

158232

T.C.
İNÖNÜ ÜNİVERSİTESİ
TIP FAKÜLTESİ
ORTOPEDİ VE TRAVMATOLOJİ ANABİLİM DALI

EKSTREMİTE İSKEMİ-REPERFÜZYON YARALANMASINA
CAPE, MELATONİN VE RESVERATROLUN ETKİSİ
(Ratlarda Deneysel Çalışma)

UZMANLIK TEZİ
DR. FERHAT TAŞ

TEZ YÖNETİCİSİ
DOÇ. DR. NURZAT ELMALI

MALATYA 2004

İÇİNDEKİLER

TABLolar VE ŞEKİLLER DİZİNİ.....	III
KISALTMALAR.....	V
I. GİRİŞ VE AMAÇ.....	1
II.GENEL BİLGİLER.....	3
II.A OKSİDATİF STRES.....	3
II.B REAKTİF OKSİJEN VE NİTROJEN RADİKALLERİ.....	4
II.B.1 Süperoksit Radikalleri.....	4
II.B.2 Hidrojen peroksitler.....	4
II.B.3 Hidroksil Radikalleri.....	4
II.B.4 Nitrojen Kaynaklı Radikaller.....	5
II.B.5 Peroksil Radikalleri.....	5
II.C HÜCREDE SERBEST OKSİJEN RADİKAL KAYNAKLARI.....	6
II.C.1 Mitokondriyel Elektron Transport Zinciri.....	6
II.C.2 Ksantin Oksidaz (XO).....	7
II.C.3 Fenton ve Haber-Weiss Reaksiyonları.....	7
II.C.4 Araşidonik Asit Metabolitleri ve Lipit Peroksidasyonu.....	7
II.C.5 Nötrofil Aktivasyonu ve Akümülyasyonu.....	8
II.C.6 Nitrik Oksit ve Peroksinitrit Radikalleri.....	8
II.D ANTİOKSİDAN SAVUNMA SİSTEMLERİ.....	8
II.D.1 ENZİMATİK ANTİOKSİDAN SAVUNMA.....	9
II.D.1.1 Süperoksit Dismutaz (SOD).....	9
II.D.1.2 Katalaz (CAT).....	9
II.D.1.3 Glutasyon Peroksidaz (GSH-Px).....	10
II.D.1.4 Glutasyon Redüktaz (GSH-Px).....	10
II.D.1.5 Glukoz-6 Fosfat Dehidrojenaz.....	10
II.D.2 NONENZİMATİK ANTİOKSİDAN SAVUNMA.....	10
II.D.2.1 Glutasyon (GSH).....	10
II.D.2.2 Beta Karoten (β -Karoten).....	11
II.D.2.3 Vitamin C (Askorbik Asit).....	11
II.D.2.4 Vitamin E.....	11
II.D.2.5 CAPE (Caffeic acid phenethyl ester).....	11
II.D.2.6 Melatonin.....	14

II.D.2.7 Resveratrol.....	16
II.E İSKEMİ-REPERFÜZYONYARALANMASI.....	18
II.E.1 Hücre İçi Ca Artışı, Ksantin Oksidaz aktivitesi ve Nötrofil Aktivasyonu.....	18
II.E.2 Mast Hücreleri.....	24
II.E.3 Kompleman Aktivasyonu.....	24
II.E.4 Nitrik Oksit (NO).....	25
II.E.5 No-Reflow Fenomeni.....	26
II.E.6 Kompartman Sendromu.....	27
II.E.7 İskemi Reperfüzyonun Sistemik Etkileri.....	28
III. GEREÇ VE YÖNTEM.....	30
IV. BULGULAR.....	34
V. TARTIŞMA.....	49
VI. SONUÇ.....	65
VII. ÖZET.....	66
VIII.SUMMARY.....	68
IX. KAYNAKLAR.....	70

RESİMLER VE TABLOLAR DİZİNİ

- Resim 1: İ/R yaralanması sırasında serbest radikal oluşturan enzimatik ve spontan reaksiyonlar
- Resim 2: Hücrede serbest radikal oluşum mekanizmaları
- Resim 3: CAPE'nin kimyasal yapısı
- Resim 4: Melatonin'in kimyasal yapısı
- Resim 5: Resveratrol (3,4',5-trihydroxy-trans-stilbene)'ün kimyasal yapısı
- Resim 6: İ/R yaralanması, serbest radikal oluşumu ve doku hasarı meydana gelmesi
- Resim 7: NF-κB aktivasyonu
- Resim 8: İskemi-reperfüzyon yaralanmasında endotel, lökosit ilişkisi
- Resim 9: Ortalama MDA düzeyleri
- Resim 10: Ortalama GSH düzeyi
- Resim 11: Ortalama XO düzeyi
- Resim 12: Ortalama NO düzeyleri
- Resim 13: Gastroknemius kası 4 saat iskemi / 4 saat reperfüzyon
- Resim 14: Gastroknemius kası 4 saat iskemi / 4 saat reperfüzyon + CAPE
- Resim 15: Gastroknemius kası 4 saat iskemi / 4 saat reperfüzyon + MLT
- Resim 16: Gastroknemius kası 4 saat iskemi / 4 saat reperfüzyon + RES
- Resim 17: Gastroknemius kası 4 saat iskemi / 8 saat reperfüzyon
- Resim 18: Gastroknemius kası 4 saat iskemi / 8 saat reperfüzyon + CAPE
- Resim 19: Gastroknemius kası 4 saat iskemi / 8 saat reperfüzyon + MLT
- Resim 20: Gastroknemius kası 4 saat iskemi / 8 saat reperfüzyon + RES
- Resim 21: Siyatik sinir 4 saat iskemi / 4 saat reperfüzyon
- Resim 22: Siyatik sinir 4 saat iskemi / 4 saat reperfüzyon + CAPE
- Resim 23: Siyatik sinir 4 saat iskemi / 4 saat reperfüzyon + MLT
- Resim 24: Siyatik sinir 4 saat iskemi / 4 saat reperfüzyon + RES
- Resim 25: Siyatik sinir 4 saat iskemi / 8 saat reperfüzyon
- Resim 26: Siyatik sinir 4 saat iskemi / 8 saat reperfüzyon + CAPE
- Resim 27: Siyatik sinir 4 saat iskemi / 8 saat reperfüzyon + MLT
- Resim 28: Siyatik sinir 4 saat iskemi / 8 saat reperfüzyon + RES

Tablo 1: Deney Grupları

Tablo 2: Biyokimyasal analizlerin grup ortalamaları ve standart sapmaları

Tablo 3: Karşılaştırılan grupların p değerleri (biyokimyasal değerler)

Tablo 4: Kas histopatolojik analizleri grup ortalamaları ve standart sapmaları

Tablo 5: Karşılaştırılan grupların p değerleri (histopatolojik değerler)

Tablo 6: Siyatik sinir histopatolojik değışikler ortalama değer ve standart sapmalar

Tablo 7: Karşılaştırılan grupların p değerleri (siyatik sinir)



KISALTMALAR

AP-1	Aktivatör Protein-1
ARDS	Akut Respiratuar Distres Sendromu
ATP:	Adenozin Trifosfat
ATN	Akut Tübüler Nekroz
BOS	Beyin Omurilik Sıvısı
Ca	Kalsiyum
CAT	Katalaz
CAPE	Caffeic Acid Phenethyl Ester
CD11/18	Calcium Bağımlı Yüzey Adezyon Molekülü
COX	Siklooksijenaz
Cu	Bakır
DNA	Deoksiribonükleik asit
ECSOD	Ekstrasellüler Süperoksit Dismutaz
eNOS	Endotelial Nitrik Oksit Sentaz
Fe	Demir
GSH	Redükte Glutasyon
GSSH	Okside Glutasyon
GSH-Px	Glutasyon Peroksidaz
GSH-Rd	Glutasyon Redüktaz
ICAM	İntersellüler Adezyon Molekülü
IL-1 β	İnterlökin-1Beta
iNOS	İnduklenebilir Nitrik Oksit Sentaz
I/R	İskemi-Reperfüzyon
LOO•	Lipit peroksil radikalleri
LTB ₄	Lökotrien B ₄
MDA	Malondialdehit
MLT	Melatonin
Mn	Manganez
MnSOD:	Manganez Süperoksit Dismutaz
MODS	Multiple Organ Disfonksiyon Sendromu
MPO	Miyeloperoksidaz
mRNA	Messenger Ribonükleik Asit

NAD	Nikotin Amid Adenin Dinükleotid
NADP	Nikotin Amid Adenin Dinükleotid Fosfat
NADPH	İndirgenmiş Nikotin Amid Adenin Dinükleotid Fosfat
NF-κB	Nükleer Faktör Kappa-B
NO	Nitrik Oksit
NOS	Nitrik Oksit Sentaz
PAF	Platelet Aktive Edici Faktör
PMNL	Polimorfonükleer Lökosit
RES	Resveratrol
ROT	Reaktif Oksijen Türevleri
RTN	Reaktif Nitrojen Türevleri
SOD	Süperoksit Dismutaz
TBARS	Tiyobarbitürik Asit
TNF	Tümör Nekroz Faktör
TXA ₂	Trombaksan A ₂
XD	Ksantin Dehidrojenaz
XH	Ksantin
XO	Ksantin oksidaz
Zn	Çinko

I. GİRİŞ VE AMAÇ

Günümüzde mikrocerrahi teknikler ve ekipmanlardaki gelişmelere paralel olarak, vasküler yaralanma sonucu dolaşımı bozulmuş bir ekstremitte tekrar revaskülarize edilebiliyor, kopan bir ekstremitte replante edilebiliyor, geniş doku defektleri serbest fleplerle kapatılabiliyor, akut arteriyel tıkanmalar en gelişmiş kateterlerle açılabilir, başarılı turnike uygulamalarıyla üst ve alt ekstremitelerde kansız ameliyatlar yapılabilir. Ne var ki tüm bu olaylar sırasında dokular bir süre iskemiye maruz kalmakta ve reperfüzyonla birlikte mikrosirküler düzeyde gelişen bir dizi biyokimyasal ve histopatolojik olaylar sonucu, başarılı mikrocerrahi girişimlere rağmen doku kaybı ile cerrahları yüzyüze bırakmaktadır.

Bir süre iskemik kalan herhangi bir dokunun, mikrocerrahi yöntemlerle revaskülarize edilmesi sonucu ortaya çıkan ve özellikle reperfüzyon sırasında belirginleşen oksidatif stresin tetiklediği doku hasarına İ/R (iskemi-reperfüzyon) yaralanması denir. İ/R yaralanması sırasında iyon gradienti sürdürülemediğinden hücre içi kalsiyum (Ca) düzeyi artar, ksantin dehidrojenaz (XD) enzimi ksantin oksidaz (XO) enzimine dönüşür. Spontan ve enzimatik reaksiyonlarla serbest oksijen ve nitrojen radikalleri üretilir, lökosit, mast hücresi ve kompleman aktivasyonu meydana gelir. Bu olayların sonucunda iskemik dokuda ödem, kompartman sendromu, no-reflow fenomeni, enfeksiyon ve nekroz gibi lokal komplikasyonlar meydana gelir. İ/R yaralanması sadece lokal değil, akut respiratuar distress sendromu (ARDS), akut tübüler nekroz (ATN), multiple organ yetmezliği sendromu (MODS) ve sistemik inflamatuvar cevap sendromu (SIRS) gibi yaşamı tehdit eden ciddi sorunlara da yol açabilir. Son klinik ve deneysel çalışmalarda İ/R yaralanması sürecini başlatan en önemli faktörün serbest oksijen ve nitrojen radikalleri olduğu bildirilmiştir. Bu nedenle serbest radikalleri detoksifiye edebilen, oksidasyon reaksiyonlarını durdurabilen ve antioksidan savunma sistemlerini hem doğrudan hem de dolaylı olarak güçlendirebilen antioksidanların İ/R yaralanmasını önleyebileceği düşünülmüştür (1).

Literatür taramamızda A, C ve E vitaminleri, Caffeic Acid Phenethyl Ester (CAPE), Melatonin (MLT), Resveratrol (RES), Nitrik oksit (NO) donörleri, lökosit antiadezyon antikorları, kompleman inhibitörleri, mast hücre stabilizatörleri, süperoksit dismutazlar (SOD) ve katalaz (CAT) gibi antioksidan, antiinflamatuvar özellikleri bulunan molekül ve enzimlerin çeşitli deneysel İ/R modellerinde kullanılmakta olduğu ve yüzgüldürücü sonuçlar alındığı bildirilmektedir.

Hardy ve arkadaşları kalça hizasından lastik turnike uygulamak suretiyle oluşturdukları ekstremite İ/R modelinde kan akımını % 98 azaldığını bildirmişlerdir. Arteriyel akımdaki bu submaksimal azalmanın insanlardaki akut arteriyel yaralanmalar, turnike uygulamaları ve revaskülarizasyon-replantasyon ile benzerlik gösterdiği düşünülmektedir (2). Biz bu çalışmamızda Hardy ve arkadaşları'nın tanımladığı şekilde ratların sağ arka ekstremitelerine, trokanter majör üzerinden 4 saat lastik turnike uygulayarak, İ/R modeli oluşturduk. İskemi süresinin son 45 dakikası içinde ratlara intraperitoneal (İP) olarak CAPE, MLT ve RES verdik. Turnikenin sonlandırılmasını takiben 4 saat ve 8 saat reperfüzyon uygulayarak, işlemler sonunda ratları yüksek doz anestezi ile sakrifiye ettik. Takiben siyatik sinir, gastroknemius ve tibialis anterior kasında meydana gelen değişiklikleri histopatolojik ve biyokimyasal olarak değerlendirdik.

II. GENEL BİLGİLER

II. A. OKSİDATİF STRES

İskemik ekstremitenin revaskülarizasyonu, replantasyonlar, serbest flep uygulamaları, turnike uygulanması ve arteryel embolektomi sonrası reoksijenasyonla birlikte iskemik dokularda, hücrenin antioksidan savunma sistemlerini etkisiz hale getiren aşırı miktarda reaktif serbest oksijen ve nitrojen radikalleri oluşur. Bu durumda reperfüzyonla birlikte gelen oksijen molekülleri, XO enzimi ve aktive olan lökositlerce hızla reaktif oksijen ve nitrojen türevlerine dönüştürülmekte, oluşan radikaller hem antioksidan savunma sistemlerini yetersiz bırakmakta hem de antioksidan üretimini engellemektedir. Bütün bu patolojik süreçte hücre yoğun serbest radikal bombardımanına maruz kalmaktadır ki, bu olaya oksidatif stres, oksidatif stresin başlattığı hücresel hasara da İ/R yaralanması denir (3). İ/R yaralanması sırasında ortaya çıkan serbest radikaller hücre membranı, DNA, enzimler, proteinler, karbonhidratlar başta olmak üzere hücrenin bütün fonksiyonel ve yapısal oluşumlarına zarar vermekte, hatta hücreyi ölüme götürmektedir. Otoimmün hastalıklar (romatoid artrit vs.), osteoartrit, hipertansiyon, yaşlanma, tümör gelişimi, fiziksel ve kimyasal travmalar, radyasyon, ateroskleroz, nörodejeneratif hastalıklar, diabetes mellitus ve İ/R yaralanması gibi birçok hastalığın temelinde oksidatif stresin rol aldığı düşünülüyor. Oksidatif strese daha yatkın olması nedeniyle, serbest radikallerinin morbidite ve mortalite açısından en birincil hedefi kardiyovasküler sistemdir (4).

II. B. REAKTİF SERBEST OKSİJEN VE NİTROJEN RADİKALLERİ

Bir süre iskemik kalan dokunun yeniden oksijenasyonu ile birlikte, hücrenin yaşaması için en önemli molekül olan oksijen ve nitrojenler, bir dizi spontan ve enzimatik reaksiyonlarla hücreyi öldüren birer serbest radikale dönüşür. Serbest radikaller son yörüngesinde çiftlenmemiş elektronlar bulunan, kararsız, oldukça reaktif ve yapısına katıldığı molekülün niteliğini değiştiren zararlı organik veya inorganik moleküllerdir (5) (Resim1).

II. B. 1. Süperoksit Radikalleri ($O_2^{\cdot-}$)

Oksijenin tek bir elektron alarak redükte duruma geçmesiyle oluşur. Bu reaksiyon $O_2 + e^- \rightarrow O_2^{\cdot-}$ şeklinde gösterilir. Serbest radikal olmasına rağmen fazla doku hasarı oluşturmaz, ancak İ/R yaralanması sırasında hidrojen peroksit ve hidroksil radikali için kaynak teşkil etmesi, Haber-Weiss ile Fe^{+2} ve Cu^+ gibi metal iyonlarıyla reaksiyona girerek, hidroksil radikali oluşturması ve NO ile reaksiyona girip oldukça sitotoksik olan peroksinitrit radikallerine dönüşmesi ile bütün serbest radikallerin temelini oluşturur.

II. B. 2. Hidrojen Peroksit (H_2O_2)

Oksijen molekülünün 2 elektronla redükte hale geçmesi sonucu oluşur. $O_2 + 2e^- \rightarrow H_2O_2$ şeklinde gösterilir. Okside edicidir ancak fazla reaktif değildir. İ/R yaralanması sırasında Fenton reaksiyonu ile geçiş metalleri ve NO ile reaksiyona girerek, hidroksil ve peroksinitrit radikallerini oluşturur.

II. B. 3. Hidroksil Radikalleri (OH^{\cdot})

Hidrojen peroksitin geçiş iyonları varlığında parçalanmasıyla ortaya çıkar. Bu reaksiyon Fe^{+2} katalizörlüğünde gerçekleşir ve Fenton reaksiyonu olarak adlandırılır. ($H_2O_2 + Fe^{+2} \rightarrow \cdot OH + OH^- + Fe^{+3}$). Ayrıca süperoksitle başlayan bütün serbest radikal reaksiyonları, hidroksil radikallerin oluşması ile sonlanır. Çok kısa ömürlü olduğundan hücreden dışarı çıkmaya zaman bulamaz, fakat küçük miktarlarda dahi üretildiği bölgede ileri derecede hasar yapabilir. Bilinen serbest radikaller içinde en reaktif ve en sitotoksik radikaldir.

II. B. 4. Nitrojen Kaynaklı Radikaller

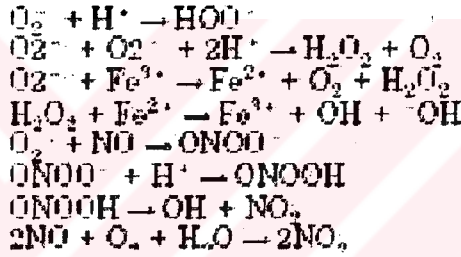
Bir serbest radikal olan NO, kolaylıkla kimyasal reaksiyona giren, biyolojik membranlardan hızla geçebilen, 6-10 sn gibi çok kısa ömürlü bir moleküldür. İskemi durumunda süperoksitle ($O_2^{\cdot-}$) reaksiyona girip, peroksinitrit, nitrojen dioksit (NO_2) ve peroksinitroz asit ($ONOOH$) gibi sitotoksik radikallere dönüşür (6).

II. B. 5. Peroksil radikalleri (LOO^{\cdot})

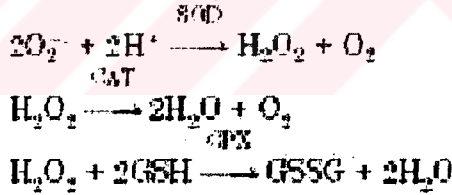
Oksidatif stres durumunda oluşan reaktif oksijen ve nitrojen radikallerinin başlattığı lipid peroksidasyonu sırasında ortaya çıkan zincirleme reaksiyon ürünleridir. Bu progresif ve spontan reaksiyonlarla hem membran lipitleri yıkılır hem de sürekli olarak peroksil radikalleri ortaya çıkar ve daha fazla doku hasarı oluşur (5).

ROT/RNT reaksiyonları ve etkileşimleri

spontan reaksiyonlar



Enzimatik reaksiyonlar



Resim.1.İ/R yaralanması sırasında serbest radikal oluşturan enzimatik ve spontan reaksiyonlar.

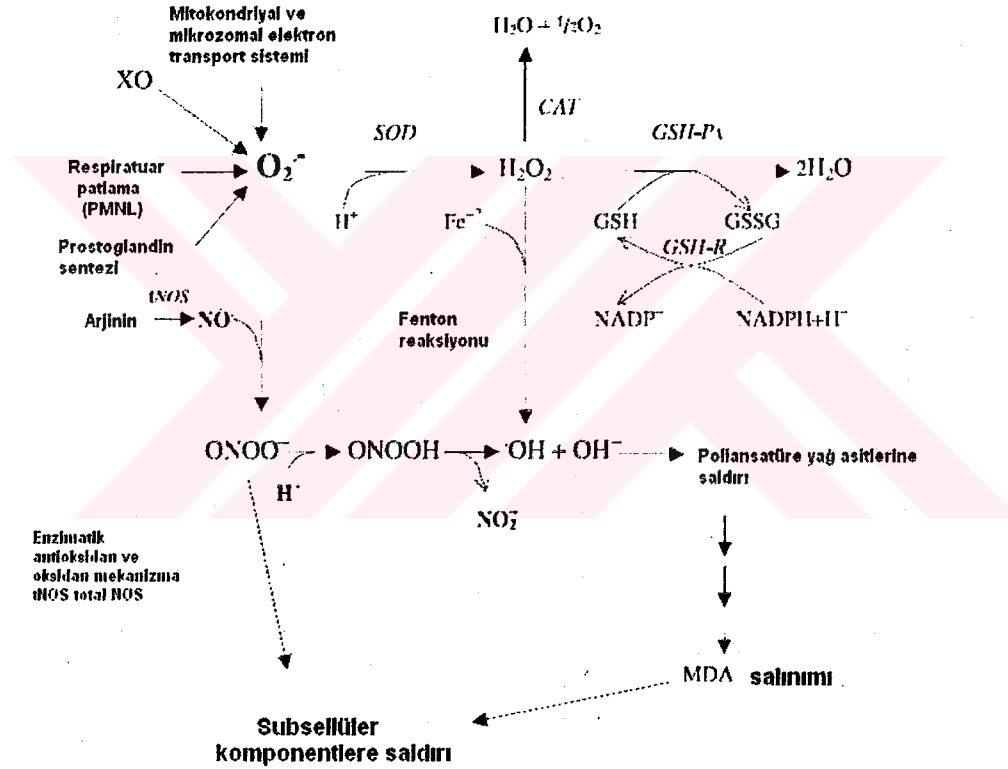
ROT: reaktif oksijen türevleri, RNT: reaktif nitrojen türevleri, $O_2^{\cdot-}$: süperoksit, H_2O_2 : hidrojen peroksit, OH: hidroksil, HOO_2^{\cdot} : hidropersil radikali, NO: nitrik oksit, $ONOO^{\cdot-}$: peroksinitrit, NO_2 : nitrojen dioksit, $ONOOH$:peroksinitroz asit, SOD: süperoksit dismutaz, CAT: katalaz, GSH: redükte glutatyon; GPX: glutatyon peroksidaz, GSSG: okside glutatyon

II. C. HÜCREDE SERBEST RADİKAL KAYNAKLARI

İ/R yaralanması sırasında reaktif oksijen ve nitrojen radikallerinin ortaya çıkmasını sağlayan hücre içi ve hücre dışı kaynaklar mevcuttur (7) (Resim 2).

II. C. 1. Mitokondriyal Elektron Transport Zinciri

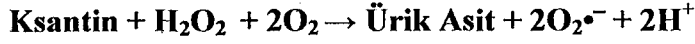
Reperfüzyon sırasında oksijen, iskemik fazda indirgenmiş bir mitokondriyal elektron transport zinciriyle karşılaşır ve bu durum mitokondri iç membranında serbest oksijen radikali oluşumunu tetikler. Mitokondriyal matrikste süperoksitlerin dismutasyonu ile oluşan hidrojen peroksitler, sitozolün dışına diffüze olur ve stoplamada metal iyonları, $O_2^{\bullet-}$, NO ve miyoglobinle reaksiyona girerek, hidroksil radikali oluşmasına neden olur (5).



Resim 2. Hücrede Serbest radikal oluşum mekanizmaları

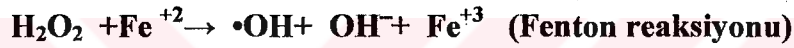
II. C. 2. Ksantin Oksidaz (XO)

İskemi sırasında hücre içi Ca artışıyla birlikte ksantin dehidrojenaz (XD)'in XO'ya dönüşümü ya proteolitik ayrılma ya da sülfhidril gruplanının oksidasyonu ile oluşmaktadır. İ/R sırasında XO ile biryandan O_2^- , H_2O_2 ve OH^\bullet üretilmekte, biryandan da bu radikaller tarafından XD'in XO'ya dönüşümü hızlanmaktadır. Ayrıca ksantin oksidaz enzimi yardımıyla üretilen O_2^- , H_2O_2 'ler NO ile ilgili farklı yollarla serbest nitrojen radikali üretilir(8).



II. C. 3. Fenton ve Haber-Weiss Reaksiyonu

İskemik dönemde demir (Fe^{+2}), fenton reaksiyonu sonucu H_2O_2 ile reaksiyona girerek, $\bullet OH$ radikallerini oluşturur. Ayrıca ortamda Bakır (Cu) ve Fe gibi geçiş metalleri, Haber-Weiss reaksiyonu sonucu oksijenle direk reaksiyona girerek, O_2^\bullet radikallerinin doğmasına yol açarlar (8).



II. C. 4. Araşidonik Asit Metabolitleri ve Lipit Peroksidasyonu

İ/R yaralanması sırasında enerji yokluğu nedeniyle hücre membranında iyon dengesi sürdürülemez ve serbest radikallerin hücre membran lipitlerine saldırması sonucu membran akışkanlığı ve geçirgenliğini bozular. Bu nedenle hücre içinde aşırı Ca birikerek, inaktif litik enzimler aktif hale gelir. Litik enzimlerden fosfolipaz A_2 , aktive olarak membran fosfolipitlerini parçalar, başta araşidonik asit olmak üzere birçok serbest yağ asitleri oluşur. Membran fosfolipitlerinin parçalanması ve araşidonik asitin siklooksijenaz, lipooksijenaz enzimleri ile yıkılması sırasında süperoksit (O_2^-) radikalleri ortaya çıkar. Ayrıca İ/R yaralanması sırasında ortaya çıkan O_2^- , OH^\bullet radikalleri ve H_2O_2 gibi reaktif oksijen türevleri, $ONOO^-$ gibi nitrojen kaynaklı radikaller hücre membranında doymamış yağ asitleri ile reaksiyona girer ve zincirleme reaksiyonlarla her geçen dakika daha fazla peroksil (LOO^\bullet) radikallerinin oluşmasına yol açar. İskemik doku ve kanda lipit peroksidasyon indikatörü olarak kullanılan malondialdehit (MDA) ve tiyobarbitürik asit (TBARS) membran lipitlerinin oksidasyonu ile ortaya çıkan stabil son ürünlerdir (9).

II. C. 5. Nötrofil Aktivasyonu ve Akümüasyonu

İ/R yaralanması sırasında nötrofil membranında yerleşen, NADPH oksidaz enzimi oksijeni kullanarak, süperoksit radikalleri üretir. Daha sonra bu süperoksitler süperoksit dismutaz (SOD) enzimiyle hidrojen peroksitlere dönüşür. Nötrofil lizozomlarında bulunan miyeloperoksidaz (MPO) enzimiyle H_2O_2 'ler oldukça sitotoksik hipoklorik asit (HOCl)'e dönüşür. Normal koşullarda bu reaktif oksijen metabolitleri lökositler tarafından patojenlerin öldürülmesi amacıyla savunma mekanizmasında görev alır.

II. C. 6. Nitrik Oksit ve Peroksinitrit Radikalleri

Normal koşullarda NO nötrofil, fagositik hücre ve endotelde NOS (nitrik oksit sentaz) enzimi yardımıyla üretilir. NOS'ın nöronal (nNOS), endotelial (eNOS) ve indüklenebilir (iNOS) olmak üzere 3 izoformu vardır. Makrofaj, nötrofil ve endotelde bulunan NOS indüklenebilir türdendir. nNOS ve eNOS hücre içi kalsiyum düzeyine bağlı olarak sentezlenirken, iNOS sentezi Ca'dan bağımsız, oksidasyon ve inflamasyon olaylarında indüklenir (5). İ/R yaralanması sırasında NO , $O_2^- + NO \rightarrow ONOO^-$ reaksiyonuyla $ONOO^-$ (peroksinitrit) radikallerine dönüşür. Peroksinitritlerin biyolojik sistemde yarı ömrü 1-2 saniyedir ve 100 mikrometre gibi uzak mesafelere diffüze olabilir, üretildiği noktanın uzağında da etki gösterebilir.

II. D. ANTIOKSİDAN SAVUNMA SİSTEMLERİ

Antioksidanlar, ortamda okside olabilecek substratlardan (lipit, protein, DNA) daha az miktarda bulunan ancak bu substratların oksidasyonunu geciktiren veya durduran maddeler şeklinde tanımlanmıştır. Hücrelerde intrasellüler, ekstrasellüler veya hücre membranında aktivite gösteren ve sitotoksik oksijen ve nitrojen radikallerini detoksifiye eden antioksidan savunma sistemleri vardır. Bu mekanizmalar normal biyokimyasal olaylar sırasında az miktarda oluşan radikalleri nötralize edebilirler. Ancak iskemi sonrası reperfüzyon sırasında dokularda aşırı miktarda reaktif oksijen radikalleri ortaya çıkar ki, bu durumda enzimatik ve nonenzimatik bütün antioksidan savunma sistemleri çöker (8). Bu nedenle İ/R yaralanması sırasında hücrenin antioksidan savunmasını replase eden veya güçlendiren moleküllerin oksidatif stres olaylarında etkileri araştırılmaktadır.

Antioksidanlar başlıca dört mekanizmayla etki gösterirler;

- Serbest radikallere elektron sunarak veya onlardan elektron alarak kararlı hale getirirler (10). Baskılayıcı etkiyle radikal oluşturan reaksiyonları durdururlar (11).
- Zincir kırıcı etkiyle lipid peroksidasyonu gibi serbest radikal üreten zincirleme kimyasal reaksiyonları durdururlar (12).
- Onarıcı etkiyle lipid, protein ve DNA gibi yapılarda oluşan biyolojik moleküller hasarı rejenere ederler.
- Organizmada SOD ve CAT gibi antioksidan enzimlerle glutatyon (GSH) gibi enzimatik olmayan antioksidanların transkripsiyonunu ve sentezini arttırırlar (13).

II. D. 1. ENZİMATİK ANTIOKSİDAN SAVUNMA

Enzimatik savunma sistemleri oksidatif strese karşı her durumda hücrede bulunan ve genetik bilgi ile sentezlenen proteinlerdir, serbest oksijen radikallerine karşı ilk savunma hattını oluşturur ve reaktif oksijen türevlerini detoksifiye ederler.

