmaya yöneliktir.

50 adet, 220-300 ağırlığında, Wistar-Albino sıçan, 5 gruba ayrılmıştır; grup 1 (kontrol grubu), grup 2 (iskemi/reperfüzyon), grup 3 (iskemik önkoşullama + iskemi/reperfüzyon), grup 4 (hiperbarik oksijen uygulaması+ iskemi/reperfüzyon), grup 5 (hiperbarik oksijen uygulaması+ iskemik önkoşullama+ iskemi/reperfüzyon). Her bir çalışma tamamlandığında kan ve karaciğer dokularının lipid peroksidasyon ve Myeloperoksidaz (MPO) seviyeleri ölçülmüş, istatistik analizler The-KruskaWalls-One-Wall ANOVA ile gruplar arasındaki önemli farkı anlamak için ölçülmüştür. Post-Hoc testide çoklu karşılaştırmalar içinde kullanılmıştır. Gruplar arasındaki korelasyonlar için Pearson Correlation Sig. (2-tailed) test kullanılmıştır.

Lipid peroksidasyon (LPO) ölçümleri serumda ve karaciğer dokularında grup 2 ile karşılaştırıldığında önemli ölçüde artmış, grup 4, grup 5 ve grup 3, grup 2 ile karşılaştırdığında hepsinin düşük serum LPO seviyelerine sahip olduğu gözlemlenmiştir. Aynı şekilde grup 4 ve grup 5 doku LPO seviyeleri, yalnızca grup 2 değil, grup 3’de de önemli ölçüde düşük olduğu gözlemlenmiştir. Bütün grupların serum MPO seviyeleri kontrol grubuna göre karşılaştırıldığında, grup 4 istatistiksel olarak anlamlı fark görülmektedir. Doku MPO seviyelerinde ise, grup 5 ile kontrol grubu arasında istatistiksel anlamlıdır. Myeloperoksidaz serum seviyeleri korelasyon ölçümlerinde, grup 3 ile kontrol grubu arasında anlamlı pozitif bir korelasyon varken, grup 5 ile grup 2 arasında anlamlı negatif korelasyon vardır. LPO doku seviyelerinin grup 3 ile kontrol grubu ve grup 2 arasında anlamlı pozitif korelasyon varken grup 5 arasında anlamlı negatif korelasyon görülmektedir

İskemik ön koşullama ve hiperbarik oksijen uygulaması, iskemik-reperfüzyon nun zararlı etkilerini lipid peroksidasyonunu düşürerek hafifletir. Bu gelişme, iki tedavinin kombinasyonu ile maksimumdur. Yüksek MPO seviyeleri, polimorfik nükleer hücre (PMN) toplanmasında hiperbarik oksijen uygulanan gruplarında önemlidir ve hiperbarik oksijen tedavisi PMN’ nin iskemik dokuda ve serumda toplanmasında etkisi yoktur.

Anahtar Sözcükler; iskemik reperfüzyon hasarı, iskemik önkoşullama, hiperbarik oksijen uygulaması, myeloperoksidaz, lipid peroksidasyon, polimorfik nükleer nötrofil

ABSTRACT

In this experimental study, we aimed to investigate the effect of Hyperbaric oxygen pretreatment (HBOP) and ischemic preconditioning on ischemia-reperfusion injury of the liver separately and together by investigating lipid peroxidation parameters and myeloperoksidaz (MPO) levels.

A total of 50 Wistar-Albino rats weighing 220-300 gr were allocated into 5 groups. Group 1 (sham operated), group 2 (ischemia-reperfusion), group 3 (ischemic preconditioning + ischemia-reperfusion), group 4 (hyperbaric oxygen pretreatment + ischemia-reperfusion), group 5 (hyperbaric oxygen pretreatment + ischemic preconditioning + ischemia-reperfusion). The end of the each study, blood and liver tissue samples were taken to investigate lipid peroxidation and myeloperoksidase levels. Statistically analysis was done by using The-Kruska-Wallis-One-Wall Anova to measure significant differences between groups, and the Post-hoc test was used for multiple comparisons. Pearson Correlation Sig. (2-tailed) test was also used for correlation for groups one by one.

Lipid peroxidation (LPO) measurement in liver tissue and serum showed that group 2 had significantly increased levels when compared with control group. It is observed that Group 4, group 5 and group 3 compared with group 2 all had significant lower serum LPO levels. In the same way, group 4 and group 5 had significant lower tissue LPO levels than not only group 2 but also group 3. MPO measurement in liver serum showed that group 4 had significant higher serum level when all groups compared with control group. Comparisons between group 5 and control group for MPO level measurement in liver tissue, group 5 had significant difference. Myeloperoksidaz serum level correlation measurement showed that group 3 had a positive significant correlation when compared with control group. Group 5 had a negative significant correlation when compared with group 2. Lipid peroxidation tissue level measurement showed that group 3 had a significant positive correlation when compared with control group and group 2 but a significant negative correlation when compared with group 5.

Ischemic preconditioning and hyperbaric oxygen pretreatment can alleviate the harmful effect of ischemia-reperfusion injury by decreasing lipid peroxidation. The improvement was maximum when these two treatment modalities used in combination. Higher MPO levels, which may suggest polymorphonuclear cell accumulation (PMN), were especially prominent in hyperbaric oxygen -pretreated groups that hyperbaric oxygen pretreatment has no effect on PMN accumulation within ischemic tissue.

Key Words; ischemic reperfusion injury, ischemic preconditioning, hyperbaric oxygen pretreatment, myeloperoksidase, lipid peroksidase, polymorphonuclear leukocytes

1.GİRİŞ

İskemi, kan akımının, hücresel fonksiyonları karşılamak için gerekli olan düzeyin altında olması durumudur. Aerobik koşullarda yaşayan biyolojik organizmalar, temel yaşam kaynakları olan oksijen ve metabolit substratlar ortamda bulunmadığı zaman canlılıklarını belirli bir süre devam ettirebilmektedirler. İskemik dokunun reperfüzyonu ise, bir yandan iskemi sırasında kaybolan bazı fonksiyonların geri gelmesini sağlarken diğer yandan, ani ve fazla miktarda oksijen, ve dolaşımdaki kan elemanları, iskemik hasara uğramış dokularda, özellikle serbest oksijen radikallerinin oluşması yolu ile ileri hasara yol açmaktadır Ayrıca iskemik bölgeye lökositlerin, öncelikle de polimorfonükleer lökositler (PMN) olan nötrofillerin infiltrasyonunun dokuda hasara neden olduğu düşünülmektedir. Bilindiği gibi nötrofiller fagositoz olayı ile canlıyı enfeksiyöz ajanlardan koruyan kan hücreleridir (İşlekel vd., 2000a).

İskemik ön koşullama (İÖK), iskeminin ve perfüzyonun ana iskemik perfüzyondan önceki kısa periyodudur ve zararlı etkileri hafiflettiği düşünülmektedir (Demiryürek vd.,2003). Diğer yandan, hiperbarik oksijen (HBO_2) dokulara oksijen taşınmasını artırır ve lipid peroksidasyonu hafifletir (Bhalchandra vd., 2000). Lipid peroksidasyonu sırasında, karbon bağlarının kopması ile aldehit yapısında yıkılım ürünleri ortaya çıkmaktadır. Bu sitotoksik metabolitler, malondialdehid (MDA) gibi alkaneller, 4 hidroksinonenal gibi hidroksialkenallerdir. Malondialdehid sınıfından olan tiyobarbitürik asit ile reaksiyon veren maddeler (TBARS), iskemi reperfüzyon olayında lipid peroksidasyonunun en duyarlı göstergelerindendir (İşlekel vd., 2000b).

Malondialdehit, doymamış yağ asitlerin yıkımı sonucunda oluşur ve peroksidasyon reaksiyonlarının derecesini belirleyen elverişli bir indeks gibidir. Malondialdehit lipid peroksidasyonların sonucu gibi tanımlanmıştır (Buege., ve Aust., 1978).

PMN, hedef hücreler için zararlı olan hidrojen peroksid ve hipoklorik salınması yoluyla hasara neden olurlar. Doku hasarı nötrofil infiltrasyonu derecesi ile orantılıdır ve direkt olarak myeloperoksidazın (MPO) aktivitesiyle ölçüle bilinir (Katleen, vd 1998).

Bu deneysel çalışmada, hiperbarik oksijen uygulamanın ve iskemik ön koşullamanın ayrı ve birlikte, sıçan karaciğeri hasarında, lipid peroksidasyon seviyelerini ve myeloperoksidaz aktivitesini inceleyerek etkisini araştırmaya yöneliktir.

2. KAYNAK TARAMASI

2.1 İskemik reperfüzyon Hasarının Temeli:

İskemi de anormalliğin başlangıç kısmı, ATP üretiminde özel bir öneme sahip organ, sellüler mitokondri üzerinde durulmuştur. Buna rağmen dramatik bir şekilde büyümesi bir çok sayıda olaylara bağlıdır. Oksijen serbest radikal üretimi, demir depo salınımı, organların iskemi-reperfüzyon kaynaklı mikrovaskular hasarı, inflamatuvar sitokinez, komplement aktivasyonu ve hasar kısmından nötrofil infiltrasyonu gibi olaylar örnek verebilir [1]. Hücresel seviyede iskemi, aerobik mekanizmadan hücre içi ATP seviyesinin düşmesi ile sonuçlanan anaerobik mekanizmaya değişimi başlatır. ATP bağımlı enzimlerin bozulmasıyla hücre içi Ca^{+2} birikmesine neden olur. Bu sitolojik kalsiyum birçok kalsiyum duyarlı enzimlerin aktivasyonuna neden olur. Örneğin; fosfolipaz hücre membranındaki lipidleri yıkar (Katleen, vd 1998). Bununla birlikte hücre hasarı reperfüzyon sırasında meydana geldiği söylenmektedir. Reperfüzyon, serbest oksijen radikalleri, süper oksit anyon, hidrojen peroksit ve hipoklorik asit oluşumuna neden olur (Katleden, vd 1998). Söz konusu radikallerin başlıcaları oksijenin dokularda belirli koşullarda kısmen indirgenmesi sonucu oluşan çok kısa ömürlü ve güçlü oksidan nitelikli oksijen metabolitleri olan aşağıdaki 4 maddedir: hidrojen peroksit (H_2O_2), süperoksit anyonu ($O_2^{\cdot-}$), hidroksil radikali ($OH\cdot$) ve singlet oksijen. Bunlardan en reaktif ve en sitotoksik olanı hidroksil radikalidir, serbest demir iyonunun katalizör etkisi altında hidrojen peroksitten aşağıdaki reaksiyonla da oluşur [2] (Haber-Weiss reaksiyonu (2.1)):



Bu radikal, süperoksit anyonu ile hidrojen peroksitin etkileşmesi sonucu aşağıdaki reaksiyonla da oluşur (reaksiyon 2.2).



Hidroksil radikalleri, Cl^- ile reaksiyona girerek dokuda diğer bir sitotoksik madde olan HOCl (hipoklorik asit) oluşturabilir. Süperoksit anyonu, damar endotelinde endojen nitrik oksit (NO) ile reaksiyona girerek, daha fazla sitotoksik olan peroksinitrit ($ONOO^-$) ve sonra peroksinitröz asit oluşturur. Reaktif oksijen radikalleri, artan oksijen parsiyel basıncı sonucu konsantrasyona bağımlı olarak birçok hücre türünde ve özellikle alyuvarlar, damar endotel hücreleri ve iltihap hücrelerinde artmış miktarlarda oluşur. Bu maddeler; sitoplazmik membranı ve hücre-içi organel membranının lipidlerinin peroksidasyonuna ve membran geçirgenliğinin artmasına, enzimlerin ve sitostrüktürel proteinlerin sülfidril oksitlenmesine ve çapraz-bağlanmasına, enzimlerin inaktivasyonuna, bu arada antiproteazların inhibasyonu

sonucu proteolitik enzimlerin aktivasyonuna, DNA yapısının bozulmasına ve kırılmasına (mutasyona) ve mukopolisakkaridlerin depolimerizasyonuna neden olurlar. Lipid peroksidasyonu membran yapısını bozduktan başka, oluşan lipid peroksitler (L00•), iltihap hücreleri için kemotaktik olduğu için bu hücreleri dokuya çekerek inflamatuvar reaksiyon oluşturur. Radikaller glikozaminoglikan moleküllerinde de oksidatif zedelenme yaparlar. Hücrede iyon transportunu transmembranal potansiyeli bozarlar. Radikal oluşma hızının derecesine, antioksidan savunma mekanizmaları etkinlik derecesine ve diğer özelliklere göre hücre türlerinin, reaktif oksijen radikallerinin toksisitesine duyarlılığı farklıdır. Vurgulanması gereken bir nokta, serbest oksijen radikallerinin, hücrelerde hiperoksi olmaksızın da fizyolojik olaylar veya patolojik olaylar sonucu meydana gelmesidir. Hiperoksi, bu olayların radikal oluşturmalarını potansiyalize eder. Söz konusu radikalleri fizyolojik olaylar mitokondriyel ve mikrozomal elektron transport zincirleri ve oksidan enzimlerin katalize ettiği olaylardır [2].

