

**T.C.
GAZİ ÜNİVERSİTESİ TIP FAKÜLTESİ
KALP VE DAMAR CERRAHİSİ ANABİLİM DALI**

**BACOPA MONNIERİ EKSTRAKT TEDAVİSİNİN
AKUT ALT EKSTREMİTE
İSKEMİ REPERFÜZYON HASARI ÜZERİNE ETKİSİ**

**UZMANLIK TEZİ
Dr. HİLAL ÖZLÜ**

**TEZ DANIŞMANI
Prof. Dr. GÜRSEL LEVENT OKTAR**

**ANKARA
AĞUSTOS 2018**

**T.C.
GAZİ ÜNİVERSİTESİ TIP FAKÜLTESİ
KALP VE DAMAR CERRAHİSİ ANABİLİM DALI**

**BACOPA MONNIERİ EKSTRAKT TEDAVİSİNİN
AKUT ALT EKSTREMİTE İSKEMİ REPERFÜZYON HASARI
ÜZERİNE ETKİSİ**

**UZMANLIK TEZİ
Dr. HİLAL ÖZLÜ**

**TEZ DANIŞMANI
Prof. Dr. GÜRSEL LEVENT OKTAR**

Bu tez Gazi Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi tarafından
01/2018-2 proje numarası ile desteklenmiştir.

**ANKARA
AĞUSTOS 2018**

TEŞEKKÜR

Kalp ve Damar Cerrahisi Uzmanlık eğitimim süresince iyi bir cerrah olabilmem ve insanlığa fayda sağlayabilmem adına bilgi ve tecrübeleriyle yol gösteren, sahip oldukları bilgi ve deneyim ile sağladıkları tüm katkılardan dolayı en başta tez danışmanım Prof. Dr. G. Levent OKTAR olmak üzere Prof. Dr. Levent GÖKGÖZ, Prof. Dr. Halim SONCUL, Prof. Dr. Volkan SİNCİ, Prof. Dr. Erkan İRİZ, Prof. Dr. Dilek ERER, Doç. Dr. Tolga TATAR, Doç. Dr. Mustafa Hakan ZOR, Doç. Dr. Hikmet Selçuk GEDİK ve Uzm. Dr. Abdullah ÖZER'e;

Kalp ve Damar Cerrahisi gibi yardımımızı bekleyen kritik ve zor hastalarımızın yoğun olduğu bölümümüzde günün her anı fedakarlıklarını esirgemeyen ve hastalarımıza yardım adına ekip olabilmeyi başarabildiğimiz tüm mesai arkadaşlarıma;

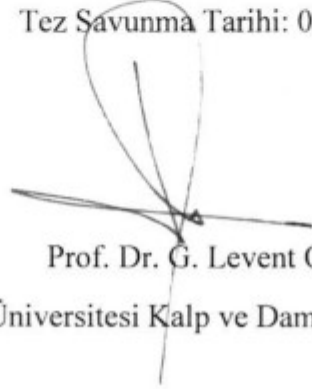
Tez çalışmam süresince sağladıkları tüm destekler için Prof. Dr. Çimen KARASU, Prof. Dr. Gülnur TAKE KAPLANOĞLU, Zübeyir ELMAZOĞLU, Ayşe ÇAKIR GÜNDOĞDU, Dr. Demet KASIM BAL ve tüm Farmakoloji Bölümü asistan arkadaşlarıma;

Hayatımın her anını bana kazandırdıkları değerleri dünyaya kazandırabilme çabasıyla doldurarak kendilerine layık olmaya çalıştığım Sevgili Annem Neriman ÖZLÜ, Sevgili Babam Cemal ÖZLÜ ve Sevgili Abim Kemal ÖZLÜ'ye sonsuz teşekkür ederim.

T.C.
GAZİ ÜNİVERSİTESİ
TIP FAKÜLTESİ

Kalp ve Damar Cerrahisi Anabilim Dalı Uzmanlık Programı çerçevesinde yürütölmüş olan bu çalışma aşağıdaki jüri tarafından Uzmanlık Tezi olarak kabul edilmiştir.

Tez Savunma Tarihi: 03/09/2018



Prof. Dr. G. Levent OKTAR

Gazi Üniversitesi Kalp ve Damar Cerrahisi ABD

Prof. Dr. Erkan IRİZ
T.C. GÜTF Gazi Hastanesi
Kalp ve Damar Cerrahisi
Doğru 1383, Etiler No. 73591



Başkent Üniversitesi Hastanesi
Prof. Dr. Hakkı Tamer AKAY
Dip. Tes. No 93297
Kalp Damar Cerrahisi ABD



Başkent
Prof.
Kalp

İÇİNDEKİLER

KISALTMALAR ve SİMGELER

ŞEKİLLER ve TABLOLAR

GRAFİKLER

RESİMLER

1. GİRİŞ ve AMAÇ ... 1

2. GENEL BİLGİLER ... 4

2.1. Tanımlar ... 4

2.2. İskemi Reperfüzyon Hasarının Komponentleri ... 6

2.2.1. İskemi Hasarı ... 6

2.2.2. Reperfüzyon Hasarı ... 9

2.3. İskemi Reperfüzyon Hasarı Mekanizması ... 11

2.3.1. Serbest Radikaller ... 11

2.3.2. Polimorf Nüveli Lökositler ... 17

2.3.3. Kompleman Sistemi ... 17

2.3.4. Endotel ... 18

2.4. Vasküler Cerrahi Alanında İskemi Reperfüzyon ... 19

2.5. Antioksidanlar ... 24

2.5.1. Süperoksit Dismutaz (SOD) ...	24
2.5.2. Katalaz (KAT) ...	25
2.5.3. Glutasyon Peroksidaz (GSH-Px) ...	25
2.5.4. Glutasyon-S Transferaz (GST) ...	26
2.5.5. Glutasyon Redüktaz ...	26
2.5.6. Mitokondriyal Sitokrom Oksidaz ...	26
2.5.7. Malondialdehit (MDA) ...	26
2.6. Bacopa Monnieri ...	27
3. GEREÇ ve YÖNTEM ...	29
3.1. Çalışma Dizaynı ...	30
3.2. Aortik Oklüzyon ve İskemi-Reperfüzyon Protokolü ...	31
3.3. ELISA Analizleri ...	34
3.3.1. İntrinsik Antioksidan Enzimler Üzerine Olan Etkisi ...	34
3.3.1.1. Katalaz (KAT) Aktivitesi ...	34
3.3.1.2. Glutasyon Peroksidaz (GPx) Aktivitesi ...	35
3.3.2. Nitrozatif Stres ve İnflamatuvar Belirteçler Üzerine Olan Etkisi ...	36
3.3.2.1. 3- Nitrotirozin (3-NT) Düzeylerinin Belirlenmesi	

3.3.2.2. iNOS Düzeylerinin Belirlenmesi ...	36
3.3.2.3. IL-1 beta Düzeylerinin Belirlenmesi ...	37
3.3.2.4. TNF alfa Düzeylerinin Belirlenmesi ...	37
3.4. İmmünohistokimyasal Değerlendirme ...	38
3.4.1. Hematoksilen-Eozin Boyama Yöntemi ...	38
3.4.2. TUNEL Yöntemi ...	39
3.5. İstatistiksel Analiz ...	40
4. BULGULAR ...	41
4.1. ELISA Analizleri	
4.1.1. İntrinsik Antioksidan Enzimler �zerine Olan Etkisi	
4.1.1.1. Katalaz (KAT) Aktivitesi	
4.1.1.2. Glutasyon Peroksidaz (GPx) Aktivitesi ...	43
4.1.2. Nitrozatif Stres ve İnflamatuvar Belirteçler �zerine Olan Etkisi ...	45
4.1.2.1. 3- Nitrotirozin (3-NT) Düzeylerinin Belirlenmesi	
4.1.2.2. iNOS Düzeylerinin Belirlenmesi ...	47
4.1.2.3. IL-1 beta Düzeylerinin Belirlenmesi ...	49
4.1.2.4. TNF alfa Düzeylerinin Belirlenmesi ...	51