II. D. 1. 1. Süperoksit Dismutaz (SOD)

SOD enzimi, $O_2^{\bullet-}$ radikallerini H_2O_2 'e dönüştürür. Asidik koşullarda bu tepkimeler spontan olarak da gerçekleşebilir. ($2O_2^{\bullet-} + 2H^+ \rightarrow H_2O_2 + O_2$) Böylece $O_2^{\bullet-}$ radikallerinin NO ile reaksiyona girerek, peroksinitrit oluşturmamasını; Fe^{+2} ve Cu^+ gibi metal iyonlarıyla reaksiyona girip, OH^{\bullet} radikali oluşumunu da engeller. Bu enzimin **Cu/ZnSOD**, **MnSOD**, **ECSOD** (ekstrasellüler) olmak üzere üç formu vardır. Metal içerdikleri için metalloenzimler olarak adlandırılır. Cu/ZnSOD sitoplazma ve çekirdekte bulunur. İki alt ünitesine Cu ve Zn bağlanır. MnSOD mitokondriyal bir enzimdir, ancak ekstrasellüler sıvıya da salınabilir (10). İki alt ünitesine manganez (Mn) bağlanır. ECSOD ekstrasellüler alanda, BOS'da ve serebral damarlarda bulunan formudur (14).

II. D. 1. 2. Katalaz (CAT)

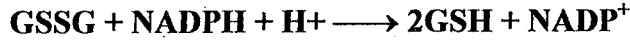
CAT enzimi H_2O_2 'in su ve oksijene yıkılmasını katalizler (15). ($H_2O_2 \rightarrow H_2O + 1/2O_2$) Dört alt üniteden oluşur. Alt ünitelerinin prostetik gruplarında, Fe^{+3} içeren protoporfirin IX bulunur. Dokulara göre katalazın enzim aktivitesi değişiklik gösterir. Karaciğer ve böbrekte en yüksek aktiviteye sahipken, destek dokularında en az aktiviteye sahiptir. Ortamda H_2O_2 düzeyi artınca aktivite gösterir ve H_2O_2 'nin suya dönüşümünü sağlar.

II. D. 1. 3. Glutayon Peroksidaz (GSH-Px)

GSH-Px enzimi prostetik grup olarak selenyum bulundurduğu için metalloenzimdir. H_2O_2 'in detoksifikasyonunu yüksek spesifite ile katalizler. ($H_2O_2 + 2GSH \longrightarrow GSSG + 2H_2O$) Lipit peroksil radikallerinin indirgenmesini katalizler. İndirgenmiş glutatyondaki hidrojeni kullanarak, glutatyonun yükseltgenmesini sağlar (16). Ortamda az miktarda bulunan H_2O_2 durumunda öncelikli olarak bu enzim tarafından detoksifiye edilir.

II. D. 1. 4. Glutayon redüktaz (GSH-Rd)

GSH-Rd enzimi oksidasyon reaksiyonlarıyla yükseltgenen glutatyonun (GSSH), kofaktör olarak NADPH kullanarak, indirgenmiş glutatyona (GSH) dönüşmesini katalizleyen enzimdir. NADP kaynağı ise glikolitik yolda pentoz fosfat yolağıdır.



II. D. 1. 5. Glukoz-6 Fosfat dehidrojenaz (G-6-P Dh)

G-6-P Dh Hücrede oksidasyon-redüksiyon olaylarında ve birçok metabolik aktivitenin gerçekleşmesinde kofaktör olarak kullanılan indirgeyici NADPH sentezinin yapıldığı pentoz fosfat yolunda görev alır.

II. D. 2. NONENZİMATİK ANTİOKSİDAN SAVUNMA

II. D. 2. 1. Glutayon(GSH)

Glutayon (GSH), glutamat, sistein ve glisinden sentezlenen bir tripeptittir. Çeşitli biyolojik reaksiyonlar sırasında proteinlerin tiol (-SH) gruplarının redükte halde tutulmasını ve hidrojen peroksitlerin detoksifikasyonunu sağlar. GSH, oldukça sitotoksik olan hidroksil ($OH\cdot$) radikali, diazot trioksit (N_2O_3) ve peroksinitrit ($ONOO^-$) ile hızlı, nonenzimatik şekilde reaksiyona girer ve onları detoksifiye eder. Bu reaksiyonlar sırasında selenyum bağımlı GSH-Px enzimiyle yükseltgenmiş glutatyona (GSSH) dönüştür. GSSH ise NADPH- $NADP^+$ oksidasyonu ile indirgenmiş GSH dönüşür. GSH-Px ve GSH-Rd enzimiyle hücre içinde **GSH / GSSH** oranı sabit tutulur. Bu dengenin bozulması hücreyi oksidatif stresle karşı karşıya bırakır (17).

II. D. 2. 2. Beta-Karoten(β -karoten)

Yağda eriyen, vitamin A öncülü β -Karotenler, İ/R sırasında zincirleme membran lipit peroksidasyon reaksiyonlarını durdurular. Peroksil radikalleri başta olmak üzere, serbest radikalleri temizlerler.

II. D. 2. 3. Vitamin C (Askorbikasıit)

Suda eriyen C vitamini, hücre içi kalsiyum birikimini, serbest oksijen radikalleri oluşumunu baskılayarak, reperfüzyon hasarını azaltır. Membran içindeki ve ekstrasellüler sıvıdaki lipit peroksidasyonunu önler, süperoksit ve hidroksil radikali ile kolayca reaksiyona girerek serbest oksijen radikallerini ortamdan temizler (18).

II. D. 2. 4. Vitamin E

Antioksidan özelliğiyle vitamin E, $O_2^{\bullet-}$, OH^{\bullet} gibi serbest radikallerle reaksiyona girerek, membran lipitleri, proteinleri, enzimleri ve DNA'ı oksidasyona karşı korur. Zincirleme membran lipit peroksidasyon reaksiyonlarını durdururlar. Son yapılan çalışmalarda vitamin E'nin radikal temizleme, baskılama, onarma ve endojen savunmayı artırma mekanizmalarının tümünü kullanabildiği, bu nedenle çok hızlı ve geniş bir antioksidan etki kapasitesine sahip olduğu gösterilmiştir (19).

II. D. 2. 5. CAPE (Caffeic Acid Phenethyl Ester)

CAPE (3,4-dihydroxycinnamic acid), arı kovanlarında arıların bal dışında kendilerini soğuktan ve patojenik ajanlardan korumak için sentezledikleri, kovanda bulunan delikleri sıvamak için kullandıkları propolisin aktif bir bileşenidir. CAPE antiinflamatuvar, immunomodülatör, antikarsinojen, antioksidan özelliğiyle geniş spektrumlu güvenilir bir farmakolojik ajandır (20-23). CAPE bu özelliklerinin çoğunu NF- κ B (Nükleer faktör kappa-B) inhibisyonu üzerinden gerçekleştirir (20).

Birçok hastalığın patogeneğinde NF- κ B'nin rolü olduğu düşünülüyor (24). Yapılan deneysel çalışmalarda H_2O_2 , bakteriyel ürünler, TNF α ve IL-1 gibi çeşitli inflamatuvar sitokinler tarafından NF- κ B nin aktivasyonu indüklenir. Aktiflenen NF- κ B ise metalloproteazlar, adezyon molekülleri, majör histokompatibilite proteinleri, COX-2 ve iNOS transkripsiyonunu indükler. CAPE, NF- κ B aktivasyonunu spesifik şekilde, doza bağımlı ve geri dönüşümlü olarak bloke eder (20).

Osteoartrit ve romatoid artrit gibi dejeneratif ve inflamatuvar hastalıkların patogeneğinde NF- κ B tarafından gen düzeyinde sentezi regüle edilen TNF α ve IL-1 β , öne çıkan başlıca proinflamatuvar sitokinlerdir (25).

Elmalı ve ark., tavşanlarda ön çapraz bağı keserek oluşturdukları osteoartrit modelinde, 2 hafta süreyle diz içine 150µmol/kg CAPE uyguladılar. İki hafta sonra eklem kıkırdığı ve sinovya da yapılan histopatolojik incelemede, kontrol grubuna göre daha az kıkırdak harabiyeti ve sinovyal inflamasyon gözlemlenmişlerdir. Elmalı ve ark., bu ön bilgiye dayanarak, osteoartrit modelinde daha az kıkırdak harabiyeti ve sinovyal inflamasyon görülmesini CAPE'nin NF-κB yi inhibe etmesi özelliğine bağlı olabileceğini düşünmüşlerdir (26).

CAPE, güçlü bir serbest radikal temizleyicisidir. İ/R yaralanması sırasında ortaya çıkan serbest radikalleri temizleyerek doku hasarını önleyebilir. İskemik dokuda majör bir serbest radikal kaynağı olan XO enzimini de inhibe eder. Ayrıca CAPE süperoksit, hidrojen peroksit ve hidroksil radikallerinin yol açtığı membran lipid peroksidasyon reaksiyonlarını önler (27). İn vitro yapılan bir çalışmada 10µMol konsantrasyonunda CAPE'nin, ksantin/ksantin oksidaz enzim sistemini ve insan nötrofillerinde reaktif oksijen türevleri üretimini tamamen bloke ettiği gösterilmiştir (28). Şahin ve ark., spinal kord İ/R çalışmasında, CAPE'nin XO aktivitesini, XD'ın, XO'a dönüşümünü inhibe ederek azatlığını ve membran lipid peroksidasyonunu önlediğini göstermişlerdir (29). CAPE, lipooksijenaz yolu ve NF-κB inhibisyonu üzerinden COX-2 (siklooksijenaz) enzimlerini inhibe ederek, arasıdonik asit metabolizmasını önler ve böylece antiinflamatuvar özellik gösterir (30).

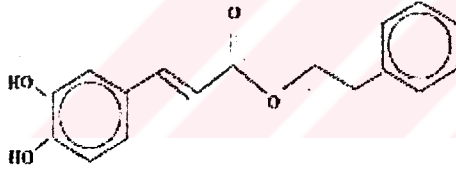
İ/R yaralanması sonrası dokularda NO seviyesi azalma eğilimindedir. Bir vazodilatatör olarak NO doku kan akımını artırmaktadır. NO'in azaldığı durumlarda kapiller düzeyde vazokonstrüksiyon meydana gelmekte, trombosit agregasyonu, Trombaksan A₂ (TXA₂) ve Platelet aktive edici faktör (PAF) salınımı artmaktadır. Ayrıca NO, nötrofillerin kemotaksis, adezyon ve aktivasyonunun internal inhibitörüdür. CAPE antioksidan özelliğiyle İ/R yaralanması sırasında, NO sentezini ve aktivitesini artırarak, dokulara kan akımını artırır ve böylece doku hasarını önler (31).

Koltuksuz ve ark., İntestinal İ/R yaralanmasında CAPE'nin serbest oksijen radikali oluşumunu inhibe ederek, reperfüzyon hasarını azalttığı göstermişlerdir (32). Gürel ve ark., böbrek İ/R modelinde reperfüzyon öncesi CAPE verilmesiyle renal reperfüzyon hasarının önlendiğini göstermişlerdir. Bu çalışmada CAPE'nin lipid peroksidasyonunu inhibe ettiği, serbest radikalleri temizlediği, NO sentezini stimüle ettiği ve polimorfonükleer lökosit infiltrasyonu önlediği sonucuna varılmıştır (33).

CAPE, aktive olmuş inflamatuvar hücrelerde apoptozisi başlatarak, inflamasyon bölgesinde nötrofillerin doku hasarı meydana getirmesini engeller.

Ratlarda oluşturulan subkutan inflamasyon modellerinde CAPE'nin lokal verilmesiyle inflamasyon bölgesinde lökositlerde apoptozisin arttığı görülmüş ve eksuda içinde lökosit, monosit ve nötrofil konsantrasyonunun daha az olduğu tesbit edilmiştir(34).

Alt ekstremitte İ/R yaralanmasından sonra akciğerlerde nötrofil infiltrasyonu ve oksidatif inflamatuvar hasar geliştiği biliniyor (35,36). Çalıkoğlu ve ark. ratların arka ekstremitelerine turnike uygulamak süretiyle 4 saat iskemi, takiben 4 saat reperfüzyon uygulamışlar ve yaptıkları histopatolojik incelemede CAPE'nin akciğerde inflamasyonu azalttığını gözlemişlerdir. Ayrıca hem akciğer dokusunda hem de serumda lipid peroksidasyon indeksi olan MDA seviyesinin düştüğünü, akciğerde Na-K ATPaz aktivitesinin arttığını, lökosit aktivitesi indikatörü olarak MPO seviyesinin düştüğünü bildirmişlerdir (37). Reperfüzyonla birlikte iskemik dokuda aktive olmuş lökositler tekrar sistemik dolaşıma geçerek uzak organlarda mikrovasküler endotele tutunur. TNF α ve IL-1 β gibi inflamatuvar, kemotaktik ve vazoaaktif mediyatörler, proteolitik enzimler ve serbest radikaller salgılar. CAPE aktive olan lökositlerde serbest radikal üretimini ve lipoksijenaz enzimini bloke ederek, NF- κ B inhibisyonu üzerinden COX-2, TNF α ve IL-1 β transkripsiyonlarını baskılayarak uzak organlarda iflamasyon ve doku hasarını önler (38,39,40).



Resim.3.CAPE'nin kimyasal yapısı

II. D. 2. 6. MELATONİN (MLT)

MLT, pineal bezden salgılanan bir nörohormondur. MLT'in pineal bezden başka retina, bağırsak gibi organlarda da sentezlendiği gösterilmesine rağmen, bunun kan MLT düzeyine etkisi yok denecek kadar azdır(41). MLT pineal bezde belirgin gün içi ritimle sentezlenir. MLT üretimi ve salınımı karanlık ile başlar, aydınlık ile sonlanır. Aydınlık dönemin uzatılması veya aniden ışığa çıkılması MLT sentezini durdurur. MLT ön maddesi bir aminoasit olan triptofandır ve pinealositler içinde önce seratonine daha sonra MEL'e dönüşür.

Esansiyel aromatik aminoasit triptofandan türeyen indoller ve özellikle MLT, mitokondiyel elektron transferini düzenleyebilmekte, reaktif ara ürünleri detoksifiye edebilmekte, peroksidatif reaksiyon zincirlerini kontrol edebilmektedir (42).

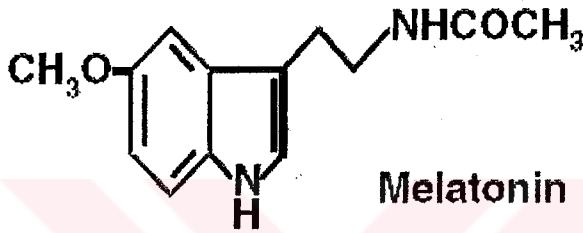
Biyolojik sistemin biyokimyasal işleyişinde oksidasyon ara ürünleri ve dolayısıyla oksidatif stres oluşumu kaçınılmazdır. Ancak gene biyolojik sistem, bu kaçınılmaz oksidatif strese karşı etkin antioksidan koruma düzeneklerine sahiptir. Son çalışmalarda, endojen antioksidan moleküller içinde en güçlüsünün MLT olduğu gösterilmiştir (43,44). MLT molekülü kolaylıkla oksitlenmez, otooksidasyona uğramaz ve redoks döngüsünde, hidroksil radikali üreten reaksiyonlara katılmaz. MLT yanı sıra MLT metabolitlerinden hiçbirinin prooksidatif aktivitesi yoktur. MLT'in hidroksil radikali nötralize etme özelliği glutatyondan 5 kat, mannitolden 15 kat, peroksit radikal tutucu özelliği ise E vitamninden 2 kat daha güçlüdür. MLT'in yüksek konsantrasyonlarda direkt radikal temizleyici kapasitesi ile farklı oksidatif stres saldırılarına karşı hücreyi koruduğu gösterilmiştir (45,46). MLT'in hidroksil, süperoksit radikalleri, singlet oksijen ve nitrojen kaynaklı peroksinitrit radikallerini temizlediği, SOD, GS-Px, GSH-Rd ve G-6-P Dh enzimlerini stimüle ettiği biliniyor (47,48,49).

Fizyolojik veya farmakolojik dozlara yakın dozlarda MLT antioksidan enzimlerin mRNA düzeyini artırır ve bu şekilde reseptör aracılığıyla antioksidan enzimlerin sentezini regüle eder. MLT CuZnSOD ve GSH-Px'in mRNA stabilitesini de regüle eder. Bu bilgilerden hareket edilerek, hücresel düzeyde antioksidanların nörohormonal olarak MLT tarafından düzenlendiği sonucuna varılmıştır(50)

MLT farklı dokular ve farklı türlerde antioksidan özelliği araştırılmış ve nörodejeneratif hastalıklar, yaşlanma, diğer oksidatif stres durumlarında genel bir koruyucu olduğu kanaatine varılmıştır (51). Farmakolojik olarak MLT, düşük konsantrasyonlarda antioksidan enzim aktivitesini ve ekspresyonunu indükler, yüksek konsantrasyonlarda direkt radikal temizleyicisidir. MLT, NF-κB aktivasyonunu düzenleyerek, özellikle CuZnSOD olmak üzere antioksidan enzimler üzerinde olumlu etki gösterdiği bildirilmiştir (52)

MLT, *invivo* ve *invitro* olarak lipit peroksidasyonunu etkili bir şekilde önleyerek hücre membranlarını, serbest radikallere karşı proteinleri yapıları ve DNA'yı korur (53-56). İskemik dokuda hücrelerin bütün subzelluler kompartmanlarına girer ve radikalleri temizler. Bu özelliği ile MLT diğer bütün antioksidanlardan daha avantajlıdır (57). Serbest radikal temizlemesi yanında MLT, İ/R yaralanması sırasında hücre içi Ca konsantrasyonunu düşürür, insan platelet agregasyonunu ve TXA₂ üretimini inhibe eder

(58). Sahna ve ark., böbrek İ/R modelinde MLT'in (4mg/kg) hem histopatolojik hem de biyokimyasal olarak böbrekleri koruduğunu göstermişlerdir. Böbreklerde kontrol grubuna göre daha düşük MDA düzeyi saptanmış ve histopatolojik olarak daha az doku hasarı ve lökosit infiltrasyonu görülmüş (59). Sonuç olarak MEL; Oksijen ve nitrojen kaynaklı serbest radikalleri temizler, antioksidan enzimleri stimüle eder, peroksidatif enzimleri inhibe eder, hücre membranını stabilize eder, oksidatif fosforilasyonun etkin olmasını ve düzgün çalışmasını sağlar, lökosit birikimi ve lökosit-endotel yüzeyinde adezyon moleküllerinin ekspresyonunu baskılar (60).



Resim. 4. Melatonin kimyasal yapısı

II. D. 2. 7. RESVERATROL (RES)

RES (resveratrol) bitkileri mantar enfeksiyonundan koruyan bir fitoaleksindir. Özellikle üzüm kabuğunda bulunur. Kırmızı şarap yapımı sırasında üzüm kabuğu da işleme tabi tutulduğundan kırmızı şarapta daha fazla bulunduğu tesbit edilmiştir. Son birkaç yılın çalışmasında RES'un kardiyoprotektif ve kemopreventif özelliği olduğu tesbit edilmiştir. RES'un kardiyoprotektif etkisi tam olarak anlaşılammıştır ancak trombosit agregasyonunu inhibe ettiği, düşük dansiteli lipoproteinlerin oksidasyonunu engellediği ve NO üretimini indüklediği biliniyor. RES'un ribonükleotid reduktaz ve DNA polimerazı inhibe edebilme ve hücre büyümesini baskılama yeteneğinin de kardiyoprotektif özelliğine katkıda bulunduğu düşünülmüyor (61-63).

RES'un TNF α , IL-1 β gibi çeşitli inflamatuvar sitokinlerin ve oksidatif stresin başlattığı NF- κ B aktivasyonun güçlü bir inhibitörü olduğu gösterilmiştir ve bu inhibisyon hücre tipine özgü değildir. NF- κ B bağımlı reporter gen transkripsiyonu da RES tarafından baskılanmıştır. Resveratrol TNF α tarafından indüklenen reaktif oksijen

radikallerinin üretimini ve lipit peroksidasyonunu bloke etmesi transkripsiyon faktörü ve ilişkili kinazlarla etkileşmesine bağlıdır (64).

RES hidroksil ve süperoksit radikallerini temizler, platelet agregasyonunu inhibe eder. RES ipoksijenazı güçlü şekilde inhibe ederek ve NF- κ B inhibisyonuyla COX-2 enzim sentezini önleyerek, araşidonik asit metabolizmasını engeller, böylece antiinflamatuvar ve antianafilaktik, antimutajen etki gösterir (65).

RES, trombositlerin biyolojik aktivitelerini inhibe eder. Trombin tarafından indüklenen agregasyonu azaltır, trombositlerin tip-1 kollajen ve fibrinojene yapışmasını inhibe eder. Muhtemelen araşidonik asit metabolizmasına inhibitör etkisi bu özelliğine kısmen katkıda bulunmaktadır. RES trombositlerde serbest radikallere karşı antioksidan olarak aktivite gösterir (66).

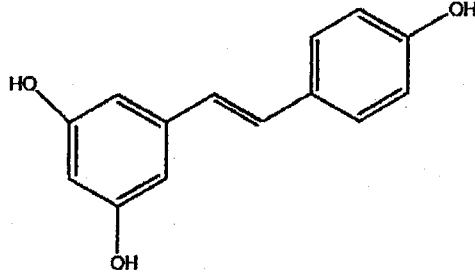
Reaktif oksijen metabolitleri fosfolipaz A2 aktivitesini artırarak, araşidonik asit serbestleşmesini başlatırlar. Araşidonik asitten lipooksijenaz enzimiyle lökotrienler (LTB₄, LTC₄/D₄/E₄), COX yoluyla prostoglandinler, trombaksanlar ve protosiklinler ortaya çıkar. RES COX-1 ve COX-2'yi inhibe ederek inflamatuvar süreci baskırlar. Hücre kültürlerinde de hidrojen peroksitler tarafından başlatılan COX-2 indüksiyonu resveratrol tarafından baskılanmıştır (67). RES serbest radikaller tarafından başlatılan membran lipit peroksidasyonunu ve oksidatif DNA hasarını önler (68).

Birçok hayvan ve insan deneysel çalışmalarında östrojen hormonunun endotelial NO sentezini düzenleyerek, kardiyoprotektif özellik taşıdığı gösterilmiştir (69). RES yapısal olarak sentetik bir östrojen olan dietilstilbestrole benzer. Dolayısıyla RES'un östrojen sensitif dokularda ve hücre kültürlerinde östrojen α ve β reseptörlerine bağlanarak, ilgili koruyucu genlerin transkripsiyonunu aktive ettiği gösterilmiştir (70).

Hipertansiyon, ateroskleroz ve diyabet gibi çeşitli kardiyovasküler patolojilerde anormal NADPH oksidaz aktivitesi ile gereksiz süperoksit radikalleri üretilir ve bu radikaller endotel hücrelerinde eNOS aktivitesini baskılayarak, NO sentezini önler. Bu nedenle vasküler yapılarda vazokonstrüksiyon meydana gelir. Son çalışmalarda RES'un vasküler NADPH oksidaz aktivitesini ve süperoksit üretimini inhibe ettiği, böylece endotelial NO sentezini artırarak vazorelaksasyon sağladığı bildirilmiştir. Bu etkisinin yanı sıra RES, NO yıkımını yavaşlatarak da vazorelaksasyona katkıda bulunur

Onarılamayacak düzeyde DNA hasarı meydana gelmiş insan hücrelerinde, p53 geninin apoptozisin başlamasında önemli olduğu gösterilmiştir. p53 eksikliği olan hücrelerin, normal apoptotik süreçten kurtulduğu ve kansere dönüştüğü görülmüştür.

p53 en önemli tümör süpressör gendir. Mutasyon veya p53 proteininin fonksiyon kaybı insan kanserlerinin yarısından fazlasında tesbit edilmiştir. Resveratrol p53 bağımlı transkripsiyonel aktiviteyi indükler ve apoptozis meydana getirir. Farklı hücrelerde resveratrolun apoptozisi uyarması için p53 geninin gerekli olduğu gösterilmiştir (72).



Resim. 5. Resveratrol (3,4',5-trihydroxy-trans-stilbene)

II. E. İSKEMİ-REPERFÜZYON YARALANMASI

Klinik olarak ekstremitte amputasyonları, vasküler travma, uzun süreli turnike uygulaması, serbest flep ameliyatları ve akut arteriyel emboli sonrası reoksijenasyonla birlikte iskemi süresi, ortam ısısı ve doku kitlesinin özelliğine bağlı olarak, reperfüzyon yaralanması meydana gelmektedir. Revaskülarizasyonla birlikte iskelet kası nekrozu, periferik sinir hasarı, doku ödemi, kompartman sendromu, ekstremitte amputasyonları, hipovolemik şok, miyoglobini, hiperkalemi, aritmi, metabolik asidoz, akut böbrek yetmezliği, pulmoner yaralanma, multiorgan yetmezliği ve ölüme yol açan birçok lokal ve sistemik komplikasyonlara meydana gelebilmektedir (73).

İskemik dokunun tekrar önceki fonksiyonlarını kazanıp-kazanmayacağı, normal hücrel metabolizmanın restore olup-olmayacağı ya da İ/R yaralanmasıyla sonuçlanıp-sonuçlanmayacağı temel olarak iskemi süresiyle ilişkili bir olaydır. Belkin ve ark., turnike ile oluşturdukları ekstremitte İ/R modelinde kas dokusunda hücre ölümüne yol açan temel faktörün reperfüzyon değil, iskemi süresi olduğunu göstermişlerdir. İskemik süresi ne kadar uzun ise reperfüzyon yaralanması da o kadar fazladır (74). Doku tipi, ortam ısısı, perfüzyon basıncı, farmakolojik tedaviler ve fizyolojik koşullar da İ/R yaralanmasını etkileyen diğer faktörlerdir. Genel olarak iskelet kası 4 saat, sinir dokusu 8 saat, yağ dokusu 13 saat, cilt 24 saat ve kemik 4 güne

kadar iskemiye tolere edebilir (75). Örneğin el ve ayak parmakları dışında replantasyonlar majör replantasyonlar olarak değerlendirilir ve kas kitlesi daha fazla olduğu için İ/R yaralanması daha fazla olacaktır. Replante veya revaskularize edilecek dokunun soğuk ortamda veya özel solusyonlarda muhafaza edilmesi metabolizmayı yavaşlatacağından iskemiye toleransı arttıracaktır. Normal koşullar altında reperfüzyon, normal kan akımını ve normal metabolik fonksiyonları restore eder (76).

II. E. 1. Hücre İçi Ca Artışı, Ksantin Oksidaz Aktivitesi ve Nötrofil Aktivasyonu

Herhangi bir nedenle canlı ve aktif bir doku iskemik kaldığında hücrelerde oksijensizlik nedeniyle aerobik solunum, anaerobik yöne doğru hızla değişir. Buna bağlı olarak hücre içi laktat, piruvat, ürik asit, üre, ksantin, hipoksantin gibi anaerobik metabolitler birikerek, hücre içi asidoz meydana gelir. İskemi süresiyle ilişkili olarak, oksijen sağlanamadığında hücrenin yapım-yıkım aktivitesi için gerekli olan ATP refosforile olamaz ve ADP, AMP, adozin, inozin ve hipoksantin şeklinde alt basamaklara parçalanır. Na-K ATPaz, Na-Ca iyon pompası ATP yokluğu nedeniyle inaktive olur ve hücrenin iyon gradienti bozulur. Bu nedenle hücre içine göç eden Ca hem dışarı atılamaz hem de depolanamaz ve sitozolik serbest Ca miktarı önemli derecede yükselir (77,78). Hücrenin iyon dengesinin bozulması ve hücre içinde anaerobik metabolitlerin birikimi sonucu hücre içi ozmotik basınç arttığından, iskemiye ilk reaksiyon şişme şekline ortaya çıkar.

Sitozalde kalsiyum artışı:

1. Proteaz, fosfolipaz, endonükleaz, ATPaz (ATP yıkıcı) ve diğer bazı yıkıcı enzimlerin aktivasyonuna sebep olur. Proteolitik enzimler, hücre membran bütünlüğünü bozarak, membranlardan daha fazla kalsiyumun içeri girmesine neden olur.

2. Normal şartlarda, kas hücresinde depolarizasyonu için sarkoplazmik retikulumdan sitozole Ca salınması gerekir. Bu şekilde kas kontraksiyonlar meydana gelir. Kasın gevşemesi için ise kalsiyumun hücre içi depolarına geri dönmesi gerekir. Bu işlemler sırasında da ATP gereklidir. ATP eksikliği nedeniyle kalsiyum iyonları depolara geri dönemez ve sitozalde sürekli yüksek konsantrasyonda bulur, bu durum sürekli kas kontraksiyonunu uyararak, gereksiz enerji tüketimine yol açar

Sitozalde serbest Ca'un aktive ettiği proteazlardan biri XD enzimini, ksantin oksidaz enzimine dönüştüren kalpeindir (79). XD enziminin, XO enzimine dönüşmesi dokunun metabolik aktivitesi, ortamın ısısı ve iskemi süresine göre farklılık gösterir. İskelet kası bu dönüşüme oldukça dirençli iken, endotel hücresi ise oldukça duyarlıdır

(80). Normal koşullarda XD enzimi, pürin bazlarının yıkım ürünü olan ksantin ve hipoksantinin ürik asite yıkılmasını gerçekleştirir. Bu reaksiyon sırasında hiçbir zaman serbest radikal oluşmaz. Ancak hücre içi serbest Ca'un proteolitik enzimleri aktive etmesiyle XD'in yapısı değişir ve XO'a dönüşür. Ürik asit oluşumu sırasında XD ksantin ve hipoksantinden kopardığı elektronları, NAD⁺'e transfer ederken, XO kopardığı elektronları oksijen moleküllerine transfer eder.