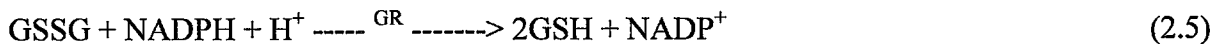
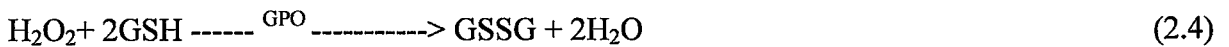
I/R hasarının fizyopatolojik sürecinde oksijen radikalının önemi, serbest radikal yakalayıcı, süper oksit dismutaz, katalaz veya glutatyon peroksidaz gibi perfüzyon sırasında hasarı önleyen enzimlerin enjekte edilmesiyle gösterilmiştir (Katleen, vd 1998). Hücrelerde ve ekstraselüler sıvıda sitotoksik oksijen radikallerini zararsız duruma getirmeye çalışan antioksidan savunma mekanizmaları vardır. Bu mekanizmalar normal biyokimyasal olaylar sırasında az miktarda oluşan radikalleri etkisizleştirebilirler. Ancak hiperoksi, iskemiden sonra reperfüzyon ve bu radikalleri bol miktarda oluşturan aktive edilmiş nötrofiller ile diğer fagositlerin dokuda toplanması gibi durumlarda oksidan/antioksidan dengesi bozulursa antioksidan mekanizmalar tükenir (deplezyon); sonuçta sitotoksik radikal etkinliği artar ve hücre zedelenmesine ve ölümüne yol açar. Antioksidan savunma mekanizmalarının başlıcaları şunlardır [2]:

- (i) Reaktif oksijen radikallerini daha az toksik ürünlere dönüştüren antioksidan enzim sistemleri: katalaz, superoksit dismutaz ve glutatyon redoks siklusu enzimleri (glutatyon peroksidaz), GSH redüktaz, glukoz-6-fosfat dehidrojenaz vb. gibi).
- (ii) Radikalleri yakalayıp etkisizleştiren antioksidan maddeler (“scavengers”): insanda hücre membranında oksidanın yapacağı zedelenmeyi önleyen E vitamini (alfa-tokoferol), hem ekstraselüler sıvıda ve hem de hücrede anti-oksidan etkinlik gösteren ve antiproteazların oksidanlarla inaktivasyonunu önleyen askorbik asit (C vitamini), indirgenmiş glutatyon (GSH), ürik asit, beta-karoten (pro-vitamin A), taurin ve yüksek molekül ağırlıklı antioksidanlar olan mukus ve albümin,

(iii) Reaktif oksijen radikallerinin oluşmasını önleyen ve oluşanın yayılmasını engelleyen (kompartmentalize eden) sistemler: Bunlar hidrojen peroksit ve süperoksit anyonundan hidroksil radikali oluşmasını sağlayan Haber–Weiss reaksiyonunu katalize eden demir ve bakır iyonunu hücrede ve plazmada bağlayan ferritin, transferin, laktoferrin ve seruloplazmin ve mitokondrilerde doğal olarak oluşan radikalleri suya indirgeyen mitokondriyel sitokrom oksidazdır. Enzim–dışı antioksidan maddelerden yağda çözünür bir vitamin olan E vitamini hücre membranında yerleşmiştir ve oksijen radikallerinin lipid peroksidasyonu yapmasını engeller. A vitamini ve beta–karoten, zincir reaksiyonu kıran antioksidanlardır ve ayrıca singlet oksijeni doğrudan yakalarlar (etkisizleştirir). Askorbik asit nötrofillerdeki oksidantları, hidroksil radikali ve hidrojen peroksidi yakalar. İndirgenmiş glutatyon (GSH), hücrelerde (özellikle karaciğerde) sistein, glisin ve glutamik asit’ten sentez edilen bir tripeptittir; reaktif oksijen radikallerini ya doğrudan ya da yukarıda değinildiği gibi enzimatik olarak yakalar. Enzimatik ve enzim–dışı antioksidan mekanizmalar genellikle tek başlarına değil, birbiri ile yakından etkileşerek bir batarya halinde çalışırlar. Şöyle ki askorbik asit ve GSH; lipid peroksit ($LOO\bullet$) ile reaksiyona girerek onu normal ($LOOH$) durumuna getirirler; ayrıca, bu sırada oksitlenmiş olan E vitamini, tekrar indirgenmiş (aktif) E vitamini haline getirirler; başka bir deyişle E vitamini siklusunun sürdürülmesini sağlarlar. Savunma mekanizması enzimlerinden süperoksit dismutazın katalize ettiği ilk basamaktaki reaksiyon aşağıdaki şekilde olur (reaksiyon 2.3) [2] .



Meydana gelen H_2O_2 , ufak miktarda ise indirgenmiş glutatyon peroksidaz (GPO) tarafından suya ve O_2 ’ye dönüştürülerek yok edilir; eğer fazla miktarda oluşmuşsa, daha ziyade katalaz ile ve aynı şekilde yok edilir. Süperoksit radikalinden yukarıda gösterildiği şekilde oluşan H_2O_2 yok edilemezse, vücuttaki demir (ferro) ve bakır iyonları tarafından hidroksil radikaliye dönüştürülür. Glutatyon peroksidaz, glutatyonu oksitlerken hidrojen peroksidi suya dönüştürür. Oksitlenmiş glutatyonun (GSSG), indirgenmiş (aktif) glutatyon (GSH’ ye) çevrilmesi glutatyon redüktaz (GR) enzimi tarafından yapılır. Glutatyonla ilgili oksitlenme ve indirgenme reaksiyonları (2.4, 2.5) aşağıdaki gibidir [2]:



Farklı dokular, hipoksiye farklı zaman periyotlarında dayanır. İskelet kasları iskemiye saatlerce maruz kalabilmesine rağmen, dakikalık iskemi neuronal hasarda geri dönüşülemez hasara neden olur. Aynı organın değişik kısımları, örneğin; bağırsak (intestine) jejunum ve

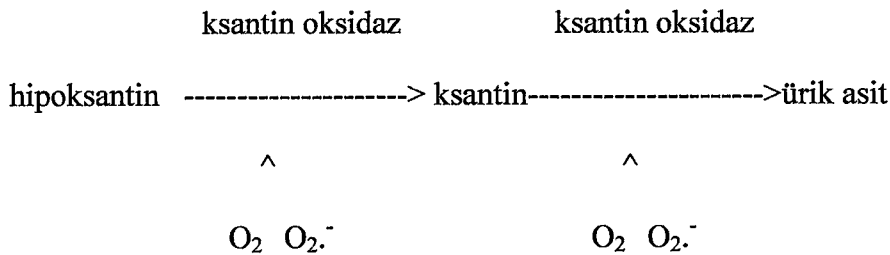
Sellüler ATP'nin düşmesi, ATP- bağımlı iyon kanallarının regülasyonunun kaybı ile sonuçlanır ve hücre membranına geçen pasif iyon değişimlerinin sağlar. K^+ ve Mg^{+2} dışarıya difüzyon olurken Na^+ , Ca^{+2} ve H_2O içeriye difüzyon olur ve hücreyi şişirir. Artmış sellüler Ca^{+2} yıkıcıdır ve en önemli sonuçlarından biriside kalsiyuma bağlı proteazların aktivasyonuna neden olur ve ksantin dehidrogenaz (XDH)'ın ksantine oksidaz'a (XOD) yıkar (Şekil 2.1). Cerrahi reconstruction (yeniden yapılanma) tedavilerini gören hastalarda ekstim akıntı kanı incelemiş ve insan dokusunda iskemide ksantin oksidaz'ın arttığını doğrulanmıştır. Hayvan çalışmalarında, iskemik organ canlılığının araştırılması için ATP ve hipoksantin seviyeleri, kullanışlı parametre olduğu gösterilmiştir [1].

Buna rağmen toksik radikallerin kaynağı az bilinen bir olaydır. Toksik radikaller birçok sayıda parenkima hücreleri, vaskular endotel, nötrofiller ve makrofajlar gibi, değişik hücrelerden oluştuğu var sayılır.

Reaktif oksijen metabolitleri, normal fizyolojik koşullarda mikrosom ve mitokondri ETS' de üretilir. Serbest radikallerin konsantrasyonları minimum düzeyde, serbest radikal yakalayıcıları glutatyon ve glutatyon peroksidaz enzimleri tarafından tutulur. Sınırlanmış oksijen varlığında aktif oksijenin hücresel kaynakları gelişir (Şekil 2.1). Serbest radikallerin oluşumu mitokondride normal metabolizmanın sonucu oluşur. Fakat sınırlı oksijen uygulaması sırasında ATP azalmasından dolayı, mitokondri ATP yoksunluğun üstesinden gelmek için serbest radikallerin üretimi belirgin bir şekilde artırarak daha fazla çalışır. (Kathleen vd., 1998)

2.1.2 Reperfüzyon

Toksik radikallerin ikinci kaynağı ise iskemik perfüzyon sırasında XDH'ın XOD' tersine çevrilemez olarak dönüşmesiyle hipoksantin (yıkılmış ATP) ksantine dönüşmesi esnasında süper oksit iyonları ve hidrojen peroksid oluşturarak neden olur. Reperfüzyonda, hipoksantin ksantin'e ve ürik asit'e dönüştürülür. Oksijen ve ksantin oksidaz varlığında superoksit radikalleri oluşur[1].



Superoksit, nispeten düşük enerji seviyeli bir radikaldir fakat hayli reaktif ve hasar veren hidroksil radikal üretiminde sorumludur. 3 saatlik iskemi ve 1 saatlik reperfüzyonun ürettiği

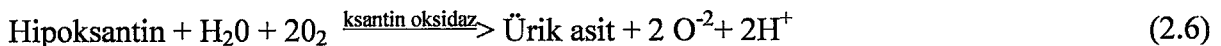
istestinal hasar, 4 saatlik perfüzyonsuz iskeminin ürettiğinden daha fazladır (Parks, ve Granger,1986).

Eğer iskemide ksantin oksidaz'ın ve hipoksantinin toplanması silahın doldurulması ve horozunun çekilmesine benzetilirse, reperfüzyon da tetiğin çekilmesine benzetilebilir, zararlı serbest radikal üretimine sebep veren reaksiyon patlamalarını başlatır. Allopurinol, ksantin oksidaz'ın inhibitörüdür, tetiğin çekilmesini önleme kapasitesine sahip olduğu ispatlanmıştır [1].

2.2 Reperfüzyonda Serbest Radikal Üreten Kaynaklar

Reperfüzyonda çok çeşitli hücre, organel ve enzimler serbest radikal kaynağını oluşturmaktadır. Mitokondrial elektron transport zincirinden (METZ) oksijen kaçaklarının artması bunlardan biridir. Normal koşullarda METZ'de oksijenin kısmi indirgenmesi ile oluşan serbest radikallerin %1-5 olduğu belirtilmiştir. Reperfüzyonda gelen ani ve yüksek konsantrasyondaki moleküler oksijenin iskemi sırasında birikmiş indirgen eşdeğerler (NADH, FADH₂) ile kısmi indirgenmesi sonucunda, serbest radikal iletimi ve oksijen kaçağındaki fizyolojik oran artmaktadır (İşlekel vd., 2000a).

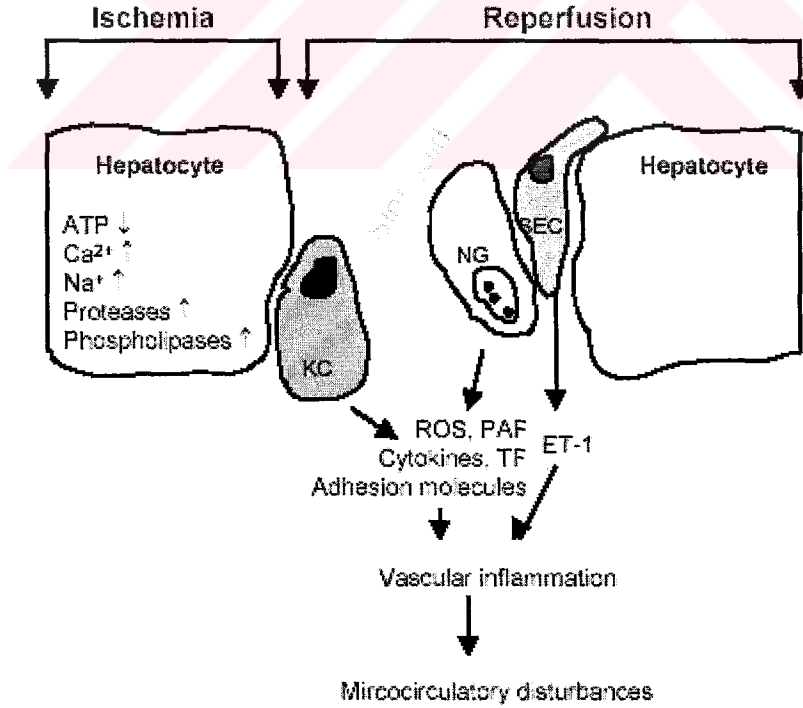
İskemi ve reperfüzyon (iskemik dokunun yeniden kanlanması) olaylarının meydana geldiği klinik durumlarda (şok ve şokun düzenlenmesi, myokard infaktusunda trombolik ilaç yada balon anjiyoplasti uygulanarak tıkanmış koroner dalının açılması, karaciğer gibi organ transplantasyonu, iskemik ekstremitenin revaskülarizasyonu ve barsaktaki tıkanıklığın açılması gibi) ve deneysel olarak bir organın arterinin klamplanması, sonra birden kapakların açılması durumunda bu olaylardan etkilenen dokulardaki hücrelerde belirgin oksidatif stres oluşur. Bunun bir nedeni de iskemik epidozun uzunluğuna bağlı olarak iskemi sırasında XOD enziminin sentezinin, etkinliğinin ve substratlarının artması ve böylece, enzimin reperfüzyon sırasında dokuda konsantrasyonu birden artan oksijeni aşırı miktarda su-peroksid anyonuna dönüştürmesidir. İskemi döneminde Ca²⁺ bağımlı proteazlarca veya sülfidril gruplarının oksidasyonu ile ksantin dehidrogenazın, ksantin oksidaza dönüşmesi sonucunda dokuda ksantin oksidaz oranı %10 luk fizyolojik oranın üzerine çıkmaktadır. Yine iskemide ATP'nin hidrolizi ile ortaya çıkan purin metabolitlerinden hipoksantin ve ksantin, XOD için substrat oluşturmaktadır. Reperfüzyon ile moleküler oksijenin ani ve fazla miktarda dokuya girmesi sonucu XOD reaksiyonu ile ürik asit, yan ürün olarak da süperoksid anyon radikali (O⁻²) oluşmaktadır [2].



Oluşan süperoksid radikali H₂O₂ ve ·OH'ni oluşturmaktadır.