4.2. İmmünohistokimyasal Değerlendirme ... 53

4.2.1. Hematoksilen-Eozin Boyama Yöntemi ile Değerlendirme

4.2.2. TUNEL Yöntemi ile Değerlendirme ... 74

5. TARTIŞMA ... 90

6. SONUÇ ... 96

7. KAYNAKLAR ...97

8. ÖZET ... 106

9. SUMMARY ... 107

10. EKLER ... 108

11. ÖZGEÇMİŞ ... 109

KISALTMALAR VE SİMGELER

İskemi-Reperfüzyon (İ/R)

Bacopa Monnieri (B. monnieri)

Serbest oksijen radikalleri (SOR)

Adenin trifosfat (ATP)

İmmünglobulin M (IgM)

Mitokondriyal membran permeabilite tranzisyon por (MPTP)

Hidrojen iyonu (H⁺)

Sodyum-Kotasyum ATPaz (Na-K ATPaz)

Sodyum (Na⁺)

Kalsiyum iyonu (Ca²⁺)

Nükleer faktör-kappa B (NF- κ B)

Hücreler arası adezyon molekülü-1 (ICAM-1)

Endoteliyal lökosit adezyon molekülü (E selektin)

Nitrik oksit (NO)

Platelet Aktive Edici Faktör (PAF)

Deoksiribonükleik asit (DNA)

Akut solunum sıkıntısı sendromu (ARDS)

Elektron taşıma zinciri (ETZ)

İndirgenmiş nikotinamid adenin dinükleotidi (NADH)

Su (H₂O)

Hidroksil radikali (OH⁻)

Süperoksit radikali (O₂⁻)

Oksijen (O₂)

Hidrojen peroksit (H₂O₂)

Hidroperoksil (HO₂⁻)

Nitrik oksit sentetaz (NOS)

İndüklenebilir NOS (iNOS)

Kompleman (C)

Tümör nekrozis faktör alfa (TNF- α)

İnterlökin-1 (IL-1)

Makrofaj inflamatuvar protein (MIP)

Monosit kemoatraktan protein (MCP)-1

Tromboksan A₂ (TxA₂)

Endotelin (ET)

Potasyum (K⁺)

Lökotriyen B4 (LTB4)

Akut böbrek yetmezliği (ABY)

Süperoksit Dismutaz (SOD)

Katalaz (KAT)

Glutasyon Peroksidaz (GSH-Px)

Glutasyon-S transferaz (GST)

Malondialdehit (MDA)

tiyobarbitürik asit reaktif substans (TBARS)

3- Nitrotirozin (3-NT)

ŞEKİLLER ve TABLOLAR

Şekil 1. İskemi Hasarı.....	7
Şekil 2. Reperfüzyon Hasarı.....	10
Tablo 1. Serbest Radikal Türleri.....	13

GRAFİKLER

Grafik-1. Katalaz Aktivitesi Analizi.....	42
Grafik-2. Glutasyon Peroksidaz Aktivitesi Analizi.....	44
Grafik-3. 3-Nitrotirozin Düzeylerinin Analizi.....	46
Grafik-4. İndüklenebilir Nitrik Oksit Sentaz Düzeylerinin Analizi.....	47
Grafik-5. İnterlökin-1 Beta Düzeylerinin Analizi.....	50
Grafik-6. Tümör Nekrozis Faktör-Alfa Düzeylerinin Analizi.....	52

RESİMLER

- Resim-1.** Bacopa Monnieri Bitkisi ... 27
- Resim 2.** Rat cerrahi pozisyonu ... 33
- Resim 3.** Rat Cerrahi prosedür ... 34
- Resim 4.** Sham Kontrol Grubu Kas Doku H&E ... 53
- Resim 5.** Bacopa Kontrol Grubu Kas Doku H&E ... 54
- Resim 6.** İ/R Grubu Kas Doku H&E ... 55
- Resim 7.** Bacopa-İ/R Grubu Kas Doku H&E ... 56
- Resim 8.** Sham Kontrol Grubu Böbrek Korteks Dokusu H&E ... 58
- Resim 9.** Sham Kontrol Grubu Böbrek Medulla Dokusu H&E ... 59
- Resim 10.** Bacopa Grubu Böbrek Korteks Dokusu H&E ... 61
- Resim 11.** Bacopa Grubu Böbrek Medulla Dokusu H&E ... 62
- Resim 12.** İ/R Grubuna Böbrek Korteks Dokusu H&E ... 64
- Resim 13.** İ/R Grubu Böbrek Medulla Dokusu H&E ... 65
- Resim 14.** Bacopa-İ/R Grubu Böbrek Korteks Dokusu H&E ... 67
- Resim 15.** Bacopa-İ/R Grubu Böbrek Medulla Dokusu H&E ... 68
- Resim 16.** Sham Kontrol Grubu Akciğer Doku H&E 70
- Resim 17.** Bacopa Grubu Akciğer Dokusu H&E 71
- Resim 18.** İ/R Grubu Akciğer Dokusu H&E 72
- Resim 19.** Bacopa-İ/R Grubu Akciğer Dokusu H&E ... 73
- Resim 20.** Sham Kontrol Grubu Kas Dokusu TUNEL ... 75
- Resim 21.** Bacopa Grubu Kas Dokusu TUNEL ... 76

- Resim 22.** İ/R Grubu Kas Dokusu TUNEL ... 77
- Resim 23.** Bacopa-İ/R Grubu Kas Dokusu TUNEL ... 78
- Resim 24.** Sham Kontrol Grubu Böbrek Dokusu TUNEL ... 80
- Resim 25.** Bacopa Grubu Böbrek Dokusu TUNEL ... 81
- Resim 26.** İ/R Grubu Böbrek Dokusu TUNEL ... 82
- Resim 27.** Bacopa-İ/R Grubu Böbrek Dokusu TUNEL ... 83
- Resim 28.** Sham Kontrol Grubu Akciğer Dokusu TUNEL 85
- Resim 29.** Bacopa Grubu Akciğer Dokusu TUNEL 86
- Resim 30.** İ/R Grubu Akciğer Dokusu TUNEL 87
- Resim 31.** Bacopa-İ/R Grubu Akciğer Dokusu TUNEL ... 88

1. GİRİŞ VE AMAÇ

Bilimsel çalışmamızın temeli şiddetli akut iskeminin ve bunu takiben iskemik dokudaki akut reperfüzyonun vücudun diğer organlarındaki etkisinin patofizyolojisini araştırma üzerine kurulmuştur.

İskemi-reperfüzyon (İ/R), etkilenen dokularda metabolik, trombotik ve inflamatuvar değişiklikler ile sonuçlanan hücre içi ve hücre dışı yolları içeren karmaşık bir patolojik süreçtir.