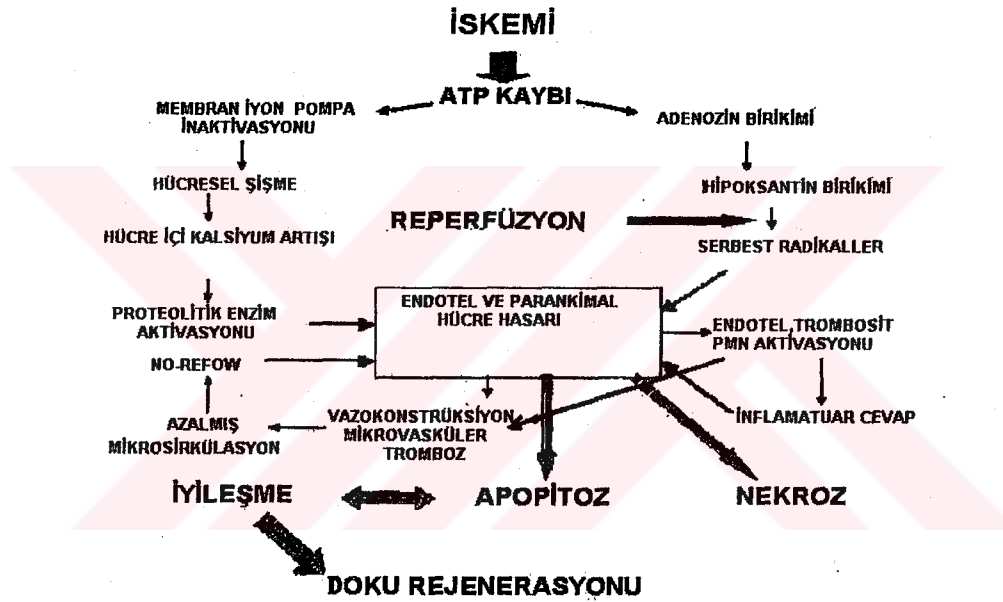
Reperfüzyonun başlamasıyla birlikte iskemik süreçte hücre içinde birikmiş olan hipoksantin, iskemik dokularda metabolik aktivite ve iskemi süresiyle ilişkili olarak artmış XO enzimiyle ksantin ve ürik asite yıkılır. Bu yıkım sırasında XO enzimi hipoksantinden bir elektron kopararak, reperfüzyonla birlikte, bol miktarda gelen oksijen moleküllerine transfer eder. Bir elektron alan oksijen moleküllü speroksit (O₂⁻) olarak adlandırılan serbest oksijen radikaline dönüşür. Süperoksitler de SOD enzimiyle bir elektron daha alarak, hidrojen peroksitlere (H₂O₂) dönüşür. Ortamda bol miktarda biriken H₂O₂ ve O₂⁻'ler spontan ve enzimatik çeşitli reaksiyonlarla •OH radikallerine dönüşür. ATP yıkım ürünleri ne kadar fazla birikirse bu reaksiyonlar okadar fazla olacaktır. İskemi süresi arttıkça ATP yıkım ürünleri de artacağından, reperfüzyon hasarı da o denli fazla olacaktır (81) (Resim 6).

Normal şartlarda endotelde ve kas hücrelerinde sentezlenen ve vazodilatasyondan sorumlu NO ise süperoksit ve hidrojen peroksit radikalleriyle spontan reaksiyona girerek, peroksinitrit radikallerini oluşturur. Peroksinitritler hidrojen iyonlarıyla reaksiyona girerek, peroksinitröz asitleri oluşturur. Peroksintröz asit ise hızla nitrojen dioksit ve hidroksil radikallerine ayırır. Gerek oksijen kaynaklı, gerekse nitrojen kaynaklı olsun bütün serbest radikaller sonuçta hücreler için en toksik ve en zararlı radikal olan OH• radikallerine dönüşür (82). Ayrıca hem ortamda bulunan hem de asidozla birlikte bağlı buldukları proteinlerden ayrılan demir (Fe⁺²) iyonları, Fenton ve Haber-Weiss reaksiyonlarıyla süperoksitler ve hidrojen peroksitlerle tepkimeye girip, hidroksil radikallerini oluştururlar (83).

Reperfüzyonla birlikte sağlanan oksijen molekülleri iskemik dönemde oldukça indirgenmiş bir mitokindriyel respiratuar zincirle karşılaşır ve bu durum mitokondri iç membranında hızla süperoksit radikallerinin oluşmasına yol açar. Matrikste süperoksitlerin dismutasyonu ile hidrojen peroksitler oluşarak, hücrenin stoplazmasına diffüze olur. Stoplazmada hidrojen peroksitler miyoglobinlerle reaksiyona girerek tekrar hidroksil radikallerinin doğmasına yol açar (84,85).

Reperfüzyon sırasında ortaya çıkan serbest oksijen radikalleri hücre membranı lipid komponentlerine saldırarak, zincirleme lipid peroksidasyon reaksiyonlarını başlatır. Peroksidasyon reaksiyonlarıyla hasar gören hücre membranı, bütünlük, akışkanlık ve geçirgenliğini kaybeder ve hücre içine yoğun sodyum, kalsiyum ve su akımı başlar. Sonunda hücre şişerek, lizise uğrar. Ayrıca hücresel proteinler, enzimler, karbonhidratlar ve DNA gibi bütün yapısal ve fonksiyonel birimler, yoğun serbest radikal saldırısına maruz kalır, yapı ve fonksiyonları değişir (86).

Mikrosirkülasyonda serbest radikaller kollajenlere ve bazal membranlara zarar vererek endotel hasarını başlatırlar, bu şekilde granülosit ve platelet adezyonunu kolaylaştırır, mikrosirkülasyonda pıhtılaşma şelalesi tetiklenir (87).



Resim.6. İ/R yaralanması, serbest radikal oluşumu ve doku hasarı meydana gelmesi.

İ/R yaralanması sırasında inflammatuar hücreler ve endotelden, transkripsiyon ve RNA'dan sentezi gerekmeyen lipid orijinli, erken faz PAF (platelet aktive edici faktör), LTB_4 (lökotrien B_4) ve TXA_2 (trombaksan A_2) gibi mediyatörler salınır. LTB_4 ve TXA_2 araşidonik asit metabolitleridir. Bu mediyatörlerin üretilmesi nötrofillerdeki enzimler (lipoksijenaz ve siklooksijenaz) ve endotelde hücre içi Ca artışı sonucu aktive olan fosfolipaz A_2 ile başlar. Deneysel olarak bu enzimlerin bloke edilmesiyle İ/R yaralanmasının azaldığı gösterilmiştir (87). Nötrofiller kemotaktik uyarılarla inflamasyon bölgesine çekilir. Bu kemotaktik sinyaller İ/R sırasında serbest

radikallerin aktive ettiği veya zarar verdiği trombositler, endotel hücreleri, diğer lökositler, makrofajlar ve mast hücrelerinden tarafından salınır. PAF, TX ve LT gibi inflamasyona cevap olarak ortama salınan mediyatörler daha fazla platelet ve lökosit aktivasyonuna, daha fazla serbest radikal doğmasına yol açmaktadır (87).

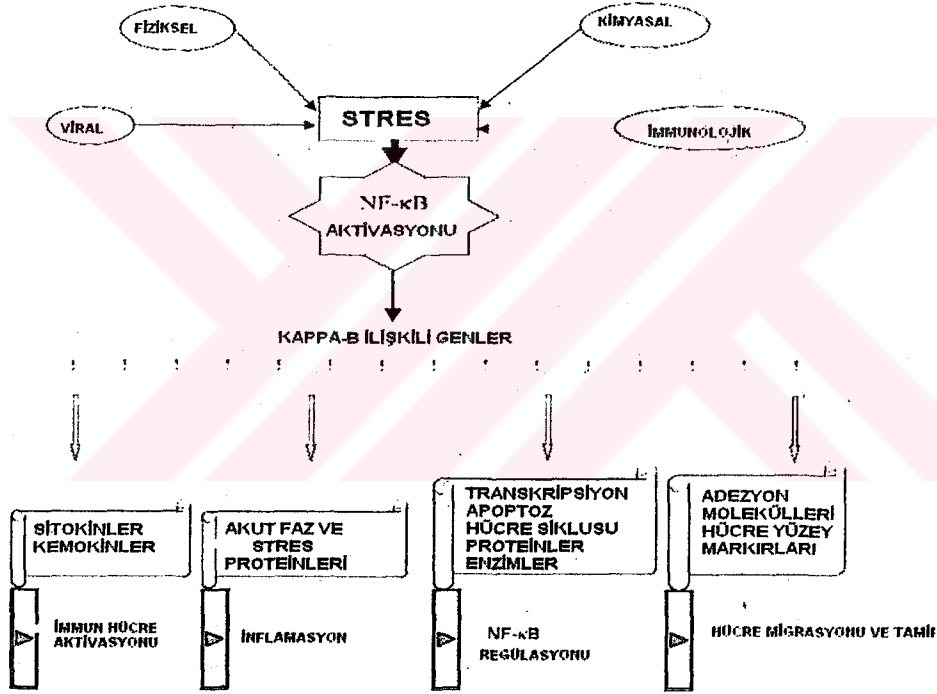
PAF endotel hücreleri ve birçok inflamatuvar hücrelerce üretilir. PAF platelet aktivasyonu ve birikimine ilave olarak, güçlü bir vazokonstrüktör, bir kemotaktik ajan ve nötrofil aktivatörüdür. PAF aynı zamanda protein orijinli, sentezi NF- κ B tarafından düzenlenen TNF- α (tümör nekroze edici faktör) ve IL-1 β (interlökin) üretimini de indükler ve bu ajanlar inflamasyonu alevlendirirler. Trombositler vasküler anastomoz hattına tutunmasa dahi, konnektif doku elemanlarıyla karşılaşması sonucu PAF salgılayabilir, bu durum vazokonstrüksiyona, mikrosirkülasyonda nötrofil aktivasyonuna yol açar (87).

Memeli hücresinde p50 ve p65 protein alt ünitelerden oluşan, heterodimer yapıda bir transkripsiyon faktör olan Nükleer faktor kapa-B (NF- κ B) tesbit edilmiştir. Normal koşullarda NF- κ B sitoplazmada I κ B α (inhibitör kappa B) tarafından inaktif şekilde tutulur. İ/R yaralanması, inflamatuvar sitokinler (TNF, İnterlökin), prostonoidler, serbest radikaller, sitoplazmada I κ B'nin fosforilasyona uğramasına ve yıkılmasına yol açarlar. Bu durumda aktif hale geçen NF- κ B hemen çekirdeğe göç ederek, TNF α ve IL-1 β gibi geç faz inflamatuvar, kemotaktik ve vazoaktif sitokinler, proteazlar, lökositik ve endotelial yüzey adezyon moleküllerinin, iNOS ve COX-2 enzimlerinin transkripsiyonu başlatır (88)(Resim 7). COX enzimi, prostoglandinler, TXA₂ ve prostosiklinlerin sentezinde görev alan bir enzimdir. COX-2 enzimi, COX enziminin endotel hücreleri, fibroblastlar ve makrofajlarda bulunan ve IL-1 β gibi proinflamatuvar ajanlar tarafından uyarılabilen formudur (115,116).

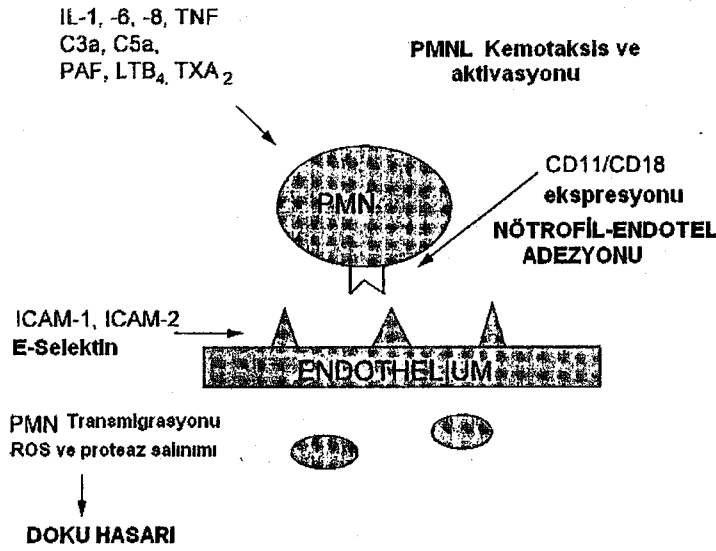
İ/R yaralanması sonucu oluşan oksidatif stresle aktive olan NF- κ B endotelde P-selektin, E-selektin, ICAM-I, ICAM-II (intersellüler adezyon molekülleri) gibi adezyon moleküllerinin ve aktive olan lökosit yüzeyinde CD₁₁/CD₁₈ adezyon moleküllerinin oluşmasını başlatır. Bu yüzey adezyon molekülleri yardımıyla lökosit endotel etkileşimi başlar, yuvarlanma, marjinasyon, diapedez ve parankime lökosit infiltrasyonu şeklinde devam eden süreç başlar. Daha sonra aktive olan lökositler MPO ve NADPH oksidaz enzimleri ile reperfüzyon sırasında bol miktarda gelen oksijenleri kullanarak, ikinci serbest radikal saldırısını başlatır. Ayrıca lökositlerden salınan proteolitik enzimler ve fosfolipazlarla çok hızlı geri dönüşü olmayan doku hasarı meydana getirir (89,90) (Resim.8

Lökositler içerdikleri proteolitik enzimlerle bazal membranları ve endotelial bariyeri oluşturan birleştirici proteinleri parçalar. Böylece endotelial bariyer fonksiyonu bozularak, parankime lökosit infiltrasyonu, sıvı ve makromolekül ekstravazasyonu meydana gelmektedir.

Uzun süren iskemi veya I/R yaralanması durumunda endotel hücrelerinin yapı ve fonksiyonlarını bozular. Endotel hücresi yassı yapısını kaybedip, şişer ve yuvarlaklaşır, kapiler lümen daralır, kapiller devamlılıkta bozulma meydana gelir ve damar duvarı geçirgenliği artar. Morfolojik değişikliğe ilave olarak, endotel hücresi fizyolojik fonksiyonlarını da kaybeder. Normal endotel hücresi NO gibi vazodilatatör sentezleme ve vazokonstrüktör yıkabilme kapasitesine sahiptir. NO endotel hücrelerinde normal olarak sentezlenen bir vazodilatatördür. Anoksik durumda endotel hücresi NO sentezleme ve vazokonstrüktör yıkabilme yeteneğini kaybeder (91).



Resim-7. NF-κB aktivasyonu (88)



Resim.8. İskemi-reperfüzyon yaralanması endotel, lökosit ilişkisi (89)

II. E. 2. Mast Hücreleri

İnflamasyon; artmış mikrovasküler geçirgenlik (permeabilite) sonucu protein ve sıvı ekstrasvazyonu ve parankimde lökosit infiltrasyonu ile karakterize bir durumdur. Birçok inflamatuvar süreçte zengin inflamatuvar mediyatörler içeren mast hücrelerinin önemli roller aldığı biliniyor. Mast hücreleri kemik iliğinde stem hücrelerden kaynaklanan granüllü hücrelerdir. Kanda bulunan bazofillerin aksine mikrovasküler çevreye yakın bağ dokusunda yerleşim gösterirler, bazofil kaynaklı değildir. İ/R olayında aktive olan mast hücrelerinin akciğer, kalp kası ve ince bağırsakta doku hasarı oluşturduğu iyi bilinmesine rağmen iskelet kasında rolü tam olarak bilinmiyor. Kas ve sinir dokusunda bulunan mast hücreleri İ/R yaralanması sürecince aktive olunca PAF, TNF- α gibi sitokinler, kimokinler, triptaz ve kimaz gibi proteinazlar, proteazlar, prostenoidler, aminler, lökotrienler ve NO gibi kimyasal mediyatörler salgılar. Lökositlerin adezyon, migrasyon kolaylaştırırlar ve salgıladıkları histamin ve bradikinin gibi vazoaaktif aminlerle dokularda ödeme yol açarlar. İskelet kası İ/R yaralanmasında mast hücrelerinin majör rol oynadığı ve mast hücre inhibitörleri kullanılarak reperfüzyon yaralanmasının azaltılabileceği deneysel çalışmalarda gösterilmiştir (92,93,94).

II. E .3. Kompleman aktivasyonu (C)

Kompleman 20 kadar farklı proteinden oluşan bir sistemi ifade etmek için kullanılan ortak terimdir. Esas olarak, C1-9 ve B, D olmak üzere 11 proteinden oluşan ve normal olarak plazma proteinleri ile kapillerden dokulara sızan plazma proteinleridir.

Enzim ön maddeleri normalde inaktiftir. C5a'nın nötrofil ve makrofajlarda kemotaksis etkisi mevcuttur. C3a, C4a ve C5a fragmanları mast hücreleri ve bazofilleri aktive eder ve bu şekilde lokal sıvılara histamin, bradikinin vb.maddelerin serbestlenmesine yol açarlar. Aktive olan kompleman şalesinde C5b litik kompleks olarak bilinir. Hücre membranını direkt olarak tahrip edici etkisi vardır (95). C1 esteraz gibi kompleman inhibitörlerinin kullanılması veya kompleman komponentlerine spesifik (ör. C5, C5a) monoklonal antikorların kullanılmasıyla, İ/R yaralanması modellerinde doku hasarında belirgin azalma görülmüştür. Son çalışmalarda İ/R yaralanmasında özellikle terminal kompleman komponentlerinin önemli olduğu tesbit edilmiştir.

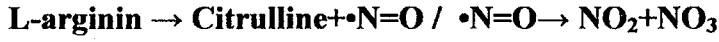
İ/R yaralanmasında alternatif kompleman yolunun aktive olduğu birçok çalışmada gösterilmiştir. Alternatif yol antijen-antikor kompleksine ihtiyaç duymadan, erken dönemde nonspesifik savunmanın meydana gelmesinde rol alan mekanizmadır. Deneysel hayvan çalışmalarında kompleman aktivasyonu C3 ve C5 aşamasında bloke edilince inflamasyon ve İ/R yaralanmasında dikkate değer azalmalar tesbit edilmiştir. Kompleman yolunun herhangi bir yolakla aktivasyonu sonucu C5 konvertaz enzimiyle C5, C5a ve C5b'ye parçalanmaktadır. Miyokart infarktüsü, intestinal iskemi, böbreklerde alt ekstremitelerde, İ/R yaralanması sürecinde komplemanların önemli roller aldığı gösterilmiştir. Ancak İ/R yaralanması sürecinde oluşan oksidatif stresin hangi mekanizmayla kompleman aktivasyonuna yol açtığı tam olarak bilinmiyor (96).

II. E. 4. Nitrik Oksit (NO)

Normal vasküler fizyolojide NO vazodilatör olarak kan basıncını ayarlar, nontrombotik endotelial yüzey sağlayarak, PAF ve TXA2 gibi proinflamatuvar sitokinlerin üretimini baskılar, böylece trombosit agregasyonunu engeller. İ/R yaralanması sırasında süperoksit radikalleri lehine bozulan dengeler hem pozitif geri beslemeyle NO üretimini azaltır hem de NO'in koruyucu etkilerini baskılar (97). NO azaldığında selektin gibi endotelial yüzey adezyon molekülleri ve nötrofillerin endotele tutunmasını sağlayan CD11/CD18 gibi yüzey adezyon molekülleri artar. Ayrıca NO'in nötrofillerin kemotaksis, adezyon ve aktivasyonunun internal inhibitörü olduğu gösterilmiştir (98, 99).

NO sentezi L-arjinden nitrik oksit sentaz enzimiyle (NOS) L-sitruilin oluşması sırasında sentezlenir. Bu yol oksijen(O₂) ve kofaktör olarak NADPH ve tetrahidrobiopterin (BH₄) gerektiren bir reaksiyondur. Mikromolar düzeyde NO sentezi

için önemli miktarda oksijen gerekmektedir. NOS enzimi bir molekül NO üretmek için iki molekül oksijen harcar (98).



Yapısal ve indüklenbilir olarak iki tür NOS biliniyor. Yapısal NOS nöronlarda, endotel hücrelerinde, sentezi genetik olarak kodlanmış şekilde her hücrede bulunur. Yapısal NOS Ca^{++} bağımlıdır ve bu yüzden intrasellüler Ca seviyesini değiştiren ajanlarca sentezi aktive veya inhibe olur. Endotel hücrelerinde asetil kolin, bradikinin, taikinin, serotonin, platelet aktive edici faktör (PAF) ve histamin intrasellüler Ca düzeyini arttırarak, NO üzerinden vazodilatasyon yaparlar (100).

İndüklenbilir NOS Ca'dan bağımsızdır ve inflamatuvar hücrelerde, endotel hücresinde, düz kaslarda ve diğer hücrelerde bulunur. Lipopolisakkarit ve interferon-gama (IFN- γ), tümör nekroze edici faktör (TNF- α) ve interlökin-1 α (IL-1- α) gibi sitokinler NF- κB 'i aktive ederek iNOS aktivitesi uyarılır (98).

Kang Liu ve ark. reperfüze kremaster kasında NO donörü (nitrozo N-asetil sistein) SNAC verilmesiyle kontraktıl fonksiyonların korunduğunu göstermişlerdir. Mekanizması tam olarak bilinmemekle birlikte SNAC verilmesiyle oluşan NO sayesinde mikrovasküler yatakta dolaşım düzelmekte, nütrüent moleküllerin ulaşması ve sitotoksik metabolitlerin uzaklaştırılması sağlanmaktadır (101).

Endojen sentezlenen NO'nın mast hücre aktivitesini de düzenlediği ve bu yolla mikrovasküler akımı etkilediği düşünülmektedir. Bir çalışmada endojen NO sentezini inhibe eden L-arginin analogu L-NAME (N-nitro-L-arginin metil ester) verilen gruplarda mast hücre degranülasyonu meydana geldiği, mikrovasküler permeabilite ve lökosit infiltrasyonunun arttığı gösterilmiştir (102).

II. E. 5. No-Reflow fenomeni

No-reflow fenomeni İ/R yaralanması sırasında, majör damarlarda akım olmasına rağmen besleyici kapiller yatakta akımın olmaması şeklinde tanımlanur (103). No-reflow fenomeninde, kapiller lümende endoteller şişmiş, endotel hücreleri kısmen detaçe olmuş, vazokonstrüksiyon ve intestisiyel ödem nedeniyle lümenler daralmış, damar lümeninde lökosit, trombosit ve eritrosit tıkaçları belirlemiştir. Klinik olarak ilerleyici organ disfonksiyonu, doku nekrozu ya da terminal organ destrüksiyonu şeklinde ortaya çıkar. No-reflow mekanizmasını açıklayan birkaç teori ortaya atılmıştır.

İntravasküler hemokonsantrasyon teorisi: Bu teoriye göre kapiller permaabilite artışı sonucu, intravasküler alandan sıvı kaçıışı olmakta ve rölatif olarak kapiller içinde hemotokrit yükselmektedir. Kan yoğunluğu artınca kapiller düzeyde akım gerçekleşmemektedir. Preoperatif kan hematokrit düzeyinin düşürülmesi ile İ/R yaralanmasında azalma görülmesi bu teoriyi destekleyen en önemli bulgudur.

Endotel hücrelerinde şişme: Bu teoriye göre hipoksik ortamda ATP yetersizliği sonucu iyonik pompaların çalışmaması ve anaerobik metabolitlerin hücre içinde birikmesiyle hücre içinde ozmotik basınç artmakta, endotel hücrelerinde şişme meydana gelmektedir. Şişen endotel hücreleri ise kapiller lümenin daralmasına ve akıma karşı hidrostatik direncin yükselmesine neden olmaktadır.

Kapiller Lümenin lökosit, eritrosit ve trombosit tıkaçlarıyla kapanması: Mikrosirkülasyonda İ/R yaralanmasının en yoğun yaşandığı bölge postkapiller venüllerdir. Eritrositlerin parçalanması, trombosit ve lökosit aktivasyonları, pıhtılaşma şalesinin ateşlenmesi ile kapiller düzeyde tıkaçlar oluşmaktadır.

İnterstisiyel ödem teorisi: Endotel hücre hasarı, vazoaktif inflamatuvar mediatörler ve sitokinler vs.mekanizmalarla damar dışına sıvı kaçıışı olmaktadır. Damar dışına çıkan sıvı miktarı arttıkça intersitisiyel alanda basınç artmakta, bu durun kapiller yatağa dışardan bası yapmaktadır. Bu şekilde kapiller akım durmaktadır.

Şüphesiz ki, no-reflow fenomeni gelişmesinde bütün bu teorilerin ayrı-ayrı rolleri vardır, belki de bu teorilerin birleşimi sonucu no-reflow fenomeni meydana gelmektedir. No-reflow fenomeni İ/R yaralanmasının geri dönüşü olmayan son basamağını gösterir (87).

II. E. 6. Kompartman Sendromu

İ/R yaralanması sürecinde serbest oksijen ve nitrojen radikalleri, aktive olan lökositlerin salgıladıkları proteolitik enzimler ve vazoaktif inflamatuvar sitokinler nedeniyle endotel hücreleri zarar görerek, endoteliyel bariyer fonksiyonu bozulur. Bunun sonucu eritrositler, nötrofiller, proteinler ve makromoleküller ekstravaze olmaktadır. Damar dışına çıkan proteinler kısır döngüye neden olarak daha fazla sıvının dışarı çekilmesine yol açar. Özellikle baldır ve önkol gibi adale kitlesinin fazla olduğu bölgelerde kompartman sendromuna zemin hazırlar. Fasial kılıf ile sınırlı volumdaki

adale kitlesi, periferik sinir ve vasküler yapılarda ekstrasellüler sıvı basıncının artması, dokuların sıkışmasına ve ekstremitayı tehdit eden kompartman sendromuna yol açar. Bu durum ekstremitayı iskemik kontraktür gelişiminden nekroza kadar götüren, erken müdahale edilmesi gereken ve klinik olarak yakın takip gerektiren bir tablodur. Pasif eklem hareketleriyle çok şiddetli ağrı olması, distalde nabızların palpe edilebilmesine rağmen parestezi/paralizi gelişmesi ve hastanın daha önceki ağrılarında çok farklı bir ağrı tanımlaması, ağrı kesicilere cevap alınamaması başlıca klinik bulgulardır. Kompartman sendromu şüphesinde klinik bulguları maskeleyeceği için ağrı kesiciler kontendikedir. Klinik olarak şüphelenildiği durumlarda profilaktik fasiotomi yapılması gerekir. Erken ve doğru girişimle kurtarılabilecek canlı adale dokusunun nekroza gitmesi önlenebilir (104).

II. E. 7. İskemi-Reperfüzyon Yaralanmasının Sistemik Etkileri

Akut başlayan iskemik sonrası revaskülarizasyon yüksek mortalite (%10-20) ve morbidite (%20-30) ile sonuçlanır. Revaskülarizasyon sendromu olarak adlandırılan bu tabloda lokal komplikasyonlar (ödem, no-reflow fenomeni, kompartman sendromu, nekroz, reamputasyon, rabdomiyoliz, enfeksiyon vs) yanında, uzak organ yaralanması (akciğer, karaciğer, kalp, böbrekler, karaciğer ve gastrointestinal sistem) ve sistemik komplikasyonlar (ARDS, DIC, SIRS, MODS) ortaya çıkmaktadır. Bütün bu komplikasyonlar iskemik süresi, ortam ısısı ve iskemik doku kitlesinin metabolik aktivitesiyle doğru orantılıdır. Reperfüzyon sırasında XO enzimi, serbest oksijen radikalleri, kemotaktik özelliği olan proinflamatuvar mediyatörler ve iskemik dokuda aktive olan lökositler sistemik dolaşıma geçer (1).

Endotel hücrelerinin XO açısından zengin oluşu, bu enzimin süperoksit (O_2^-) ve hidrojen peroksit (H_2O_2) oluşumlarını indüklemesi İ/R yaralanmasının neden olduğu uzak organ yaralanmasına katkıda bulunur. Aort oklüzyonu sonrası, hepatik ve intestinal İ/R yaralanması olaylarında plazma XO düzeyinin dramatik şekilde yükseldiği görülmüştür. Deneysel çalışmalarda ksantin oksidaz enzimi ve ürünlerinin inhibisyonuyla, akciğer ve karaciğer gibi uzak organlarda İ/R hasarı azalmıştır (105).

Vega ve ark., ratlarda ekstremitaya turnike uygulayarak, gerçekleştirdikleri deneysel çalışmalarda XO enziminin sistemik dolaşıma geçmesiyle, karaciğerde kupfer hücreleri, polimorfonükleer lökositlerin aktive olduğunu, endotel hasarı ve uzak organ yaralanması oluştuğunu göstermişlerdir. Vega ve ark., 5 saat iskemik sürecinde gastrocnemius kasında XO enziminin % 30' unun XO döndüştüğünü, reperfüzyon

sırasında ise ilk 10 dk. İçinde XO' ın femoral ven yoluyla sistemik dolaşıma geçtiğini göstermişlerdir. İlave olarak, endojen XD enziminden bağımsız olarak, reperfüzyonun 30 dk. içinde karaciğer dokusunda XO düzeyinin anlamlı şekilde arttığını göstermişlerdir. 60 dk. içinde hepatik XD'ın XO'a dönüşmeye başladığını, hepatik vende alanin transferaz (ALT)'ın yükseldiğini, oksidatif stres sonucu karaciğer parankim hücrelerinin hasar gördüğünü ve karaciğer dokusunda nötrofil aktivasyonunu gösteren MPO aktivite artışını da göstermişlerdir. (106).

Nötrofillerin O_2^- ve H_2O_2 ürettikleri, $H_2O_2 + Cl^- \rightarrow HOCl$ reaksiyonunu hipoklorik asit oluşumunu sağlayan, MPO enzimi salgıladıkları ve bu enzimin uzak organlarda hasar oluşturduğu biliniyor. Ayrıca aktive olan nötrofiller endotelial bariyer fonksiyonun sürdürülmesini sağlayan junctional protein gibi endotelial bazal membranın bütün komponentlerini parçalayabilen proteazlar da salgılar. İskemik dokuda aktive olan lökositler reperfüzyonla birlikte tekrar sistemik dolaşıma geçebilir. Bu aktive olan lökositler uzak organ yaralanmasını başlatan $TNF\alpha$ ve $IL-1\beta$ gibi mediyatörlerin salınımında da rol alır. Deneysel çalışmalarda lökosit adezyonunu inhibe edilmesiyle uzak organ yaralanmasında azalma tesbit edilmiştir (107).

Alt ekstremitte İ/R yaralanmasını sonrası akciğerlerde vasküler permeabilite artışı, alveollere protein kaçıışı ve nötrofil infiltrasyonu karakterize ARDS (akut respiratuar distres sendromu) meydana geldiği tesbit edilmiştir (108). Postiskemik dokudan, sistemik dolaşımdaki nötrofilleri aktive eden $TNF\alpha$, TXB_2 , PAF ve C5a gibi inflamatuvar mediyatörler salınır. $TNF\alpha$ uzak organlarda nötrofil aktivitelerini indükleyerek, nötrofil kaynaklı doku hasarını artırır. C5a gibi kompleman aktivasyon ürünleri lökositler için kemotaktik, aktive edici özellik taşır ve lökositlerin serbest radikal üretimini, yüzey adezyon moleküllerinin ekspresyonunu stimüle eder. PAF nötrofil aktivasyonunu ve adezyonunu güçlendirerek, lökosit kaynaklı doku hasarını artırır. Deneysel çalışmalarda sistemik olarak, PAF verilmesi ile MODS (multiorgan yetmezliği sendromu)'nda görülen hipotansiyon, vasküler permeabilite artışı, platelet agregasyonu ve kardiyak depresyon bulgularına benzer sonuçlar ortaya çıkmıştır (109).