Reperfüzyon periyodunda kan desteği restore edildiğinde, hepatik ve ekstra-hepatik mekanizmaların karışık ağı karaciğer hasarının daha da kötüleşmesine neden olurlar. Kupfer hücreleri, karaciğer makrofajları hızlıca aktive olurlar ve genellikle hepatik mekanizmaların en önemli etkenidirler. Reaktif oksijenlerin salınışıyla, çok çeşitli sinyal transdüksiyon prosesleri başlar. Lipid peroksidasyonda reaktif oksijen radikalleri'nin (ROS) amaçlanmış direk toksitesi hasarın önemli mekanizması gibi görünmektedir. Bunun tersine, trombosit aktive eden faktör (PAF), interleukins ve TNF- α endotel hücrelerden ve monositlerden salınışıyla, ve de redoks duyarlı transkripsiyon faktörlerin (TF) AP-1 ve NF-kB aktivasyonu ile adhezyon moleküllerinin uyarılmış inflamatuvar cevabı, nötrofil sekestrumu, makrofaj ve nötrofillerin toksitelerinin artması için hazırlanılmasını başlatır. Hepatik mikrosörkülasyonda gecikmiş perfüzyon başarısızlığın gelişimi ileri basamaklarda iskemi reperfüzyon hasarı'na atfedilir. Bu olay endotelin-1 (ET-2), ROS gibi vasokonstriksiyonların üretiminin artırılması, nitrik oksit (NO) gibi vasodilasyonların kısıtlanması ile karaciğer perfüzyonunda dengesizliğe neden olabilir. (Gerwig, 2002) (Şekil 2.2)



Şekil 2.2-İskemi reperfüzyon hasarının patomekanizması (Gerwig, 2002).

Karaciğer hasarında oksijen radikalleri önemli bir rol oynar. Ayrıca radikallerden başka, aktifleşmiş lökositler, endotel hücreler (kupfer hücrelerini (KC) de içeren), mikrosörkular bozukluklar ve diğerleri de karaciğer iskemi reperfüzyonuna neden olurlar. Aşırı inflamatuvar cevap reperfüzyon sırasında hasarın açıklayan en önemli kilit mekanizmadır. İskemi KC aktive eder ve ilk perfüzyon periyodu sırasında oluşan reaktif oksijen radikallerin en önemli vaskular kaynağıdır. Fakat bu etki yalnızca no-flow fenomenlu iskemide görülmektedir. Bununla beraber kanamalı yaralanmalarda, örneğin, düşük-akışlı iskemide görülmemektedir. KC odaklı oksidatif stres, iskemik epidozun uzunluğu ile, ksantin ve mitokondri kaynaklı hücre arası reaktif oksijen üretiminde karaciğer bozukluğuna ve iskemi sırasında oluşan hücre hasarına neden olabilir. Fagositoz-tipi NADPH oksidaz varlığı son zamanlarda endotel hücrelerde ve hepositlerde süper oksit üretiminin en önemli kaynağı olarak tanımlanmıştır. GTP' az ların Rho ailesinden Rac1 bu enzimi regüle eder ve inhibe edilmesi hücreler arası oksidatif stresi erken perfüzyon sırasında azaltır ve karaciğer hasarına karşı korur (Jaeschke, H., (2003).

2.3 İskemi-Reperfüzyonda Meydana Gelen Başlıca Hasarlar

İskemi-reperfüzyon sırasında meydana gelen başlıca hasarlar; lipid peroksidasyon hasarı, lipid karboksilasyonu hasarı ve nötrofil kaynaklı hücre hasarıdır.

2.3.1 Lipid peroksidasyon hasarı

Lipid peroksidasyon hayvan ve bitkilerin her ikisinde de meydana geldiği bilinen karmaşık bir süreçtir. Lipid radikallerinin oluşumu ve yayılmasını, oksijen kullanımını, doymamış lipidlerde çift bağların ayarlanmasını içerir. Membran lipidlerin yıkımında sonuç olarak birçok yıkım ürünü oluşur.

İskemi-reperfüzyon hasarının (I/R) en önemli nedeni, artan serbest radikallerin iskemik hücre, plazma ve organel membranlarında, vasküler endotel hücre membranında başlattıkları lipid peroksidasyonudur. Radikal aracılı bir zincir reaksiyon mekanizması şeklinde gelişen lipid peroksidasyonu sırasında, doymamış yağ asitlerinin yan zincirlerinde yeniden düzenlenme söz konusudur.

Lipid peroksidasyon genellikle doymamış yağ asidinden hidrojen atomu kopartılması ile başlar ve lipid radikallerin oluşması ile son bulur. Çift bağların düzenlenmesi konjuge dienlerin oluşması ile sonuçlanır. Moleküler oksijen ile atak, lipid peroksit radikalleri oluşturur. Komşu lipidten hidrojen kopartılması ile ya lipid hidroperoksit veya lipid endoperoksitleri oluşur. Doymamış yağ asitlerde endoperoksidaz oluşumu, yıkım ürünü gibi

malondialdehit oluşmasına neden olabilen en az 3 metilen aralıklı çift bağ içerir. (Buege ve Aust, 1978)

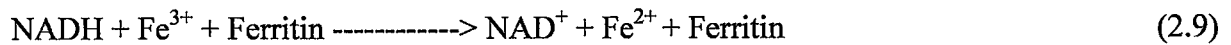
Lipid peroksidasyonu üç aşamada gerçekleşmektedir; Lipid peroksidasyon üç aşamada gerçekleşmektedir; Başlangıç basamağı (initiation), ilerleme basamağı (propagation), sonlanma basamağı (termination).

2.3.1.1 Başlangıç basamağı (initiation)

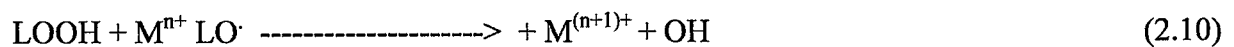
Hız kısıtlayıcı olup yeterli reaktivitedeki oksijen kaynaklı bir radikalın bir metilen (-CH₂-) grubundaki divinil (allilik) hidrojen atomunu koparması ile gerçekleşmektedir. Yağ asidinde çift bağ varlığı C-H bağını zayıflatarak H⁺ atomunun kopartılmasını kolaylaştırmaktadır. Bu nedenle membran lipidlerinin doymamış yağ asitleri yan zincirleri, peroksidasyona özellikle duyarlıdırlar. İlk hidrojen atomunu kopartacak reaktivitedeki radikaller, hidroksil (·OH), alkoksil (RO·), peroksil (ROO·) ve hidroperoksil (HO₂·) radikalleri olup, süperoksit anyonu ve hidrojen peroksit bu reaksiyonu başlatamamaktadır. Hidrojen atomu tek bir elektron içerdiği için, başlangıç reaksiyonu sonunda geride karbon üzerinde eşlenmemiş bir elektron kalmaktadır (-CH·). Daha önce başlangıç reaksiyonu kavramı daha ileri basamakları kapsamaktaysa da, son görüşler bu aşamanın sadece hidrojen atomunun koparılması reaksiyonu olduğunu kabul etmektedir.

2.3.1.2. İlerleme basamağı (propagation)

Karbon merkezli radikal, moleküler bir düzenleme ile izole çift bağ formundan, konjuge dien formuna geçer. Oluşan lipid alkil radikali oksijen ile reaksiyona girerek lipid peroksil radikalini oluşturur (Şekil 2.3). Lipid peroksil radikali ise, bir başka yağ asidinden hidrojen atomunu kopararak lipid hidroperoksidi ve yeni bir lipid alkil radikalini oluşturarak yeni bir zincir reaksiyonu başlatabilmektedir. Lipid hidroperoksitleri, fizyolojik koşullarda nispeten kararlı moleküller olmakla birlikte, geçiş metalleri veya metal komplekslerinin katalizörlüğünde parçalanabilmektedirler Serbest demirin en önemli kaynağı ferritindir. NADH ve O², ferritindeki ferrik demirin indirgenmesini ve ferröz demir (Fe²⁺) olarak salınmasını kolaylaştırmaktadır(2.9).



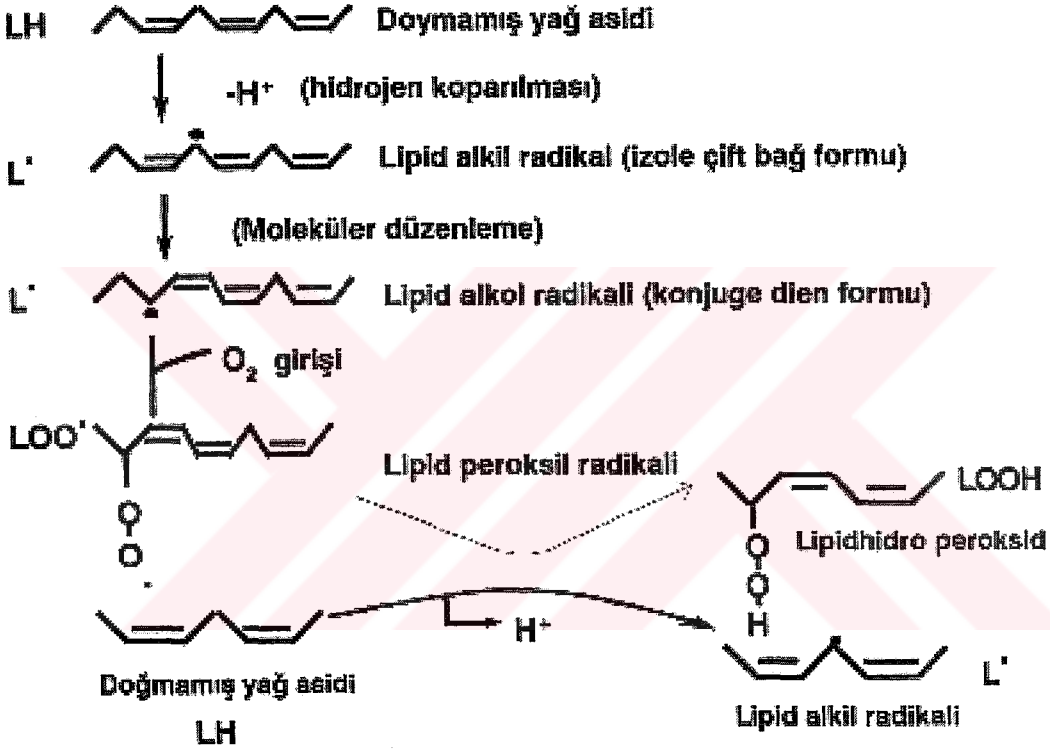
İndirgenmiş metal iyonları (Fe²⁺ ve Cu⁺) lipid hidroperoksidi ile reaksiyona girerek alkoksil radikalini (LO·), okside metal iyonları ise (Fe³⁺ ve Cu²⁺) daha yavaş bir reaksiyonla alkoksil ve peroksil (LOO·) radikallerini oluşturmaktadır (2.10).



Her iki radikal de başka yağ asitlerinden hidrojen atomu kopartarak lipid peroksidasyonu zincir reaksiyonunu sürdürürler.

2.3.1.3 Sonlanma basamağı

Lipid peroksidasyonu zincir reaksiyonları, iki lipid peroksid radikali etkileşinceye kadar sürmekte ve siklik peroksid (LOOL) oluşumu ile sonlanmaktadır (2.11).



Şekil 2.3 Lipid radikalleri (İşlekel vd., 2000b).

Lipid peroksidasyonu sırasında, karbon bağlarının kopması ile aldehit yapısında yıkılım ürünleri ortaya çıkmaktadır. Bu sitotoksik metabolitler, malondialdehid (MDA) gibi alkaneller, 4 hidroksinonenal gibi hidroksialkenallerdir. Malondialdehid sınıfından olan tiyobarbitürik asit ile reaksiyon veren maddeler (TBARS), iskemi reperfüzyon olayında lipid peroksidasyonunun en duyarlı göstergelerindendir. Çünkü tiyobarbitürik asitle tepkimeye girerek 576 nm absorbansta ölçüm verir. Mikrozomal membranın lipidlerinin peroksiteleşmesi sırasında oluşan malondialdehit oluşumu, farklı dokularda farklı miktarda olması lipid peroksidasyonun seviyesinin karşılaştırmayı zorlaştırır. Bunun nedeni farklı dokuların mikrozomal membranında değişik miktarlarda doymamış yağ asitlerin neden olmasından

kaynaklanır, çünkü yalnızca 3 veya 3 den fazla metilenmiş çift bağlara sahip doymamış yağ asitleri yıkım ürünü olarak malondialdehit üretebilir. Buna rağmen, tiyobarbitürik asit analizi lipid peroksidasyonların görüntülenmesinde duyarlılık ve basitliğe sahip olmasıyla kullanışlı bir metot olmayı sürdürmektedir. (Buege ve Aust, 1978)

İskemide başlayan lipolizin, reperfüzyon süresince de devam ettiğine dair kanıtlar bulunmaktadır. Bu nedenle reperfüzyonda, enzimatik lipoliz ve lipid peroksidasyonu, membran hasarında sinerjizm içinde sürmektedir. Peroksidede olmuş yağ asitleri, lipolizi gerçekleştiren fosfolipazlar için doğal yağ asitlerine oranla daha iyi substratlardır. Ayrıca lipid peroksidasyon ürünleri de fosfolipaz aktivitesini stimüle etmektedirler. Lipid peroksidasyonu, ortamda doymamış yağ asitleri, oksijen ve metal katalizörler (Fe^{2+} , Cu^{+}) bulunduğu sürece logaritmik olarak artarken yeni serbest radikallerin oluşumuna neden olmaktadır. Bu nedenle reperfüzyon dönemi, lipid peroksidasyonu için gerekli koşulları sağlaması bakımından çok uygundur. Lipid radikalleri veya MDA gibi peroksidasyon ürünleri aracılığı ile lipid peroksidasyonu, biyolojik membranlarda yaygın hale geldiği zaman hücresel yapı ve fonksiyon hasarları ortaya çıkmaktadır. Lipid peroksidasyonu sonucu ortaya çıkan ve fonksiyonel hasara neden olan temel yapısal değişiklik; membran yağ asidlerinin interior alkil zincirlerine hidrofilik bir grubun girmesi ve yağ asidlerinin aköz faza doğru dönmeleridir. Bunun sonucunda oluşan fonksiyonel hasarlar şunlardır:

Lizozomal ve mitokondrial membranları ilgilendiren ileri derecede lipid peroksidasyonu ile organel içeriğinin (mitokondrial matriks enzimleri, lizozomal enzimler gibi) hücre içine salınması. Normal koşullarda lizozomlar içinde güvenli bir şekilde tutulan lizozomal proteolitik enzimlerin sitoplazmaya salınmaları ile hücre içi proteolizin hızlanması ve doku hasarının şiddetlenmesi (İşlekel vd., 2000b).

2.3.3 Lipid Karboksilasyonu hasarı

Reperfüzyonda ortaya çıkan serbest radikallerin etkisi ile oluşan lipid radikali, dokuda artmış bulunan karbondioksit ile reaksiyona girerek lipid karboksil radikalini oluşturmaktadır. Karboksil radikali, lipid peroksidasyonu kadar yaygın olmasa da membran hasarına katkıda bulunmaktadır (Gutteridge, 1995).