İ/R, hücrenin metabolizması devam ettirebilmek için gerekli maddeleri hücreye alınmasını ve metabolik süreç sonunda oluşan atıkların hücreden uzaklaştırılmasını sağlayacak fizyolojik yapının bozulmasına sebebiyet veren tüm durumlarda iyileşme oranını belirleyen önemli bir patolojidir. Bu durumun sebepleri arasında ateroskleroz, tromboz, hipovolemik şok, travma, kardiyopulmoner arrest gibi perfüzyonun kesilmesine ya da kritik düzeyde azalmasına neden olan patolojiler ile birlikte kalp cerrahisi, rekonstrüksiyon cerrahisi, ortopedik cerrahi, transplantasyon cerrahisi, vasküler cerrahi gibi kan dolaşımının belli bir süre durdurulmasını mecbur kılan cerrahi prosedürler de olabilmektedir (1, 2). Tüm bu klinik tablolardaki tedavi başarısı İ/R patofizyolojisinin anlaşılabilir hasarın önlenmesine bağlıdır. Bu durum İ/R yaralanmasının doğasını anlama ve etkilerini önleme veya iyileştirme tedavileri geliştirme konusunda sürekli bir ilgi doğmasına sebep olmuştur. Kan akışı tekrar sağlanmazsa sonuçta iskemik hücreler ölür, ancak aynı zamanda bu süreç reperfüzyon sırasındaki hasarın da çoğunun başlangıcı olur. Böylece, paradoksal

olarak, iskemi tedavi etmek için gerekli terapötik müdahale, reperfüzyon doku patofizyolojisini başlatır (3).

I / R hasarının bir sonucu olarak ortaya çıkan hücresel hasar, insanlar, deney hayvanları ve hücre kültürü sistemlerinde yoğun olarak çalışılmıştır. Akut iskemik olayların başlıca tedavisi mekanik ve / veya farmakolojik (trombolitik) müdahale ile hızlı reperfüzyon sağlanmasıdır. Bugüne kadar, çok az insan çalışmasında reperfüzyona yardımcı olarak uygulanan bir farmakolojik maddenin I / R hasarını azaltabileceğine dair kanıt sağlanmıştır.

Bacopa Monnieri (B. monnieri), deneysel çalışmalarda kardiyoprotektif, antihipertansif, antioksidan, anti-aging, anti-inflamatuvar, hepatoprotektif, nefroprotektif etkilerinin olduğuna dair bulgular elde edilmiş olan geleneksel Hint tıbbında (Ayurveda) kullanılan bir bitkidir (4).

Bu çalışmanın amacı akut iskemi devamında akut reperfüzyon patofizyolojisinin aydınlatılarak oluşan doku hasarı için tedavi olanakları oluşturmaktır. Dokuda iskemi reperfüzyon hasarı patolojisini anlamak ve tedavi olanakları oluşturmak ateroskleroz ve travmatik arter yaralanması gibi dokuda iskemi oluşmasına sebebiyet veren hastalıkların morbidite ve mortalite oranlarını düşürecektir. Aynı zamanda vasküler cerrahi prosedürlerin uygulanma sürecinde de zorunlu olarak oluşturulan doku iskemisinin tedavi başarısında klinik önemi söz konusudur.

Deneysel hayvan çalışmamız B. Monnieri ekstraktının kullanımının iskemi reperfüzyon hasarını önleyici veya tedavi edici olması hipotezi üzerine planlanmıştır.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. Tanımlar

İ/R hasarı, bir dokuya verilen kan miktarı dakika ila saat boyunca bloke edildiğinde (iskemi) ve daha sonra onarıldığında (reperfüzyon) oluşur (5). İ/R, etkilenen dokularda metabolik, trombotik ve inflamatuvar değişiklikler ile sonuçlanan hücre içi ve hücre dışı yolakları içeren karmaşık bir patolojik süreçtir.

Ekstrem İ/R 'nin yayınlanmış ilk klinik gözlemlerinden biri olan akut iskemi sonrası revaskülarizasyon uygulanan hastalarda palpabl nabızların varlığında devam eden alt ekstremitte kas nekrozu ve miyoglobin kaynaklı böbrek yetmezliği kliniği şeklinde ortaya çıkan myonefropatik sendrom, 1950' li yılların sonlarında Haimovici tarafından tanımlanmıştır (6). Cerra ve arkadaşları tarafından 1975' te yapılan deneysel hayvan modelinde saptanan reperfüzyon patolojisi, insanlarda gelişen klinik ile korelasyon göstermiştir. Köpek miyokardının histolojik değerlendirmesi sonucunda, subendotelyal hemorajik nekroz gelişiminin kan akışının restorasyonunun ile ilişkili olduğunu saptanmıştır (7). Aort kapak replasmanı operasyonu sonrası ölen hastaların tıbbi kayıtlarının ve otopsi dokularının değerlendirmesi sonucunda subendotelyal hemorajik nekroz patolojisinin 70 dakikadan fazla kardiyopulmoner bypassa maruz kalan bireylerde geliştiği gösterilmiştir. Bu bulgular kalp ameliyatları için kardiyopulmoner baypasa alınan hastalarda ölüm nedeni olarak reperfüzyon hasarı ile ilişkili bulunmuştur (8).

İskemik süreç devamında kan akışı tekrar sağlanamazsa sonuçta iskemik hücreler ölür, ancak aynı zamanda bu süreç reperfüzyon sırasındaki hasarın da çoğunun başlangıcı olur. Böylece, paradoksal olarak, iskemiyi tedavi etmek için gerekli terapötik müdahale, reperfüzyon doku patofizyolojisini başlatır (9). Reperfüzyon hasarı nasıl meydana gelir? Muhtemel cevap, zararlı süreçlerin reperfüzyon sırasında harekete geçirilmesi ve iyileşmiş olabilecek hücrelerin ölmesine neden olmasıdır. Bununla ilgili birkaç mekanizma öne sürülmüştür:

- **Oksidatif stres:** Yeniden oksijenasyon sırasında reaktif oksijen ve azot türlerinin artan üretimi ile yeni hasar başlatılabilir. Bu serbest radikaller, hasar görmüş mitokondriler tarafından oksijenin eksik tamamlanmasının bir sonucu olarak ya da lökositler, endotel hücreleri veya parenkimal hücrelerdeki oksidazların etkisiyle reperfüzyonlu dokuda üretilebilir. İskemi, serbest radikallerin birikmesine sebep olarak hücrel antioksidan savunma mekanizmalarını tehdit edebilir.
- **Hücre içi kalsiyum aşırı yüklenmesi:** İntraselüler ve mitokondriyal kalsiyum aşırı yükü akut iskemi sırasında başlar; hücre zar hasarından kaynaklanan kalsiyum akışı ve serbest oksijen radikalleri (SOR) aracılı sarkoplazmik retikulum yaralanması nedeniyle reperfüzyon sırasında şiddetlenir. Kalsiyum aşırı yükü, sonuçta mitokondriyal gözeneklerin açılması ile adenin trifosfat (ATP) tükenmesine neden olur. Bu da daha fazla hücre yaralanmasına neden olur.
- **Enflamasyon:** İskemik hasar ölü hücrelerden salınan tehlike sinyallerinin sonucu olan enflamasyonla ilişkilidir. Makrofajlar gibi yerleşik immün hücreler

tarafından salgılanan sitokinler, hipoksik parankimal ve endotel hücreleri tarafından adezyon moleküllerinin ekspresyonunun artması sonucu dolaşımdaki nötrofillerin reperfüze dokuya çekimine ve enflamasyona sebep olur. Enflamasyon ise ek doku hasarına neden olur. Reperfüzyon hasarında nötrofil akınının önemi, sitokinler veya yapışma moleküllerini bloke eden ve dolayısıyla nötrofil ekstrasvazasyonu azaltacak antikorlarla yapılan tedavinin faydalı etkileri ile gösterilmiştir.

- **Kompleman sisteminin aktivasyonu:** Bazı immünglobulin M (IgM) antikorları, bilinmeyen nedenlerle iskemik dokularda tutulma eğilimi gösterir ve kan akışı yeniden başlatıldığında, tamamlayıcı proteinler birikmiş antikora bağlanır, etkinleştirilir ve daha fazla hücre yaralanmasına ve enflamasyona neden olur (10).