Barry ve ark., aortun klempenmesi ve klempin kaldırılmasıyla ortaya çıkan İ/R yaralanması modelinde sistemik dolaşımda $TNF\alpha$ ve TXB_2 düzeyinin arttığını ve iki mediyatörün plazma konsantrasyonuyla, pulmoner vasküler disfonksiyon arasında doğru orantı olduğunu tesbit etmişlerdir. İ/R sırasında sistemik dolaşıma geçen inflamatuvar mediyatörler, uzak organlarda endotel ve lökosit yüzeyinde adezyon

moleküllerinin ekspresyonunu attırmakta, bu şekilde lökosit adezyonu, migrasyonu ve infiltrasyonuna ve endoteliyal bariyer fonksiyonların bozulmasına yol açmaktadır (110).

Hasarlı ya da nekrotik dokulardan histamin, kompleman, trombaksan ve bradikinin gibi inflamatuvar mediyatörlerin sistemik dolaşıma geçmesiyle faktör XII aktive olarak, pıhtılaşma şelalesi başlatılır ve dissemine intravasküler koagülolojiyle sonuçlanabilir. Uzak organ yaralanması bakımında çizgili kaslarda nekroz sonucu miyoglobin dolaşıma geçer ve miyoglobüri sonucu böbreklerde yakın takip gerektiren akut tübüler nekroz (ATN) gelişebilir (1).

III. GEREÇ VE YÖNTEM

İskemi-Reperfüzyon Modeli

İnönü Üniversitesi Tıp Fakültesi Deney Hayvanları Etik Kurulu'nun onayı alınarak, 200-250 gr ağırlığında matür, dişi 48 wistar albino rat, rasgele altışar rattan oluşan 8 gruba bölündü. Bütün hayvanlar 20⁰ C oda ısında, standart rat yemi ve çeşme suyuyla beslendi. Ratlar intraperitoneal 75 mg/kg Ketamin HCL (Ketalar®) ve 8 mg/ kg Xylozin HCl (Pompun®) verilerek anestetize edildi. Anestezi altında ratların sağ arka ekstremitelerine trokanter majör üzerinden 3 tur dolanmak suretiyle standardize edilerek, 4 saat lastik turnike uygulandı. İskemi süresinin son 45 dakikası içinde ratlara intraperitoneal (IP) olarak CAPE, MLT ve RES verilerek, turnike sonlandırılmak suretiyle 4 saat ve 8 saat reperfüzyon uygulandı. İşlemler sonrası sağ arka ekstremiteler dezartiküle edilerek, tibialis anterior kasında biyokimyasal değişimler, gastrocnemius kası ve siyatik sinirde histopatolojik değişiklikler değerlendirildi.

Deney grupları (Tablo.1)

Grup-1 (Kontrol-1)

Altı rat anestetize edildikten sonra sağ arka ekstremiteye 4 saat turnike uygulandı ve iskeminin son 45 dakikası içinde %5'lik 0,5 cc etil alkol IP verildi. Turnike sonlandırılmak suretiyle, 4 saat reperfüzyona izin verildi.

Grup-2 (Kontrol-2)

Altı adet rat anestetize edildikten sonra sağ arka ekstremiteye 4 saat turnike uygulandı ve iskeminin son 45 dakikası içinde % 5'lik 0,5 cc etil alkol İP verilerek, 8 saat reperfüzyona izin verildi.

Grup-3 (CAPE-1)

Altı adet rat anestetize edildikten sonra sağ arka ekstremiteye 4 saat turnike uygulandı ve iskeminin son 45 dakikası içinde etil alkolde çözüldükten sonra 0.5 cc içinde 20 µM/kg CAPE (Sigma Aldrich Co.) İP olarak verildi ve 4 saat reperfüzyona izin verildi.

Grup-4 (CAPE-2)

Altı adet rat anestetize edildikten sonra sağ arka ekstremiteye 4 saat turnike uygulandı ve iskeminin son 45 dakikası içinde etil alkolde çözüldükten sonra 0.5 cc içinde 20 µM/kg CAPE, İP olarak verildi ve 8 saat reperfüzyona izin verildi.

Grup-5 (MLT-1)

Altı adet rat anestetize edildikten sonra sağ arka ekstremiteye 4 saat turnike uygulandı ve iskeminin son 45 dakikası içinde etil alkolde çözüldükten sonra 0.5 cc içinde 20 mg/kg MLT (Sigma Aldrich Co.) İP olarak verildi ve 4 saat reperfüzyona izin verildi.

Grup-6 (MLT-2)

Altı adet rat anestetize edildikten sonra sağ arka ekstremiteye 4 saat turnike uygulandı ve iskeminin son 45 dakikası içinde etil alkolde çözüldükten sonra 0.5 cc içinde 20 mg/kg MLT, İP olarak verildi ve 8 saat reperfüzyona izin verildi.

Grup-7 (RES-1)

Altı adet rat anestetize edildikten sonra sağ arka ekstremiteye 4 saat turnike uygulandı ve iskeminin son 45 dakikası içinde etil alkolde çözüldükten sonra 0,5 cc içinde 10 mg/kg RES (Sigma Aldrich Co.) İP olarak verildi ve 4 saat reperfüzyona izin verildi.

Grup-8 (RES-2)

Altı adet rat anestetize edildikten sonra sağ arka ekstremiteye 4 saat turnike uygulandı ve iskeminin son 45 dakikası içinde etil alkolde çözüldükten sonra 0,5 cc içinde 10 mg/kg RES, İP olarak verildi ve 8 saat reperfüzyona izin verildi.

Tablo.1. Deney Grupları

Grup-1	4 saat iskemi + 4 saat reperfüzyon + Etil alkol	% 5, 0,5 cc İP
Grup-2	4 saat iskemi + 8 saat reperfüzyon + Etil alkol	% 5, 0,5 cc İP
Grup-3	4 saat iskemi + 4 saat reperfüzyon + CAPE	20 µM/kg İP
Grup-4	4 saat iskemi + 8 saat reperfüzyon + CAPE	20 µM/kg İP
Grup-5	4 saat iskemi + 4 saat reperfüzyon + MELATONİN	20 mg/kg İP
Grup-6	4 saat iskemi + 8 saat reperfüzyon + MELATONİN	20 mg/kg İP
Grup-7	4 saat iskemi + 4 saat reperfüzyon + RESVERATROL	10 mg/kg İP
Grup-8	4 saat iskemi + 8 saat reperfüzyon + RESVERATROL	10 mg/kg İP

İşlemler bittikten sonra bütün ratlar 200 mg/kg thiopental, İP yüksek doz anestezile sakrifiye edildi. Sonra turnike uygulanan sağ arka baldır kaslarından tibialis anterior kası, doku XO (Ksantin oksidaz), NO (Nitrik oksit), MDA (Malondialdehit) ve GSH (Glutatyon) düzeyi araştırılmak üzere, gastroknemius kası ve siyatik sinir ise histopatolojik inceleme için çıkarıldı.

Tibialis Anterior Kasında MDA, GSH, XO ve NO Düzeylerinin Araştırılması

Yaklaşık 100 mg rat tibialis anterior kas örneği, % 1.15'lik KCl çözeltisi içinde % 10'luk homojenat oluşturacak şekilde, 1500 devir/dk. hızda 1 dakika süreyle buz çözeltisinde homojenize edildi. Ortamda bulunan MDA'nın tiyobarbitürik asit ile reaksiyona girerek, renkli bir kromojen oluşturması sağlandı. Oluşan kromojenin 535 nm'de absorbansı okunarak, MDA konsantrasyonu nmol/gr doku cinsinden tesbit edildi. Tibialis anterior kasından oluşturulan homojenatın 5,5'-ditiyobis 2-nitrobenzoik asit ile reaksiyona girmesiyle, sarı yeşilimsi renk elde edildi. Oluşan bu rengin ışık şiddeti 410 nm'de spektrofotometrede okunarak, GSH miktarı nmol/gr doku cinsinden tesbit edildi. Ortamda bulunan XO miktarı, ürik asit düzeyi ölçülerek tesbit edildi. XO enzim miktarı U/gr protein cinsinden ölçüldü. NO üretildiği bölgede önce nirite daha sonra nitrate dönüşür. Bu nedenle dokudaki total nitrit analizi doğrudan NO göstergesi olacaktır. Homojenattaki NO düzeyinin belirlenmesi için, kadmiyum granüllerinin ortamdaki nitratı, nitrite indirgemesi sağlandı. Oluşan nitrit Greiss reaktifi ile kırmızımsı bir renk meydana getirdi. Bu rengin de 548 nm'de, spektrofotometrik analizi ile dokulardaki NO tayini nmol/gr doku olarak tesbit edildi.

Gastroknemius Kası ve Siyatik Sinir Histopatolojik Analiz

Ratlar sakrifiye edildikten sonra turnike uygulanan sağ arka ekstremiteleri kalçadan dezartiküle edildi. Gastroknemius ve siyatik sinirler çıkarılarak % 10'luk formaldehit içinde 24 saat bekletildi. Gastroknemius ve siyatik sinir standart teknik kullanılarak, gastroknemius kasından 4 µm ve siyatik sinirden 2 µm parafin kesitler alındı. Kas ve sinir dokular H&E (hemotoksilen&eozi) ve mason-trikrom ile boyandı. Bütün kesitlerde İ/R yaralanmasına ait bulgular planimetrik yöntemle, ışık mikroskopunda değerlendirildi.

Kas dokusunda nötrofil infiltrasyonu 0=yok (< %5), 1=hafif (< %10), 2=orta (< %15-20) ve 3=şiddetli (< % 20-25) şeklinde skorlanarak, değerlendirildi

Kas hücrelerinde diğer histopatolojik değişikliklerle Akar ve ark., nın kriterleri modifiye edilerek değerlendirildi. Kas hücrelerinde intermiyofibriler ve intrafibriler ödem, boyut değişiklikleri, striasyon kayıpları, eritrosit ekstrasvazasyonu ve segmental nekroz değerlendirildi (111). Her değer (0)=yok, (1)=hafif, (2)=orta, (3)=şiddetli olarak belirlendi.

Siyatik sinir dokusu Nukada ve ark., larının histopatolojik değerlendirmeleri modifiye edilerek karşılaştırıldı (112). Buna göre endonöral-perinöral ödem, nötrofil infiltrasyonları ve eritrosit ekstrasvazasyonları değerlendirildi. Her değer (0)=yok, (1)=hafif, (2)=orta, (3)=şiddetli olarak belirlendi.

İstatistiksel Analiz

İstatistiksel değerlendirme için SPSS 10.01 (Statistical Package for Social Science) versiyonu kullanıldı. Bütün gruplarda biyokimyasal ve histopatolojik parametreler, grup içi dağılımı normal olduğundan, student's t testi karşılaştırıldı. Sonuçlar ortalama değer \pm standart sapma olarak ifade edildi. Karşılaştırma sonucu elde edilen p değerinin $< 0,05$ olması istatistiksel olarak anlamlı kabul edildi.

IV. BULGULAR

Turnike uygulandıktan hemen sonra ratların sağ arka ekstremitelerinde yaklaşık 5 dakika süren tetani tarzı kasılmalar oldu. İlerleyen dakikalarda siyanoz, soğukluk, ödem meydana geldi ve kapiller dolaşımın olmadığı izlendi. Dört saat iskemi sonrası turnike sonlandığında sağ arka ekstremitede kapiller dolaşım geri döndü, hiperemi, şiddetli ödem (baldır kaslarında kompartman sendromu) ve paralizi gelişti.

Biyokimyasal Değerlerin Karşılaştırılması

Grup I ve Grup II

Grup II (4 saat iskemi / 8 saat reperfüzyon)'de grup I (4 saat iskemi /4 saat reperfüzyon)'e göre MDA ve XO düzeyi istatistiksel olarak anlamlı şekilde azalmış ve GSH düzeyi anlamlı şekilde yükselmişti. NO düzeyleri bakımından her iki grup arasında istatistiksel olarak anlamlı fark yoktu.

Grup I ve grup III

Grup III (4 saat iskemi / 4 saat reperfüzyon + CAPE)'de grup I (4 saat iskemi /4 saat reperfüzyon)'e göre MDA ve XO düzeyleri anlamlı şekilde azalırken GSH düzeyleri anlamlı şekilde yükselmişti. NO düzeyleri açısından her iki grup arasında anlamlı fark bulunamadı.

Grup I ve grup V

Grup V (4 saat iskemi / 4 saat reperfüzyon + MLT)'de grup I (4 saat iskemi /4 saat reperfüzyon)'e göre MDA, XO düzeyleri anlamlı şekilde azalırken, GSH düzeyleri anlamlı şekilde yüksek bulundu. NO düzeyleri bakımından her iki grup arasında istatistiksel olarak anlamlı fark bulunamadı.

Grup I ve grup VII

Grup VII (4 saat iskemi / 4 saat reperfüzyon + RES)'de grup I (4 saat iskemi /4 saat reperfüzyon)'e göre MDA ve XO düzeyleri anlamlı şekilde azalmış ve GSH düzeyi

anlamli şekilde artmisti. NO duzeyleri bakımından heriki grup arasında anlamli fark yoktu.

Grup II ve grup IV

Grup IV (4 saat iskemi / 8 saat reperfüzyon + CAPE)'de grup II (4 saat iskemi / 8 saat reperfüzyon)'e göre MDA ve XO duzeyi istatistiksel olarak anlamli şekilde azalırken, GSH duzeyleri istatistiksel olarak anlamli şekilde yükselmişti. Heriki grupta da NO duzeyleri arasında istatistiksel olarak anlamli fark yoktu.

Grup II ve grup VI

GrupVI (4 saat sikemi / 8 saat reperfüzyon + MLT)'de grup II (4 saat iskemi / 8 saat reperfüzyon)'e göre MDA ve XO duzeyleri istatistiksel olarak anlamli şekilde azalırken, GSH duzeyleri anlamli şekilde daha yüksekti. Heriki grup NO duzeyleri arasında istatistiksel anlam yoktu.

Grup II ve grup VIII

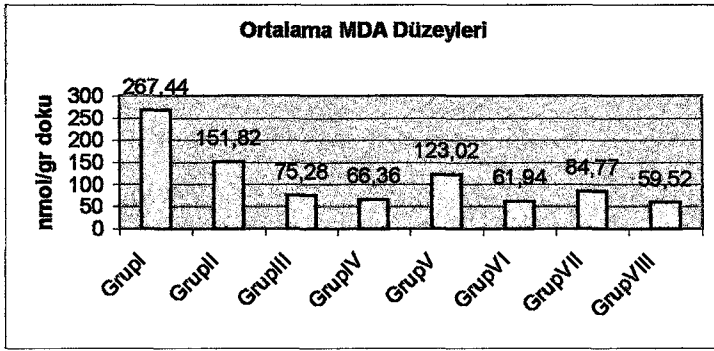
Grup VIII (4 saat iskemi / 8 saat reperfüzyon + RES)'de grup II (4 saat iskemi / 8 saat reperfüzyon)'e göre MDA ve XO duzeyleri anlamli şekilde azalırken, GSH düzeleri anlamli şekilde daha fazla yüksekti. NO duzeyleri bakımında heriki grup arasında istatistiksel olarak anlam yoktu.

Tablo.2. Biyokimyasal analizlerin grup ortalamaları ve standart sapmaları

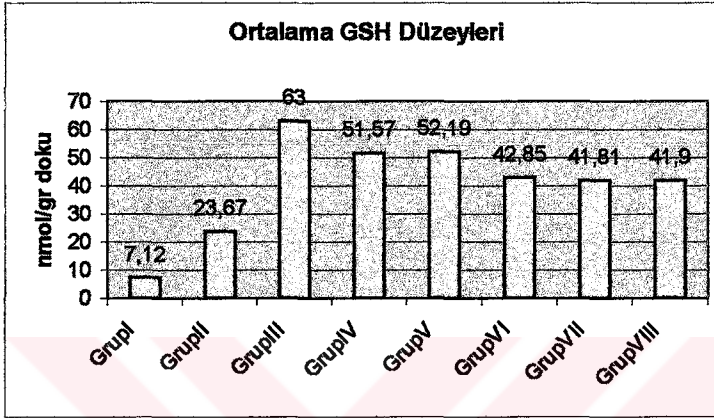
Gruplar	MDA (nmol/gr)	GSH (nmol/gr)	XO (U/gr protein)	NO (nmol/gr)
GrupI	267,44±17,94	7,12±1,80	81,03±7,18	3082,66±45,89
GrupII	151,82±9,24	23,67±1,46	57,67±1,70	3049,33±27,82
GrupIII	75,28±4,99	63,00±8,39	29,95±1,53	3012,00±15,42
GrupIV	66,36±7,43	51,57±4,25	26,77±1,75	3060,00±28,45
GrupV	123,02±1,68	52,19±4,16	28,19±1,51	3049,33±35,01
GrupVI	61,94±3,43	42,85±0,96	23,54±1,91	2997,33±16,48
GrupVII	84,77±4,73	41,81±4,89	29,89±1,78	2989,33±8,43
GrupVIII	59,52±3,13	41,90±4,50	22,70±2,93	3100,00±27,14

Tablo.3. Karşılaştırılan Grupların p Değerleri. (p < 0,005 anlamli kabul edildi)

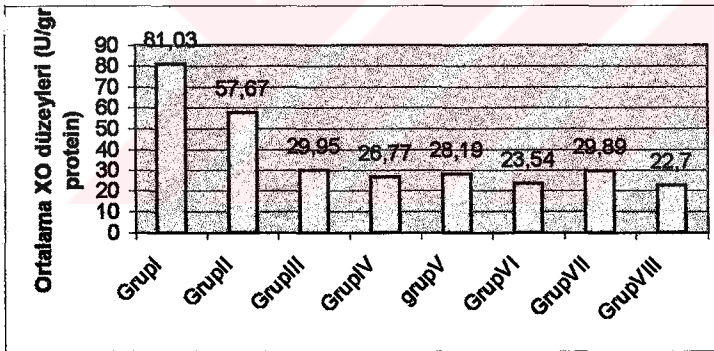
GRUP	MDA (p)	GSH (p)	XO (p)	NO (p)
I-II	0,000	0,000	0,010	0,548
I-III	0,000	0,000	0,000	0,175
I-V	0,000	0,000	0,000	0,577
I-VII	0,000	0,000	0,000	0,073
II-IV	0,000	0,000	0,000	0,794
II-VI	0,000	0,000	0,000	0,139
II-VIII	0,000	0,003	0,000	0,222



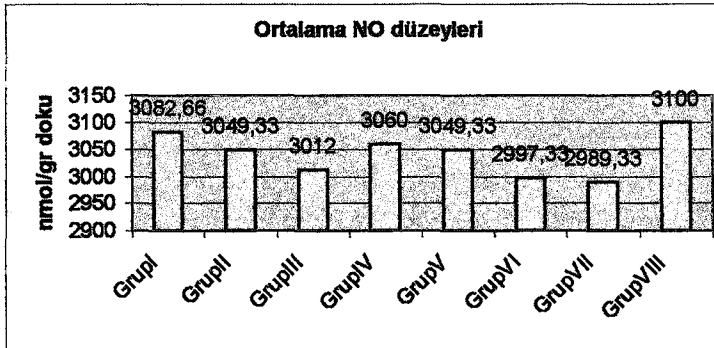
Resim.9. Ortalama MDA düzeyleri



Resim.10. Ortalama GSH düzeyi



Resim.11. Ortalama XO düzeyi



Resim.12. ortalama NO düzeyleri

Gastroknemius Kası Histopatolojik Değişikler

Grup-I ve II (kontrol)

Grup II (4 saat iskemi / 8 saat reperfüzyon)'de grup I (4 saat iskemi / 4 saat reperfüzyon)'e göre istatistiksel olarak anlamlı şekilde nötrofil infiltrasyonu ile miyofibriler ve intermiyofibriler ödem artmıştı. Boyut değişikliği, striasyon kaybı, segmental nekroz ve eritrosit ekstravazasyonu ortalama değer olarak artmıştı, ancak istatistiksel olarak anlamlı değildi.

Grup I ve grup III (CAPE)

Grup III (4 saat iskemi / 4 saat reperfüzyon + CAPE) te grup I (4 saat iskemi / 4 saat reperfüzyon)'e göre miyofibriler ve intermiyofibriler ödem, boyut değişikliği, eritrosit ekstravazasyonu, nötrofil infiltrasyonu ve segmental nekroz anlamlı şekilde azalmıştı. Striasyon kaybı ortalama olarak azalmıştı, ancak istatistiksel olarak anlamlı değildi.

Grup I ve Grup V (MLT)

Grup V (4 saat iskemi / 4 saat reperfüzyon + MLT) te grup I (4 saat iskemi / 4 saat reperfüzyon)'e göre boyut değişikliği, eritrosit ekstravazasyonu, nötrofil infiltrasyonu ve segmental nekroz anlamlı şekilde azalmıştı. Ödem ve striasyon kaybında anlamlı değişim yoktu.

Grup I ve Grup VII (RES)

Grup VII'de (4 iskemi / 4 saat reperfüzyon + resveratrol) grup I (4 saat iskemi / 4 saat reperfüzyon)'e göre ödem, boyut değişikliği, eritrosit ekstravazasyonu, nötrofil infiltrasyonu ve segmental nekroz anlamlı şekilde azalmıştı. Striasyon kaybı ortalama olarak azalmakla birlikte istatistiksel anlamı yoktu.

Grup II ve Grup IV (CAPE)

Grup IV (4 saat iskemi / 4 saat reperfüzyon + CAPE) te grup II (4 saat iskemi / 8 saat reperfüzyon)'e göre ödem, boyut değişikliği, striasyon kaybı, eritrosit ekstravazasyonu, nötrofil infiltrasyonu ve segmental nekroz anlamlı şekilde azalmıştı.

Grup II ve Grup VI (MLT)

Grup VI (4 saat iskemi / 8 saat reperfüzyon + MLT) da grup II (4 saat iskemi / 8 saat reperfüzyon)'e göre ödem, boyut değişikliği, nötrofil infiltrasyonu ve segmental nekroz anlamlı şekilde daha az bulunurken, striasyon kaybı ve eritrosit ekstravazyonunda anlamlı değişiklik yoktu.

Grup II ve grup VIII (RES)

Grup VIII'de (4 saat iskemi / 8 saat reperfüzyon + RES) grup II (4 saat iskemi / 8 saat reperfüzyon)'e göre ödem, nötrofil infiltrasyonu ve segmental nekroz anlamlı şekilde azalırken, boyut değişikliği, striasyon kaybı ve eritrosit ekstrevasyonunda ortalama olarak azalma vardı, ancak istatistiksel olarak anlamlı değildi.

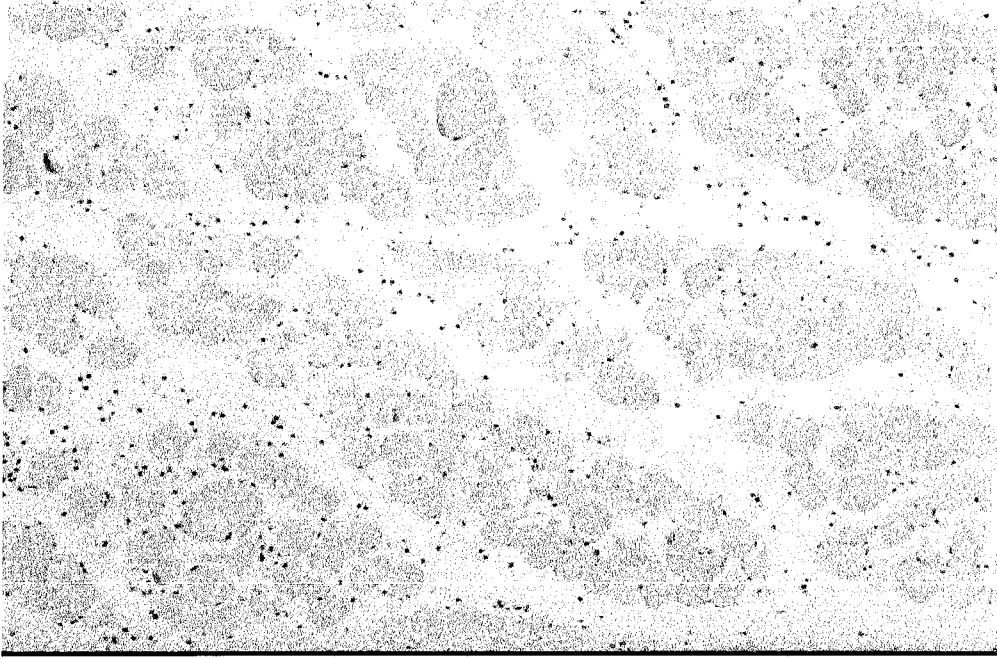
Tablo.4.Kas histopatolojik analizleri grup ortalamaları ve standart sapmaları

Gruplar	Ödem	Boyut dşk.	Striasyon kyb.	Eritrosit eks.	Nötrofil inf.	Segment nek.
I	1,66± 0,21	2±0,25	1,5±0,34	0,83±0,16	2±0,000	1,66±0,21
II	2,83±0,16	2,66±0,21	2,5±0,22	2,66±0,21	2,83±0,16	2,33±0,21
III	0,5±0,22	0,66±0,21	0,83±0,30	0,66±0,21	0,83±0,30	0,5±0,22
IV	0,66±0,21	0,83±0,16	1,16±0,16	1,33±0,21	1,5±0,22	0,66±0,21
V	0,66±0,21	0,83±0,16	1±0,000	0,83±0,16	1±,063	0,5±0,22
VI	1,33±0,21	1,5±0,21	1,5±0,34	1,33±0,21	1,5±0,22	0,83±0,16
VII	0,5±0,22	0,33±0,21	0,66±,021	0,83±0,16	1,16±0,16	0,66±0,21
VIII	1,16±0,30	1,5±0,42	2±0,36	1,66±0,21	1,5±0,22	1±0,00

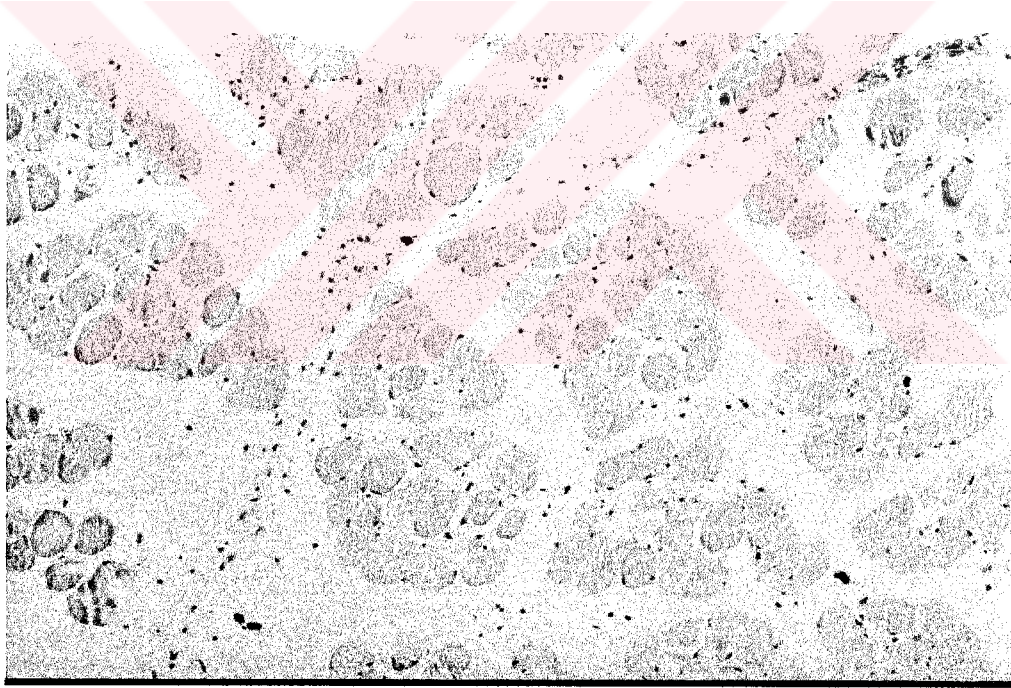
Tablo.5.Karşılaştırılan Grupların P Değerleri (P < 0,005 anlamlı kabul edildi)

Gruplar	Ödem (p)	Boyut değişikliği(p)	Striasyon kaybı(p)	Eritrosit ekstrevasyonu(p)	nötrofil infiltrasyonu(p)	Segment nekrozu(p)
I-II	0,001	0,073	0,034	0,011	0,004	0,122
I-III	0,004	0,003	0,177	0,001	0,001	0,004
I-V	0,007	0,004	0,174	0,002	0,004	0,004
I-VII	0,004	0,001	0,065	0,002	0,003	0,007
II-IV	0,000	0,000	0,001	0,001	0,001	0,002
II-VI	0,000	0,004	0,034	0,007	0,001	0,002
II-VIII	0,001	0,035	0,270	0,007	0,001	0,003

Gastroknemius Kası Histopatolojik Resimler

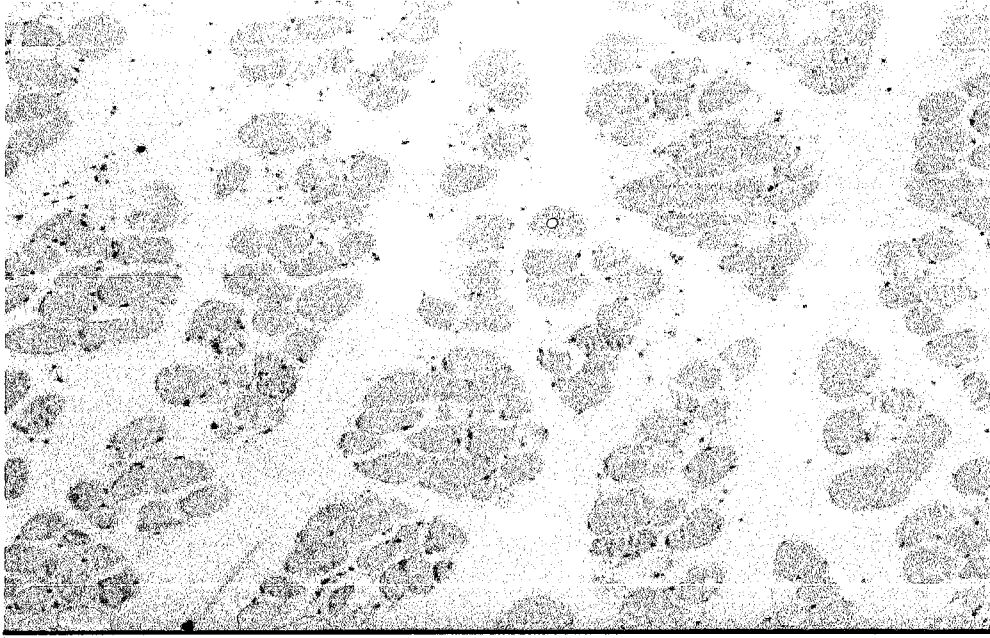


Resim.13. 4 saat iskemi / 4 saat reperfüzyon. Yoğun nötrofil infiltrasyonu, eritrosit ekstrasvazasyonu, segmental nekroz, boyut değişikliği mevcut. H&E X200