2.3.3 Nötrofil Kaynaklı Hücre Hasarı:

Reperfüzyon hasarının önemli bir nedeni de, iskemik bölgeye lökositlerin, öncelikle de polimorfonükleer lökositler (PNL) olan nötrofillerin infiltrasyonudur. Bilindiği gibi nötrofiller fagositoz olayı ile canlıyı enfeksiyöz ajanlardan koruyan kan hücreleridir. Son yıllarda yapılan çalışmalarda, iskemiye maruz kalmış hücrelerin nötrofil ve trombositlerin vasküler endotele adhezyonuna dolayısıyla yangısal yanıtı açan, kemoatraktan maddeleri ve adhezyon molekül aktivatörlerini salgıladıkları gösterilmiştir. Nötrofil kemotaksisine neden olan en önemli etken, XOD reaksiyonu sırasında ortaya çıkan süperoksit anyon radikalleridir.

Nötrofiller, adhezyon molekülleri aracılığı ile etkileşime girdikleri endotel hücreleri arasında ilerleyerek (diapedez olayı) ekstrasvasküler dokuya doğru göç ederler. Aktifleşmiş nötrofiller, antimikrobiyal savunma sisteminde kullandıkları mekanizma olan NADPH oksidaz enzimi aktivasyonu ile reperfüzyonda gelen moleküler oksijenden seri reaksiyonlar sonucunda süperoksit anyon radikali (O_2^-), hidrojen peroksit (H_2O_2), hidroksil radikali ($\cdot OH$), hipoklorik asit ($HOCl$) ve kloraminleri ($R'RNCl$) oluşturarak, ileri doku hasarına neden olurlar (İşlekel vd., 2000a).

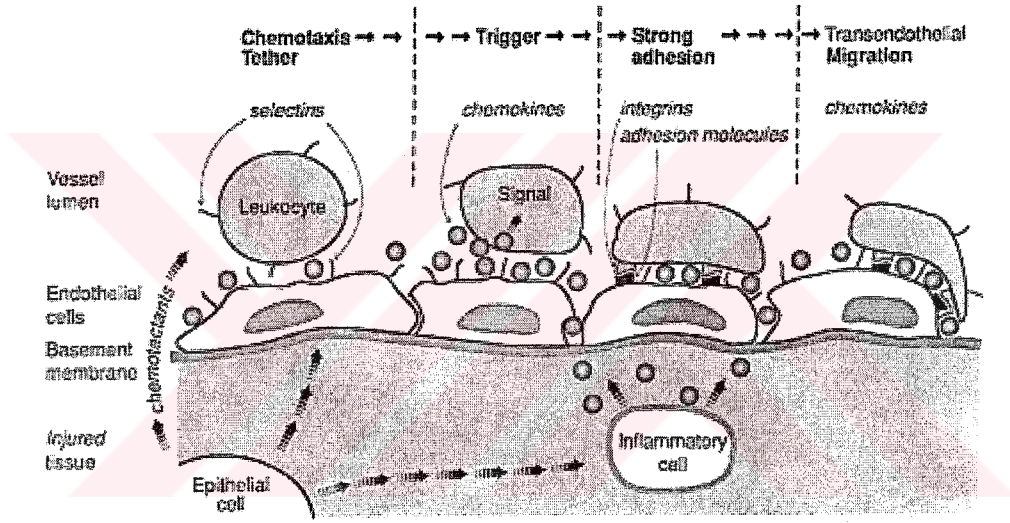
Perfüzyon sırasında kapillerler, anoksik hasarın daha kötü yapma ihtimaliyle kapanır ve 'no-flow' fenomen olarak bilinir. Reperfüzyon döneminin en önemli mikrovasküler patolojisi olan kan akışının geri dönmemesi fenomenine (no reflow phenomenon), aktive olmuş nötrofillerin yol açtığı ve nötrofillerin kapillerlerdeki agregasyonları ile kan akımının geri dönmesine engel olan kapiller tıkaçları oluşturduğu bildirilmiştir. (İşlekel vd., 2000b).

Nötrofiller salgıladıkları vazokonstriktör ajanlar ve trombosit aktive edici faktör (PAF) ile daha büyük damarlarda da (arteriyol, prekapiller damarlar) daralmaya neden olmaktadır. Hidrojen peroksidin, kültürleşmiş endotel hücrelerin PAF üretimi için uyarılmasını ve sonuç olarak lökositlerin ve monolayer endotel hücrelerin adhezyonunu teşvik ettiğini göstermiştir. İskemiye izleyen perfüzyonun, PAF seviyesini önemli ölçüde arttırdığını ve lökosit adhezyonunu kolaylaştırdığını göstermiştir. Nötrofillerce üretilen süperoksit anyon radikalinin de eritrositlerin agregasyonunu hızlandığını ve bu etkinin nötrofil agregasyonu ile birlikte kapiller tıkanmayı daha arttırıcı olabilmektedir [1]

Polimorfik hücrede myeloperoksidaz (MPO) ve NAPH oksidaz'ın mekanizmasına doğru serbest radikaller de üretebilir. PMN, hedef hücreler için zararlı olan hidrojen peroksit ve hipoklorik salınması yoluyla hasara neden olabilirler. Nötrofil granülleri serine proteaz, elastaz, kollegenaz ve jeletinaz gibi çok sayıda enzimi içerir. Sonuçta bu enzimler mikrovasküler geçirgenliğin artmasına sebep olurlar. Nötrofillerden kaynaklanan toksik

metabolitler yoluyla proteolitik enzimlerin doku yıkımına alakalı katkısı hala açık değildir. (Katleen, vd 1998).

İskemik dokuda, serbest radikaller de dahil olmak üzere diğer bazı kemoatraktanların etkisi ile göç eden nötrofiller, aşağıdaki mekanizmalar ile reperfüzyonda doku hasarının ilerlemesine yol açmaktadırlar. Lökositlerin inflamatuvar bölgelerine ikmali birkaç basamakta olur. Birincisi, ilk iskemi olayından sonra, kemotaraksların, sitokinlerin salınımı; lokal inflamatuvar bölgesinden sırayla salınır ve endotel ve nötrofilleri aktive eder. İzleyen yapışma olayı birbirini takip eden 4 bölüme ayrılır; bağlanma reaksiyonları (tethering), başlama reaksiyonları (triggering), kuvvetli yapışma (strong adhesion) reaksiyonları ve kendiliğinden hareket basamağı (motility) (Adams ve Shaw, 1994) (Şekil 2.4).



Şekil 2.4- Lökosit'in endotele adhezyon basamaklarının sırası (Adams ve Shaw, 1994)

Endotel hücreler ve lökosit arasındaki bağlanma reaksiyonları selektin ve ligantları vasıtasıyla lökosit'in küçülmesine neden olur. Endotel hücreleri sitokineyle aktive olduğunda (triggering), sitoplazmik granüllerden olan integrinlerin endotel hücre membranına translokasyonu hızlı olur. Endotel ve lökosit arasında integrin ve hücre arası bağlanma moleküllerinin vasıtasıyla sıkı bağlanma (yapışma) meydana gelir. Kuvvetli bağlanmadan sonra lökosit yassılaşır ve göç basamağı başlar (Adams ve Shaw, 1994). Temel membrana doğru göç, proteazların salınmasına neden olur ve lökosit göçü gerçekleşmiş olur. PMN'ler ilk inflamatuvar yanıtın kritik mediatörü gibi uzun süre kabul edildi fakat I/R'da ki rolü hala tartışmalıdır (Katleen, vd 1998).

PMN, karaciğer I/R hasarında önemli bir rol oynar. I/R hasarı karaciğerin 1. dereceden bozuklukları önemli klinik problemleri arasında yer alır ve ölümcül olarak atfedilir. İskemi

reperfüzyon hasarında belirgin iki fazı tespit etmiştir. İlki, oksidant stres yoluyla kupfer hücrelerine atfedilir. Sonraki faz ise, reperfüzyon sırasında, karaciğerde polimorfiknükleer hücrelerin kütle toplanmasına eşlik eder. Birinci fazda meydana gelen olaylar kupfer hücrelerinin aktivasyonunu içerir ve karmaşık inflamatuvar cevabı aktive eder. Bu da nötrofillerin hepatik birikintisiyle sonuçlanır. Birikmiş nötrofiller direkt olarak hepatositleri, oksidant ve proteazlar salarak hasara neden olurlar. Aktiflenmiş PMN I/R hasarında can alıcı faktörler olarak atfedilir (Jiang vd., 2003).

Jaescke vd, (1993) anti-CD 11 monoklonal antikor kullanarak I/R deneylerini yapmıştır. Bu antikorla öncül tedavi karaciğer hasarını önemli ölçüde hafifletmiş ve post-iskemik karaciğerde polimorfiknükleer hücrelerin sayısını morfolojik olarak ölçüldüğünde %59 azaltmıştır. Ek olarak, in vitro olarak nötrofillerin süper oksit oluşturma yeteneğini azaltmıştır. Farhood vd, (1995) bildirdiğine göre de; anti-ICAM-1 monoklonal antikor kullanılmasının karaciğer hasarını üzerinde koruyucu bir etkisinin olduğu, infltre nötrofillerin sayısında sınırlandırılmış düşüş oluştururken süper oksit oluşumunda ise in vitro olarak etkisinin olmadığı görülmüştür.

T-hücrelerinden yoksun fare modellerini kullanarak, Zwzcka vd, (1997) T-lenfositlerin (CD4+hücreler) iskemi/reperfüzyon sonrası karaciğerde subakut nötrofil inflamatuvar yanıtın kilit aracı olduğu gösterilmiştir. Subakut karaciğer hasarının kapsamı (GTP(glutamat pruvat transaminaz) ile ölçülmüş) ve hepatosellular nekrosis, T-hücresi yoksun farede dramatik şekilde azalmıştır ve spesifik olmayan sıçan anti-mouse antikorlu immunoflüoresans boyama ile ölçülen hepatik nötrofil infiltrasyonunda 10 kat azalma ile alakalı olduğunu görmüştür.

Vollmar vd, (1994) sıçan karaciğerinde iskemi reperfüzyon deneyinde vivo flüoresans mikroskopi tekniğin kullanmış; hasar ve post-sinosodual venüllerde lökosit yapışma miktarı arasında önemli bir korelasyon bulmuştur.

Harada vd., (1999), modife antitrombin kullanarak iskemik hepatik hasarın endotel hücrelerden prostacyclin salınarak lökositlerin hücre yüzeyindeki glikoaminoglikanlara yapışmasını engelleyerek hasarı azalttığını bulmuştur. Prostocyclin aktivitelerinden biride vasodilasyondur ve lökositlerin aktivasyonunu inhibe eder. Bunu da monositlerden, nötrofillerin endotel hücreye yapışması ile salınan TNF- α inhibe ederek sağlar.

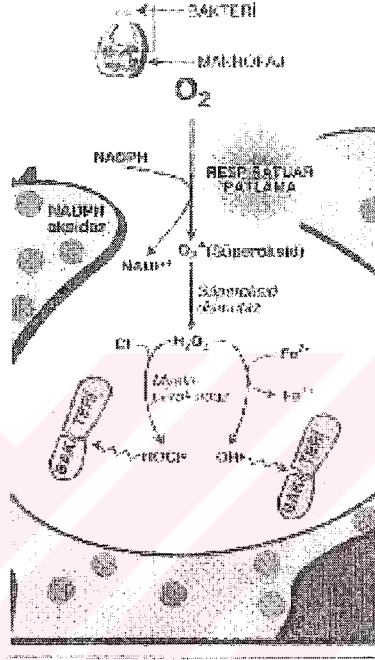
Zhang vd, (1994) 30 dakikalık iskemiden sonra PMN ile aktive edilmiş izole perfüzyonu göstermiş ve 60 dakikalık perfüzyondan sonra ölü hepatositlerin sayısında önemli bir artış azalmakta ve olaylar kısır bir döngü içine girmektedir.

I/R hasarında, nötrofiller endotel hücrelere yapışma ve interstitial bölgelere göç için aktive olurlar. Doku hasarı nötrofil infiltrasyonu derecesi ile orantılıdır ve direkt olarak myeloperoksidazın (MPO) aktivitesiyle ölçülebilir. Sıçanlarda iskemi/perfüzyondan sonra, filtre içi nötrofillerin sayısında ve MPO aktiviteleri arasında iyi bir korelasyon vardır. Uzun süreli süperoksid dismutaz ile öncül tedavi, yükselmiş MPO aktivitesini ve I/R hasarı ile indüklenmiş nötrofil sayısını önemli ölçüde hafifletir (Katleen, vd 1998).

Fagositoz mikroorganizmalar, yabancı partiküller ve hücre atıklarının nötrofil (PMN) ve makrofaj gibi hücreler tarafından yutulmasıdır. Özellikle bakteriyel enfeksiyonlarda önemli bir savunma mekanizmasıdır. PMN ve monositler bakterilerin öldürülmesi için hem oksijen/bağımlı hem de oksijen bağımsız mekanizmalar içerir. Oksijen bağımlı mekanizmalar MPO sistemini oksijen türevi serbest radikallerin üretimini sağlayan başka bir sistemi içerir. Oksijenden bağımsız bir sistem patojenlerin öldürülmesinde fagolizomdaki pH değişiklikleri ve lizozomal enzimleri kullanır. Bütününde, bu bakterisidal mekanizmaların etkisi MPO sistemleridir (Şekil 2.5). Fagositoz olduktan sonra, lökosit hücre membranında yerleşmiş olan NADPH oksidaz sistemi çevre dokulardaki moleküller oksijeni süper okside dönüştürür. Süper oksit oluşumuna etki eden moleküller oksijenin hızlı tüketimi 'respirator patlama' olarak adlandırılır. Daha sonra süperoksit, süper oksidaz dismutaz (SOD) ile hidrojen perokside dönüşür. Fagolizozomlarda bulunan lizozomal bir enzim olan MPO'nun varlığında peroksit ve klorür iyonları bakteriyi öldüren hipokloröz aside (HOCl , çamaşır suyunun temel maddesidir) dönüştürülür. Fazla peroksit katalaz veya glutatyon peroksidaz ile nötralize edilir. NADPH oksidaz hormonal olarak düzenlenen ve alt birimlerinde sitokrom ile flavin koenzimi taşıyan bir enzim kompleksidir (Champe ve Harvey, 1997).