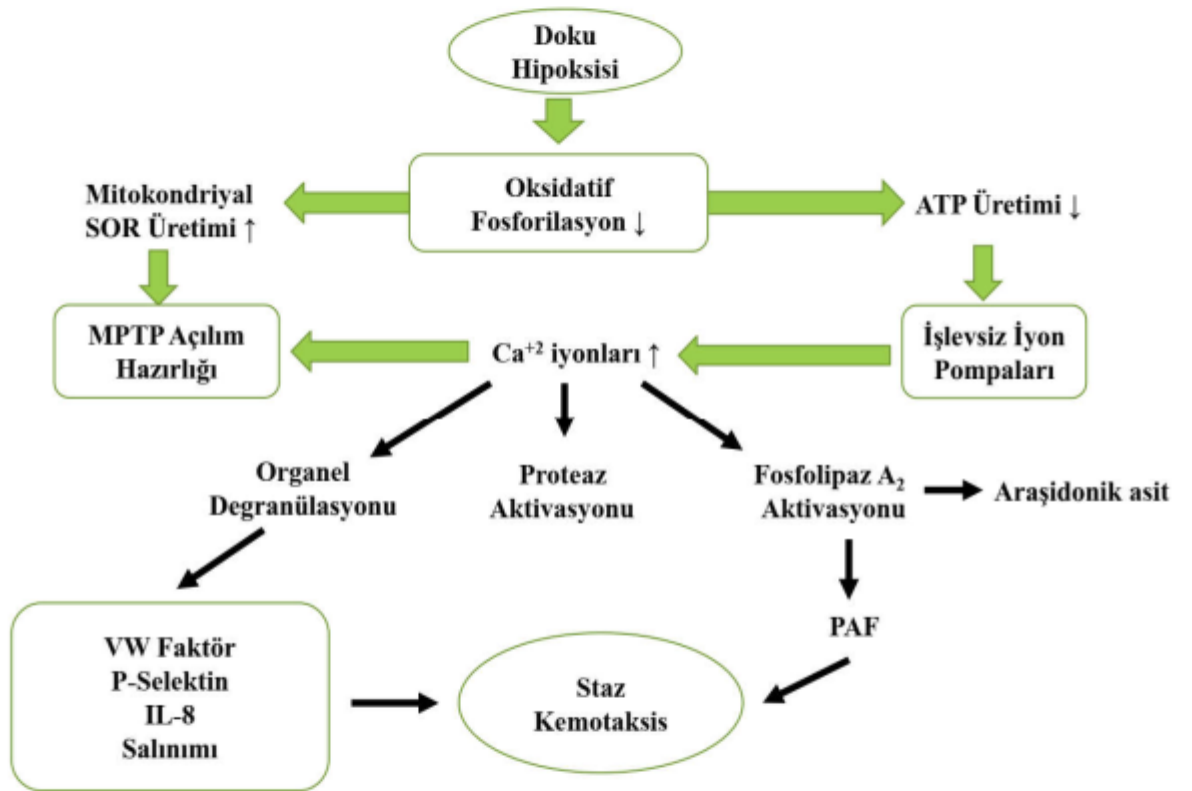
2.2. İskemi Reperfüzyon Hasarının Komponentleri

Biyokimyasal perspektiften I / R hasarını anlamak ve karakterize etmek için, bu süreci iki bileşenli iskemik yaralanma ve reperfüzyon hasarı açısından araştırmak yararlı olacaktır.

2.2.1. İskemi Hasarı

I / R hasarının iskemik fazında hasar doku hipoksisi kaynaklıdır. Çeşitli organlardan alınan dokuların iskemi sürecini tolere edebilme kapasitesi, her

dokunun temel metabolik talebine bağlıdır. Normotermik koşullar altında insan iskeleti kası iskemiye 2 saatten fazla tolere edebilirken, jejunum dokusunda 30 dakika iskemi sonrası iskemik hasarın histolojik kanıtları gelişmiş olur (11).



Şekil 1. İskemi Hasarı. Azalmış oksijen sunumu metabolik, inflamatuvar ve protrombotik kompleks kaskadı aktive eder ve reperfüzyon sırasında MPTP açılmasının koşullarını hazırlar. ATP, Adenozin trifosfat; MPTP, mitokondriyal membran permeabilite tranzisyon por; SOR, serbest oksijen radikali.

İskemi devamında gelişen hipoksi ile aerobik metabolizma durur (Şekil 1). Bu süreçte öncelikle mitokondrideki oksidatif fosforilasyon engellenmesi nedeniyle ATP, kreatin gibi yüksek enerjili fosfat depoları azalır (12). Mevcut ATP sırasıyla adenzindifosfat, adenzinmonofosfat, inozin ve hipoksantin'e yıkılır. Oluşan ve biriken bu metabolitler fosfofruktokinaz enzimini uyarır. Hücrel metabolizmanın anaerobik yöne kaymasına neden olur. Aerobik metabolizmanın durması devamında ön plana geçen anaerobik glikoliz sonucu oluşan laktik asit ve hasarlanmış lizozomlardan salınan hidrojen iyonu (H^+) nedeniyle hücre içi pH düşer. ATP azalması, hücre zarında aktif sodyum-potasyum ATPaz (Na-K ATPaz) pompasında inhibisyona neden olur. Solid madde birikimine izosmotik su birikimi eşlik eder ve hücrel şişme meydana gelir. Artan glikoliz aktivitesi ile redüksiyon sistemleri aktive olur. Hücre içi sodyum (Na^+) artması sonucu kalsiyum iyonu (Ca^{2+}) artar (13). Hücre içinde Ca^{2+} artışı fosfolipazlar (fosfolipaz A₂), proteazlar (kalpainler) ve endonükleazlar gibi enzimleri aktive eder. Membran fosfolipidleri fosfolipaz enzimi ile parçalanır. Başlayan katabolik süreçte membran ve hücre iskelet proteinleri stimüle olmuş proteaz enzim ile yıkılır. Endonükleaz enzim aktivitesinin artması ise nükleer kromatin hasarının meydana gelmesine neden olur. Tüm bu olaylar sonucunda plazma membran permeabilitesi ve mitokondri permeabilitesi artar ve membran potansiyeli kaybolur. Neticede anoksik hasar devamında nekrotik hücre ölümü gerçekleşir (14).