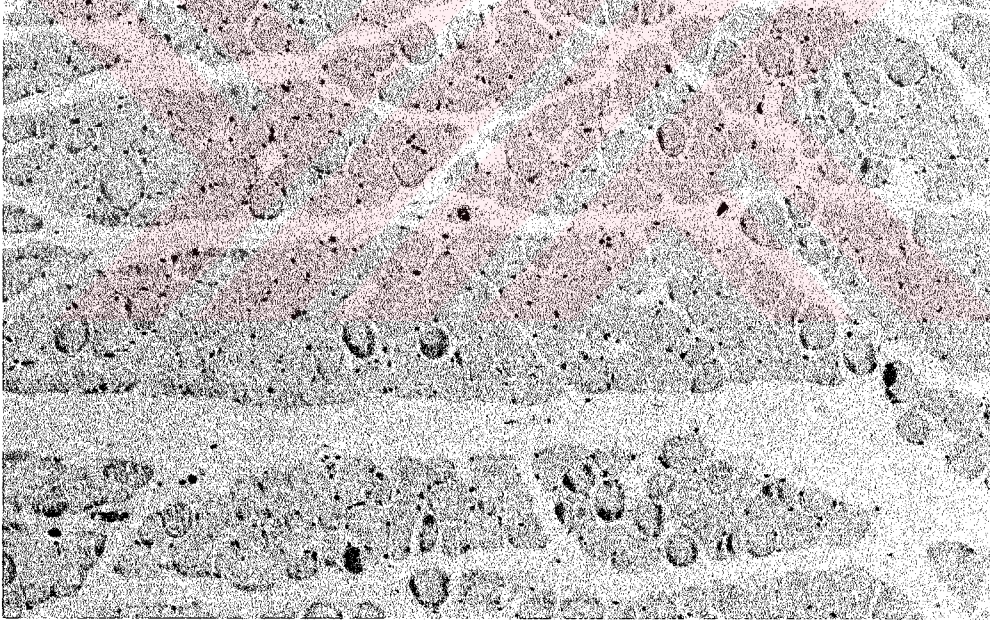


Resim.14. 4 saat iskemi / 4 saat reperfüzyon+CAPE. Nötrofil infiltrasyonu ve eritrosit ekstrasvazasyonu belirgin şekilde azalmıştır.H&E X 200

Gastroknemius Kası Histopatolojik Resimler

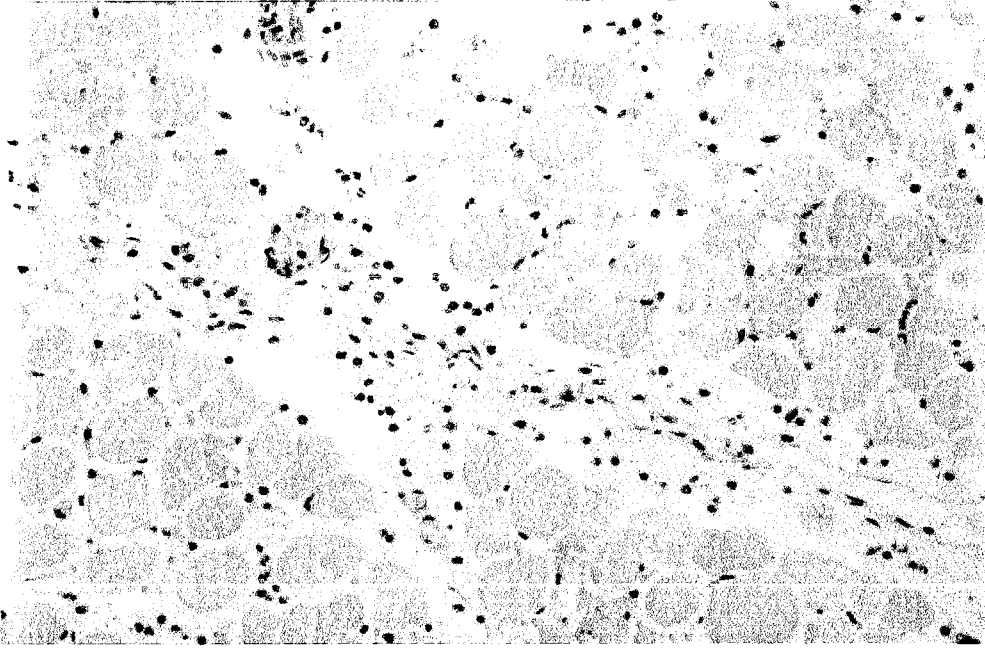


Resim.15. 4 saat iskemi / 4 saat reperfüzyon+MLT. Nötrofil infiltrasyonu, eritrosit ekstravazasyonu ve segmental nekroz belirgin şekilde azalmıştır.H&E X 200

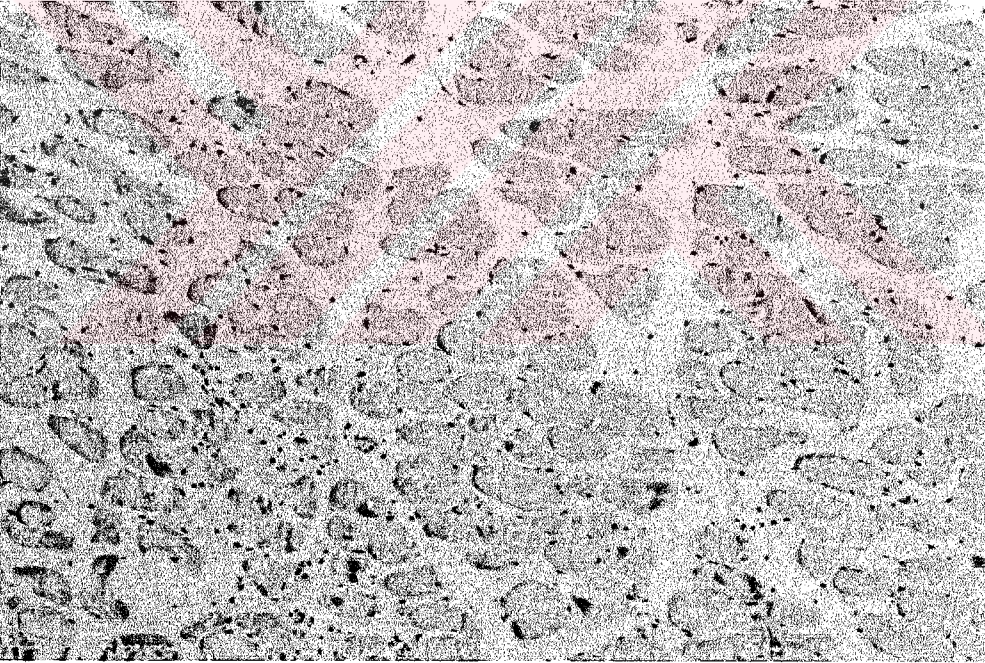


Resim.16. 4 saat iskemi / 4 saat reperfüzyon+RES. Nötrofil infiltrasyonu, eritrosit ekstravazasyonu, boyut değişikliği ve ödem azalmıştır. H&E X 200

Gastroknemius Kası Histopatolojik Resimler

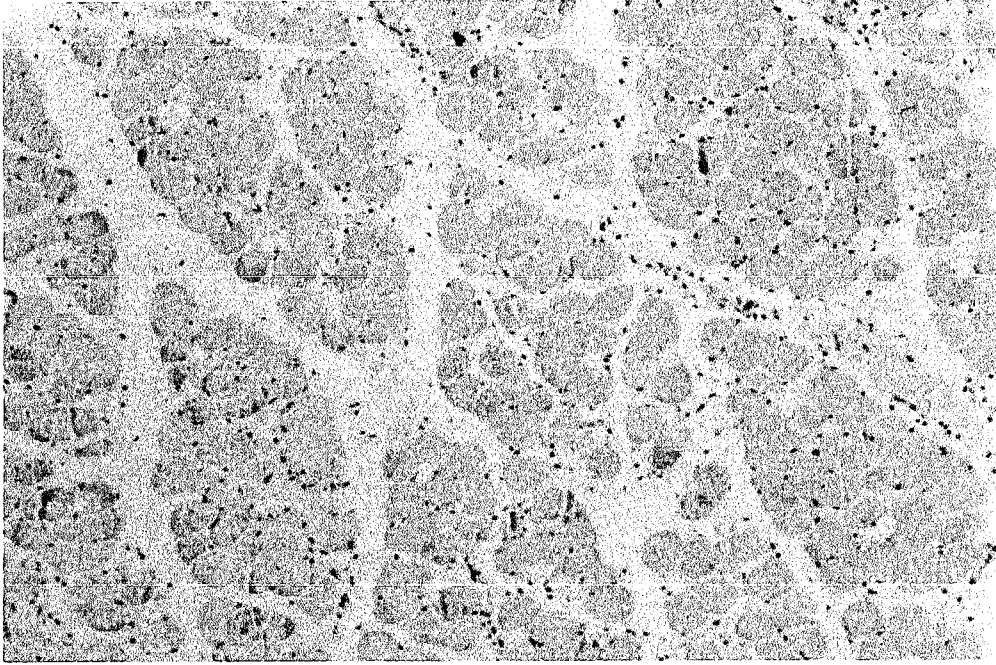


Resim.17. 4 saat iskemi / 8 saat reperfüzyon. Nötrofil infiltrasyonu, eritrosit ekstravazasyonu ve ödem belirgin şekilde artmıştır. H&E X 200

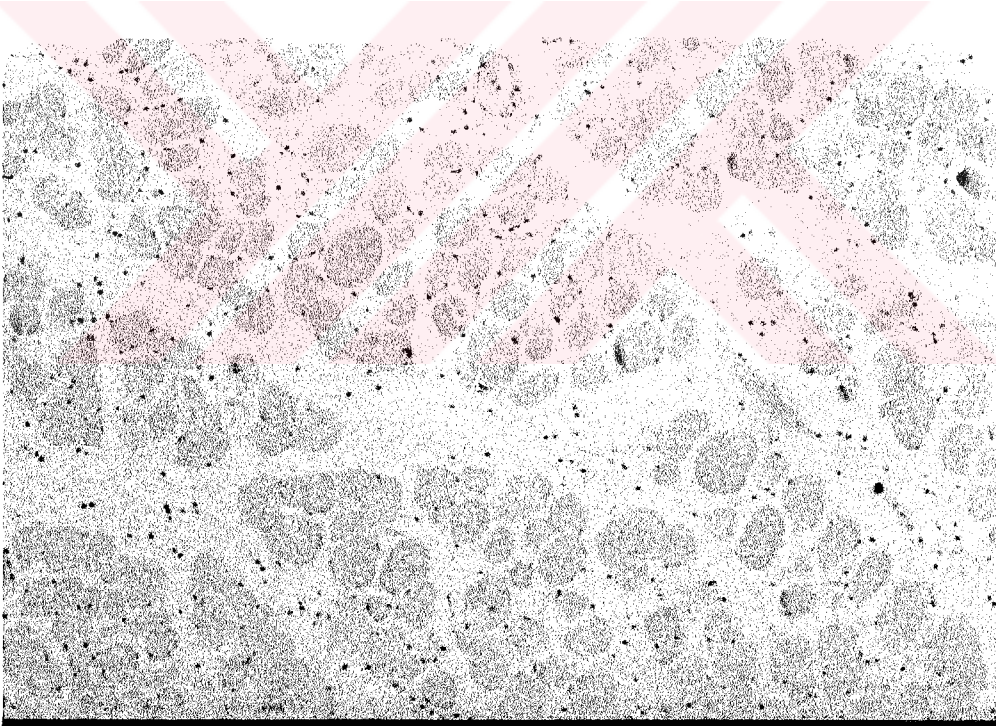


Resim.18. 4 saat iskemi / 8 saat reperfüzyon + CAPE. Nötrofil infiltrasyonu, eritrosit ekstravazasyonu ve ödem belirgin şekilde azalmıştır. H&E X 200

Gastroknemius Kası Histopatolojik Resimler



Resim.19. 4 saat iskemi / 8 saat reperfüzyon+MLT. Nötrofil infiltrasyonu, boyut değişikliği, segmental nekroz ve ödem almıştır. H&E X 200



Resim.20. 4 saat iskemi / 8 saat reperfüzyon +RES. Nötrofil infiltrasyonu, eritrosit ekstravazasyonu, segmental nekroz ve ödem azalmış. H&E X 200

Siyatik Sinirde Histopatolojik Değişiklikler

Grup I ve grup II

Her iki grupta ödem, nötrofil infiltrasyonu ve eritrosit ekstrasvazasyonu açısından anlamlı fark izlenmedi. Ortalama olarak, grup II'de ödem artmıştı.

Grup I ve Grup III

Grup III (4 saat iskemi / 4 saat reperfüzyon + CAPE)'te grup I (4 saat iskemi / 4saat reperfüzyon)'e göre ödem, nötrofil infiltrasyonu ve eritrosit ekstrasvazasyonu anlamlı şekilde azalmıştı.

Grup I ve Grup V

Grup V (4 saat iskemi / 4 saat reperfüzyon + MLT)'te grup I (4 saat iskemi / 4saat reperfüzyon)'e göre ödem, nötrofil infiltrasyonu ve eritrosit ekstrasvazasyonu anlamlı şekilde azalmıştı.

Grup I ve Grup VII

Grup VII (4 saat iskemi / 4 saat reperfüzyon + RES)'de grup I (4 saat iskemi / 4saat reperfüzyon)'e göre ödem, nötrofil infiltrasyonu ve eritrosit ekstrasvazasyonu anlamlı şekilde azalmıştı.

Grup II ve Grup IV

Grup IV (4 saat iskemi / 8 saat reperfüzyon + CAPE)'te grup II (4 saat iskemi / 4 saat reperfüzyon)'e göre ödem, nötrofil infiltrasyonu ve eritrosit ekstrasvazasyonunda anlamlı şekilde azalma bulunmuştur.

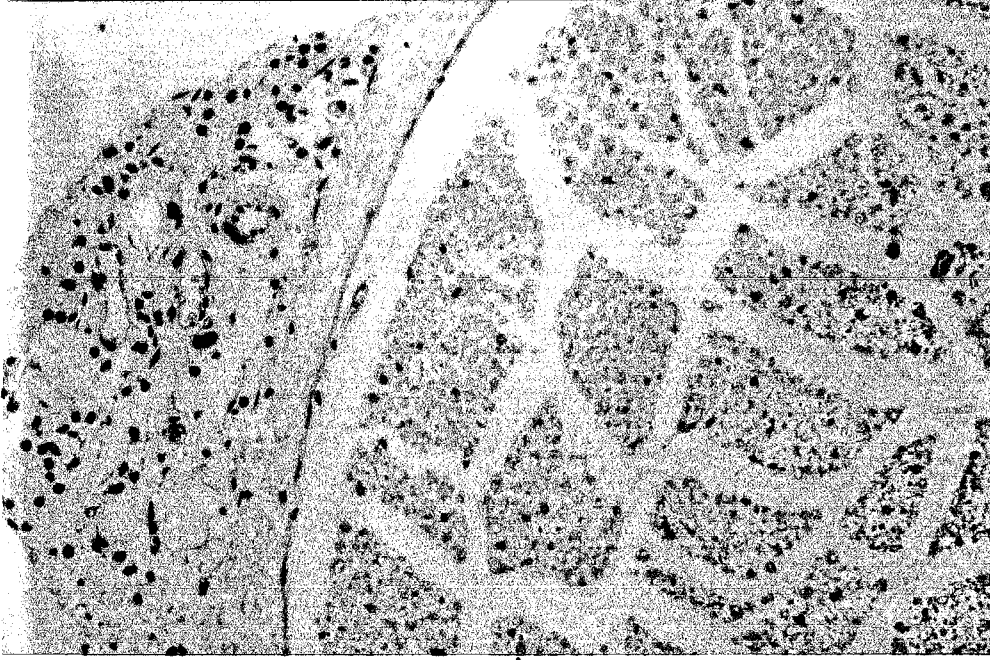
Grup II ve Grup VI

Grup VI (4 saat iskemi / 8 saat reperfüzyon + MLT)'da grup II (4 saat iskemi / 4 saat reperfüzyon)'e göre ödem, nötrofil infiltrasyonu ve eritrosit ekstrasvazasyonunda anlamlı şekilde azalma bulunmuştur.

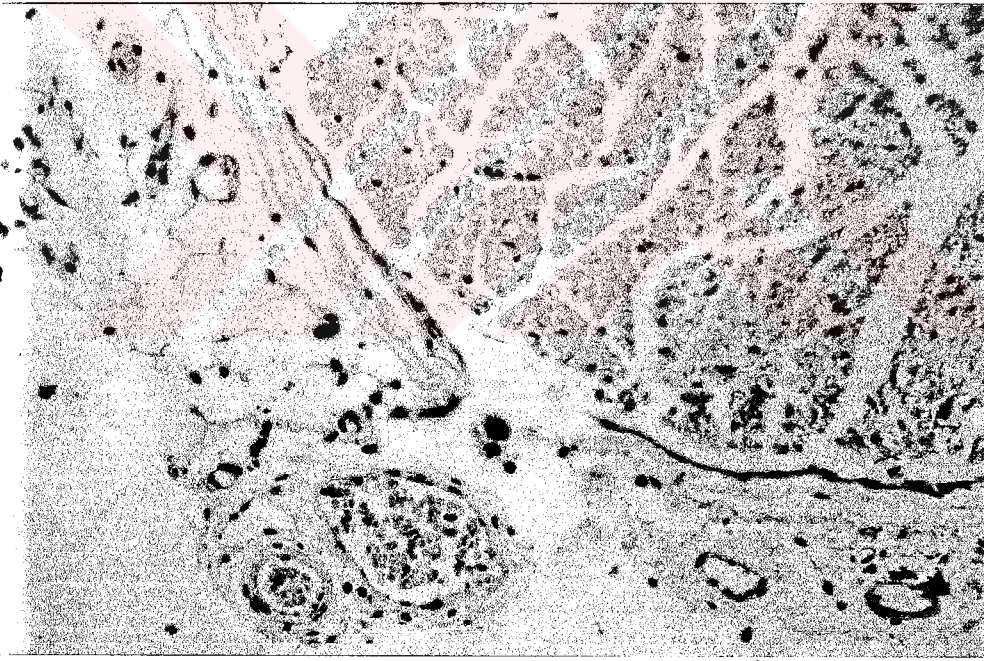
Grup II ve Grup VIII

Grup VIII (4 saat iskemi / 8 saat reperfüzyon + RES)'de grup II (4 saat iskemi / 4 saat reperfüzyon)'e göre ödem ve eritrosit ekstrasvazasyonunda istatistiksel olarak anlam azalma tesbit edilirken, nötrofil infiltrasyonu ortalama olarak azalmıştı, anca istatistiksel anlamı yoktu.

Siyatik Sinir Histopatolojik Resimler

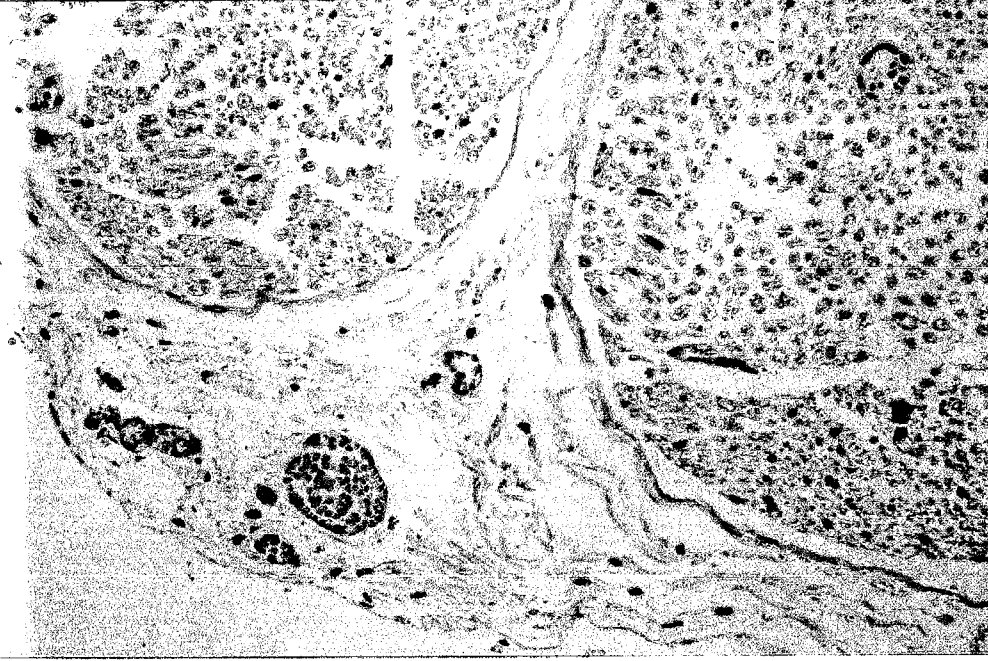


Resim.21. 4 saat iskemi / 4 saat reperfüzyon. İntramiyalik ödem artışı ve perinöral bölgede yoğun nötrofil infiltrasyonu izleniyor. H&E X 200

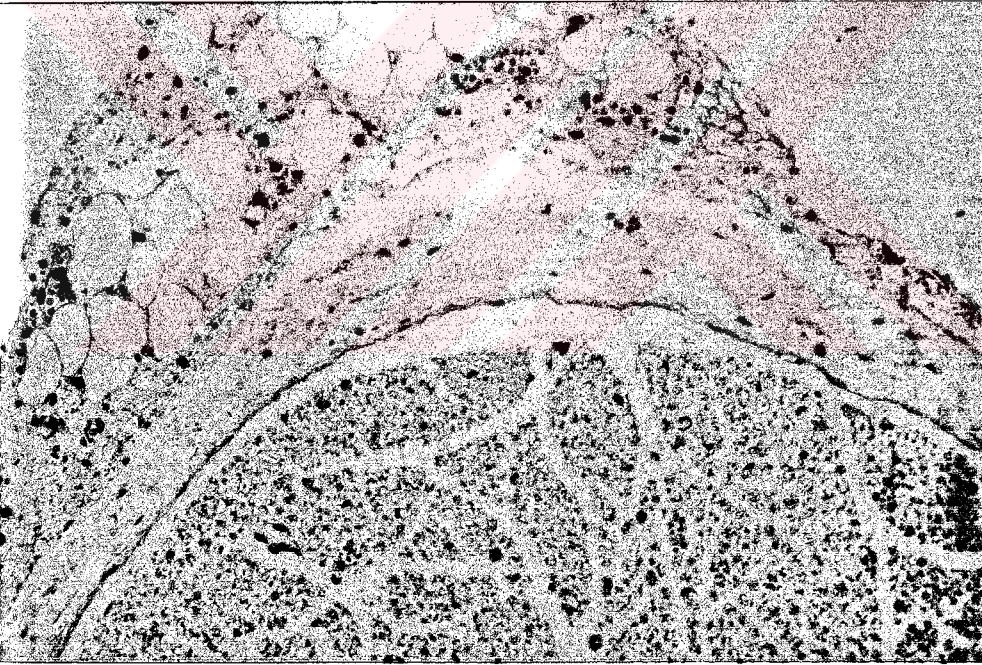


Resim.22. 4 saat iskemi/ 4 saat reperfüzyon + CAPE. Perinöral ve İntramiyelik ödem, nötrofil infiltrasyonu azalmış, eritrosit ekstravazasyonu izlenmiyor. H&E X 200

Siyatik Sinir Histopatolojik Resimler

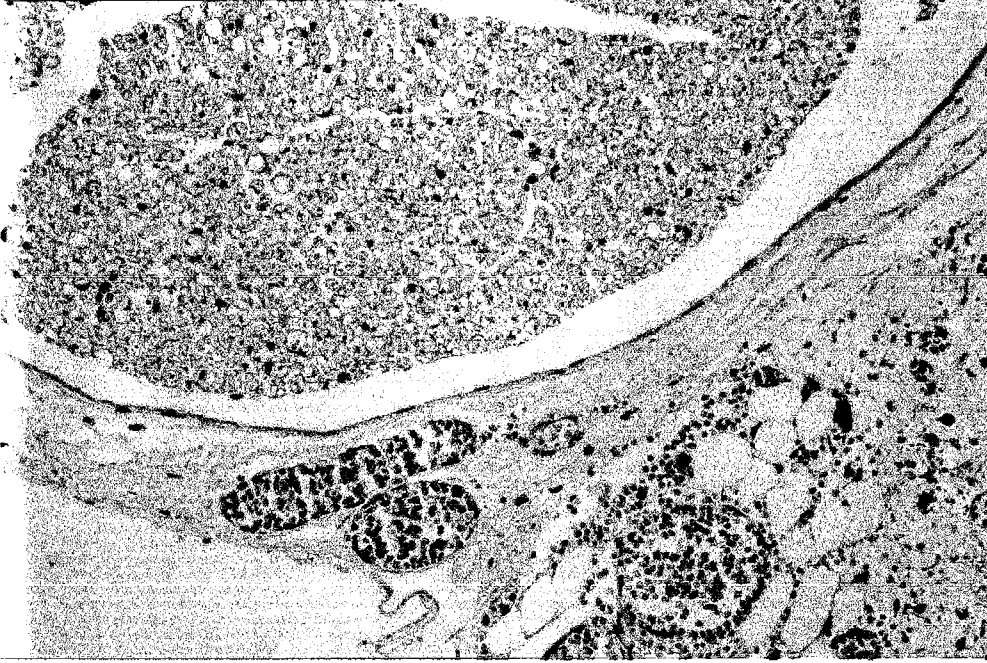


Resim.23. 4 saat iskemi / 4 saat reperfüzyon + MLT. Perinöral ve intramiyalinik ödem, eritrosit ekstravazasyonu ve nötrofil infiltrasyonu izlenmiyor. H&E X 200

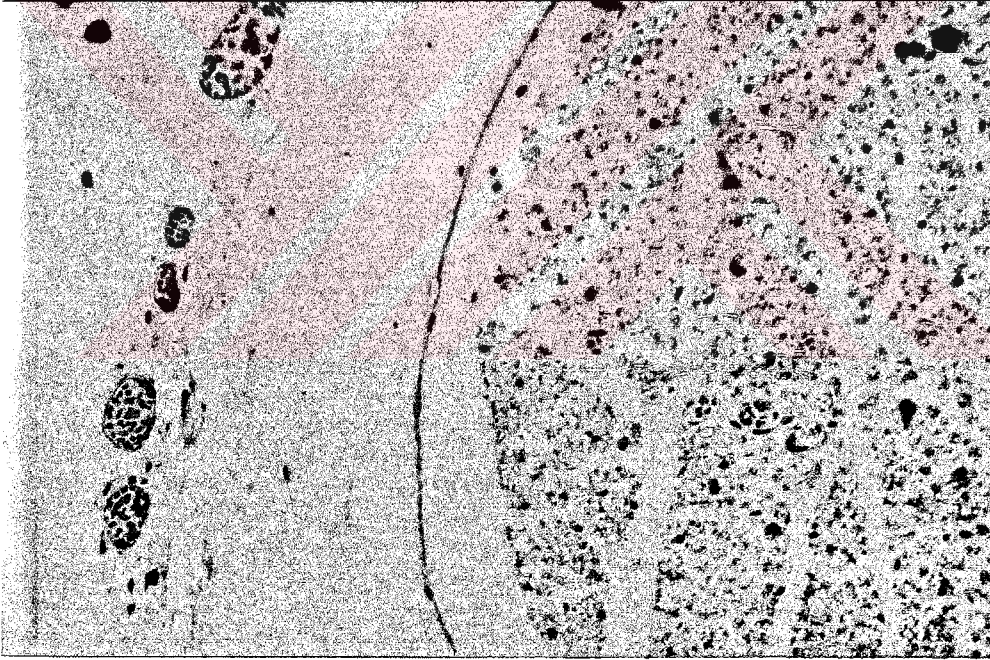


Resim.24. 4 saat iskemi / 4 saat reperfüzyon + RES. Perinöral ve intramiyalinik ödem, eritrosit ekstravazasyonu ve nötrofil infiltrasyonu azalmış. H&E X 200

Siyatik Sinir Histopatolojik Resimler



Resim.25. 4 saat sikem / 8 saat reperfüzyon. Perinöral ödem, yoğun eritrosit ekstravazasyonu ve minimal nötrofil infiltrasyonu izleniyor. H&E X 200

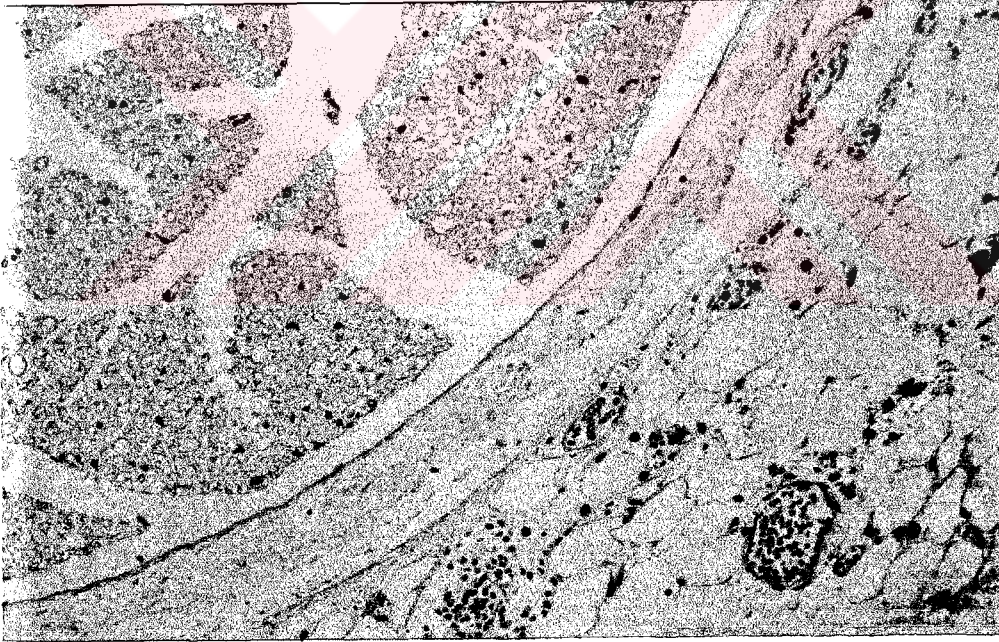


Resim.26. 4 saat iskemi / 8 saat reperfüzyon + CAPE. Perinöral bölge ve intramiyalinik bölgede ödem azalmış, eritrosit ekstravazasyonu izlenmiyor ve nötrofil infiltrasyonu izlenmiyor. H&E X 200

Siyatik Sinir Histopatolojik Resimler



Resim.27. 4 saat iskemi / 8 saat reperfüzyon + MLT. Perinöral ödem, eritrosit ekstravazasyonu ve nötrofil infiltrasyonu azalmış. H&E X 200



Resim.28. 4 saat iskemi / 8 saat reperfüzyon + RES. Perinöral ödem, eritrosit ekstravazasyonu ve nötrofil infiltrasyonu azalmış. H&E X 200

V. TARTIŞMA

Akut ekstremite iskemisini takiben ekstremitenin yeniden perfüzyonu şiddetli doku hasarı ve sistemik komplikasyonları beraberinde getirmektedir. Buna bağlı ölüm oranı %25-50, amputasyon oranı ise %15-40 olarak bildirilmiştir (113). Başarılı cerrahi teknikler ve teknolojik gelişmelere rağmen ortopedik cerrahide turnike uygulamaları, replantasyonlar, revaskülarizasyonlar ve geniş doku defektlerini kapatmak için uygulanan serbest flep sonrası İ/R yaralanması önemli bir problem olarak karşımıza çıkmaktadır.