MPO, polimorfik nükleer lökositler de halojen iyonlarını kofaktör gibi kullanarak bakterilerin öldürülmesinde önemli rol oynar. Toplam kuru hücre ağırlığının % 5' i kadar olan MPO, PMN' nin normal fonksiyonları için gerekli bir enzimdir. PMN' nin içinde azurofil granüllerine yerleştirilmişlerdir ve fagositozis sonucu olarak fagolizozomlarından salınır. PMN çeşitli uyarıcılar tarafından uyarıldığı zaman, MPO hücrenin diğer lizozomal enzimleriyle birlikte salınır. MPO, ayrıca fagozomlanmış bakteriyi direkt olarak klorlayabilir olmasından dolayı MPO-hidrojen peroksid-Cl sistemi, mikrop dezenfektaninde çok önemli bir role sahip olduğu görülmektedir. Kesin mekanizmalarla mikrop dezenfektanı tartışılmalı iken , açıkça görülüyor ki MPO sistemi işlemlerin optimal bir şekilde gerçekleşmesi için çok önemlidir (Suzuki, vd., 1983).

Bakteri dezenfektasına ek olarak, MPO–hidrojen peroksidaz sisteminin ürünleri mantar, parazit, protozoa, virüs, tümör hücreleri, natürel öldürücüler (natural killer) ve trombositlerin öldürülmesinde önemli bir rol oynadığı düşünülmektedir. Ayrıca MPO hidrojen peroksid-Cl sistemi respiratuvar patlamasını da sonlandır maktadır. Çünkü MPO aktivitesinden yoksun bireyler respiratuvar patlamasını sürdürmektedir (Lanza, 1998).



Şekil 2.5 Nötrofil, oksijen bağımlı myeloperoksidaz sistemi (Champe ve Harvey, 1997)

MPO analizinde, metot yaygın olarak kullanılan madde olan dimetoksi benzidin (DMB) kullanılır. Çünkü DMB, kanserojen olarak bilinen tetrametoksi benzidine (TBM)’nin alternatifidir. İnkübe sıcaklığı, madde konsantrasyonları ve pH gibi tahlil koşulları, Andrew & Krinsky’nin TBM metodu üzerine geliştirilmiştir. MPO’nun enzim kaynağı gibi kullanılması mantıklıdır. Çünkü MPO her ikisi de potansiyel lizozomal enzimlerin salınmasında etkili olan sitoklasin ve f-met-leu-phe’ nin uyarılması ile fagozomların bakterilerin öldürüldüğü yere, hücre içine salını. MPO tahlilinin duyarlılığı artırılmış ve çok sayıda örnek eklenmesiyle aynı zamanda tahlil yapılabilmektedir (Suzuki, vd., 1983).

2.4 Hiperbarik Oksijen (HBO₂) Tedavisi

Hiperbarik oksijen tedavi (HBOT)'si, deniz seviyesindeki atmosferik basınçtan (1 ATA [atmosphere absolute] = 760 mmHg) 2-3 kat daha fazla bir basınçta %100 oksijen solutulması ile uygulanan, birçok akut veya kronik hastalığın tedavisinde primer tedavi yöntemi olarak, ya da bir çok iskemik reperfüzyon hasarının tedavisinde yardımcı terapi olarak kullanılan bir yöntemdir bir tedavi şeklidir. Maske, başlık veya endotrakeal tüp ile uygulanan HBO₂ ile arteriyel oksijen basıncı 2000 mmHg'ya, doku oksijen basıncı da 400 mmHg'ya kadar çıkarılabilir. Bu basınçla yapılan oksijen uygulaması biyokimyasal, sellüler ve fizyolojik birçok yarar sağlar (Buras vd., 2000).

Hiperbarik oksijenin klinik yararı, basıncın mekanik etkisiyle, gaz kanunlarının fiziğiyle, hiperoksianın fizyolojik ve biyokimyasal etkileriyle ve ayrıca hedef hücrelerin lokal hipoksinin ters dönüşümüne bakılarak açıklana bilinir (Lieutenant, 2000).

2.4.1 Hiperbarik Oksijen Uygulamasında Biyokimyasal, Hücresel Etkiler ve Fizyolojik Etkiler

HBOT'si sırasında PaO₂'nin artmasının başlıca farmakolojik etkiler şu şekilde sıralayabiliriz;

2.4.2 Kan Oksijen İçeriğinin Artması

Deniz seviyesinde çözünmüş oksijenin plazmadaki konsantrasyonu 3 ml/ l dir. Hareketsiz normal perfüzyona uğramış hücre her litre kan için yaklaşık 60 ml oksijene ihtiyaç duyar. 3 ATA da çözünmüş oksijen konsantrasyonu 60 ml/ l ye yükselir ve dokuda oksijen taşınması için gerekli olan hemoglobine gerek duymadan yapabilir. Böylece HBO₂ (hiperbarik oksijen)'nin yararı açıkça patolojide hemoglobin içeren karbon monoksit zehirlenmesi gibi ve ciddi anemilerde yararı açıktır. (Lieutenant, 2000).

2.4.3 Antibakteriyel etki

Lokal hipoksi, nötrofil-ilişkili bakteri ölümünü serbest radikaller vasıtasıyla azaltarak yarayı enfeksiyona yatkın hale getirir. HBO₂ savunma mekanizmasını güçlendirir ve fagositoz ile bazı bakterilerin öldürülmesini sağlar. Ek olarak, HBO₂, *Clostridium perfringens* gibi bazı anaeroblar üzerine bakterisidal, bazı *escherichia* ve *pseudomonas* türleri üzerine de bakteriostatik etkiye sahiptir. Aynı zamanda clostridial alfa toksin yapımını da baskılar (Gökmen, 2001),

2.4.4 Vazokonstriksiyon

HBOT, yüksek arteriyel oksijen tansiyonundan dolayı kemoresöptörleri etkilediğinden vazokonstriksiyon neden olurlar. Bu % 20'lik kan artışının azaltılması kapiller sızmayı ve disaptisesi azaltır, dolayısıyla ödemi azaltır. HBOT önemli anerooplara karşı direk antibakterial etki gösterir. Fagositozdan sonra lökositlerin öldürücü özelliğini korur. HBOT doku oksijen tansiyonunu, fibroblastların kollogenlere uygulanması için gerekli seviyenin üstünde angiogenesisin oluşması için artırır. Ek olarak HBOT aktif transportla hücre duvarını geçen antibiyotiklerin etkisini artırır [3].

2.4.5 Akut Travmatik İskemik Hasar

Birçok mekanizma HBOT' sinin iskemik hasarda yararı olarak düşünülmüştür. Bunların biride dokuyu radikallerden koruyan radikal yakalayıcıların üretimini teşvik etmek ve hücre membranının lipid peroksidasyonlarını engellemek ve lökositlerin iskemiye maruz kalmış hücrede alıkonulmasını teşvik ederek hasarlı hücrede toplanılmasını engellemektir (Zamboni vd., 1989)

HBOT'si lipid oksidasyon ürünlerinin (konjuge dienler, trienler, thiobarbutirik asit-reaktif maddeleri) plazmasında, düşük yoğunlukta lipoproteinlerde ve plazmanın yüksek yoğunluklu lipoprotein fraksiyonlarında, karaciğerde bu ürünlerin birikmesini azaltır. Tekrarlanan HBOT' sine veya hiperoksiye maruz kalma hidrojen peroksidin üretilmesine neden olur ve hidrojen peroksit myeloperoksidaz-katalizli hipokloröz asidin üretilmesinde önemli bir etkidir. Diğer taraftan tekrarlanmış korunmasız, HBO₂ doku tarafından antioksidan reajaant veya enzimlerin üretilmesini indükleyebilir. (Bhalchandra vd., 2000)

HBO₂ bütün vücut için daha fazla oksijenleşme sağlar. Artmış doku oksijeni, fibroblastların büyümesini, kollajen oluşumunu, anjiogenesizi ve hipoksik lökositlerin fagositoz kapasitesini artırır. Böylece reperfüzyonla alakalı hasar lökositlerin uygun olamayan aktivasyonu ile alakalıdır. İskemik aralığın izlenmesi ile, tüm hasar iki kompartmandan oluşur. Hipoksiden kaynaklanan direk geri dönüşümsüz hasar komponenti ve lökositlerin uygun olmayan aktivasyonlarından kaynaklanan indirekt hasar. HBO₂ hasarın indirekt olanını azaltır. Marjinal dokuların korunması net etkidir. (Yaşar vd., 2003).

Reperfüzyonda ani gelen yüksek O₂ kan, ROS oluşması ile hasara neden olurken, HBO₂ tedavisinin kullanılması aykırı görünmektedir. Fakat HBO₂ tedavisi reperfüzyon hasarı deneylerinde yapılan son invivo çalışmalarda etki mekanizması kesin olarak bilinmemekle birlikte hasarın üstesinden gelmiştir. Reperfüzyon hasarı tamamıyla hasarlı dokuya nötrofil infiltrasyonu ve serbest radikaller üretmesiyle alakalıdır. Hücreler arası adhezyon molekülleri

ICAM-1, iskemik hasarda CD11/CD18 polimorfonükleer lökositler ekspresyonu ile alakalıdır. Peptidlerin bloklaşması aracılığıyla ICAM-1 fonksiyonunun inhibasyonu ve ICAM-1 nul-trasjenik fare modellerinde reperfüzyon hasarında önemli ölçüde bir azalma olduğu gösterilmiştir. HBO₂, PMN adhezyonu üzerine ve infiltrasyonuna olan yararlı etkisinin moleküler mekanizması çok iyi şekilde tanımlanmamıştır fakat yapılan bir çok çalışmalarda HBO₂'nin PMN adhezyon molekülleri üzerindeki etkisini ICAM-1 protein ekspresyonunu ayarlamasıyla olabileceği üzerine çalışılmıştır. Hipoksiyi izleyen endotel hücrelerinin HBO₂ tedavilerinde ICAM-1 protein ekspresyonlarını indüklemesinin kaldırılması için uyarılmıştır. Ayrıca PMN nin endotel monolayer adhezyonu da engellemek için de uyarılmıştır. Kısaca HBO₂ nin I/R hasarında yararlı etkisi ICAM-1 molekülünün ekspresyonunu azaltarak olmaktadır (Buras vd., 2000).

Reperfüzyon hasarı, "crush injury" ve kompartman sendromunda tabloyu ağırlaştırır ve cilt flepleri ve doku greftlerinin beslenmesini bozar. Nötrofiller reperfüzyon hasarında suçlanan önemli bir endojen faktördür. Nötrofiller iskemik damar duvarına yapışarak proteaz ve serbest oksijen radikalleri salınımına neden olur, buna bağlı olarak vazokonstriksiyon ve aşırı doku yıkımı ortaya çıkar. HBO₂ nötrofillerin yapışmasını ve fare iskemik dokusunda oluşan post iskemik vasokonstriksiyonu engeller. "Crush injury" ve ekstremitelerde meydana gelen diğer ciddi travmalar, büyük damarlarda yırtılma ve mikrosirkülasyonda bozulma ile sonuçlanır. Buna bağlı gelişen iskemi ve ödem, kompartman sendromu ve doku nekrozu ile sonuçlanır. Akut travmatik iskemik hasarda, halen tedavide temel yöntem cerrahidir. Ödemin azaltılması, reperfüzyon hasarından korunma ve yara iyileşmesinin sağlanmasında, HBO₂ destek tedavi olarak yararlıdır. Deneysel iskemi ve kompartman sendromu oluşturulan hayvanlarda, HBOT'i, tedavi uygulanmamasına kıyasla daha etkili olduğu gösterilmiştir. HBO₂'nin akut travmatik iskemik hasarda yararlı olduğunu gösteren birçok olgu sunumları ve olgu serileri olmasına karşın, hayvanlar ve insanlarda normobarik ve hiperbarik oksijenin etkilerini kıyaslayan karşılaştırmalı bir çalışma yoktur (Gökmen, 2001).

HBO₂ oksijen için itici difüzyon gücünü ve onunla ilgili artan doku oksijen elde edilebilmesini etkili bir şekilde artırır. Bu I/R üstesinden gelir ve oluşan ödemi engeller, hücre membranı ve bariyerlerin bütünlülüğünü korur, toksik maddeleri nötralize eder, fagositozu teşvik eder, serbest radikalleri yakalar, anjiogenesizi stimüle eder [5]

Hipoksi serbest oksijen radikallerine neden olur. Dokuya yetersiz oksijen verilmesi ATP nin adenozine katabolizlanmasına ve elektron verici olan, ksantaninin üretilmesine neden olur. Oksijen varken, elektron superoksit iyonundan O₂ den alınır. Burada önemli olan hipoksinin

hidroksil iyonunu oluşturan, membranın hasar görmesi ve kalsiyumun hücre içine çekilmesi gibi bir sürü reaksiyona neden olmasıdır. Hipoksinin düzenlenmesi bu serbest radikallerin oluşmasını sınırlar. Hekimlerin çoğu oksijenin oksidatif strese neden olduğunu düşüncesine meyillidirler fakat oksijenin yokluğu hasara neden olur. Reperfüzyon hasarı sörkulasyon kesildiğinde ve sonra oksijeni düşük kan dolaşımında iken olur. Hiperbarik oksijenleştirmenin yararını reperfüzyon hasarını dramatik şekilde düşürdüğünden görebiliriz [4]

2.4.6 Hiperbarik oksijenin yararlı mekanizmaları

Yararlı birçok mekanizma HBO_2 aralıklı uygulanmasıyla alakalıdır. Tek başına yada diğer ilaçlarla ve cerrahi prosedürlerle kombinasyonunda, bu mekanizmalar tedavi koşullarında iyileşmeyi ve detoksifikasyonlarını artırır. Hiperoksijenlenme kan akışının az olduğu bölgeye acilen oksijen verilmesini sağlar. Yüksek basınçta hiperbarik odada oksijen plazma konsantrasyonunu, ve faal durumdaki kapillerden perfüzyonlanan oksijen konsantrasyonunun dört kat artırır. Bu hiperoksijenlenme formu yalnızca geçici ölçüm iken, doku canlılığını korunmasında doğrulayıcı ölçümler yapılanabilene veya yeni kan akışı oluşana kadar yardımcı olur. ATP üretimi, hücre membranının bütünlüğü, iyon ve membrandan geçen moleküllerin korunması için gereklidir. İskemik hasarda, ATP seviyesi düşer ve buna bağlı olarak oksijene dayalı olan üretimde düşer HBO_2 'nin iskemiden sonra ATP düşüşünü azalttığı ve iskemik dokuda da laktoz birikmesini önemli ölçüde düşürdüğü gösterilmiştir. (Lieutenant, 2000)

Lipid peroksidasyon iskemik hasarda en önemli süreç olarak kabul edilir. Farelerde ve CO zehirlenmesi çalışmalarında HBOT'si 2 ATA lipid peroksidasyonu engellediği gösterilmiştir (Gökmen, 2001).