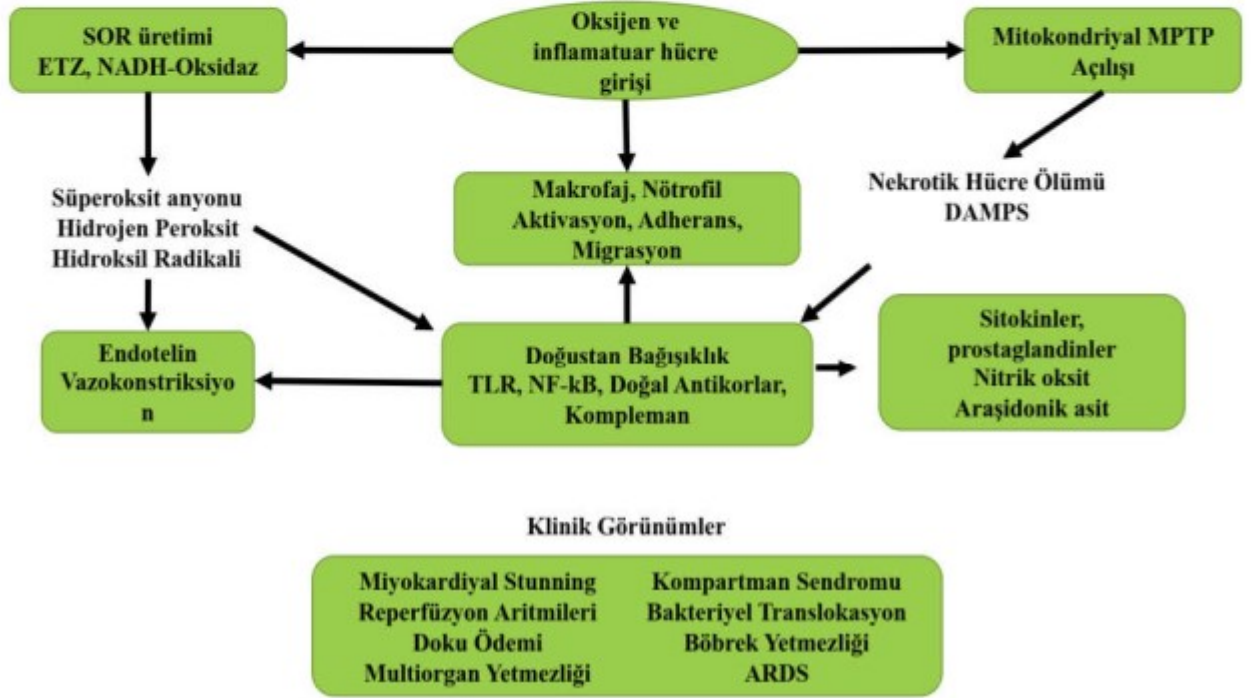
İskemi sürecinde dokuda birçok mekanizma daha aktive olur. Nükleer faktör-kappa B (NF- κ B) aktive olur ve iltihabi araçlar ile adezyon moleküllerinin özellikle hücreler arası adezyon molekülü-1 (ICAM-1) ve endotelial lökosit

adezyon molekülü (E selektin) sentezinde artışa neden olur. Adezyon moleküllerindeki artış ile iltihabi iskemik bölge, lökosit adezyonunu artırır. Oksijen, nitrik oksit (NO) sentezi için de gerekli olup, iskemik dokuda NO seviyesinde azalma görülür. Endotelin sentezlediği NO inaktivasyonu vazokonstriksiyona sebebiyet verir. Araşidonik asit kaskadında denge prostasiklin aleyhine çevrilir ve sonucunda hem vazokonstriksiyon hem de platelet aktivasyonu gerçekleşir. Kompleman sisteminin aktive olması ve Platelet Aktive Edici Faktör (PAF) sentez artışı ile oluşan patolojik tablo dokunun reperfüzyon hasarına karşı daha hassas bir duruma gelmesine neden olur. Perfüzyonun düzelmesi bu süreci geri döndürebilir. Ancak iskeminin devamı durumunda geri dönüşümsüz zedelenme kaçınılmazdır (15).

2.2.2. Reperfüzyon Hasarı

İskemi sürecinden sonra tekrar kan akımı sağlandığında reperfüzyon hasarı dokuya verilen karmaşık bir yanıttır. Reperfüzyon hasarının metabolik, trombotik ve inflamatuvar komponentleri söz konusudur (Şekil 2).

Reperfüzyon sağlanması iskemik kalmış olan dokuda her zaman hasarın geri dönüşümü ile sonuçlanmayabilir hatta reperfüzyon, çok daha fazla hasar meydana getiren bir sürecin başlangıcı olabilir. Bu karmaşık patolojik sürecin açıklanması amacıyla çeşitli hipotezler geliştirilmiştir.



Şekil 2. Reperfüzyon Hasarı. Oksijenin dönüşü, enflamatuvar hücrelerin girişi ve metabolitlerin dağılması hücre ölümüne katkıda bulunur. Oluşan inflamatuvar ve protrombotik ortam doku hasarını şiddetlendirir. Reperfüzyon sırasında yaralanma. ARDS, akut solunum sıkıntısı sendromu; DAMPS, tehlikeyle ilişkili moleküler paternler; ETZ, elektron taşıma zinciri; MPTP, mitokondriyal membran permeabilite transport por; NADH, indirgenmiş nikotinamid adenin dinükleotidi; NF-κB, nükleer faktör kappa B; SOR, serbest oksijen radikali; TLR, toll benzeri reseptörler.

İskemi bazı hücrelerde hasara karşı duyarlılığa neden olabileceği ve reperfüzyon ile ortaya çıkan bazı zararlı etkenlerin bütünlüklerini kaybetmelerine neden olabileceği ileri sürülmüştür. Bu zararlı maddelerden en önemlilerinin endotel ve parankimal hücrelerden ve enflamasyon nedeniyle dokuya nüfuz etmiş nötrofillerden kaynaklanan SOR olduğu düşünülmüştür. SOR, lipid peroksidasyonu ile membranlara ve protein, DNA, mitokondrilere zarar verebilir. Bunun dışında hücre içinde masif Ca^{+2} birikiminin ve Ca^{+2} 'un özellikle mitokondrilere geçmesinin reperfüzyon hasarının ana patofizyolojisini oluşturduğu yönünde kanıtlar saptanmıştır. İskemi sürecinde dokuda biriken metabolik atıklar reperfüzyon ile sistemik dolaşıma katılarak uzak organ hasarına neden olurlar (16).

2.3. İskemi Reperfüzyon Hasarı Mekanizması

İ/R patofizyolojisinde sürecin bileşenleri şu şekilde gruplandırılabilir (17):

- Serbest oksijen radikalleri,
- Polimorf nüveli lökositler,
- Kompleman sistemi,
- Endotel hücreleri

2.3.1. Serbest Radikaller

Dış yürüncesinde bir ya da birden fazla eşlenmemiş elektron içeren atom ya da moleküllere verilen isimdir.

Serbest radikal oluşumu üç farklı yol ile olabilir (18):

1. Moleküle ait kovalent bağın homolitik yıkımı ile,
2. Bir molekülden tek elektronun kaybı veya bir molekülün heterolitik olarak bölünmesi ile,
3. Bir moleküle bir elektronun eklenmesi ile

Biyolojik sistemlerdeki serbest radikallerin en önemlileri oksijenden oluşmuş olanlardır (19). Serbest radikaller stabil değildirler ve ömürleri kısadır. Pozitif, negatif veya nötr elektriksel yüke sahip olabilirler. (14). Oksijen atomuna ait dış yörüngeyi oluşturan p orbitalinde iki adet elektronun eksik olması nedeniyle “diradikal” olarak değerlendirilir. Bu özelliği oksijenin diğer serbest radikallerle daha kolay reaksiyona girmesini sağlar. Radikal olmayan maddelerle ise yavaş reaksiyona girer. Metabolizmada oksijen, en son basamakta suya indirgenir. Oksijenin kısmen indirgenmesi ile reaktif oksijen radikalleri oluşur (20). Oksijen, kararsız yapısını daha kararlı hale getirebilmek için başka bir oksijen atomuna ait dış yörüngedeki iki elektronu ortaklaşa kullanır ve oksijen radikalleri oluşur (21).

SOR kısa ömürlüdürler ve güçlü oksidan etkileri vardır. Serbest radikaller fizyolojik şartlarda organizmada belirli oranlarda oluşmaktadır ve intrinsek mekanizmalar yardımı ile zararlı etkileri önlenir. Organizmada oluşan SOR endojen kaynaklı oksijen, NO, uyarılmış nötrofil, , endoplazmik retikulum, mitokondriyal elektron transport sistemi, plazma membranı ve peroksizom olarak sayılabilir (17).

SOR için en önemli kaynak aerobik canlılardaki moleküler oksijendir. O₂'nin %98'i normal metabolik süreçte suya (H₂O) indirgenmektedir. Yaklaşık

%2'lik kısım ise hidroksil (OH⁻) radikali ve süperoksit (O₂⁻) radikaline dönüşür. En önemli serbest oksijen radikalleri O₂⁻ ve OH⁻ anyonlarıdır (Tablo-1).