İ/R yaralanması vücudun herhangi bir bölümünün belli bir süre iskemik kalması ve tekrar kan desteğinin restore edilmesiyle ortaya çıkan doku hasarıdır (114). Bilindiği üzere iskemik bir dokuda iskemi süresi, doku kitlesi, dokunun metabolik aktivitesi ve ortamın ısısına bağlı olarak birçok yapısal ve fonksiyonel hasar meydana gelmekte ve reperfüzyonla birlikte bu iskemik hasar daha ileri düzeye taşınmaktadır. Reperfüzyonla birlikte iskemik dokuya ulaşan oksijen molekülleri XO enzimi ve nötrofillerde bulunan MPO, NADPH oksidaz enzimleriyle hızla serbest oksijen radikallerine dönüşmektedir. Serbet radikaller hücrenin lipid, karbonhidrat, protein ve DNA gibi yapısal ve işlevsel komponentlerine zarar vermekte ve hücrenin ölümüne yol açmaktadır.

İ/R yaralanması sonucu ortaya çıkan serbest oksijen ve nitrojen radikalleri, TNF- α , IL-1 β , PAF, TX'lar gibi birçok kemotaktik, inflamatuvar sitokinlerin açığa çıkmasına yol açarak, kompleks inflamatuvar cevaba neden olurlar. İnflamasyon sürecinin erken fazında, COX, LT, PAF ve lipoksijenaz ürünleri gibi lipid kaynaklı mediyatörler salınır. Geç dönemde İSE NF- κ B bağımlı iNOS, COX-2, TNF α ve IL-1 β gibi mediyatörler, nötrofil infiltrasyonu ve H₂O₂, O₂⁻, OH• gibi nötrofil kaynaklı radikaller, diğer nötrofillerden salınan mediyatörler ortaya çıkar (115,116). MDA (Malondialdehit), TBARS (tiobarbitürik asit) linoleik asit ve linolenik asit gibi

doymamış membran lipitlerinin serbest oksijen radikalleri ile reaksiyona girmesiyle ortaya çıkan zincirleme reaksiyonun stabil son ürünleridir. İ/R yaralanması olayında serbest radikallerin artması nedeniyle membran lipit peroksidasyonu artacağından doku MDA düzeyi yükselecektir. Bu iki ürün İ/R yaralanması gibi oksidatif stres olaylarında lipit peroksidasyonu ve hücre hasarının güvenilir bir indikatörüdür (117). XO enzimi ise pürin bazlarının yıkılması sonucu ortaya çıkan hipoksantin ve ksantin, ürik asite yıkılarak atılmasında görev alan bir enzimdir. Normal koşullarda hipoksantin ve ksantin XD enzimiyle ürik asite parçalanır ve bu süreçte serbest oksijen radikali oluşmaz. XO enzimi de hipoksantin ve ksantinden bir elektron kopararak, reperfüzyonla birlikte bol miktarda gelen oksijen molekülüne transfer ederek, ürik asit oluşumunu sağlar. Bir elektron alan oksijen molekülü süperoksit radikaline dönüşür. Sonra süperoksitlerle çeşitli spontan ve enzimatik reaksiyonlar sonucu hidrojen peroksit, hidroksil radikalleri ve peroksinitrit radikalleri gibi serbest oksijen ve nitrojen radikalleri ortaya çıkar. Bu nedenle XO enzimi İ/R yaralanması olayında önemli bir serbest radikal kaynağıdır. (117). İ/R yaralanması sırasında dokunun metabolik aktivitesine, ortamın ısısına ve iskemi süresine bağlı olarak XO düzeyi yükselir.

Normal koşullarda hücrenin birçok metabolik ve katabolik aktivitelerinde birçok serbest radikaller ortaya çıkar. Ancak bu serbest radikaller CAT, SOD, GPX, glutatyon A, C ve E vitamini gibi enzimatik ve nonenzimatik antioksidan savunma sistemiyle yok edilerek, zararsız hale getirilirler. İ/R olayında okadar aşırı serbest radikal üretimi ortaya çıkar ki, bütün antioksidan savunma sistemleri iflas eder ve hücre yoğun bir oksidatif ve nitrozatif stresle karşı karşıya kalır (1). Kısaca İ/R olayında hücrenin oksidan ve antioksidan dengesi oksidanlar lehine bozulmaktadır. Bu nedenle birçok klinik ve deneysel İ/R yaralanması modellerinde CAPE, MLT ve RES gibi antiinflamatuvar, antiradikal ve antioksidan maddelerin kullanımı ağırlık kazanmıştır.

Hücrenin nonenzimatik antioksidan savunma sisteminde rol alan GSH (Glutatyon) bir enzim aracılığı olmaksızın oksidanlara doğrudan hidrojenleri transfer ederek, antioksidan etki gösterir. GSG-Px enziminin katalizine koenzim olarak katılır, İ/R yaralanması olaylarında H_2O_2 'nin suya ve oksijene yıkılmasını sağlar. GSH sitotoksik Fenton reaksiyonu ürünü hidroksil radikali, sitotoksik ürün diazot trioksit (N_2O_3) ve peroksinitrit ($ONOO^-$) ile hızlıca ve enzimatik olmayan biçimde reaksiyona girer ve onları detoksifiye eder. Endojen GSH proteinlerin tiyol gruplarını oksidasyondan korur, serbest radikaller ile direkt reaksiyona girerek, onları detoksifiye eder. Bütün bu reaksiyonlar sonucu, GSH-Px enzimiyle redükte glutatyon (GSH),

okside glutatyona (GSSH) dönüşür. GSSH, GSH-Rd (GSH redüktaz) enzimiyle NADPH varlığında tekrar GSH'a dönüştürülür. Glutasyon peroksidaz ve glutasyon redüktaz enzimiyle hücre içinde GSH/GSSH oranı sabit tutulur. İ/R yaralanmasında olduğu gibi bu dengenin bozulması hücreyi oksidatif stresle karşı karşıya bırakır (17). İ/R yaralanması sırasında GSH azalırken, GSSH miktarı artar.

NO Kan damarlarında histamin, bradikinin gibi vazoaaktif ajanlara cevap olarak endotel hücrelerinden salınan ve vazodilatasyon yaparak kan akımının düzenlenmesinde rol alan bir moleküldür. Bir vazodilatatör olarak NO doku kan akımını artırmaktadır. NO'in azaldığı durumda kapiller düzeyde vazokonstriksiyon meydana gelmektedir. NO azaldığında trombosit agregasyonu, TXA₂ (trombakasanA₂) ve PAF (platelet aktive edici faktör) salınımı, nötrofillerin endotele tutunmasını sağlayan hücresel adezyon molekülleri artar. Ayrıca NO nötrofillerin kemotaksis, adezyon ve aktivasyonunun internal inhibitörüdür. İ/R yaralanmasında NO yararı ve zararı konusunda tartışmalı bir moleküldür. Bazı kaynaklarda NO'in iskemik dokuda kan akımını artırarak, yararlı olduğu savunulurken, bazı kaynaklarda NO'in serbest oksijen radikalleriyle reaksiyona girerek nitrojen kaynaklı sitotoksik peroksinitrit radikallerine dönüştüğü ve hücresel hasarı indüklediği savunulmaktadır (101,118)

Gerçekten NO damar düz kasına sahip arteriollerde ve kapiller sistemde vazodilatasyon yaparak dolaşımı güçlendirmektedir. Ancak damar düz kası olmayan ve İ/R yaralanmasının birincil hedefi postkapiller venüllerde vazodilatasyondan ziyade nitrojen kaynaklı radikallere dönüşerek, hücre hasarını arttırmaktadır. Ancak NO seviyesi İ/R sonrası dokularda azalma eğilimindedir. Dokularda NO seviyesinin nasıl düştüğü tam olarak bilinmiyor. İR süresince NO substratı L-arjinin bitiyor olabilir. Ya da L-arjinin transporting sistem, Na bağımlı olduğu için ATP yetersizliği nedeniyle inaktive olabilir. Ortamda bulunan serbest radikaller endotele zarar verip NO sentezini bozuyor veya NO'ü inaktive ediyor olabilir. NO biyolojik sistemde NOS enzimi tarafından argininden sentezlenen bir serbest radikaldir. Geniş biyolojik yararlarının yanı sıra oksijen, süperoksit ve diğer oksijen kaynaklı serbest radikallerle, Fe ve Cu gibi geçiş metalleriyle, proteinlerin tiol gruplarıyla reaksiyona girme eğilimindedir. Süperoksitlerle reaksiyona girip, peroksinitrit radikallerini oluşturur. Peroksinitrit radikalleri ise nitrojen dioksit (NO₂) ve hidroksil radikallerine yıkılır. Peroksinitrit ve diğer metabolitleri lipid peroksidasyonu, bazı moleküllerin nitrozilasyonu ve demir, bakır gibi redoks potansiyeli olan metallere reaksiyonu vs. olaylarla hücresel hasar oluşmasına neden olur.

Appel ve ark., sıçanlarda arka ekstremiteye turnike uygulayarak oluşturdukları İ/R modelinde 90 dk iskemi ve 60 dk reperfüzyon sonrası soleus kasında ödem oluşumunun arttığını, GSH düzeyinin azaldığını ve XO düzeyinin yükseldiğini göstermişlerdir (119). Saba ve ark., ratların sağ arka ekstremitelerine turnike uygulayarak oluşturdukları İ/R modelinde soleus kasında lipt peroksidasyon indikatörü MDA ve oksidan enzimlerin (NADPH oksidaz, MPO, XO) düzeyinin plasebo grubuna göre anlamlı şekilde yükseldiğini göstermişlerdir (120). Ayrıca Hardy ve Gough'un çalışmasında iskemi döneminde vazokonstriksiyon olduğu ve NO fonksiyonlarının serbest oksijen radikalleri tarafından inhibe olduğu gösterilmiştir (121). Lijun ve ark., ratlarda common iliak arteri klempleyerek, oluşturdukları ekstremita İ/R modelinde 6 saat iskemi sonrası 3, 12 ve 24 saat reperfüzyon uygulamışlar. Reperfüzyon süresi uzadıkça tibialis anterior kasında NO düzeyinin azaldığını, en düşük düzeye ise 12 saat reperfüzyon sonrası ulaştığını tesbit etmişlerdir. Reperfüzyon sonrası 6. saatte kas dokusunda miyofibriler ve intermyofibriler ödem, kapiller damarlarda tıkanma ve lökosit infiltrasyonu izlemişlerdir. En fazla doku hasarının 12. saate meydana geldiğini göstermişlerdir. Bu çalışmada serbest radikallerin endotel hücrelerine zarar vererek, NO üretimini baskıladı ve NOS enziminin inaktive ettiği öne sürülmüştür (122).

Akar ve ark., tavşanların sağ arka ekstremitesine 4 saat iskemi ve 2 saat reperfüzyon olacak şekilde, turnike uygulayarak oluşturdukları İ/R modelinde soleus kasında segmental nekroz, striasyon kaybı, çekirdek santralizasyonu, boyut değişikliği meydana geldiğini göstermişlerdir (111). Köksal ve ark., ratlarda sol iliak arteri klempleyerek, oluşturdukları İ/R modelinde 4 saat iskemi ve 1 saat reperfüzyon uygulamışlar. Bu çalışmada gastroknemiusta yapılan histopatolojik incelemede yoğun nötrofil infiltrasyonu meydana geldiğini bildirmişlerdir. Ayrıca İ/R grubunda lipt peroksidasyon göstergesi TBARS (tiobarbitürik asit reaktif substans) düzeyinin yükseldiğini göstermişlerdir (123). Biz İ/R modelimizde ışık mikroskopu ile gastroknemius kasında ödem, boyut değişikliği, striasyon kaybı, segmental nekroz, eritrosit ekstravazasyonu ve nötrofil infiltrasyonu meydana geldiğini tesbit ettik.

Saray ve ark., ratlarda İ/R yaralanması modellerinde siyatik sinirde endonöral ödem, aksonal şişme ve dejenerasyon gözlemlemişlerdir. Histopatolojik bulguların üniform olmadığını ve reperfüzyonla arttığını, miyelin kılıfta düzensizlik, lameller cisimcikler ve demiyelinizasyon meydana geldiğini bildirmişlerdir. Akut iskemi sinir gövdesinde iskemi süresiyle ilişkili olarak, tromboz, endotelial şişme, endonöral ödem, vasanervorumlarda granulosit tıkaçları ve mikrosirkülasyonun durmasına kadar varan

sonuçlara yol açar. Uzayan iskemiyle birlikte akımsızlık fenomeni ve axonal büzüşme, dejenerasyon ortaya çıkar (124). Bizim iskemi-reperfüzyon modelimizde teknik yetersizlik nedeniyle aksonal büzüşme ve dejenarasyonu gözlemleyemedik. Ancak siyatik sinir dokusunda, ışık mikroskopu ile perinöral dokuda nötrofil infiltrasyonu, eritrosit ekstrasvazasyonu ve ödemi gözleyebildik.

Bizim çalışmamızda 4 saat iskemi, 4 saat reperfüzyon ve 4 saat iskemi, 8 saat reperfüzyon karşılaştırıldığında MDA düzeyi 8 saatlik reperfüzyonda anlamlı şekilde azalmış, GSH düzeyi yükselmişti. XOve NO düzeylerinde anlamlı değişiklikler oluşmamıştı. Ancak XO düzeyi ortalama olarak azalmıştı. Lijun ve ark. çalışmasından anlaşıldığına göre, reperfüzyon süresi ilerledikçe doku hasarı, tamir sürecine ulaşıncaya kadar artmakta, daha sonra azalmaktadır. Ayrıca reperfüzyonun ilk dönemlerinde biyokimyasal değişiklikler ön planda iken, daha sonra nekroz ve nötrofil infiltrasyonu gibi histopatolojik değişiklikler ortaya çıkmaktadır. Bizim çalışmamızda reperfüzyon süresinin artmasıyla MDA, XO düzeyinin azalması ve GSH düzeyinin artması, doku nekrozu ve fagositoz sonucu ortamda hasar gören canlı hücre miktarının azaldığını, mevcut canlı hücrelerin ise progresif olarak oksidan-antioksidan dengesini tekrar kazadığını gösterebilir. Bu nedenle reperfüzyon süresinin uzamasıyla hücrelerde GSH düzeyi restore edilmiş olabilir. İskemik dokuda oluşan XO reperfüzyonla birlikte sistemik dolaşıma geçmekte ve reperfüzyon süresinin uzamasıyla birlikte dokularda XD enziminin, XO'a dönüşümü azalıyor veya mevcut XO yıkılıyor olabilir.

I/R yaralanması sürecinde endotel hücrelerinin fonksiyonlarını kaybetmesi ve ortamdaki NO'in serbest radikallere dönüşmesi nedeniyle NO düzeyi azalır. Bizim plasebo grubumuz olmadığından kas dokusunda gerçek NO düzeyini değerlendiremedik. Ancak 4 saat ve 8 saat reperfüzyon süresinde tibialis anterior kasında NO düzeyleri değişmemişti. Lijun'un çalışmasında olduğu gibi reperfüzyon süresinin artmasıyla birlikte dokularda NO düzeyinin azalmasını bekleriz. Bizim çalışmamızda reperfüzyon süresinin uzamasıyla doku NO düzeyi ortalama olarak azalmıştı, ancak istatistiksel olarak anlamlı bulunmadı.

Gastroknemius kasında reperfüzyon süresinin uzamasıyla birlikte ödem formasyonu istatistiksel olarak anlamlı şekilde artmış, boyut değişikliği, striasyon kaybı, eritrosit ekstrasvazasyonu ve nötrofil infiltrasyonu ortalama olarak artmış, ancak istatistiksel olarak anlamlı değildi. Bilindiği üzere reperfüzyon süresi uzadıkça dokular tamir sürecine ulaşıncaya kadar doku hasarı ilerler, histopatolojik ve morfolojik değişiklikler belirginleşir. Bu nedenle bizim çalışmamızda reperfüzyon süresi uzadıkça

histopatolojik değişikler artmıştır. Siyatik sinirde ise reperfüzyon süresinin uzamasıyla birlikte histopatolojik olarak, ödem, eritrosit ekstravazasyonu ve nötrofil infiltrasyonu değişmemiştir. Bilindiği üzere sinir dokusunun metabolik aktivitesi yavaş oduğundan 8 saat iskemiye tolere edebilir. Bizim iskemi süremiz 4 saat olduğundan, siyatik sinirde fazla hasar meydana gelmediğini ve reperfüzyon süresinin mevcut hasarı arttırmadığını düşünürüz.

Natarajan ve ark., *in vitro* yaptıkları bir çalışmada CAPE'nin TNF- α 'ın aktive ettiği NF- κ B'i doz ve zamana bağlı olarak spesifik ve geri dönüşümlü şekilde inhibe ettiğini göstermişlerdir (20). Gürel ve arkadaşları ratlarda oluşturdukları böbrek İ/R yaralanması modelinde CAPE kullandıkları grupta böbrek dokusunda kontrol grubuna göre daha az nötrofil infiltrasyonu meydana geldiğini gözlemlemişlerdir. Böbrek dokusunda nötrofil infiltrasyonunun belirgin şekilde azalmasını CAPE'nin İ/R yaralanmasıyla aktive olan NF- κ B'nin inhibisyonuyla açıklamışlardır (33). Bilindiği üzere TNF α ve IL-1 β gibi birçok inflamatuvar, kemotaktik mediyatörün, proteazların, COX-2, iNOS ve adezyon moleküllerinin genetik ekspresyonunda NF- κ B anahtar rol oynamaktadır. İ/R olayında NF- κ B aktivasyonu sonucu nötrofil ve endotel hücre yüzeylerinde CD11/CD18, E-selektin, p-selektin, ICAM-I ve ICAM-II gibi adezyon molekülleri oluşmaktadır. Adezyon molekülleri yardımıyla nötrofiller endotel hücrelerinde tutunmakta ve dokuya infiltre olmaktadır. CAPE'nin lipit peroksidasyonunu inhibe ettiği, serbest radikalleri temizlediği ve NO sentezini stümile ettiği bildirilmiştir. Bu şekilde CAPE, İ/R olayında NF- κ B inhibisyonu üzerinden inflamasyonu ve nötrofil infiltrasyonunu önlemekte, süperoksit, hidrojen peroksit ve hidroksil radikallerinin yol açtığı membran lipit peroksidasyonunu, majör serbest radikal kaynağı ksantin oksidaz enzimini inhibe etmekte ve serbest radikalleri temizlemektedir (27,30).

Rossi ve ark., *in vitro* çalışmalarında CAPE'nin makrofajlarda, araşidonik asit metabolizmasını COX-1 ve COX-2 enzimlerini inhibe ederek önlediğini göstermişlerdir (125). CAPE'in lipooksijenaz enzimini inhibe ederek de antioksidan ve antiinflamatuvar özelliği tesbit edilmiştir. Araşidonik asitin lipooksijenaz yoluyla yıkılması sonucu ortaya çıkan ürünlerin inflamasyon gelişiminde önemli roller aldığı biliniyor. Böylece CAPE lipooksijenaz, COX-1 ve COX-2 inhibisyonu üzerinden inflamasyonu sınırlayarak, inflamatuvar ve kemotaktik PG'ler, LT'ler ve TX'ların sentezini engeller (126). Bu şekilde CAPE hem NF- κ B inhibisyonu yaparak hem de araşidonik metabolizmasını önleyerek, antiinflamatuvar özelliğe sahiptir.

CAPE aktive olan inflamatuvar hücrelerde apoptozisi başlatır, böylece inflamasyon bölgesinde nötrofillerin doku hasarı oluşturmasını önler. Ratlarda oluşturulan subkutan inflamasyon modellerinde lokal CAPE verilmesiyle inflamasyon bölgesinde lökosit apoptozisi artmış ve eksuda içinde lökosit, monosit ve nötrofil konsantrasyonu azalmıştır (34).

İlhan ve ark., ratlarda oluşturdukları spinal kord iskemii-reperfüzyon modelinde CAPE kullandıkları grupta spinal dokuda, nötrofil infiltrasyonunun ve MDA düzeyinin anlamlı şekilde azaldığını gözlemlemişlerdir. Bu çalışmada CAPE'nin antioksidan ve antiinflamatuvar özelliği ile serbest radikalleri temizlediği, nötrofil infiltrasyonu ve lipit peroksidasyonunu önlediği, böylece spinal kord İ/R yaralanmasına karşı koruduğu sonucuna varmışlardır (127).

Sud'ina ve arkadaşları in vitro deneysel çalışmalarında antioksidan, antiinflamatuvar özelliğiyle CAPE'nin 10µMol konsantrasyonunda ksantin/ksantin oksidaz enzim sistemini ve insan nötrofillerinde reaktif oksijen türevleri üretimini tamamen bloke ettiğini, lipit peroksidasyonunu önlediğini bildirmişlerdir (28).

Başka bir çalışmada Irmak ve ark., beyin İ/R modelinde CAPE'in NO düzeyini azaltarak, doku hasarını önlediğini bildirmişlerdir (128). Literatürde CAPE'nin iskemik dokuda NO düzeyini nasıl etkilediği konusunda otörler arasında bir konsensus oluşmamıştır.

Özen ve ark., cisplatinle renal toksisite oluşturdukları oksidatif stres modelinde CAPE'nin NO düzeyini ve lipit peroksidasyon göstergesi MDA düzeyini azalttığını göstermişlerdir. Ayrıca çalışmalarında CAPE'nin cisplatin tarafından oluşturulan renal hasar sonucu aktive olan NF-κB'yi de inhibe ettiğini ve histopatolojik araştırmada doku hasarını azalttığını göstermişlerdir (129). Koltuksuz ve ark., ratlarda testis torsiyonuyla oluşturdukları İ/R modelinde sadece torsiyon yapıp, sakrifiye edilen grupta NO düzeyinin plasebo grubuna göre yükseldiğini, torsiyon/detorsiyon grubunda belirgin olarak azaldığını, CAPE verilen grupta ise NO düzeyinin tekrar plasebo grubundaki NO düzeyine yükseldiğini tesbit etmişlerdir. Bu çalışmada CAPE'nin NO düzeyini normal normal doku düzeyine yükselttiği bildirmişler ve CAPE'nin İ/R yaralanması sırasında NO düzeyini nasıl yükselttiği tam olarak açıklayamamışlardır (130).

Zhang ve ark. spesifik rat kremaster kasında İ/R modelinde iNOS inhibitörü 1400W kullanmışlardır. İ/R olayında NF-κB aktivasyonu ile iNOS sentezi artarak, ortamda NO düzeyinin yükseldiğini ve NO'nun ise serbest oksijen radikalleriyle

reaksiyona girip, peroksinitrit gibi nitrojen kaynaklı radikallerin oluşturduğunu göstermişlerdir. Böylece kas dokusu ve periferik sinirde doku hasarının agra ve olduğunu belirtmişlerdir. iNOS spesifik inhibitörü 1400W alan grupta kontrol grubuna göre ödemin, kas nekrozunun ve nötrofil infiltrasyonunun azaldığını, kan akımının restore edildiğini göstermişlerdir (131).

Russo ve ark., invitro çalışmalarında CAPE'nin XO enzim aktivitesini inhibe ederek, süperoksit radikalleri oluşumunu engellediğini göstermişlerdir. Ayrıca çalışmalarında CAPE lipit peroksidasyonunu önlemiş, süperoksit ve hidroksil radikallerini temizlemiştir (27).

Elmalı ve ark., nın tavaşanlarda oluşturdukları deneysel osteoartrit modelinde histopatolojik olarak CAPE verilen grupta kontrol grubuna göre kırıldak harabiyeti, sinovyal enflamasyon ve inflamatuvar hücre infiltrasyonu anlamlı şekilde azalmıştı. Bu çalışmada CAPE'nin NF-κB'yi inhibe ederek, osteoartrit patogenezinde suçlanan TNF-α ve İL-1β gibi sitokinlerin ekspresyonunu önlediği ve bu şekilde osteoartrit gelişimin azalttığı ileri sürülmüştür (26).

Bizim İ/R çalışmamızda CAPE verilen gruplarda tibialis anterior kası XO düzeyi anlamlı şekilde azalmıştı. Literatürde belirtildiği gibi CAPE antioksidan etkisiyle İR yaralanması sırasında serbest radikalleri temizleyerek ve membran lipit peroksidasyonunu doğrudan önleyerek, hücre içi Ca düzeyini azaltabilir. Bu şekilde hücre içi Ca artışıyla aktive olan Calpein gibi proteazların XO'ya dönüştürmesini engelleyebilir. Ayrıca XO aktivitesini inhibe ederek de XO miktarını azaltmış olabilir. Ayrıca İ/R sırasında ortaya çıkan serbest radikalleri temizleyerek, lipit peroksidasyonu engelleyerek veya lipit peroksidasyonunu doğrudan baskılayarak, tibialis anterior kasında lipit peroksidasyon indikatörü doku MDA düzeyini azaltmış olabilir.

Bilindiği üzere İ/R olayında GSH düzeyi yoğun oksidatif stres nedeniyle azalırken, okside GSH (GSSH) düzeyi yükselir. Bizim çalışmamızda tibialis anterior kasında kontrol grubunda doku GSH düzeyi azalmıştı, CAPE verilen grupta ise GSH düzeyi anlamlı şekilde artmıştı. CAPE antioksidan özelliğiyle serbest oksijen, nitrojen radikalleri ve lipit peroksidasyonunu temizleyerek, hücrenin endojen antioksidan savunma sistemi GSH' un okside olmasını sağlayarak, tükenmesini önlemiş olabilir. Hücre içi GSH düzeyi korunduğunda proteinlerin tiol grupları da oksidasyona karşı korunacağından, XO enziminin XO'ya dönüşümü de engellenecektir.

Bazı çalışmalarda İ/R yaralanması sırasında, NF-κB aktivasyonuna bağlı olarak indüklenen iNOS senteziyle doku NO düzeyinin yükseldiği ve bu şekilde

iskemik bölgede NO'nin süperoksitlerle reaksiyona girip, peroksinitrit radikalleri oluşturduğu bildirilmiştir. Peroksinitrit radikallerinin ise doku hasarı meydana getirdiği iddia edilmiştir. Bazı çalışmalarda ise endotel hücre hasarı nedeniyle iskemik dokularda NO düzeyinin azaldığı, bu şekilde vasküler yatakta vazokonstrüksiyon meydana geldiği ve doku hasarının arttığı iddia edilmiş, NO düzeyinin yükseltilmesiyle vazodilatasyon sağlanarak doku hasarının azaltılabileceği bildirilmiştir. Buradan da anlaşıldığı gibi İ/R yaralanmasında NO'nin yararı veya zararı konusunda otörler arasında bir konsensus yoktur. Kimi çalışmalarda İ/R yaralanması sırasında CAPE'nin doku NO düzeyini yükselttiği ve bu şekilde doku hasarını önlediği iddia edilmiştir. Kimi çalışmalarda ise CAPE'nin İ/R yaralanması sırasında NO düzeyini azalttığı ve bu şekilde peroksinitrit radikallerinin oluşumunu engelleyerek, doku hasarını azalttığı bildirilmiştir. CAPE, NF-κB inhibisyonu ile iNOS sentezini önler. Biz CAPE'nin bu şekilde aşırı NO üretimini baskıladığını, nitrojen kaynaklı serbest radikallerin oluşumunu engelleyerek, doku hasarını önlediğini düşünüyoruz. CAPE NF-κB inhibisyonuyla iNOS sentezini baskımlarken, eNOS ve nNOS aktivitesini indükleyebilir ve bu şekilde NO düzeyini normal doku düzeyine yükseltiyor olabilir. Bizim çalışmamızda CAPE verilen grupla kontrol grubuna göre NO düzeyi ortalama olarak azalmıştı, ancak istatistiksel olarak anlamlı değildi. Burada CAPE iNOS sentezini önleyerek, eNOS ve nNOS aktivitesini arttırarak kontrollu şekilde NO düzeyinin optimal doku düzeyinde kalmasını sağlamış olabilir. Bizim normal dokuda NO düzeyini değerlendirecek plasebo grubumuz olmadığında bu çalışmada CAPE'nin NO düzeyini nasıl etkilediğini tesbit edemedik. Ancak biz CAPE'in İ/R yaralanması sırasında NO düzeyini azaltma eğiliminde olduğunu düşünüyoruz.

Histopatolojik olarak gastrokneimis kasında CAPE verilen gruplarda ödem, boyut değışikliği, segmental nekroz, eritrosit ekstravazasyonu ve nötrofil infiltrasyonu anlamlı şekilde azalmıştı. CAPE NF-κB inhibisyonu yaparak, endotel ve nötrofiller üzerinde adezyon moleköl ekspresyonunu ve TNFα ve IL-1β gib inflamatuvar, kemotaktik sitokinlerin transkripsiyonunu inhibe ederek nötrofil infiltrasyonunu azaltmış olabilir. CAPE aktive olan inflamatuvar hücrelerde apoptozu başlatarak da nötrofil infiltrasyonunu azaltmış olabilir. Ayrıca CAPE İ/R sırasında oluşan zararlı serbest radikalleri temizlemeyerek membran lipit peroksidasyonunu önlemiş ve bu şekilde endotelial hasar oluşumunu önleyerek, eritrosit ekstravazasyonu, intrasellüler ve intersellüler ödemi, boyut değışikliğini azaltmış olabilir. Bilindiği üzere XO enzim aktivasyonu ve nötrofillerden salınanan serbest radikaller ve proteolitik enzimler,

hücrenin lipit, DNA, protein ve enzim gibi fonksiyonel ve yapısal birimlerine saldırılar ve geri dönüşümü olmayan hasarlar meydana getirirler. CAPE serbest radikalleri temizleyerek, lipit peroksidasyonu ve nötrofil infiltrasyonunu önleyerek, XO enzimini inhibe ederek hücre nekrozu ve fagositozunu önlemiş olabilir.