HBOT'si, dokuda kısmi oksijen basıncını değiştirir ve yararlı birçok hücresel cevaba neden olur. HBOT'inde oksijen hasarlı bölgeye uygulandığında sistematik şekilde oksijen verildiğinden, yalnızca tedavi edilen bölge değil bütün dokular üzerinde etkisi olduğu için önemlidir. Hepatik, pulmonary, retinal, kardiak, vaskular, neural, iskelet kasları dokuları oksijen uygulamasından ayrı etkilenirler ve oksidatif koşullarda değişikliklere neden olurlar. (Yasar vd., 2003)

HBOT'si hücreler arası ATP seviyesini korur, ödemi engeller ve reperfüzyon hasarına karşı korur. HBOT'si nötrofillerin hasarlı hücre duvarına yapışması eğilimini azaltır. Global hipoksik limlerde ödem oluşmasını % 50, HBOT 8 saatlik sürede engeller. HBOT'si ilk fizyolojik etkisi akut arteri yetersizliğinden kaynaklanan dokunun hiperoksijenlenmesidir. Bu etki lineer değil logaritmiktir ve yeteri kadar oksijen plazmada fiziksel olarak çözünmüş

haldedir. HBOT' sinde P_{O_2} 10, 15 lik bir faktör ile basıncı artırır. Bu artış, kapillerden dokuya oksijeni 3- 4 kez daha fazla artırır. Farelerde HBOT' sinden sonra post-iskemik ödem oluşmasını önemli ölçüde azaltmıştır [5].

Chen vd., (1998), fare modellerinde hiperbarik oksijen uygulamasını hepatik reperfüzyonda incelemiş ve çalışmasında HBO_2 grubunda lökosit yapışma miktarını azaltarak (6.00 ± 1.31 hücre/200 mikrom vs 11.38 ± 2.88 hücre/200 mikrom), MDA seviyesini düşürerek (1.04 ± 0.24 nmol/mg protein vs 2.24 ± 0.49 mikromol/g protein), ve ATP seviyesini artırarak (2.03 ± 0.17 mikromol/g yaş doku vs 0.73 ± 0.11 micromol/g yaş doku)iskemik reperfüzyon zararlı etkilerini azalttığını bulmuştur.

2.5 İskemik Ön koşullaşma

Bir organın maruz kaldığı kısa süreli iskemik periyotlar, aynı organda daha sonra meydana gelecek uzun süreli bir iskemik periyodun neden olacağı hücre ölümünü önleyebilir. Bu koruyucu mekanizma iskemik ön koşullaşma (İÖK) olarak adlandırılmaktadır. İlk kalpte tanımlanmış, daha sonra bu fenomen beyin, böbrek, iskelet kasları ve karaciğere genişletilmiştir. İÖK' nın koruyucu etkisi çalışılan tüm türlerde gösterilmiştir. Koruyucu etki türe özgü değildir. Bu buluşun önemi İÖK kullanılan deneylerde iskemik hasarın iyileşmede tutarlılık göstermesine işaret edilmiştir. Buna rağmen İÖK, iskemi ve reperfüzyon hasarına karşı koruyucu etkisi henüz açıklanabilinmemiştir. Birçok mekanizma; mitokondirik ATP sensetif potasyum kanallardan (K_{ATP}), lökosit adhezyon molekülü olan P-selektin'nin baskılanmasına, heat-shock proteinlerin indüklenmesi ve muhtemelen adenosin salınımının artırımına, iskemik ön koşullaşma sırasında salıverilen reaktif oksijen ve nitrojen türlerinin korumada rol oynadığı öne sürülmektedir. (Demiryürek, vd., 2003; John, 2001)

Dışarıdan adenosin vererek hepatik reperfüzyon hasarını azalttığı bir çok çalışmada doğrulanmıştır (Peralta vd., 1999). Adenosin, reseptörlerinin aktivasyonları ve kısa süreli iskemi-reperfüzyon boyunca oksijen radikallerinin ortama verilmesi İÖK' yı tetiklemeye katkıda bulur. Adenosin, iskemik hücrelerde ATP'nin yıkım ürünü olarak oluşmaktadır. Önce ATP iki yüksek enerjili fosfatını kaybederek AMP' ye yıkılır, daha sonra da AMP 5'-nükleotidaz enzimi ile defosforilasyon sonucu serbest adenosini oluşturur. Adenosinin iskemik ön koşullaşmada önemli rolü, adenosin A1 reseptör antagonisti ile tavşan kalbinde ön koşullaşmayla oluşan korumanın ortadan kalktığını görülmüştür. İÖK sırasında sıçan, tavşan, köpek ve domuzda interstisyel adenosin konsantrasyonunda artış olduğu belirlenmiştir. Adenosin regüle edici ajan olan acadezin, iskemi sırasında adenosin salıverilmesi artırır ve ön koşullaşma için gerekli eşiği düşürür. Adenosin transport inhibitörü dipiridamol verilmesi de

benzer etkiyi oluşturur. Şimdiye kadar 3 adenosin reseptör alt tipi (A1, A2 ve A3) tanımlanmış. A1 ve A3 adenosin reseptör antagonistlerinin tavşanda infarkt alanındaki azalmayı tamamen bloke ettiği gösterilmiştir. Dolayısıyla korumanın başlatılmasında A1 ve A3 reseptörlerinin rolü olduğu düşünülmektedir. Tavşanda adenosinle oluşan miyokardiyal infarkt alanındaki azalma PKC inhibitörleri ile ortadan kaldırılmaktadır. Adenosin ve asetilkolin gibi pek çok endojen mediyatörün İÖK'yı K_{ATP} 'ye bağımlı mekanizma ile oluşturduğu gösterilmiştir. A1 adenosin reseptörü ve K_{ATP} kanalı arasındaki bağlantının G-protein sistemi aracılığıyla olduğu gösterilmiştir. Adenosin protein kinaz C (PKC)'nin stimülasyonu aracılığıyla mitokondrideki K_{ATP} kanallarının aktivasyonuna yol açması korunmadan sorumlu olabilir. Korunmayı sağlayan K_{ATP} kanalların açılma mekanizması henüz tam olarak aydınlatılamamıştır. ATP'ye bağımlı K^+ kanalları intraselüler ATP düzeyleri düştüğünde açılır. K_{ATP} kanallarının blokajı, birçok türde ve insanlarda İÖK'yı ortadan kaldırmaktadır. Buna karşılık K_{ATP} kanallarını açan bir ajan olan bimakalim, İÖK taklit etmekte veya uyarılması için gerekli eşiği azaltmaktadır. Mitokondrial K_{ATP} kanallarını selektif olarak bloke eden 5-hidroksidekanoat, diazoksidin K^+ kanallarını açarak oluşturduğu korumayı tersine çevirebilmektedir.

Yüksek konsantrasyonlardaki serbest radikaller hücre membranında lipid peroksidasyonunu indükleyerek hücre bütünlüğünü değiştirip permeabilitesini artırır. Serbest radikallerin diğer önemli etki yerleri de hücresel homeostazisi sağlayan iyon transportu ile ilişkili membran proteinleridir. Difüze olabilen bir antioksidan olan N-2-merkaptopropiyonil glisin (MPG) ve bir radikal temizleyicisi olan dimetiltiyoüre infüzyonunun İÖK koruyucu etkiyi bloke etmesi serbest radikallerin sadece hasar oluşturmadığını, aynı zamanda düşük konsantrasyonlarda İÖK'yı da tetikleyebileceklerini göstermiştir. Serbest oksijen radikalleri, tavşan kalbinde reseptöre bağımlı olmayan tetikleyici olarak görev almaktadırlar. Serbest oksijen radikalleri oluşturmak amacı ile yapılan hipoksantin/ksantin infüzyonu ön koşullamayı taklit etmiş ve infarkt büyüklüğünü azaltmıştır. Serbest oksijen radikalleri İÖK'mada tetikleyici olarak görev almaktadırlar PKC aktivasyonu İÖK' da sinyal ileti yol ağında önemli bir basamaktır ve serbest oksijen radikalleri farklı mekanizmalarla PKC aktivasyonuna yol açabilirler. Serbest oksijen radikalleri protein kinaz C'yi direkt olarak uyarabilirler. Fosfolipaz D yine serbest oksijen radikalleri tarafından aktive edilebilmekte ve fosfolipaz C gibi PKC aktivasyonuna yol açmaktadır. PKC aktivasyonu yanında, serbest radikaller G-proteinlerini ve ATP bağımlı potasyum kanallarını aktive edebilirler. Serbest oksijen radikalleri tavşan kalbinde reseptöre bağımlı olmayan tetikleyici olarak görev almaktadırlar ve PKC de bu korunmanın sinyal ileti yolağında bulunmaktadır. Superoksit radikali ve nitrik oksidin reaksiyon ürünü olan

peroksinitritin direkt olarak düşük konsantrasyonlarda izole sıçan kalbinde ön koşullama oluşturduğu gösterilmiştir. Ön koşullama sırasında peroksinitrit oluşumu nitrotirozin ölçümü yapılarak da gösterilmiştir. Peroksinitrit ön koşullamasında tirozin kinazın rolü bulunmaktadır. Ayrıca, ön koşullama ile oluşan gecikmiş fazdaki koroner endotel korunmasında nitrik oksidin değil de peroksinitin başlıca tetikleyici olduğu ortaya konulmuştur (Demiryürek, vd., 2003).

Ön koşullama mekanizması ne olursa olsun bu cevap doku ve organın birçok kötü durumlara karşı öz metodu olabilir. Diğer durumlar ön koşullama ile alakalı değişiklikleri taklit ederler. Örneğin; dipiridamol adenosin biyoviabilityyi artırır ve lökositlerin endotel hücre adhezyonunu hafifletmede önemli olduğu düşünülmektedir. İskemiden önce dipiridamol ile tedavi reperfüzyon sırasında hasarı hafifletmiştir. Adenosin-A₂ reseptör agonisti de iskemide karaciğer endotel hücrelerine koruma sağlamıştır. NO sentez inhibitörleri, NG-monometil-L-arginine iskemik reperfüzyon hasarını daha kötü yapmıştır ve P-selektin ekspresyonuna benzer bir etki yapmıştır. P-selektin reperfüzyon hasarını nötrofil ve trombositlerin hasarlı endotele adhezyonu ile arcılık ettiği gösterilmiştir. (John, 2001). İÖK' nın PMN üzerine etki mekanizması kesin bilinmemekle birlikte, intastinal ve iskelet kaslarında lökositlerin endotel hücreyle etkileşimlerini engellediği ihtimali üzerinde durulmaktadır. Cheng vd., (2003), bildirdiğine göre iskemik ön koşullamanın I/R hasarında lökosit adhezyonunu ve infiltrasyonunun postiskemik P-selektin ekspresyonunu önleyerek hasarı azaltır.

İÖK hepatik hasarı azaltır ve canlının yaşam süresini uzatır. Normal karaciğerde, endojen koruyucu mekanizma lipid peroksidasyonlarında, hepatik mikrosirkulasyon başarısızlıklarında, nötrofil toplanmasında hepatik hasarın sonraki basamaklarını azalttığı bulunmuştur. Bu yararlı etkiler NO ile ayarlanıla bilinir, çünkü nitrik oksitlerin sentezlerinin durdurulması ve nitrojen oksit donör tedavisinin iptali veya uygulanması yararılıyla orantılıdır (Serracino-Inglott vd., 2002).

İÖK karaciğerin iskemik reperfüzyon hasarına (cold and warm iskemi) karşı daha fazla tolerans tanır. Genelde, iskemik reperfüzyonu izleyen 5 –10 dk reperfüzyon karaciğere en etkin erken korunmayı sağlar. Bu endojen koruyucu etki mekanizması şunları içerir: Karaciğer ön koşullaması sırasında oluşan kısa süreli nitrik oksit üretimi, reperfüzyon sırasında oluşan toksin reaktif maddelerin azaltılması, ekstra hepatik organlar olan karaciğer, böbrek, pankreas gibi etkiyi kontrol altına alınması, iskemi sırasında enerji metabolizmasının korunması, nükleer transkripsiyon faktör ve diğerlerinin arasında ilişki kurmak gibi mekanizmalardır. (Peralta vd., 2003).

Cavalieri vd., (2003) yaptıkları çalışmada İÖK kupfer hücresinden yoksun karaciğere uygulandığında, iskemik tolerans seviyesine bir katkısı olmadığı göstermiştir. Bu da iskemik ön koşullamanın hedef hücresinin iskemi sırasında kupfer hücreleri olduğunu gösterir. Kupfer hücrelerinin modülasyonunun heposit bütünlüğüyle ve reperfüzyon sırasında düşük pro-toksik madde üretimiyle alakalı olduğunu gösterir. Aktif kupfer hücreleri potansiyel toksik maddelerin üretebilir ve salınımını yapabilir. Bu hücrelerin modülasyonu reperfüzyon hasarına karşı karaciğeri korumak için yeni bir cerrahi ve/veya farmolojik strateji olabilir.