Tablo 1. Serbest Radikal Türleri

Oksijen kaynaklı radikaller		Oksijen kaynaklı olmayan radikaller
Potansiyel oksijen radikalleri	Reaktif oksijen türevleri	
Süperoksit radikali (O ₂ ⁻)	Singlet oksijen (¹ O ₂)	Karbon kaynaklı radikaller
Hidroksil radikali (HO ⁻)		Triklor metil (CCL)
	Hidrojen peroksit (H ₂ O ₂)	Sülfür kaynaklı radikaller
Peroksil radikali (ROO ⁻)		Thiyl (RS ⁻)
Nitrik oksit (NO)	Peroksinitrit (OONO ⁻)	Nitrojen kaynaklı radikaller
Alkoksil radikali (RO ⁻)		Fenildiazin (C ₆ H ₂ N:N)
		Geçiş metal kompleksleri
		Fe ⁺³ /Fe ⁺² , Cu ⁺³ /Cu ⁺²

SOR toksik etkileri şöyledir (22):

- Hücre membranına ve organellerine ait lipid ve protein yapısında bozulmaya neden olurlar.
- Hücre içinde bazı yararlı enzimlerin etkisizleştirilmesine neden olurlar.
- DNA'da hasar oluştururlar.
- Mitokondrilerdeki aerobik solunumun bozulmasına neden olurlar.
- Litik enzimler olan elastaz, proteaz, fosfolipaz, siklooksigenaz, lipoksigenaz, ksantinoksidaz, triptofan dioksigenaz, indolamin

dioksigenaz, galaktoz oksidaz enzimlerinin aktive olmasına neden olurlar.

- Hücrenin potasyum kaybının artmasına neden olurlar.
- Trombosit agregasyonunun artmasına neden olurlar.
- Dokulara fagosit göçünü kolaylaştırır.
- Ekstraselüler kollajen gibi doku komponentlerinin, savunma enzimlerinin ve transmitterlerin yıkılmasına neden olurlar.

Vücuttaki SOR kaynakları şöyledir (14, 22):

- Oksijenli solunum, katabolik ve anabolik normal fizyolojik süreç
- Stres faktörü ile stimüle olan katekolaminlerin artışı oksidasyonu fagositik inflamasyon hücrelerinden salgılanma (nötrofil, monosit, makrofaj, eozinofil, endotelial hücreler),
- Metabolik hastalıklar, yaşlanma süreci, sıcak şoku, güneş ışını, sigara,
- Oksidatif stres (iskemi, hemorajik, travma, radyoaktivite, intoksikasyon, ksenobiyotik maddeler),
- Oksidan enzimler (Ksantin oksidaz, İndolamin dioksigenaz, Triptofan dioksigenaz, Galaktoz oksidaz, Siklooksigenaz, Lipooksigenaz, Monoamino oksidaz).

Süperoksit (O_2^-): Aerobik hücrelerde moleküler oksijenin (O_2) bir elektron alarak indirgenmesi sonucu oluşur. Çok toksik değildir. Zayıf oksidandır. Süperoksit radikali olarak kendisi direkt olarak zarar vermez. Hidrojen peroksit (H_2O_2) kaynağıdır. Düşük pH değerlerinde protonlanarak hidroperoksil (HO_2^-) oluşturur. Bu radikal anyonun asıl önemi budur. Geçiş metalleri iyonlarının indirgeyicisidir (14).

Hidrojen peroksit (H_2O_2): Süperoksitin etrafından bir elektron alması veya moleküler oksijenin etrafındaki moleküllerden iki elektron alması sonucu peroksit oluşur. Peroksit molekülü iki hidrojen molekülü ile birleşerek H_2O_2 oluşturur. H_2O_2 tek başına radikal değildir (23). H_2O_2 uzun ömürlü oksidan olup membranlardan geçebilir. Kendisi bir serbest radikal olmadığı halde, reaktif oksijen türleri içine girer ve serbest radikal biyokimyasında önemli bir görev oynar. Süperoksit anyon radikaliyle geçiş metal iyonları mevcudiyetinde hızla gerçekleşen bir reaksiyonla en reaktif radikal olan hidroksil radikalini oluşturmaktadır (20).

Hidroksil radikali ($OH^\cdot$): Hücrede olduğu yerden daha uzağa gidemez. Oldukça reaktif ve toksik bir radikaldir, yarılanma ömrü çok kısadır. Oluştığı yerin çevresinde oldukça büyük hasara yol açabilir. Fenton Reaksiyonu ve Haber-Weiss Reaksiyonu sonucu hidrojen peroksitten oluşmaktadır. Ayrıca suyun yüksek enerjili iyonize edici radyasyona maruz kalması sonucunda da oluşur. Elektronegativitesi ve büyük molekül yapısı sebebiyle DNA, protein, karbonhidrat

ve lipitler gibi makromoleküllerle reaksiyona girerek oksidatif hasar oluşmasına neden olur. (14, 24)

Singlet oksijen (O_2): Radikal değildir. Serbest oksijen radikalleri ile birlikte olan reaktif oksijen türüdür (14).

Nitrik oksit (NO): L-Arginin'in guanidium grubundan, nitrik oksit sentetaz (NOS) enzimi aracılığı ile endotelde sentezlenen serbest radikaldır. Üç farklı NOS enzimi vardır. Endotelial, nöronal ve indüklenabilir NOS (iNOS)'dur. NO , süperoksit anyon radikali ile hızla reaksiyona girdiğinden hücre koruyucusu olarak düşünülebilir (14, 25).

NO , vasküler tonusun fizyolojik düzenlenmesi, vasküler geçirgenliğin devamı, endotele lökosit adezyonunun engellenmesi, trombosit agregasyonunun inhibisyonu, immun defansın güçlendirilmesi, oksijen kaynaklı serbest radikallerin temizlenmesi, düz kas proliferasyonunun engellenmesi, endotel hücrelerinin rejenerasyonu gibi birçok olayda etken bir maddedir (26). Ayrıca iskemik dokularda süperoksit dismutaz aktivitesini etkileyerek hidrojen peroksit birikimini azaltır.

2.3.2. Polimorf Nüveli Lökositler

İskemi/Reperfüzyon hasarı sonrasında aktif hale gelen ilk hücreler polimorf nüveli lökositler olup, mikrovasküler permeabilitede artıştan başlıca sorumlu tutulan ana hücrelerdir (10, 28). Mikrodolaşım, en uç kan dolaşımı sistemidir. Arteriol, venül, arteryel ve venöz kılcalların boyutu 7-100 µm arasında değişir. İskeminin ardından dokuda reperfüzyon sağlandığında uyarılmış lökositler mikrodolaşımda birikerek kollaps ve tıkanıklığa neden olurlar. Bu nedenle lökosit-trombosit ve lökosit-endotel hücre etkileşimleri ana mekanizma olup, interstisyel sıvı birikimi ve endotel bağımlı vazodilatasyonda azalma bu duruma katkıda bulunur (29). Bu durum ilk kez 1967 yılında Majno tarafından “no reflow” fenomeni olarak tanımlanmıştır (30).

2.3.3. Kompleman Sistemi

Kompleman sistemi bir dizi plazma proteini ve bu proteinlerin hücre zarı reseptörlerinden oluşur. Kompleman (C) komponentlerinin sentez yerleri makrofajlar, monositler, hepatositler, böbreğin glomerüler ve tübüler hücreleridir. Proinflamatuvar komponentler (C3a, C5a, C3b ve C5b-9) kompleman sisteminin aktivasyonu sonucunda oluşur. C3a ve C5a, lökositleri aktive eden anafilatoksinlerdir. C5a ayrıca, tümör nekrozis faktör alfa (TNF- α), interlökin-1 (IL-1), IL-6, makrofaj inflamatuvar protein (MIP)-2, MIP-1a, MIP-1b ve monosit kemoatraktan protein (MCP)-1 üretimini uyarak inflamatuvar yanıtı artırır (31).