CAPE siyatik sinirde perinöral ödem, eritosit ekstrasvazasyonu ve nötrofil infiltrasyonunu azaltmıştı. CAPE, NF- κ B inhibisyonu üzerinden vasküler yatakta inflamasyonu azaltarak ve nötrofil infiltrasyonunu azaltarak, lipit peroksidasyonunu engelleyerek, serbest radikallerin yol açtığı endotelial hasarı önleyerek siyatik sinirde ödem oluşumu, eritrosit ekstrasvazasyonu ve nötrofil infiltrasyonunu azaltmış olabilir. Bilindiği üzere serbest radikaller ve nötrofil-endotel etkileşimi sunucu endotel bariyer fonksiyonu bozulur, böylece damar dışına makromolekül ve eritrosit ekstrasvazasyonu meydana gelir. Ayrıca hasar gören endotel hücreleri şişerek, kan akımını güçleştirir, doku nekrozu ve hücre ölümünü kolaylaştırır.

Melatonin; pineal bezden salınan bir nörohormon olup amfililik bir moleküldür ve bilinen bütün biyolojik bariyerleri rahatlıkla geçer, hücrenin bütün alt birimlerine penetre olduğundan diğer antioksidanlara göre daha avantajlıdır (57). MLT serbest radikal temizleyici özelliği yanında İ/R sırasında hücre içi Ca konsantrasyonunu azaltabilir ve platelet agregasyonunu ve plateletlerden TXB₂ salınımını inhibe eder (58).

Sahna ve ark., ratlarda oluşturdukları böbrek İ/R modelinde 4 mg/kg farmakolojik dozlarda MLT verilen grupta böbrek dokusunda nötrofil infiltrasyonunun daha az olduğunu, doku MDA düzeyinin kontrol grubuna göre anlamlı şekilde azaldığını tesbit etmişlerdir. Ayrıca pinealektomize ratlarda, pinealektomize yapılmayan ratlara göre böbreklerde daha fazla nötrofil infiltrasyonu tesbit etmişler ve böbrek dokusunda lipit peroksidasyonu göstergesi MDA düzeyinin daha yüksek olduğunu bildirmişlerdir. Bu çalışmada fizyolojik dozlarda dahi MLT'in böbrekleri İ/R yaralanmasına karşı koruyabileceğini belirtmişlerdir (59).

Reiter ve ark., İ/R yaralanması gibi oksidatif strese maruz kalan kardiyovasküler sistemde MLT'in hidroksil, süperoksit, hidrojen peroksit ve peroksinitrit başta olmak üzere bütün oksijen ve nitrojen kaynaklı radikalleri temizlediğini, SOD ve CAT gibi antioksidan enzimleri stimüle ettiğini, lipit peroksidasyon reaksiyonlarını baskılayarak membranları stabilize ettiğini, GSH düzeyini yükselttiğini, mitokondriyel solunum sisteminde oksidatif fosforilasyonu düzenlediği, lökosit infiltrasyonu ve adezyonunu bloke ettiğini bildirmişlerdir (60).

Kashimoto ve ark., ratlarda oluşturdukları kalp İ/R modelinde MLT'in iskemi

sonrası reperfüzyon sırasında ortaya çıkan hidroksil radikallerini detoksifiye ettiğini göstermişlerdir. Melatoninin hidroksil radikallerini glutatyondan , peroksil radikallerini ise E vitamininde daha etkili şekilde inhibe ettiğini bildirmişlerdir. MLT'in GSH-Px enzim aktivitesini stimüle ettiğini ve NOS enzimini inhibe ederek, NO sentezini azalttığını bildirmişlerdir (132).

Herhangi bir serbest radikal, membran lipitleriyle reaksiyona girince serbest lipit radikalleri oluşmaktadır. Serbest lipit radikalleri tekrar membran lipitleriyle reaksiyona girmekte, böylece lipit peroksil radikalleri oluşmaktadır. Bu reaksiyon kendi-kendine ilerleyen zincirleme bir reaksiyondur ve yayılarak ilerleme eğilimindedir. Bu zincirleme reaksiyonu kıran ve en iyi bilinen antioksidan vitamin E'dir. Pieri ve ark., yaptıkları bir çalışmada vitamin E ile MLT'nin lipit peroksillerini temizleme kapasitesini araştırmış, kabaca MLT'nin vitamin E'den 2 kat daha güçlü olduğunu göstermiştir (133).

Gilad ve ark., mekanizmasını tam olarak açıklayamamakla birlikte MLT'in peroksinitrit (ONOO⁻) radikallerinin yol açtığı oksidatif stresi inhibe ettiği sonucuna varmışlardır. Bilindiği gibi peroksinitrit radikalleri lipit peroksidasyonunun başlamasına, mitokondiyal respiratuar enzimlerinin ve membran pompalarının inhibisyonuna, glutasyon miktarının azalmasına yol açar (134)

Mohan ve ark., MLT'in NF-κB aktivitesini inhibe ederek, iNOS enzimi ekspresyonunu önlediğini, bu şekilde NO üretimini baskıladığını bildirmişlerdir (135). Cuzzocrea ve ark., NF-κB inhibisyonu üzerinden melatonin'in COX-2 enzim ekspresyonunu baskıladığını bildirmiştir (136). Melatoninin bu etkileri antiinflamatuvar özelliğinin olduğunu göstermektedir. Lezovalc'h ve ark., MLT'in NF-κB'i nükleusa translokasyon aşamasında inhibe ettiğini bildirmişlerdir. İ/R yaralanmasının erken fazında serbest radikaller, mast hücreleri ve endoteleden salınan PAF ve LTB₄ gibi erken faz inflamatuvar mediyatörler nedeniyle NF-κB aktive olmakta, endotel ve nötrofiller üzerinde adezyon molekülü, iNOS ve COX-2 sentezi artmaktadır. MLT, NF-κB inhibisyonu yaparak, endotelial ve lökosit temasını keser, iNOS ve COX-2 sentezini baskılayarak, peroksinitrit radikalleri oluşumunu ve araşidonik asit metabolizmasını engeller (137).

Bir çok çalışmada MLT'in SOD, CAT, GSH-Px, GSH-Dh ve Glukoz-6 P dehidrojenaz gibi majör antioksidan enzimleri stimüle ettiği gösterilmiştir. GSH-Dh enzimi okside glutasyonun (GSSH) redükte glutasyonuna (GSH) dönüşmesini sağlayan

önemli bir enzimdir. Bu çalışmalarda MLT'in GSH düzeyini bu şekilde yükselttiği sonucuna varmışlardır. (138,139,48)

Bizim ekstremitte İ/R modelimizde tibialis anterior kasında MLT verilen grupV ve GrupVI'da lipit peroksidasyon göstergesi MDA ve oksidan enzim XO düzeyi anlamlı şekilde azalmıştı, GSH düzeyi ise anlamlı şekilde yükselmişti. MLT, NO düzeyini ortalama olarak düşürmüştü, ancak istatistiksel olarak anlamlı değildi.

Literatürle uyumlu olarak MLT, İ/R yaralanması sürecince ortaya çıkan oksijen ve nitrojen kaynaklı bütün radikalleri temizleyerek membran hasarını ve lipit peroksidasyonunu önlemiş ve antioksidanları güçlendirerek MDA düzeyini azaltmış olabilir. MLT, lipit peroksidasyonunu önleyerek ve serbest radikalleri temizleyerek, hücre membranlarında normal geçirgenlik ve akışkanlığın sürdürülmesini sağlar. Bu nedenle hücre membran fonksiyonları sürdürüldüğünden hücre içine serbest Ca akışı azalır, böylece MLT, XD'in XO'a dönüşümünü önleyerek, XO düzeyini azaltabilir. Ayrıca MLT endojen antioksidan GSH düzeyini yükselterek veya sentezini artırarak, XD'in sülfhidril gruplarının redükte tutulmasını sağlayarak XD'in XO'a dönüşümünü azaltmış olabilir.

MLT, İ/R yaralanması sırasında oksijen, nitrojen ve lipit kaynaklı bütün radikalleri temizleyerek ve SOD, CAT gibi enzimleri aktive ederek veya antioksidan enzimlerin ekspresyonunu artırarak, hücre içinde GSH'ın tükenmesini önleyebilir. MLT GSH sentezinde rol alan enzimleri aktive ederek optimal GSH düzeyinin sürdürülmesini sağlayabilir. Ayrıca MLT okside glutatyonun (GSSH) redükte glutatyona (GSH) dönüşümünü sağlayan GSH-Rd enzim aktivitesi ve sentezini indükleyerek de GSH düzeyini arttırmış olabilir.

MLT NF-κB inhibisyonu üzerinden iNOS sentezini engeller, böylece hücrelerde aşırı NO üretiminin önüne geçerek, peroksinitrit radikalleri oluşumunu engeller. Bizim çalışmamızda MLT verilen grupta NO düzeyi ortalama olarak azalmıştı, ancak istatistiksel olarak anlamlı değildi. Literatürde MLT'in eNOS ve nNOS aktivitesine etkisini araştıran bir bilgiye rastlamadık. Biz MLT İ/R yaralanması sırasında NO düzeyini azalttığımızı düşünüyoruz, ancak eNOS ve iNOS aktivitesinin artırarak, doku NO düzeyini olması gereken düzeye yükseltmiş olabilir.

Gastrocnemius adalesinin histopatolojik incelenmesinde melatonin verilen grupta hücreler arası boyut değişiklikleri, eritrosit ekstremitasyonu, nötrofil infiltrasyonu ve segmental nekroz anlamlı şekilde azalmıştı. Bu çalışmada melatonin NF-κB inhibisyonu ile inflamasyonu ve lökosit endotel ilişkisini azaltmış, güçlü serbest

radikal temizleyici özelliği ve lipit peroksidasyonunu önlemesiyle doku hasarını ve nekrozunu önlemiş olabilir. Antioksidan özelliğiyle endelleri koruyarak nötrofil infiltrasyonu, eritrosit ekstravazasyonunun, boyut değişikliği ve ödemi azaltmış olabilir.

Siyatik sinirde yapılan histopatolojik araştırmada ise MLT verilen gruplarda perinöral ödem, eritrosit ekstravazasyonu ve nötrofil infiltrasyonu anlamlı şekilde azalmıştı. Kas dokusunda olduğu gibi MLT, İ/R yaralanması sırasında oluşan serbest radikalleri doğrudan temizleyerek, antioksidan enzimlerin hem etkinliğini güçlendirerek hem de ekspresyonunu arttırarak, lipit peroksidasyonunu önleyerek ve NF-κB inhibisyonu üzerinden antiinflamatuvar özelliğiyle endotelial bariyer fonksiyonları korumuş olabilir. Böylece makromolekül ve eritrosit ekstravazasyonu önlenmiş, ödem azalmıştır. NF-κB inhibisyonu ile adezyon molekülleri oluşmadığından nötrofil-endotel ilişkisi kırılmış, nötrofil infiltrasyonu azalmıştır.

Resveratrol (RES), kırmızı şarap, kırmızı üzüm, yerkıştığı, dut gibi çeşitli yiyecek ve içeceklerde bulunan antioksidan bir polifenoldür. Leonard ve ark., in vitro çalışmalarında RES'un hidroksil (OH•) ve süperoksit (O₂⁻) radikallerini etkili bir şekilde temizlediğini, Fenton reaksiyonunu inhibe ettiğini, OH• radikallerinin yol açtığı DNA hasarı ve membran lipit peroksidasyonunu önlediğini ve çeşitli metal oksidanların yol açtığı NF-κB aktivasyonunu inhibe ettiğini göstermişlerdir (65).

Pellegatta ve ark., in vitro çalışmalarında RES'un TNF-α ve lipopolisakkaritlerin stümüle ettiği endotelial yüzey adezyon molekül ekspresyonunu inhibe ettiğini, böylece granulosit ve monositlerin endotele tutunmasını önlediğini göstermişlerdir. Başka bir çalışmada RES'un TNF-α ve IL-1β tarafından indüklenen NF-κB'i inhibe ettiği gösterilmiştir. Bu özelliğiyle RES antiinflamatuvar etki göstermektedir (140).

Subbaramaiah ve ark., RES'un COX-2 enziminin hem gen ekspresyonu hem de enzim aktivitesini sınırladığını ve böylece PG sentezini önleyerek, antiinflamatuvar özellik taşıdığını göstermişlerdir (141).

Maccarrone ve ark., hücre kültürlerinde RES'un hidrojen peroksidin hücre membranlarına saldırmasıyla ortaya çıkan inflamatuvar LTB₄ ve PGE₂ oluşumunu, COX (siklooksijenaz), lipoksijenaz ve peroksidaz enzimini kompetitif inhibe ederek önlediğini göstermişlerdir. (142).

Haşalık ve ark., rat overlerinde 3 saat iskemi ve 3 saat reperfüzyon modeli oluşturarak, reperfüzyon öncesi 10 mg/kg İP olarak RES vermişlerdir. Kontrol

grubunda over dokusunda XO, MDA düzeyinin arttığını ve GSH (glutasyon) düzeyinin azaldığını tesbit etmişlerdir. RES verilen grupta ise XO ve MDA düzeyi anlamlı şekilde azalmışken, redükte glutasyon (GSH) düzeyinde anlamlı şekilde artma izlemişlerdir. Histopatolojik araştırmada ise over dokusunda nötrofil infiltrasyonu, ödem ve vasküler dilatasyonun anlamlı şekilde azaldığını tesbit etmişlerdir. Bu çalışmada RES'un XO'ya dönüşümünü sınırlayabileceğini ve lipit peroksidasyonunu önleyerek MDA düzeyini düşürebileceğini belirtmişlerdir. RES'un radikal temizleyici özelliğiyle redükte GSH'un korunmasını sağladığını veya GSH sentezinde rol alan enzimleri aktive edebileceğini bildirmişlerdir. İ/R yaralanması sırasında TNF- α ve IL-1 β tarafından indüklenen NF- κ B'i RES'un süprese ettiğini ve bu şekilde NF- κ B tarafından gen transkripsiyonu düzenlenen inflamatuvar, kemotaktik mediyatörlerin ve lökositik- endotelial yüzey adezyon molekül sentezinin önlendiğini, bu nedenle nötrofil infiltrasyonunun azaldığını bildirmişlerdir (114).

Shigematsu ve ark., ratlarda oluşturdukları mezenterik İ/R modelinde RES verilen grupta lökosit adezyonu ve migrasyonunun azaldığını, endotelial bariyer fonksiyonunun korunarak, albumin ekstravazasyonunun anlamlı şekilde azaldığını göstermişlerdir. Mezenterik arteri HX/XO (hipoksantin / ksantin oksidaz) solusyonuyla perfüze ettikleri grupta belirgin lökosit adezyonu ve migrasyonu, mikrovasküler endotelial bariyerin bozulması sonucu, albumin ekstravazasyonu meydana geldiğini, RES'un ise bu patolojileri önlediğini göstermişlerdir. Diğer bir grupta mezenterik arteri proinflamatuvar PAF ve LTB₄ solusyonuyla perfüze ederek, lökosit adezyonu ve migrasyonu, mikrovasküler endotelin bozulması sonucu albumin ekstravazasyonu meydana geldiğini, sadece PAF verilen grupta bu etkilerin RES verilerek azaldığını göstermişlerdir. RES LTB₄ ün etkilerini önlememişti. Bu çalışmada RES'un İ/R yaralanması sırasında aktive olan lökositlerin adezyon ve migrasyonunu önlediğini göstermişlerdir. Ayrıca bu çalışmada HX / XO ve PAF'ın da serbest radikal üretimini indüklediğini, lökosit adezyonu ve mikrovasküler endotelial bariyer disfonksiyonu yarattığını, RES'un bu patolojileri önlediğini bildirilmiştir. İ/R yaralanması sırasında açığa çıkan reaktif oksijen türevlerinin endotel yüzeyinde P-selektin ve ICAM-1 gibi adeziv ligantların oluşumunu başlattığı, antioksidanların ise serbest radikalleri temizleyerek bu durumu engellediği biliniyor. RES, reaktif oksijen türevlerini detoksifiye ederek, antiadeziv etki göstermiştir. RES'ün vasküler endotelden NO salınımını artırdığı, NO'in ise İ/R sırasında lökosit akümülyasyonunu önlediği biliniyor (62).

Hung ve ark., ratlarda oluşturdukları İ/R modelinde RES'un iNOS aktivitesini tamamen bloke ettiğini göstermişlerdir. İ/R oluşturulan grup ile normal kalp dokusunda eNOS ve nNOS düzeyleri aynıydı. RES verilen İ/R grubunda RES eNOS ve nNOS enzim aktivitelerini güçlendirmişti. RES'un transkripsiyonel düzeyde iNOS ekspresyonunu baskımlarken, nNOS aktivitesini arttırdığını ve enzim düzeyinde eNOS aktivitesini güçlendirdiğini tesbit etmişlerdir. Bu çalışmada İ/R yaralanması sırasında iNOS enziminin aktive olduğu tesbit edilmiştir ve RES'un NO bağımlı olarak iskemik kalp dokusunda infarkt alanının küçülmesine yol açtığı sonucuna varmışlardır (143).

İ/R yaralanması sırasında ortaya çıkan reaktif oksijen türevleri plateletleri aktive etmekte, aktive olan plateletler de yaralanma bölgesinde kollajen ve fibrinojene tutunarak agregasyon göstermekte, reaktif oksijen türevleri üretmekte ve PAF gibi vazokonstrüktör, kemotaktik, inflamatuvar metabolitlerin salınmasına yol açmaktadır. Olas ve ark., in vitro çalışmalarında RES'un reaktif oksijen radikallerine karşı trombositleri koruduğunu ve plateletlerin kollajen ve fibrinojene tutunmasını engelleyerek, agregasyon, sekresyon, tromboz ve eikozonoid sentezini önlediğini göstermişlerdir. Diğer bir çalışmalarında RES'lun plateletlerden süperoksit, hidrojen peroksit ve diğer organik radikallerin salınımını baskıladığını, plateletlerde lipit peroksidasyonunu önlediğini göstermişlerdir (144). Ayrıca Martinez ve ark., RES'lun antioksidan etkisiyle makrofajlarda süperoksit ve hidrojen peroksit üretimini güçlü şekilde inhibe ettiğini göstermişlerdir. Ayrıca RES'un trombosit ve makrofajlarda reaktif oksijen türevleri üretimini ve makrofajlardan inflamatuvar, kemotaktik, vazokonstrüktörlerin salınımını engelleyerek de İ/R yaralanmasında doku hasarını önlediğini göstermiştir (145).

Bizim İ/R modelimizde RES verilen gruplarda tibialis anterior kasında MDA ve XO düzeyi anlamlı şekilde azalmış, hücre sel endojen antioksidan olan GSH düzeyi kontrol grubuna göre anlamlı şekilde artmıştı. Reperfüzyon başlangıcında oluşan aşırı serbest oksijen radikallerinin RES tarafından temizlendiği ve membran lipit peroksidasyonunun önlenmesine bağlı olarak MDA düzeyi azalmış olabilir. İ/R sırasında serbest radikaller RES tarafından temizlenerek ve lipit peroksidasyonu RES tarafından doğrudan baskılanarak, hücre membranı bütünlüğü ve fonksiyonları korunmuş, bu şekilde hücre içi aşırı Ca birikimi engellenip, XD'ın XO'a dönüşü sınırlanmış ve XO oksidaz düzeyi azalmış olabilir. RES, İ/R yaralanması sürecinde serbest oksijen, nitrojen ve lipit kaynaklı radikalleri doğrudan temizlemiş veya

oluşumunu engellemiş, bu şekilde oksidasyon olaylarını durdurarak, hücre içi GSH'un tükenmesini engellemiş olabilir.

Doku NO düzeyinde RES grubunda kontrol grubuna göre anlamlı farklar bulunamadı. RES NF- κ B inhibisyonu üzerinden iNOS transkripsiyonunu sınırlayarak, İ/R olayında aşırı NO üretimini önler. Ancak transkripsiyon düzeyinde nNOS, enzimatik düzeyde eNOS aktivitesini güçlendirerek, NO düzeyini optimal düzeyde tutabilir. Bizim hiçbir işlem yapılmayan normal grubumuz olmadığından, NO miktarının olması gereken normal düzeyini karşılayamadık. Dolayısıyla bu çalışmamızda RES'un NO düzeyine nasıl bir etkiye sahip olduğu konusunda yorum yapamadık.

RES verilen gruplarda gastrocnemius kasında ödem, boyut değişiklikleri, eritrosit ekstrevasyonu ve nötrofil infiltrasyonu azalmıştı. RES, İ/R yaralanması sırasında aktive olan NF- κ B'i inhibe ederek kemotaktik, enflamatuar mediyatörlerin ve endotel- nötrofil yüzeyinde adezyon moleküllerinin oluşmasını baskılamış olabilir. Böylece nötrofil adezyonu, migrasyonu ve infiltrasyonu azalmış olabilir. Ayrıca ortamda bulunan serbest radikalleri de temizlediğinden endotel bariyer fonksiyonu korunmuş, dolayısıyla eritrosit ekstrevasyonu ve makromolekül ekstrevasyonu önlenmiş olabilir. Siyatik sinirde de aynı mekanizmalarla ödem, nötrofil infiltrasyonu ve eritrosit ekstrevasyonu azalmış olabilir. Sinir dokunun metabolik aktivitesi kas dokusuna göre daha yavaştır, dolayısıyla iskemiye daha uzun süre tolere edebilir. Ancak periferik sinir doku da içi endotel hücreleriyle dōşeli iskemiye oldukça duyarlı mikrovasküler sisteme sahiptir. Bu nedenle kas ve sinir dokusunda olduğu gibi hiçbir dokunun İ/R yaralanmasından kaçışı mümkün değildir.

VI. SONUÇ

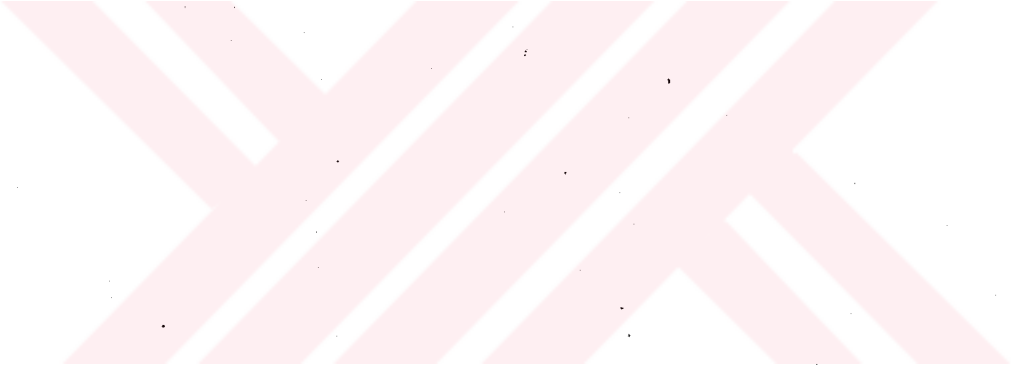
CAPE, MLT ve RES verdiğimiz ratların tibialis anterior, gastroknemius kası ve siyatik sinirlerinde yaptığımız biyokimyasal ve histopatolojik araştırmada her üç maddenin verildiği gruplarda inflamasyon ve doku hasarı azalmış, vasküler endotelial bariyer fonksiyonları korunmuştu. CAPE, MLT ve RES, deneysel İ/R yaralanması modellerinde son birkaç yıldır yoğun şekilde kullanılmakta ve yüzgüldürücü sonuçlar bildirilmektedir. Bu nedenle bizim çalışmamız literatürle uyumludur. Önümüzdeki yıllarda bu üç maddenin ortopedik cerrahide replantasyon, revaskülarizasyon, ezilme yaralanmaları, serbest flep uygulamaları ve turnike sonrası sıklıkla karşılaştığımız İ/R yaralanması vakalarında, antioksidan ve antiinflamatuvar olarak, mevcut medikal tedaviye destek amaçlı kullanılabileceğini düşünmekteyiz.

VII. ÖZET

Mikrocerrahi teknikler ve teknolojik gelişmelere paralel olarak günümüzde, kopan veya dolaşımı bozulan bir ekstremitte başarılı damar tamirleriyle replante veya revaskülarize edilebiliyor, geniş doku defektleri damarlı serbet fleplerle kapatılabiliyor, başarılı turnike uygulamalarıyla üst ve alt ekstremitelerde kansız ameliyatlar yapılabiliyor. Ancak bütün bu girişimlerle beraber, dokular belirli bir süre iskemiye maruz kalmakta ve reoksijenasyonla birlikte İ/R yaralanması gibi ciddi sorunlar karşımıza çıkmaktadır. Klinik ve deneysel çalışmalarda İ/R yaralanmasının, özellikle reperfüzyon sırasında ortaya çıkan ve hücrenin bütün yapısal-fonksiyonel ünitelerine zarar veren, aşırı miktarda serbest oksijen ve nitrojen radikalleri nedeniyle meydana geldiği gösterilmiştir. Bu nedenle İ/R olayında CAPE, MLT, RES gibi doğal, güvenilir, güçlü antioksidan ve antiinflamatuvar ajanların kullanımı gündeme gelmiştir. Biz ratlarda turnike uygulamak suretiyle oluşturduğumuz ekstremitte İ/R modelimizde CAPE, RES ve MLT'in kas ve periferik sinire etkilerini araştırdık.

48 adet Wistar-albino rat, rasgele 6'şarlı 8 gruba bölündü. Ratlar 75 mg/kg Ketamin ve 8 mg/kg Xylazine i.p verilerek anestezize edildi. Sağ arka ekstremitelerine 4 saat süreyle lastik bant turnike uygulandı ve bu süre sonunda turnike gevşetilerek 4 ve 8 saatlik reperfüzyona izin verildi. GrupI (4 saat iskemi / 4 saat reperfüzyon + % 5 etil alkol, i.p), grupII (4 saat iskemi / 8 saat reperfüzyon + % 5 etil alkol, i.p), GrupIII (4 saat iskemi / 4 saat reperfüzyon + 20 µM/kg CAPE, i.p), GrupIV (4 saat iskemi / 8 saat reperfüzyon + 20 µM/kg CAPE, i.p), GrupV (4 saat iskemi / 4 saat reperfüzyon + 20 mg/kg MLT, i.p), GrupVI (4 saat iskemi / 8 saat reperfüzyon + 20 mg/kg MLT, i.p), GrupVII (4 saat iskemi / 4 saat reperfüzyon + 10 mg/kg RES, i.p), GrupVIII (4 saat iskemi / 8 saat reperfüzyon + 10 mg/kg RES, i.p). İşlemler sonunda ratlar yüksek doz anestezi ile sakrifiye edildi. Tibialis ant. kası MDA, GSH, XO ve NO bakılmak üzere, gastroknemius kası ve siyatik sinir histopatolojik araştırma için çıkarıldı. Biyokimyasal incelemede CAPE, MLT ve RES verilen gruplarda MDA ve XO düzeyi anlamlı şekilde azalmıştı, GSH düzeyi ise anlamlı şekilde yükselmişti (p<0.005). Tüm gruplarda NO düzeyinde anlamlı değişiklik saptanmadı (p>0.005). Histopatolojik incelemede gastroknemius kasında ödem, boyut değişikliği, segmental nekroz, eritrosit ekstravazasyonu, nötrofil infiltrasyonu kontrol grubuna göre anlamlı şekilde azalmıştı (p<0.005). Siyatik sinirde perinöral ödem, perinöral eritrosit ekstravazasyonu ve nötrofil infiltrasyonu anlamlı şekilde azalmıştı (p<0.005).

Bu sonuçlara göre, doğal ve güçlü antioksidan özelliğe sahip CAPE, MLT ve RES'un intraperitoneal uygulanması ile iskelet kası ve periferik sinirleri İ/R yaralanmasına karşı koruyabileceğini düşünmekteyiz.



VIII. SUMMARY

Thanks to improving microsurgical techniques and technological improvement, in our time completely amputated extremity is replantated or an extremity with vascular incongruity is revascularized with skillful repairing vascular structure, extensive tissue defects are covered with free vascularized tissue transfers and operations of lower or upper extremity are accomplished without bleeding with applying tourniquet. However all the attempt, tissues are exposed to ischemic conditions and together with reperfusion we encounter to ischemia-reperfusion injury. Clinical and experimental studies showed that free oxygen and nitrogen radicals appear during ischemia-reperfusion injury and damage all the structural and functional units of cells. Because that considered natural, safety, strong antioxidants and antiinflammatories such as CAPE, MLT and RES have beneficial effects on I/R injury. We investigated the effects of CAPE, MLT and RES in ethyl alcohol 5% on I/R injuries on rat skeletal muscle and peripheral nerve applying rubber band tourniquet to lower extremity.

A total of 48 adult Wistar albino rats were divided into 8 groups with varied treatment. The animals were anesthetized with i.p ketamine (75 mg/kg) and xylazine (8 mg/kg). Ischemia was induced by applying rubber band tourniquets high around thigh to right hindlimb of rats during 4 hours. After that releasing the tourniquet it was allowed to reperfusion of the extremity during 4 and 8 hours. Group I (4 h ischemia / 4 h reperfusion + % 5 ethyl alcohol, i.p), group II (4 h ischemia / 8 h reperfusion + % 5 ethyl alcohol, i.p), group III (4 h ischemia / 4 h reperfusion + 20 μ M/kg CAPE, i.p), group IV (4 h ischemia / 8 h reperfusion + 20 μ M/kg CAPE, i.p), group V (4 h ischemia / 4 h reperfusion + 20 mg/kg MLT, i.p), group VI (4 h ischemia / 8 h reperfusion + 20 mg/kg MLT, i.p), group VII (4 h ischemia / 4 h reperfusion + 10 mg/kg RES, i.p), group VIII (4 h ischemia / 8 h reperfusion + 10 mg/kg RES, i.p).

In the end of experiment all rats were killed with high dose anesthetic. Afterwards right hindlimb of all animals were disarticulated from hip and tibialis anterior muscle for biochemical analysis, gastrocnemius muscle and sciatic nerve removed for histopathological analysis.

The levels of MDA and XO in groups administered CAPE, MLT and RES were significantly lower than that of the control groups ($p < 0.005$). The level of GSH was higher than that of the control groups ($p < 0.005$). In all the groups the level of NO was not change significantly ($p > 0.005$).

Histopathological analysis revealed a better conservation of muscle morphology in rats treated with CAPE, MLT and RES administration reduced the morphological changes induced by ischemia. In gastrocnemius muscle PMN infiltration, edema, erythrocyte extravasation, segmental necrosis, change of diameter were much lower in rats treated with CAPE, MLT and RES compared with control groups ($p < 0.005$). In sciatic nerve PMN infiltration, endo-perineural edema and erythrocyte extravasation were much lower in rats treated with CAPE, MLT and RES compared with control groups ($p < 0.005$).

The present study demonstrates that I.P administration of CAPE, MLT and RES, in accordance with their potent antioxidant properties, maybe effectively protects the skeletal muscles and peripheral nerves against injury associated with reperfusion.