İÖK, sıçan karaciğer ve akciğer hasarını hepatik iskemiden sonra korur. Ksantinin ve ksantinin oksidazın rolünü anlamak için yapılan çalışmada İÖK' nın, karaciğer hasarına karşı korumayı doğrulayıp doğrulamadığı incelenmiştir. Karaciğer ve serum ksantinin/XOD sevipleri ölçülmüştür. İÖK ksantinin toplanmasını, XDH'ın XOD ye iskemi sırasında dönüşümünü azalttığı görülmüştür. XOD'ın inhibasyonu post iskemik reaktif oksijen türlerinin (ROS) üretimini dolayısıyla hepatik hasarın azalttığı gözlemlenmiştir. Ön koşullama, XDH'ın XOD ye iskemi sırasında dönüşüm seviyesinin düşük olması, nötrofil toplanmasının, oksidatif stres ve endoma oluşumunun azalmasıyla sonuçlanmıştır. Sonuç olarak İÖK, ROS'i üreten ksantinin/XOD' bloklayarak, hepatik I/R hasarla indüklenen karaciğer ve akciğer hasarlarına karşı koruma sağlar. (Peralta, vd., 2003)

İÖK konseptinin son zamanlarda organ koruma deneysel modellerinde uygulanmaya başlandı. Hayvan modellerinde, İÖK donör kalp korunmasını arttırdı ve bu koruma hipertermia ve koruyucu solüsyonlarıyla alakalı yaralı etkiye katkı sağladı. Normotermik resörkulasyonunu izleyen kardiyak tutukluluğun kısa periyotları korunan domuz karaciğeri, reperfüzyonsuz kardiyak tutukluluğuna göre denenen donörlere göre önemli ölçüde hayatta kalmayı sağlamıştır. (John, 2001)

Arai vd., (2001), tarafından yapılan çalışmada, kısa süreli iskemik periyot için vasküler kan akışı tıkanıklığı, zaman kazandırır ve karaciğer sonraki iskemik hasarı tolare edebilir, uzun süreli hasar korunmasından önce İÖK uygulanmasına maruz kalmış hayvanların hayatta kalabilmelerini de arttırmıştır. Ek olarak, İÖK' nin yararlı etkisi öncelikle nonprankimal hücre popülasyonunda özellikle sinodial ve kupfer hücrelerinde görünmüştür. Önceden de gösterildiği gibi reperfüzyon hasarından-korunmanın öncelikli hedefi endotel hücre hasarıdır. İÖK endotel hücre hasarını hafiflettiği görülmektedir. (John, 2001)

3. DENEYSEL ÇALIŞMALAR

3.1 Deneydeki gruplar

Toplam 50 adet, 220-300 ağırlığında, 6-6,5 aylık Wistar-Albino sıçanlar, 5 gruba ayrıldı.

Grup 1: Kontrol grubu 8 (n=10).

Grup 2 (I/R): Hepatik hilum'un 40 dk klamplanmasını takiben 60 dk reperfüzyon (n=10).

Grup 3 (İÖK+I-R) :10 dk hilar klamplanması ile İÖK'yı takiben 5 dk perfüzyon yukarıda açıklan I/R prosedüründen az önce uygulanmış (n=10)

Grup 4 (HBO₂+I-R): Sıçanlar % 100 oksijenli li odada 2.5 atm de 80 dk, I-R periyodundan 15-20 dk önce tutulmuştur (n=10).

Grup 5 (HBO₂+ İÖK+I-R): Hiperbarik oksijen uygulaması ve iskemik ön koşullamanın her ikisi de, I-R prosedüründen önce uygulanmış (n=10).

Her bir çalışma tamamlandığında kan ve karaciğer dokuları lipid peroksidasyon ve MPO seviyeleri ölçülmek için alınmıştır. İstatiksel analizler The-KruskaWalls-One-Wall Anova ile gruplar arasındaki önemli farkı anlamak için ölçülmüştür. Post Hoc testide çoklu karşılaştırmalar içinde kullanılmıştır. Gruplar arasındaki korelasyonlar için Pearson Correlation Sig. (2-tailed) test kullanılmıştır.

3.2 Materyaller ve Metotlar:

3.2.1.1 Materyaller;

TMB; tetrametoksi benzidin, N-N dimethyl formamid içinde çözünmüş halde, DMB:3-3 dimetoksi benzidin, Dekstran; Dulbecco'nun fosfat tampon tuzunda çözünmüş halde (Phosphate Buffered Saline PBS), TCA; triklor asetik asit ,TBA; tiyobabutirik asit, HCL;hidroklorik asit, (stok TCA, TBA, HCL ayıracı: %15 w/v; %0.375 w/v; 0.25 N).

3.2.1.2 Polimorfonükleer Lökosit (PMN)' in hazırlanışı;

PMN ve eritrositler, her bir grup için bütün periferik kandan heparinle antikoagulant olarak ayrıldı (20 unit/ml kanda). Eritrositler, 1.5 % dekstran ile PMN'den 10dk oda sıcaklığında çöktürülür. Supernatant kısmı 400g 10 dk 20 C⁰ de sentrifuj edilir ve 20 mM tris-HCL (son pH 7.2) tamponu içeren %75 amonyum klorür solüsyonu ve % 25 otologus plazma solüsyonuna eklenir. 5–10 dk 37 C⁰ de kalan eritrositlerin parçalanması için hafifçe karıştırılır. Plazma, hücre canlılığını korumak ve çökeltmeyi azaltmak için eklenmiştir. PMN PBS' de iki kere yıkandıktan sonra ve 350 x g 10 dk 20 C⁰ de senrifuj edilmiştir

3.2.1.3 Dokunun hazırlanışı:

Doku homojenatları, her bir gruptan alınan dokular tartıldıktan sonra teflon uçlu homojenizator ile, serum fizyolojik (% 0,9 NaCl) ilave edilerek 1/10 (w/v) olacak şekilde homojeneze edilerek hazırlandı. Bu homojenatlar buz içinde 10 saniyelik aralıklarla 2 kez sonikasyona uğratıldı. Daha sonra homojenatlar 2000 x g devir ve 4 C⁰ de 30 dk. santrifüj edildi.

3.2 .1.4 Myeloperoksidaz Aktivitesinin Ölçümü

3.2.1.4.1.1 Geliştirilmiş Tetrametoksi Benzidin Metodu (imp-TMB)

MPO için her bir gruptan alınan 10 µl PMN supernetantı veya doku homojenatı reaksiyonu; 1.6 mM TMB , 0.3 mM H₂O₂ , 80 mM sodyum fosfat tamponu (pH 5.4), % 8 N-N dimetilformamid ve % 40 PBS (fosfat tampon tuzu), 500 µl toplam hacminde karıştırılır. Karışım 3 dk 37 C⁰ de inkübe edildikten sonrada buz banyosuna gömülmüştür. Reaksiyon 1.75 ml 200 mM sodyum asetat tamponunun eklenmesiyle sonlandırılmıştır. MPO ürünleri, Nihon Bunko 505 spektrofotometresinde 655 nm dalga boyunda ölçülmüştür. Reaksiyon aktivitesi 655 nm ($\Delta 655$ /dk/ Supernetant ml veya doku mg)' da artan absorbun ilk hızı gibi tarif edilir.

3.2.1.4.1.2 Orijinal TMB metodu

MPO için karışım reaksiyonu; PMN supernetantı, 0.88 mM TMB, 5 mM H₂O₂, 50 mM sodyum asetat tamponu (pH 4.5) 2,5 ml toplam hacminde içerir. Karışım, 26 C⁰, de inkübe edilir. Oksitlenmiş ürün oranı 655 nm obsorbasında ölçülür.

3.2.1.5 Lipid Peroksidasyonun Ölçümü

3.2.1.5.1 Tiyobarbitürik asit analizi

Her bir gruptan alınan, 1.0 ml PMN supernetantı veya doku homejenatını 2,0 ml TCA-TBA-TCL (stok TCA, TBA, HCL ayıracı: %15 triklorik asetik asit; %0.375 tiyobabutirik asit; 0.25 N hidroklorik asit) ile birleştirmek ve tamamen karıştırılır. Solüsyon 15 dakika kaynayan su küvetin içinde ısıtılır. Soğuduktan sonra yün yumağı şeklindeki çökelme, 10 dk. 1000 g santrifügasyon ile ayrılır. Örneklerin Supernetant absorbansları; kontrol grubuna (blank) karşı 535 nm absorbans ta ölçülür.

4. SONUÇLAR

Her gruptaki çalışma tamamlandıktan sonra serum MPO seviyeleri ölçülmüş,statik analizler The-KruskaWalls-One-Wall Anova Post-Hoc ile gruplar arasındaki önemli farkı anlamak için ölçülmüştür.Post-Hoc test çoklu karşılaştırmalar içinde kullanılmıştır.Aralarında korelasyonlarına bakmak içinde Pearson Correlation Sig. (2-tailed) N kullanılmıştır.

4.1. Serum Myeloperoksidaz Aktivitesinin Ölçüm Sonuçları

Çizelge 4.1.1 Serum myeloperoksidaz başlangıç hızı sonuçları (ΔA_{655} dk/ml süpernetant)

	Grup 1	Grup 2	Grup 3	Grup 4	Grup 5
1	0,842	0,936	0,806	1,104	1,173
2	1,055	0,926	0,871	0,958	1,150
3	0,989	1,175	0,962	1,094	0,660
4	0,856	1,166	0,961	1,172	0,855
5	0,964	0,909	0,919	1,201	1,142
6	0,959	0,863	0,942	1,166	1,082
7	0,956		0,858	1,162	1,128
8	0,677		0,700		1,128
9	0,494				
Ortalama+/-	0,8672 +/-	0,9958 +/-	0,8774 +/-	1,1224 +/-	1,0391 +/-
SD	0,1781	0,1376	9,27.10	$8,19 \cdot 10^{-2}$	0,1844

Serum Myeloperoksidaz Aktivitesinin Ölçüm Sonuçları çizelge 4.1.1 de verilmiştir. Myelopeoksidaz aktivitesi başlangıç hızı olarak ölçüldü. Çizelge 4.1.1 e bakıldığında, bütün grupların serum MPO seviyelerinin ortalama değerlerleri kontrol grubuna göre karşılaştırıldığında bütün gruplarda yüksek olduğu gözlemlendi. Grup 4 de ise bu fark daha belirgindir ve istatistiksel anlamlılık göstermektedir ($p= 0,032$; $p<0,05$). Yüksek MPO seviyesi polimorfiknükleer hücre toplanması fikrini öne sürebilir. Grup 4 de diğer gruplara göre yüksek MPO seviyesi görülmektedir. Fakat, HBO_2 tedavisi iskemiye maruz kalmış serumda PMN toplanmasına hiçbir etkisi yoktur.

Myeloperoksidaz serum seviyeleri korelasyonunda ise, grup 3 ile kontrol grubu arasında anlamlı pozitif bir korelasyon varken ($p=0.049$, $p< 0.050$), bu iki tedavinin kombinasyonu olan grup 5 ile grup 2 grubu arasında anlamlı negatif korelasyon vardır ($p=0.012$, $p< 0.050$)

4.2 Doku Myeloperoksidaz Aktivitesinin Ölçüm Sonuçları

Çizelge 4.2.1 Doku myeloperoksidaz başlangıç hızı sonuçları (ΔA_{655} dk/ml homojenat)

	Grup 1	Grup 2	Grup 3	Grup 4	Grup 5
1	0,78	1,69	1,98	1,32	1,46
2	1,22	0,81	2,43	1,61	1,95
3	1,05	0,74	1,20	1,23	3,29
4	1,29	1,48	1,08	2,00	1,15
5	1,19	1,75	1,49	2,53	1,33
6	1,22	3,84	1,49	0,76	4,62
7	1,03	3,19	1,07	3,30	3,32
8	1,04	2,26	2,09	3,40	2,09
9	1,04	1,94	1,66	1,49	2,74
10	1,23	1,13	2,02	2,53	1,75
Ortalama+/-	1,1090+/-	1,8830+/-	1,6510 +/-	2,0170 +/-	2,3700+/-
SD	0,1513	0,9959	0,4670	0,8953	1,1048

Çizelge 4.2.1 e bakıldığında, bütün grupların doku MPO seviyelerinin ortalama değerleri kontrol grubuna göre karşılaştırıldığında serum sonuçlarına benzer şekilde bütün gruplarda yüksek olduğu gözlemlendi. Hiperbarik oksijen uygulamaları içeren, grup 4 ve grup 5 de ise bu fark daha belirgindir fakat grup 5 de istatistiksel anlamlılık göstermektedir ($p=0,011$, $p<0.05$). HBO_2 ve IP beraber uygulandığında doku MPO değerlerinde anlamlı yüksek görülmektedir. HBO_2 tedavisi ve iskemik önkoşullamanın iskemiye maruz kalmış serumda PMN toplanmasına hiçbir etkisi olmadığı görülmektedir..

4.3 Serum Lipid Peroksidasyon Seviyesinin Ölçüm Sonuçları

Çizelge 4.3.1 Serum LPO (nM MDA / ml) Sonuçları

	Grup 1	Grup 2	Grup 3	Grup 4	Grup 5
1	7,280	8,884	6,118	7,696	6,032
2	6,292	6,656	7,592	5,980	4,992
3	6,344	8,320	5,304	6,136	6,604
4	7,020	8,632	6,032	4,368	5,876
5	6,812	9,152	6,500	5,980	5,408
6	4,212		5,980		5,200
7	6,240		8,320		5,928
8	5,876		6,396		5,304
9	6,240		5,200		5,928
10	6,396				
Ortalama+/-	6,2712+/-	8,3288+/-	6,3824+/-	6,0320+/-	5,6969+/-
SD	0,8390	0,9844	1,0092	1,1783	0,5069

Serum LPO seviyeleri için çoklu karşılaştırmaları için yapılan deney sonuçları çizelge 4.3.1 de verilmiştir. Çizelgeye bakıldığında; LPO ölçümleri serumda karşılaştırıldığında, grup 2'nin ortalama değerleri kontrol grubuna göre anlamlı artış gösterirken ($p=0,002$, $p<0,05$); grup 3, grup 4 ve grup 5, grup 2 ile karşılaştırıldığında hepsinin anlamlı düşük serum LPO seviyelerine sahip olduğu gözlemlenilmiştir ($p=0,004$ $p=0,003$ $p=0,000$ $p<0,05$). Bu sonuçlardan iskemi öncesi HBO_2 uygulamasının ve iskemik ön koşullama ile kombinasyonunun, serumda lipid peroksidasyonu hafifleterek zararlı etkiyi azaltmıştır. Aynı şekilde grup 5 ve grup 4 serum LPO seviyeleri, yalnızca grup 2 değil, grup 3'de de önemli ölçüde düşük olduğu gözlemlenilmiştir fakat değerler istatistiksel anlamlı değildirler. İki tedavinin kombinasyonu olan grup 5, grup 2 ile karşılaştırıldığında, grup 3 ve grup 4 den daha etkilidir ve istatistiksel anlamlıdır ($p=0,000$, $p=0,004$ ve $p=0,003$ $p<0,005$) göre daha etkilidir.

4.4 Doku Lipid peroksidasyon Seviyesi Ölçüm Sonuçları

Çizelge 4.4.1 Doku LPO (nM MDA / gram yaş doku)..