Sitokinler, salgılandığı hücrenin embriyolojik kaynağına göre farklılık gösteren ve hücreler arası iletişimi gerçekleştiren polipeptid yapıda aracı maddelerdir. Sitokinler çok geniş bir ailedir. Sitokin terimi ayrıca, immunomodülatör ajanlar olan interlökinler ve interferonları da tanımlamak için kullanılır. Literatürde; IL-1, IL-6, tromboksan A₂ (TxA₂) ve TNF- α 'nın etkileri, İ/R hasarı için iyi tanımlanmıştır. Bu sitokinler, lökositler ve vasküler endotel bariyeri arasında sinyal görevi üstlenerek lökositlerin selektif adezyon ve migrasyonunu sağlamaktadır (32).

2.3.4. Endotel

Endotel, kan ile dokuları birbirinden ayıran tek sıra dizilmiş hücrelerden oluşan bir bariyerdir. Damar fonksiyonlarının devam etmesinde rol alır. Kan ve dokular arasında madde alış verişini seçici geçirgen özelliği sayesinde sağlar (33). Endotel hücreleri SOR üretim kaynağı olup aynı zamanda SOR için hedef konumundadır. Endotel, mikrovasküler homeostazdan sorumlu olan endotelin (ET) ve NO'nun ana kaynağıdır (34).

2.4. Vasküler Cerrahi Alanında İskemi Reperfüzyon

İ/R sendromunda iki önemli komponent vardır. Bunlar: lokal doku hasarı ve uzak organ hasarıdır (14). İskemiye karşı doku toleransı, dokunun yapısı ve kollateral akımla yakın ilişkili olmakla birlikte, sıcaklık ve doku kütlesi de önemli faktörlerdir. Alt ekstremité iskemik reperfüzyon hasarının gelişmesinde iskelet kası, iskemik hasara karşı en duyarlı dokulardan biri olması ve büyük kütleye sahip olması nedeniyle önemli rol oynar. Prognoz, reperfüzyon hasarında kas hasarı miktarıyla ters orantılıdır (35). İskemik dokuda reperfüzyon ile birlikte başlayan inflamatuvar cevap neticesinde lokal doku hasarı artmaktadır. Ölü hücrelerden inflamatuvar cevap oluşumunda salınan histamin benzeri maddeler, asit fosfataz, laktat, lizozimler, inorganik fosfatlar, miyogloblin, potasyum, nükleotitler, aminoasitler, aspartat aminotransferaz, laktat dehidrogenaz, proteolitik enzimler, kreatin fosfokinaz, pürin bazları gibi ürünlerin önemli görevleri vardır. Ölü hücrelerden salınan yıkım ürünleri neticesinde pıhtılaşma mekanizmalarının aktifleşmesi ile mikrovasküler hasar ve mikrovasküler trombozis oluşarak kas hasarının daha da artmasıyla sonuçlanır. Böylece kapiller kaçak ve interstisyel basınçta artma gözlenir. Eğer interstisyel alandaki basınçlar mikrodolaşım basıncına yaklaşır veya aşarsa kan akımının engellenmesine neden olur (14). Pıhtılaşma neticesinde oluşan inflamatuvar mediatörler doku hasarının artmasında önemli sebeplerden biridir. Bu sebeple yüksek doz heparinin permeabilite değişikliklerini ve iskemik demarkasyon seviyesini azaltabileceği aynı zamanda kollateral akımı düzeltebileceği yapılan bazı çalışmalarda gösterilmiştir (36). Yıkım ürünleri ve prokoagülanlar dokunun reperfüzyonu sonucu sistemik dolaşıma

geçer ve sistemik koagülasyon oluşturabilirler. Faktör XII'nin uyarılması ve histamin, bradikinin, kompleman, tromboksan gibi inflamatuvar mediatörler ile pıhtılaşma başlatılabilir (14).

Alt ekstremité İ/R hasarında mikrovasküler disfonksiyon ve kas değışiklikleri birbirleriyle paralel seyretmekte olup, prognoz kas hasarı miktarına bağıdır. Sonuçta meydana gelen inflamatuvar yanıt, geri dönüşümlü zedelenme miktarı ile doğru, nekrotik kas miktarı ile ters orantılıdır. Alt ekstremité İ/R hasarında lokal ve sistemik etkiler gözlenir. Lokal etkiler iskelet kası ve damar endotelinde gözlenirken, sistemik etkiler başlıca akciğer, kalp, beyin ve böbrekler olmak üzere tüm dokularda gözlenebilir (37). Kas nekrozu ve ATP deposu azalması arasında yakın ilişki saptanmıştır. İskemik kas dokusunda öncelikle glikojen ve kreatin fosfat azalırken bu safhada miyonekroz oluşumu azdır. Sonrasında, ATP azalmasıyla birlikte, kas nekrozu hızla artma gösterir. Altı saat süresince devam eden kas iskemisini takiben ATP deposunda %80 azalma ve kas dokusunun tümünde nekroz gözlenir. Mikro dolaşım değışiklikleri, iskemik dönemde gerçekleşir ve iskemi süresi ile uyum gösterir. İskemi ilk olarak kapiller endotel hücreleri etkileyerek hem lümen hem de sitoplazmaya doğru uzanan parmaklı çıkıntılar oluşturur. İskeminin devamıyla birlikte endotel veziküllerinde artış oluşur. Bu arada, hücreler arası bağlar zayıflar ve geçit genişler. Heterojen dağılımlı endotel hücre ödemi oluşarak kırmızı küre sıkışmasını artırır. İskeminin dördüncü saatinden sonra mikrosirkülasyonda hücrel etkileşimler başlar. Venöz ve arteriyel kapillerler reperfüzyon öncesinde sıkışmış eritrositlerle kapanmış görünümündedir. Eritrosit kümeleri erken reperfüzyonda endotelde hasar oluşturur. Endotel

hücrelerinde parçalanma sonucu hücreler arası büyük geçitler oluşur. Reperfüzyonla birlikte özellikle venöz kılcallarda platelet ve fibrin kümeleri ile karakterize trombotik komplikasyonlar gelişir. Platelet kümeleri endoteldeki defektleri kapatır. Venlerde lökosit diapedezi oluşurken, venöz kılcallarda lökositlerin lenfosit ve monositlerle olan kümeleşmesi oluşur. Kas iskemisi ilerlediğinde kası besleyen damarda kalıcı tıkanıklık oluşur. İskemi süresi uzadıkça damarsal geçirgenlik artışı ve ilerleyici interstisyel ödem oluşur (38). İskemik doku reperfüzyonu inflamatuvar bir cevap doğurur. Ancak doku nekrozundan reperfüzyon döneminden çok iskemik dönem sorumludur. Reperfüzyon sağlanmış hasarlı ve nekrotik alan miktarı morbiditeyi belirler (39). İnflamatuvar cevabın tetikleyicileri; asit fosfataz, inorganik fosfat, laktik asit, miyogloblin, nükleotidler, potasyum (K^+), proteolitik enzimler, pürin bazları gibi kas yıkım ürünleridir. Bu ürünler prokoagülan özellikte olup intrinsek pıhtılaşma sistemini aktive ederek venöz kılcal trombozu ve kollateral arteriyollerde vazospazm oluşturur. Dolayısıyla antitrombotik ve antiplatelet tedaviyle geri dönüşümlü hasar bölgelerine olan kollateral akım ve mikro dolaşım korunarak nekrotik genişleme engellenebilir (37).