IX. KAYNAKLAR

1. Christopher B.A, Homer-Vanniasinkham. Clinical implications of ishaemia-reperfusion injury. *Pathophysiology*. 2003;9:229-240
2. Hardy SC, Homer-Vanniasinkam S, Gough MJ. The triphasic pattern of skeletal muscle blood flow in reperfusion injury: an experimental model with implication for surgery on the acutely ischemic lower limb. *Eur J Vasc Surg* 1990;4:587-92
3. Kerrigan C.L., Stotland M.A. Ischemia reperfusion injury: a review *Microsurgery* 1993;14:165-175
4. Ferreira R, Milei J, Grana D. Oxidative Stress And Ischaemia-reperfusion Injury In The Heart. *Asia Pacific Heart J* 1999; 8(2):97-101
5. Murrant C. L., Reid M.B. Detection of reactive oxygen and reactive nitrogen species in skeletal muscle *Microscopy Research and Technique* 2001;55:236-248
6. Mateo A.O, and Alexandre M.A. Nitric oxide reactivity and mechanisms involved in its biological effects *Pharmacological Research*, Vol. 42, No. 5, 2000;42(5):48-55
7. Tylicki L, Rutkowski B, Hörl W.H. Antioxidants: A possible role in kidney protection. *Kidney Blood Pres Res* 2003;26:303-314
8. Wall J. Antioxidants In Prevention Of Reperfusion Damage Of Vascular Endothelium *Pharmacology* 2000 Volume 1-(67-71)
9. Spark J.I, Chetter C, Gallavin L, Kestrel C, Guillou, Scott D.J.A. Reduced antioxidant capacity predicts ischaemia-reperfusion injury after femorodistal bypass. *British journal of surgery* 1998;85:221-225)
10. Zintzen H. Fat-soluble vitamins in nutrition of ruminants. Basel: La Roche 1977;2:27-29
11. Packer L. Protective role of vitamin E in biological systems. *Am J Clin Nutr* 1991;53:1050-1055
12. Van-Der-Meulen J.H, McArdle A, Jackson M.J, Faulkner J.A. Contraction-induced injury to the extensor digitorum longus muscles of rats: The role of vitamin E. *J Appl Physiol* 1997;83:817-23.
13. Stratton S.P, Liebler D.C. Determination of singlet oxygen-specific versus radical-mediated lipid peroxidation in photosensitized oxidation of lipid bilayers: Effect of beta-carotene and alpha-tocopherol. *Biochemistry* 1997;36:12911-12920
14. Splettstoeser W.D, Schuff-Werner P. Oxidative stress in phagocytes- 'The Enemy Within' *Microscopy Research and Technique* 2002;57:441-455
15. Winterbourn CC. Superoxide as an intracellular radical sink. *Free Radic Biol Med* 1993;14:85-90

16. Sies H. Damage to plasmid DNA by singlet oxygen and its protection. *Mut Res* 1993;299:183–191.
17. Al-Turk W, Sindy J.S, Fatma H.E.R, Sadeg O. Changes in glutathione and its metabolizing enzymes in human erythrocytes and lymphocytes with ages. *Pharm Pharmacol* 1987;39:13-16
18. Lagerwall K, Madhu B, Daneryd P, Schersten T, Soussi B. Purine nucleotides and phospholipids in ischemic and reperfused rat skeletal muscle: effect of ascorbate. *Am J Physiol* 1997;272(1):83-90.
19. Dündar Y, Aslan R. Bir antioksidan olarak vitamin E. *Genel Tıp Derg* 1999;9(3):109-116.
20. Natarajan K, Singh S, Burke T.R, Grunberger D, Aggrawal B.B Caffeic acid phenethyl ester is a potent and specific inhibitor of activation of nuclear transcription factor NFkappa B. *Proc Natl Acad Sci U.S.A* 1996;2(93):9090–9095
21. Mirzoeva OK, Sud'ina GF, Pushkareva MA, Korshunova GA, Sumbatian NV, Varfolomeev SD. Lipophilic derivatives of caffeic acid as lipoxygenase inhibitors with antioxidant *Bioorg Khim.*1995;21(2):143-151
22. İlhan A, Koltuksuz U, Ozen S, Uz E, Ciralı H, Akyol O. The effects of caffeic acid phenethyl ester (CAPE) on spinal cord ischemia/reperfusion injury in rabbits. *Eur J Cardiothorac Surg* 1999;16:458–463
23. Doganay S, Turkoz Y, Evereklioglu C, Er H, Borazan M, Ozerol E. (in press) The use of caffeic acid phenethyl ester to prevent sodium selenite-induced cataract in rat eyes. *J Cataract Refract Surg* 2002;28(8):1457-1462.
24. Wei H, Frenkel K. Relationship of oxidative events and DNA oxidation in Sencar mice to in vivo promoting activity of phorbol ester-type tumor promoters. *Carcinogenesis* 1993;14:1195– 201.
25. Myers S.L, Brandt K.L, Ehlich J.W, Braunstein E.M, Shelbourne, K.D, Heck DA, Kalasinski L.A Synovial inflammation in patients with early osteoarthritis of the knee. *J Rheumatol* 1990;17:1662–1669
26. Elmali N, Ayan İ, Türköz Y, Mizrak B, Germen B, Bora A. Effect of caffeic acid phenethyl ester on cartilage in experimental osteoarthritis. *Rheumatol Int.* 2002; 22: 222–226
27. Russo A, Longo R, Vanella A, Antioxidant activity of propolis: role of caffeic acid phenethyl ester and galangin. *Fitoterapia* 2002;73(suppl.1):21–29)
28. Sud'ina GF Mirzoeva OK, Puskareva MA, Korshunova GA, Sumbatyan NV, Varfolomeev SD. Caffeic acid phenethyl ester as a lipoxygenase inhibitor with antioxidant properties. *FEBS Lett* 1993;329:21-24.

29. Şahin Ş, Sadık S, Öyurt H, Uz E, İlhan A, Akyol O. Tissue xanthine oxidase activity and nitric oxide levels after spinal cord ischemia/reperfusion injury in rabbits: comparison of caffeic acid phenethyl ester and methylprednisolone. *Neuroscience Research*. 2002;31:111-121
30. Laranjinha J, Cadenas E. Redox cycles of CAPE, alpha-tocopherol and ascorbate: Implications for protection of LDL against oxidation. *IUBMB Life*, 1999, 48(1):57-65
31. Salter M, Duffy C, Garthwaite J. Ex vivo measurement of brain tissue nitrite and nitrate accurately reflects nitric oxide synthase activity in vivo. *J Neurochem* 1996; 66:1683-1690.
32. Koltuksuz U, Özen S, Uz E, Aydin M, Karaman A, Gültek A, Akyol O, Gürsoy M.H, Aydin E. Caffeic acid Phenethyl ester prevents intestinal reperfusion injury in rats. *J pediatr Surg*. 1999;34:1458
33. Gurel A, Armutcu F, Sahin S, Sogutcu S, Ozyurt H. Protective role of alpha-tocopherol and caffeic acid phenethyl ester on ischemia-reperfusion injury via nitric oxide and myeloperoxidase in rat kidneys. *Clinica Chimica Acta* 2004;339: 33-41
34. Orban Z, Mitsiades N, Burke TR. Caffeic acid phenethyl ester leukocyte apoptosis, modulates nuclear factor-kappa B and suppresses acute inflammation. *Neuroimmunomodulation*. 2000;7(2):99-105
35. Paterson I.S, Klausner J.M, Pugatch R, Allen P, Mannick JA, Shepro D. Noncardiogenic pulmonary edema after abdominal aortic aneurysm surgery. *Ann Surg* 1989;209:231-6.
36. Klausner J. M, Anner H, Paterson Y. S, Kobzik L, Valeri CR, Shepro D. Lower torso ischemic-induced lung injury is leukocyte dependent. *Ann Surg* 1988;208:761-7.
37. Çalikoglu M, Tamer N, Sucu N, Coskun B, Ercan B, Gul A, Calikoglu I, Kanik A. The effects of caffeic acid phenethyl ester on tissue damage in lung after hindlimb ischemia-reperfusion. *Pharmacological Research* 2003;48: 397-403
38. Welbourn CRB, Goldman G, Peterson IS. Neutrophil elastase and oxygen radicals: synergism in lung injury after hindlimb ischemia. *Am J Physiol* 1991;260:1852-6
39. Granger D.N. Role of xanthine oxidase and granulocytes in ischemia-reperfusion injury. *Am J Physiol* 1988;255:1269-75.
40. Simpson R, Alon R, Kobzik L, Valeri CR, Shepro D, Hechtman H.B. Neutrophil and nonneutrophil-mediated injury in intestinal ischemia-reperfusion. *Ann Surg* 1993;218:444-53.
41. Arendt J. Melatonin. *Cim Endocrinol*, 1998;29: 205-229
42. Palanoğlu Ö.S, Beşkonaklı E. Pineal bez ve yaşlanma. *Geriatrics* 1998;1(1):1318

43. Reiter RJ, Poeggeler B, Tan D: Antioxidant capacity of melatonin: A novel action not requiring a receptor. *Neuroendocrinol lett*, 1993; 15: 103-116
44. Reiter RJ. Functional diversity of the pineal hormone melatonin: its role as an antioxidant. *Exp clin endocrinol*, 1996; 104: 10-16
45. Reiter R. J. Oxidative processes and antioxidative defense mechanisms in the aging brain. *FASEB J*. 1995; 9: 526-533
46. Giusti P, Lipartiti M, Franceschini D, Schiavo N, Floreani M and Manev H. Neuroprotection by melatonin from kainate-induced excitotoxicity in rats. *FASEB J*. 1996; 10: 891-896
47. Reiter RJ, Guerrero JM, Garcia JJ, Acuna-Castroviejo D. Reactive oxygen intermediates, molecular damage and aging. Relation to melatonin. *Ann N Y Acad Sci* 1998; 854: 410
48. Reiter RJ, Tan DX, Manchester LC, Qi W. Biochemical reactivity of melatonin with reactive oxygen and nitrogen species: A review of the evidence. *Cell Biochem Biophys*. 2001; 34: 237-56.
49. Tan DX, Reiter RJ, Manchester LC, Yan MT, El-Sawi M, Sainz RM, Mayo JC, Kohen R, Allegra M, Hardeland R. Chemical and physical properties and potential mechanisms: melatonin: melatonin as a broad spectrum antioxidant and free radical scavenger. *Curr Top Med Chem* 2002; 2: 181
50. Mayo J. C, Sainz R.M, Antolína I, Herrera F, Martín V. and Rodríguez C. Melatonin regulation of antioxidant enzyme gene expression. *Cell. Mol. Life Sci*. 2002; (59): 1706
51. Giusti P, Lipartiti M, Gusella M, Floreani M. and Manev H. In vitro and in vivo protective effects of melatonin against glutamate oxidative stress and neurotoxicity. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 1997; 825: 79-84
52. Lezoualc'h F, Sparapani M. and Behl C. N-acetyl-serotonin (normelatonin) and melatonin protect neurons against oxidative challenges and suppress the activity of the transcription factor NF-kappaB. *J. Pineal Res*. 1998; 24: 168-178
53. Pieri C, Marra M, Moroni F, Decchioni R, Marcheselli F. Melatonin: a peroxyl radical scavenger more effective than vitamin E. *Life Sci* 1994; 55: 271-276
54. Hsieh, T. C, Juan G, Darzynkiewicz Z, and Wu J.M. Resveratrol increases nitric oxide synthase, induces accumulation of p53 and p21 (WAF1/CIP1), and suppresses cultured bovine pulmonary artery endothelial cell proliferation by perturbing progression through S and G2. *Cancer Res*. 1999; 59: 2596
55. Jang M, Cai L, Udeani G. O, Slowing K. V, Thomas C. F, Beecher C. W, Fong H. H, Farnsworth N. R, Kinghorn A. D, Mehta R. G. Cancer Chemopreventive activity of resveratrol, a natural product derived from grapes. *Science* 1997; 275: 218

56. Vijayalaxmi Z, Reiter RJ, Sewerynek E, Poeggeler B, Leal BZ, Meltz M.L. Marked reduction of radiation-induced micronuclei Micronuclei in human blood lymphocytes pretreated with melatonin. *Rad Res* 1995;143:102–106
57. Reiter R.J, Tan D.X Melatonin: a novel protective agent against oxidative injury of the ischemic / reperfused heart *Cardiovascular Research* 2003;58: 10–19
58. Del Zar M.M, Martinuzzo C, Falcon C, Cardinalli D.P, Carreras L.O, Vacas M.I. Inhibition of human platelet aggregation and tromboxane-B2 production by melatonin: evidence for a diurnal variation. *J Clin Endocrinol* 1990;70: 246
59. Sahna E, Parlakpınar H, Oztürk F, Cigremis Y, Acet A. The protective effects of physiological and pharmacological concentrations of melatonin on renal ischemia-reperfusion injury in rats. *Urol Res* 2003; 31: 188–193
60. Russel J. Reiter , Dun-Xian Tan. Melatonin: a novel protective agent against oxidative injury of the ischemic / reperfused heart *Cardiovascular Research* 2003;58:10–19
61. Bertelli, A. A., Giovannini L., Giannessi D, Migliori M, Bernini W., Fregoni M and Berteli A. Antiplatelet activity of synthetic and natural resveratrol in red wine. *Int. J. Tissue React.* 1995;17:1.
62. Shigematsu S, Shida S, Hara M, Takahashi N, Yoshimatsu H, Sakata T. Resveratrol, a red wine constituent polyphenol, prevents superoxide dependent inflammatory responses induced by by ischemia/reperfusion, platelet-activating factor, or oxidants *Free Radical Biology & Medicine* 2003;34(7):810-817
63. Hsieh, T. C, Juan G, Darzynkiewicz Z. and Wu J.M. Resveratrol increases nitric oxide synthase, induces accumulation of p53 and p21 (WAF1/CIP1), and suppresses cultured bovine pulmonary artery endothelial cell proliferation by perturbing progression through S and G2. *Cancer Res.* 1999;59:2596
64. Mana S.K., Mukhopadhyay A. and Aggarwal B.B. Resveratrol Suppresses TNF-Induced Activation of Nuclear Transcription Factors NF-kB, Activator Protein-1, and Apoptosis: Potential Role of Reactive Oxygen Intermediates and Lipid Peroxidation *The Journal of Immunology*, 2000;164: 6509–6519
65. Leonard S.S, Xia C, Jiang B-H, Stinefelt B, Klandorf H, Haris G.K, Shi X. Resveratrol scavenges reactive oxygen species and effects radical-induced cellular responses *Biochemical and Biophysical Research Communications* 2003;309:1017–1026
66. Olas B, Wachowicz B, Saluk-Juszczak J, Zielin'ski T. Effect of resveratrol, a natural polyphenolic compound, on platelet activation induced by endotoxin or thrombin. *Thrombosis Research* 2002;107: 141– 145
67. Moreno J. Resveratrol Modulates Arachidonic Acid Release, Prostaglandin Synthesis, and 3T6 Fibroblast Growth. *JPET* 2000;294:333–338

68. Hung L-M, Chen J-K, Huang S-S, et al. Cardioprotective effect of resveratrol, a natural antioxidant derived from grapes. *Cardiovascular Res.* 2000; 47:549-555.
69. Li H, Förstermann U. Nitric oxide in the pathogenesis of vascular disease. *J Pathol.* 2000;190:244-254
70. Henry LA, Witt DM. Resveratrol: phytoestrogen effects on reproductive physiology and behavior in female rats. *Horm Behav.* 2002;41:220-228
71. Orallo F, Alvarez E, Camina M, et al. The possible implication of trans-resveratrol in the cardioprotective effects of long-term moderate wine consumption. *Mol Pharmacol.* 2002;61:294-302
72. Dong Z. Molecular mechanism of the chemopreventive effect of resveratrol. *Mutation Research* 2003;12; 145-150
73. Li H, Förstermann U. Nitric oxide in the pathogenesis of vascular disease. *J Pathol.* 2000;190:244-254
74. Belkin, M., Brown, R. D., Wright, J. G. et al. A new quantitative spectrophotometric assay of ischemia-reperfusion injury in skeletal muscle. *Am J Surg*, 1988;156:83-86.
75. Steinau H-U. Major Limb Replantation and Postischemia Syndrome: Investigation of Acute Ischemia-induced Myopathy and Reperfusion Injury. New York: Springer Verlag, 1988, pp 9-22,23, 26, 33.
76. Petrsek, P. F, Homer-Vanniasinkam S. and Walker P. M. Determinants of ischemic injury to skeletal muscle. *J Vasc Surg*, 1994;19:623-631.
77. Lounsbury K. M , Hu Q , Ziegelstein R.C. Calcium signaling and oxidant stress in the vasculature. *Free Radical Biology & Medicine*, 2000;28(9):1362-1369
78. Johannes F, Vijay S.G, Anderson L.A, Laurentin L-P, Maldonado C, Barker J.H. Microcirculation research for microsurgeons: basic concepts and potential applications *Eur J of Trauma* 2001;27:153-162
79. Cheung J. Y, Bonventre J. V, Malis C. D. and Leaf A. Calcium and ischemic injury. *N. Engl. J. Med.* 314:1670, 1986.
80. Parks, D. A, and Granger D. N. Xanthine oxidase: biochemistry, distribution and physiology. *Acta Physiol. Scand.(Suppl)* 1986;87:548
81. Blaisdell F. W. The pathophysiology of skeletal muscle ischemia and the reperfusion syndrome: a review *Cardiovascular Surgery* 2002;10(6):620-630
82. Nohl, H. Involvement of free radicals in aging: A consequence or cause of senescence. *Br. Med. Bull.* 1993;49:653.

83. Heunks L.M.A, Dekhuijzen P.N.R. Respiratory muscle function and free radicals: from cell to COPD Thorax 2000;55:704–716
84. Boveris A, Chance B. The mitochondrial generation of hydrogen peroxide: general properties and effect of hyperbaric oxygen. Biochem J 1973;134:707-709
85. McCord J. M. Free radicals and myocardial ischemia: overview and outlook. J Free Radic Biol Med 1988;4:9-14
86. Gutteridge J., Halliwell B., Oxygen toxicity, oxygen radicals, transition metals and diseases. Review article. Biochem. J. 1984, 219:1-14
87. Carroll W.R, Esclamado R.M. Ischemia/reperfusion injury in microvascular surgery Head neck 2000;22:700-713
88. Shakir A. and Derek A. M. Signal transduction via the NF- κ B pathway: a targeted treatment modality for infection, inflammation and repair. Cell Biochem Funct 2004; 22: 67–79.
89. Cavanagh S. P, Gough M. J and Homer-Vanniasinkam S. The role of the neutrophil in ischaemiareperfusion injury: potential therapeutic Interventions Cardiovascular Surgery. 1998;6(2):112-118
90. Bajaj AK, Cobb MA, Virmani R, et al. Limitation of myocardial reperfusion injury by intravenous perfluorochemicals. Role of neutrophil activation. Circulation 1989;79:645-56.)
91. Rubanyi GM. Endothelium derived relaxing and contracting factors. J Cell Biochem 1991;46:27.
92. Keller A.M, Clancy R.M, Barr M.L. Acute reoxygenation injury in the isolated rat heart: role of resident cardiac mast cells. Circ Res. 1988;63:1044-1050.
93. Lazarus B, Messine A, Barker J.E, Hurley J.V, Rpmo R, Morrisone W.A, Knight K.R. The role of mast cell in ischaemia-reperfusion injury in murine skeletal muscle. Journal of pathology. 2000;191:443-448
94. Mukundan C, Gurish M. F, Austen K. F, Hechtman H. B.and Daniel S. F. Mast Cell Mediation of Muscle and Pulmonary Injury Following Hindlimb Ischemia–Reperfusion The Journal of Histochemistry & Cytochemistry 2001;49(8):1055-1056
95. Stahl G. L, Xu Y, Hao L, Miller M, Buras J.A, Fung M, and Zhao H. Role for the Alternative Complement Pathway in Ischemia/Reperfusion Injury American Journal of Pathology 2003;162(2):449-455
96. Dong j, Pratt J. R, Smith R.A.G, Dodd I, Sacks S. H. Strategies for targeting complement inhibitors in ischaemia / reperfusion injury. Molecular Immunology 1999;36: 957-963

97. Lovett J. E, Fink B. F, Bernard A, Ochoa J. Analysis of nitric oxide activity in prevention of reperfusion injury *Ann Plast Surg.* 2001;46:269-274
98. Lepore D. A. Nitric Oxide Synthase-Independent Generation of Nitric Oxide in Muscle Ischemia-Reperfusion Injury. *Biology and Chemistry* 2000;4(6): 541–545
99. Kubes P, Granger D. N. Nitric oxide modulates microvascular permeability. *Am J Physiol* 1992; 262:61 1-615
100. Forstermann U, and Kleinert, H. Nitric oxide synthase: Expression and expressional control of the three isoforms. *Naunyn Schmiedeberg's Arch. Pharmacol.* 1995;352, 351–364.
101. Liu K, Chen L, Seaber A. V, urbaniak J.R.S-Nitroso-N-acetylcysteine protects skeletal muscle against reperfusion injury. *Microsurgery* 1998;18:299-305
102. Gaboury J.P, Niu X.F, Kubes P. Nitric Oxide Inhibits Numerous Features of Mast Cell–Induced Inflammation *Circulation.* 1996;93:318-326.
103. Menger M.D, Rucker M, Vollmar B. Capillary dysfunction in striated muscle: Ischemia reperfusion on the mechanisms of “no re-flow.” *Shock* 1997;8:2–7.
104. Tiwari A, Hag A.I, Myint F and Hamilton G. Acute compartment syndromes. *British Journal of Surgery* 2002;89:397-412
105. Terada L.S, Dormish J.J, Shanley P.F, Leff J.A, Anderson B.O, Repine J.E. Circulation xanthine oxidase mediates lung neutrophil sequestration after intestinal ischemia±reperfusion. *Am J Physiol* 1992; 263:394-401.
106. Vega V.L, Mardones L, Maldonado M, Nicovani S, Manriquez V, Roa J. Xanthine oxidase released from reperfused hind limbs mediate kupffer cell activation, neutrophil sequestration, and hepatic oxidative stress in rats subjected to tourniquet shock. *Shock.* 2000;14(5):565-71
107. Xiao F, Eppihimer M.J, Young J.A, Nguyen K, Carden D.L. Lung neutrophil retention and injury following intestinal ischemia-reperfusion. *Microcirculation* 1997; 4: 359-367
108. B. Öcal, yıldız E, Katrancıoğlu N, Günay İ. Alt ekstremitte iskemi reperfüzyona bağlı gelişen akciğer hasrında askorbik asitin etkisi. *Turkish J Thorac cardiovasc Surg* 2000;9:238-241
109. Yasin M.M.I, Harkin D.W, Barros D'Sa A.A.B, Halliday MI, Rowlands B.J lower limb ischemia-reperfusion injury triggers a systemic inflammatory response and multiple organ dysfunction *World J. Surgery* 2002;26:115-121)

110. Barry M.C, Kelly C, Burke P, Sheehan S, Redmond H.P, Bouchier-Hayes D. Immunological and physiological responses to aortic surgery: effect of reperfusion on neutrophil and monocyte activation and pulmonary function. *Br J Surg* 1997;84: 513-519.
111. Akar H, Saraç A, Konuralp C, Yıldız L, Kolbakır F. Comparison of histopathologic effects of carnitine and ascorbic acid reperfusion injury. *European Journal of Cardio-thoracic Surgery* 2001;19:500-506
112. Nukada H, McMorran PD, Shimizu J. Acute inflammatory demyelination in reperfusion nerve injury. *Ann Neurol* 2000;47:71-79
113. Hobson II RW, Milazzo V.J, Duran W.N. Pathophysiology of skeletal muscle ischemia - reperfusion injury. In Haimovici H ed. *Vascular Surgery* New York:Blackwell Science, 1996:497-508
114. Hascalik S, Celik O, Turkoz Y, Hascalik M, Cigremis Y, Mizrak B, Yologlu S. Resveratrol, a red wine constituent polyphenol, protects from ischemia-reperfusion damage of the ovaries. *Gynecol Obstet Invest.* 2004;57(4):218-23
115. Cuzzocrea S, Reiter R.J. Pharmacological action of melatonin in shock, inflammation and ischemia-reperfusion injury *European Journal of Pharmacology* 2001;426: 1-10
116. Donna L. Carden and D. Neil Granger. Pathophysiology of ischaemia-reperfusion injury *J Pathol* 2000; 190: 255-266.
117. Özyurt H, Irmak M.K, Akyol Ö, Söğüt S. Caffeic acid phenethyl ester changes the indices of oxidative stress in serum of rats with renal ischaemia-reperfusion injury. *Cell Biochemistry and function* 2001;19:259-263
118. Mateo A.O, Artinano M.A.A. Nitric oxide reactivity and mechanisms involved in its biological effects. *Pharmacological Research* 2000;42(5):421-427
119. Appel H. J, Duarte J.A, Carvalho F, Bstos M.L. Administration of tourniquet II. Prevention of postischemic oxidative stress can reduce muscle edema. *Archives of Orthopaedic and Trauma Surgery* 1996;116:101-105
120. Saba D, Yavuz H, Şenkaya I, Ağrıç M, Dirican M, Öztürk H. Kalsiyum dobesilatın iskelet kası iskemi-reperfüzyon hasarındaki rolü. *Turkish J Thorac and Cardiovasc surg.* 2000;8:797-801
121. Hardy S.C, Gough MJ. Pharmacological manipulation of gastrocnemius muscle blood flow in an animal model of reperfusion injury. *J Biomed Eng* 1991;13:263-6
122. Lijun Z, Yaotian H. Study of L-arginine-nitric oxide pathway in ischemia-reperfusion injured limbs in rats *Chin J Traumatol.* 2002;5(1):51-54

123. Köksal C, Bozkurt A.K, Cangel U, Üstundağ N, Konukoğlu D. Atenuation of ischemia-reperfusion injury by N-acetylcysteine in a rat hind limb model *Journal of Surgical Research* 2003;111:236-239
124. Saray A, Can B, Akbıyık F, and Askar İ. İschæmia-reperfusion injury of the peripheral nevre:an experimental sduy *Microsurgey* 19:374–380 1999
125. Rossi A, Lingresti A, Longo R, Russo A ve Sautebin L. The inhibitory effect of propolis and caffeic acid phetethyl ester on cyclooxygenase in J774 macrofages. *Phytomedicine* 2002;9:530-535
126. Matsushige K, Basnet P, Kadota S. Potent free radical scavenging activity of dicaffeoyl quinic acid derivatives from propolis. *J Trad Med.* 1996;13:217-228.
127. İlhan A, Koltuksuz U, Ozen S, Uz E, Ciralik H, Akyol O. The effects of caffeic acid phenethyl ester (CAPE) on spinal cord ischemia/reperfusion injury in rabbits. *Eur J Cardio-Vascular Surg* 1999;16:458-463.
128. M. Kemal Irmak M.K, Fadillioglu E, Sogut S, Erdogan H, Gulec M, Ozer M, Yagmurca M and Gozukara M.E. Effects of caffeic acid phenethyl ester and alpha-tocopherol on reperfusion injury in rat brain *Cell Biochem Funct* 2003; 21: 283–289
129. Özen S, Akyol Ö, Iraz M, Sögüt S, Özugurlu F, Özyurt H, Odacı E. and Yıldırım Z. Role of Caffeic Acid Phenethyl Ester, an Active Component of Propolis, against Cisplatin-induced Nephrotoxicity in Rats *J. Appl. Toxicol.* 24, 27–35 (2004))
130. Koltuksuz U, Irmak M.K, Karaman A, Uz E, Var A, Özyurt H, Akyol Ö. Testicular nitric oxide levels after unilateral testicular torsion/detorsion in rats pretreated with caffeic acid phenethyl ester. *Urol Res* 2000;28:360-363
131. Zhang L, Looney C.G, Qi W.N , Chen L.E, Seaber A.V, Stamler J.S, and Urbaniak J.R. Reperfusion injury is reduced in skeletal muscle by inhibition of inducible nitric oxide synthase *J Appl Physiol* 2003; 94: 1473–1478
132. Kashimoto S, Kume M, Ikeya K, Ishiyama T, Kumazawa T. Effects of melatonin and superoxide dismutase on free radical formation in the postischemic reperfusion heart.*J.Anesth* 1999;13:23-28
133. Pieri C, Moroni M, Marcheselli F, Recchioni R. Melatonin is an efficient antioxidant. *Arch Gerontol Geriatr* 1995;20:159–65.
134. Gilad E, Cuzzocrea S, Zingarelli B, Salzman A.L. and Szabó C. Melatonin is a scavenger of peroxy nitrite. *Life Sci* 1997;60(10):169
135. Mohan N, Sadeghi K, Reiter R.J, Meltz M.L. The neurohormone melatonin inhibits cytokine, mitogen and ionizing radiation induced NF-kappa B. *Biochem. Mol. Biol. Int.* 1995;37:1063–1070.

136. Cuzzocrea S, Reiter R.J. Pharmacological action of melatonin in shock, inflammation and ischemiarreperfusion injury *European Journal of Pharmacology* 426 2001 1–10
137. Lezovalc'h F, Szaropani M, Behl C. N-acetyl-serotonin (nor-melatonin) and melatonin protect neurons against oxidative challenges and suppresses the activity of the transcription factor NF kappa B activation. *FASEB J* 1998;12:685–693
138. Rodriquez C, Mayo JC, Sainz RM, Antolin I, Herrera F, Martin V, Reiter RJ. (2004) Regulation of antioxidant enzymes: A significant role for melatonin. *J Pineal Res.*; in press.
139. Mayo J.C, Sainz R.M, Antolin I, Herrera F, Martin V, Rodriquez C. Melatonin regulation of antioxidant enzyme gene expression. *Cell Mol Life Sci.* 2002; 59: 1706–13
140. Pellegatta F, Berteli A.A.E, Staels B, Duhem C, Fulgenzi A, and Elena M Ferrero Different short- and long-term effects of resveratrol on nuclear factor-B phosphorylation and nuclear appearance in human endothelial cells *Am J Clin Nutr* 2003;77:1220–1228
141. Subbaramaiah K, Chung W.J, Michaluarti P, Telang N, Tanabe T, Inoue H, Jang M, Pezzuto.J.M, and Dannenberg A.J. Resveratrol Inhibits Cyclooxygenase-2 Transcription and Activity in Phorbol Ester-treated Human Mammary Epithelial Cells *The Journal of Biological Chemistry* 1998;273(34): 21875–21882
142. Maccarronei M , Lorenzon1 T, Guerrieri1 P. and Agro A.F. Resveratrol prevents apoptosis in K562 cells by inhibiting lipoxigenase and cyclooxygenase activity. *Eur. J. Biochem.* 1999;265: 27-34
143. Hung L, Su M.J, and Chen J.K Resveratrol protects myocardial ischemia-reperfusion injury through both NO-dependent and NO-independent. *Free Radical Biology & Medicine* 2004;36(6):774-781
144. Olas B, Wachowicz. Resveratrol and vitamin C as antioxidants in blood platelets. *Trombosis research* 2002;106:143-148)
145. Martinez J, Moreno JJ. Effect of resveratrol, a natural polyphenolic compound, on reactive oxygen species and prostaglandin production. *Biochem Pharmacol* 2000;59:865–70.