	Grup 1	Grup 2	Grup 3	Grup 4	Grup 5
1	41,748	55,664	43,239	34,79	35,784
2	43,736	57,155	47,712	43,736	36,778
3	44,233	62,125	56,161	43,239	31,808
4	44,730	61,131	58,149	44,730	29,820
5	46,718	60,137	60,137	42,245	35,287
6	45,227	60,634	62,622	42,742	31,311
7	46,718	70,077	56,658	40,257	31,808
8	49,203	56,161	54,670	38,766	36,281
9	49,700	73,556	66,101	37,772	30,317
10		48,706	51,688	41,251	36,778
Ortalama+	45,7792+-	60,5346+-	55,7137+-	40,9528+-	33,5972+-
-SD	2,5758	7,1325	6,8244	3,0834	2,8231

Doku LPO seviyeleri için çoklu karşılaştırmaları için yapılan deney sonuçları Çizelge 4.4.1 de verilmiştir. Çizelgede lipid peroksidasyon seviyelerine bakıldığında; serum seviyelerinde olduğu gibi, doku seviyelerinde grup 2 LPO ölçümleri, kontrol grubuna göre anlamlı artış gösterirken ($p=0,000$ $p<0,05$), grup 3 ($p=0,356$ $p>0,05$) LPO seviyesinde bu artış anlamlı değildir. Dokuda da serumdaki gibi, grup 5, grup 4 ve grup 3, grup 2 ile karşılaştırıldığında hepsinin düşük doku LPO seviyelerine sahip olduğu gözlemlenilmiştir (grup 3 hariç hepsi istatistiksel anlamlıdır ($p=0,000$, $p=0,000$, $p<0,05$)). Bu sonuçlardan iskemi öncesi HBO_2 uygulamanın ve iskemik ön koşullamanın dokuda da lipid peroksidasyonu hafifleterek zararlı etkiyi azaltmıştır kanısına varabiliriz. Aynı şekilde grup 5 ve grup 4 doku LPO seviyeleri, yalnızca grup 2 değil, grup 3'de de önemli ölçüde düşük olduğu gözlemlenilmiştir. Doku

lipid peroksidasyon seviyeleri korelasyonunda LPO doku seviyelerinde grup 3 ile kontrol grubu ($p<0,037$) ve grup 2 ($p<0,041$) arasında anlamlı pozitif korelasyon varken grup 5 ($p<0,025$) arasında anlamlı negatif korelasyon görülmektedir. Bu sonuçlara bakarak, HBO_2 uygulamalarını içeren tedavilerin İÖK koşulamaya nazaran daha etkili olduğu kanısına varabiliriz. Fakat her iki tedavinin kombinasyonu olan grup 5, HBO_2 uygulamasını içeren grup 4 ve İÖK içeren grup 3 tende daha etkili olması lipid peroksidasyonun zararlı etkilerini azalmada en iyi olan gruptur.



5. SONUÇLAR VE TARTIŞMA

İskemik reperfüzyon hasarı hücre membranının lipid peroksidasyonunu teşvik eden serbest oksijen radikalleri vasıtasıyla gösterir. Hiperbarik oksijen tedavisi ise dokulara oksijen taşınmasını artırır ve lipid peroksidasyonu hafifletir (Bhalchandra vd., 2000). Bir çok mekanizma hiperbarik oksijen iskemik hasarda yararlı olarak düşünülmüştür. Bunların biride dokuyu radikallerden koruyan radikal yakalayıcıların üretimini teşvik etmek ve hücre membranının lipid peroksidasyonlarını engellemek ve lökositlerin iskemiye maruz kalan bölümde alıkonulmasını teşvik ederek hasarlı hücrede toplanılmasını engellemektir (İşlekel vd., 2000a). Ön koşullama, iskeminin ve perfüzyonun ana iskemik perfüzyondan önceki kısa periyodudur ve zararlı etkileri hafiflettiği düşünülmektedir. İskemik önkoşullaşma hepatik hasarı azaltır ve canlının yaşam süresini uzatır. Normal karaciğerde, endojen koruyucu mekanizma lipid peroksidasyonlarında, hepatik mikrosörkulasyon başarısızlıklarında, nötrofil toplanmasında hepatik hasarın sonraki basamaklarını azalttığı bulunmuştur. (Serracino-Inglott vd., 2002)

Bu yapılan deneysel çalışmada, sonuç olarak; İÖK ve HBOT'si, iskemik-reperfüzyonun sıçan karaciğeri hasarında zararlı etkilerini lipid peroksidasyonunu düşürerek hafifletmekte iken, iki tedavinin kombinasyonu ile maksimum olduğunu gözlemledik ve HBOT iskemik serumda İÖK'ya göre lipid peroksidasyonu hafifletmede daha etkili olduğu görülmektedir.

Yüksek MPO seviyeleri PMN hücre toplanmasında HBO₂ gruplarında önemli olduğunu ve hiperbarik oksijen tedavisinin, PMN hücrelerin toplanmasında etkisi olmadığını gözlemledik. İskemik dokuda da HBOT ve IP beraber uygulandığında PMN hücrelerinin MPO aktivitelerinde anlamlı yükselme görülmektedir.

KAYNAKLAR

- Adams D.H. ve Shaw S. (1994), Leukocyte-endothelial interactions and regulation of leukocyte migration. *The Lancet.*, 343: 831-6.
- Arai M, Thurman RG, Lemasters JJ, (2001). Ischemic preconditioning of rat livers against cold storage-reperfusion injury: Role of nonparenchymal cells and the phenomenon of heterologous preconditioning. *Liver Transpl.*, 7:292-299.
- Bhalchandra J., Kudchodkar; Judy W.; Andras L. ve Ladislav D. (2000), Hyperbaric Oxygen Reduces the Progression and Accelerates the Regression of Atherosclerosis in Rabbits Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology, 20:1637. © 2000 American Heart Association, Inc.
- Buege, J.A. ve S.D. Aust, (1978), Microsomal lipid peroxidation, in *Methods in Enzymology, Biomembranes, Part C, Volume 52* (Packer, L. ve S. Fleischer, eds.), Academic Press, Inc., pp. 302-310.
- Buras, J.A., Stahl G.L., Svoboda K.K.H., ve Reenstra W.R., (2000) 'Hyperbaric oxygen downregulates ICAM-1 expression induced by hypoxia and hypoglycemia: the role of NOS'. *Am. J. Physiol. Cell Physiol.*, 278: C292– C302.
- Cavalieri B., Perrelli M.G., Aragno M., Ramadori P., Poli G., ve Cutrin J.C., (2003) 'Ischaemic preconditioning modulates the activity of Kupffer cells during in vivo reperfusion injury of rat liver'. *Cell Biochem Funct.*, Dec; 21(4):299-305.
- Champe, P. C. ve Harvey, R., (1997, *Biyokimya, Lippincott's illustrated review serisinden, Nobel Tıp Kitabevleri Ltd. Şti. sayfa; 114-116*
- Chen M.F., Chen H.M., Ueng S.W. ve Shyr M.H., (1998), 'Hyperbaric oxygen pretreatment attenuates hepatic reperfusion injury'. *Liver* 18: 110-116.
- Cheng, X.D., Jiang, X.C., Liu, Y.B., Peng, C.H., Xu, B., Peng S.Y. (2003), 'Effect of ischemic preconditioning on P-selectin expression in hepatocytes of rats with cirrhotic ischemia-reperfusion injury' *World J Gastroenterol*, 9(10):2289-2292
- Demiryürek, Ş., Ceylan H., ve Demiryürek T.A., (2003), 'İskemik ön koşullama ve etki mekanizması', *Genel Tıp Dergisi* 13(4); 194-97
- Farhood A, McGuire G.M., Manning A.M., Miyasaka M., Smith W.C. ve Jaeschke H. (1995), 'Intercellular adhesion molecule 1 expression and its role in neutrophil-induced ischemia-reperfusion injury in rat liver'. *J Leukoc Biol.*, 57: 368-74.
- Gutteridge J.M. (1995), 'Lipid peroxidation and antioxidants as biomarkers of tissue damage'. *Clin Chem.*, 41(12):1819-28.
- Gökmen M., (2001), 'Hiperbarik oksijen ve tedavideki yeri' *GATA Haydarpaşa Eğitim Hastanesi Anesteziyoloji ve Reanimasyon Servisi Anestezi Dergisi.*, 9 (4):245-248
- Harada, N., Okajima, K., Kushimoto, S., Isobe, H., ve Tanaka K., (1999), 'Antithrombin Reduces Ischemia/Reperfusion Injury of Rat Liver by Increasing the Hepatic Level of Prostacyclin' *Blood*, Vol. 93 No. 1 (January 1), 1999: pp. 157-164
- İşlekel H., İşlekel S., Güner, G., (2000a), 'Beyin İskemi-Reperfüzyonu Biyokimyasal Mekanizması ve Doku Hasarı' Bölüm I: Doku Hasarı *Norol Bil D.*, 17: 2
- İşlekel H., İşlekel S., Güner, G., (2000b), 'Beyin İskemi-Reperfüzyonu Biyokimyasal Mekanizması ve Doku Hasarı' Bölüm II: Doku Hasarı *Norol Bil D.*, 17: 2

Jaeschke H., Farhood A., Bautista A.P., Spolarics Z., Spitzer J.J. ve Smith C.W., (1993), 'Functional inactivation of neutrophils with a Mac-1 (CD11b/CD18) monoclonal antibody protects against ischemia-reperfusion injury in rat liver'. *Hepatology*, 17: 915-23.

Jaeschke, H., (2003) 'Molecular mechanisms of hepatic ischemia-reperfusion injury and preconditioning' *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* Vol. 284, Issue 1, G15-G26,

Jiang Y, Gu XP, Qiu YD, Sun XM, Chen LL, Zhang LH, Ding YT. , (2003) 'Ischemic preconditioning decreases C-X-C chemokine expression and neutrophil accumulation early after liver transplantation in rats'. *World J Gastroenterology*, 9(9): 2025-2029

John J.F., (2001), 'Ischemic preconditioning: Application in clinical liver transplantation' *Liver Transplantation*, Volume 7 ,Number 4

Kathleen E.D.G, Dirk K.Y., Manuela G., Sven V., Etienne J. N., Eric J.E., Marc E. D.B., (1998), 'Neutrophils and acute ischemia-reperfusion injury'. *Journal Of Nephrology*, Vol. 11 no. 3 - 1998 / pp 110-122

Lanza F., (1998), 'Clinical manifestation of myeloperoxidase deficiency'. *J Mol Med.*, Sep; 76(10): 676-81

Lieutenant S.S., (2000), 'Current indications for hyperbaric oxygen therapy'. *ADF Health.*, April, 1; 64-72

Murry CE, Jennings RB, Reimer KA., (1986), 'Preconditioning with ischemia: a delay of lethal injury in ischemic myocardium'. *Circulation.*, 74:1124-1136.

Parks D.A. ve Granger D.N., (1986), 'Contributions of ishemia and reperfusion to mucosal lesion formation'. *Am J Physiol.*, 250: G749-53.

Peralta C., Hotter G., Closa D., Prats N., Xaus C. ve Gelpí E., (1999), 'The protective role of adenosine in inducing nitric oxide synthesis in rat liver ischemia preconditioning is mediated by activation of adenosine A2 receptors'. *Hepatology*, 29:126-132.

Peralta C., Serafin A., Fernandez-Zabalegui L., Wu Z.Y., Rosello-Catafau J., (2003), 'Liver ischemic preconditioning: a new strategy for the prevention of ischemia-reperfusion injury'. *Transplant Proc.*, Aug;35(5):1800-2.

Serracino-Inglott F., Virlos I.T., Habib N.A., Williamson R.C. ve Mathie R.T., (2002), 'Adenosine preconditioning attenuates hepatic reperfusion injury in the rat by preventing the down-regulation of endothelial' *Gastroenterol.* Sep 20;2(1):22.

Suzuki, K., Ota, H., Sasagawa, S., Sakatani, T., Fujikura, T., (1983), 'Assay method for myeloperoxidase in human leukocytes', *Analytical biochemistry*, 132, 345-352.

Vollmar B., Menger M.D., Glasz J., Leiderer R., Messmer K., (1994), 'Impact of leukocyte-endothelial cell interaction in hepatic ischemia-reperfusion injury'. *Am J Physiol.*, G786-93

Yasar M., Yıldız S., Mas S., Dundar K., Yıldırım A., Korkmaz A., Akay C., Kaymakcioglu, N., Ozisik, T., Sen D., (2003), 'The effect of hyperbaric oxygen treatment on oxidative stress in experimental acute necrotizing pancreatitis *physiol. res.*, 52: 111-116.

Zamboni W.A., Roth A.C., Russell R.C., (1989), 'The effect of acute hyperbaric oxygen therapy on axial pattern skin flap survival when administered during and after total ischaemia'. *J Reconstr Microsurg.*, 5: 343-347.

Zhang J.X., Jones D.V., Clemans M.G., (1994), 'Effect of activation on neutrophil induced hepatic microvascular injury in isolated rat liver'. *Shock*, 1: 273-8.

Zwacka R.M., Zhang Y., Halldorson J., Schlossberg H., Dudus L., (1997), 'CD4+ T-lymphocytes mediate ischemia/reperfusion induced inflammatory responses in mouse liver'. J Clin Invest., 100: 279-89.

INTERNET KAYNAKLARI

[1]-<http://www.bentham.org/sample-issues/cmcaiaa1-1/chan/chan-ms.htm>.

[2]-<http://www.turyay.com.tr/oguzkayaalp/53KONUE5.pdf>

[3]-<http://www.hbotgroup.com/HBOT.php>

[4]-<http://www.healing-arts.org/children/hyperbaric.htm>

[5]-<http://www.chrononhotonthologos.com/inactive/strokedr/total.htm>



ÖZGEÇMİŞ

Doğum tarihi	20.11.74	
Doğum yeri	Seydişehir	
Lise	1988-1992	Seydişehir İH Lisesi
Lisans	1993-1999	Orta Doğu Teknik Üniversitesi Eğitim Fakültesi, Biyoloji Öğretmenliği
Yüksek Lisans	2000-2004	Yıldız Teknik Üniversitesi Kimya Anabilim Dalı, Biyokimya

Çalıştığı kurumlar

1999-2002	Muallim Cevdet İlköğretim Okulu
2002- Devam ediyor	Nilüfer Hatun İlköğretim Okulu