İ/R hasarının önemli sonuçlarından biri uzak organ hasarı olup yüksek mortalite ve morbiditeyle seyreder. Oluşan sistemik inflamasyon hemen her organda hasar oluşturabilir. İ/R hasarı klinikte lokal olarak kas ödemi, kompartman sendromu, kas nekrozu ve fonksiyon bozukluğu şeklinde ortaya çıkar. Lokal hasar sırasında ve sonrasında dokudan kana geçen miyogloblin gibi maddeler ve lökotriyen B₄ (LTB₄), TxA₂, TNF- α , IL-1 β , IL-6, aktive kompleman bileşenleri gibi inflamatuvar mediyatörler uzak organlarda fonksiyon bozukluğuna neden olur.

Uzak organlardan klinik olarak ilk belirti verenler akciğerler ve böbreklerdir. Bu organların yanı sıra, karaciğer, miyokart ve santral sinir sistemi fonksiyonlarının da etkilenmesiyle çoklu organ yetersizliği sendromu tablosu gelişebilir (40). İ/R hasarı böbrekte oldukça sık karşılaşılan ve ciddi sonuçlara neden olan patolojik süreçlerdendir. Gelişen mekanizma ne olursa olsun İ/R hasarının sonucu geri dönüşümlü veya geri dönüşümsüz hücre polarizasyonunda bozulma, apoptozis veya hücre ölümüdür. Böbrek yüksek enerji gereksinimi ve karmaşık mikrovasküler damar ağı nedeniyle İ/R hasarına çok duyarlıdır. Böbrek İ/R hasarı transplantasyon sonrası gecikmiş greft fonksiyonu, şok komplikasyonu ve kardiyak veya aortik cerrahide artmış mortalite ve morbidite ile ilişkilidir (41). Böbrek vücutta en iyi perfüze olan organ olması nedeniyle hipoperfüzyona da en çok duyarlı organlardan biridir. Abdominal aort cerrahisinde postoperatif dönemde morbidite ve mortaliteyi etkileyen en önemli komplikasyon akut böbrek yetmezliği (ABY) dir. Aortik cerrahide ABY oluşmasında en önemli fizyopatolojik mekanizma İ/R hasarıdır. Böbrek yetmezliğinde aortik klemp uygulaması ve İ/R hasarı önemli yer tutar. İskemi ile başlayan TNF- α artışı ve lökosit aktivasyonu ile karakterize inflamatuvar yanıt son organ hasarında en önemli rolü oynar. İskemiden sonra gelişen ABY; glomerüler filtrasyon hızında azalma, tübüler nekroz, böbrek damarlarında direnç artışı ile karakterizedir. Böbrek kan akımındaki kesilme veya azalma ve sonradan oluşan reperfüzyon ile birlikte çeşitli derecelerde doku hasarı oluşur. Böbrek İ/R hasarında SOR önemli rol oynamaktadır (39). İ/R hasarı öncelikle böbreğin hipoksiye duyarlı kısmından başlar. Böbreğe gelen kan akımının büyük kısmı renal korteksten geçer ve renal medullanın kanlanmasını sağlayan vasa

rektaya çok az kan gider, bu da renal medullayı hipoksiye daha duyarlı hale getirir. Medüller hipoksi ayrıca hücresel enerji depolarının azalmasına, endotel ve düz kas hücrelerindeki aktin hücre iskeletinin bozulmasına neden olur. Bunun sonucu ise hücresel deformite ve çevre dokulardaki hipoksinin artmasıdır. Renal hasar öncelikle tübüllerde oluşur. Nedeni iskemiye bağlı gelişen tübüler nekrozdur. Genellikle geriye dönüşümlüdür, reperfüzyonla birlikte 1-2 hafta içinde tübül fonksiyonları normale dönmektedir (39). İskemi reperfüzyon hasarından kaynaklanan ABY karmaşık ve dinamik bir süreçtir (42). İskemik ABY, hipoperfüzyonun böbrek parankimal hücrelerde ve özellikle de tübüler hücrelerde harabiyet oluşturması, böbrek hücrelerinin onarılması ve rejenerasyonunu gerektiğinden dolayı perfüzyon normale getirilirse bile olayın düzelmesinin 1-2 haftalık bir süre periyodunun gerekmesinden dolayı prerenal ABY' den farklılık göstermektedir. İskemik ABY ileri formlarında bilateral kortikal nekroza yol açmasından dolayı, geri dönüşümsüz böbrek yetmezliğine yol açabilmektedir. İskemik ABY en sık olarak majör kardiyovasküler cerrahi uygulanan, şiddetli travma, kanama, sepsis ve böbrek transplantasyon yapılan hastalarda gelişmektedir (43).

2.5. Antioksidanlar

Reaktif oksijen türevlerinin oluşumunu engelleyen ve oluştuktan sonra meydana getirdiği hasarı önleyici çeşitli antioksidan savunma mekanizmaları vardır. Vücutta oksidan ve antioksidan mekanizmalar arasında bir denge olmakla birlikte, bu dengenin bozulduğu durumlarda oksidatif stres meydana gelir (44). Endojen veya eksojen kaynaklı olan bu savunma sistemi oldukça karmaşıktır (45)

Endojen antioksidanlar enzimatik veya non-enzimatik olabilirler. A, C ve E vitaminleri, glutatyon, karotenoidler, alfa lipoik asit, koenzim-Q10, mineraller (bakır, çinko, mangan, selenyum), kofaktörler (folik asit, ürik asit, albümin, vitamin B1, B2, B6, B12) non-enzimatik antioksidanlardır. Enzimatik antioksidanlar ise süperoksit dismutaz (SOD), katalaz (KAT), Glutatyon Peroksidaz (GSH-Px), glutatyon-S transferaz (GST), glukoz 6 fosfat dehidrogenazdır (46). Eksojen antioksidanlar; ilaçlar, gıdalar ve vitaminlerde doğal ve yapay olarak bulunan antioksidanlar olarak sınıflandırılabilirler.

2.5.1. Süperoksit Dismutaz (SOD)

Metalloprotein yapıda olan SOD, O_2^- molekülünü O_2 molekülüne yükseltgeyip, diğer O_2^- molekülünü H_2O_2 'ye indirger. İki tip SOD vardır. Birincisi sitozolde bulunan dimerik yapıdaki bakır ve çinko içeren SOD (Cu-Zn SOD); ikincisi ise mitokondride bulunan tetramerik yapıdaki mangan içeren SOD (MnSOD)'dir (47, 48). Bu reaksiyon "oksidatif strese karşı ilk savunma" olarak da adlandırılmaktadır. Çünkü süperoksit zincirleme radikal reaksiyonlarının güçlü bir

başlatıcısıdır. Bu sistem sayesinde hücrel kompartmanlardaki süperoksit düzeyleri kontrol altında tutulmaktadır. Aynı zamanda SOD, lipid peroksidasyonunu da inhibe etmektedir. SOD aktivitesi, yüksek oksijen kullanan dokularda fazladır (49).

2.5.2. Katalaz (KAT)

Hemoprotein yapıdaki KAT peroksizomlarda lokalizedir. H_2O_2 ' yi oksijen ve suya indirger. KAT aktivitesi en fazla eritrosit, karaciğer ve böbrektedir. KAT hücrenin kendi respiratuvar patlamasına karşı koruyucu olarak hizmet etmektedir (49).

2.5.3. Glutasyon Peroksidaz (GSH-Px)

Yapısında selenosistein içeren GSH-Px, H_2O_2 ' yi suya indirger ve bu reaksiyonda redükte glutasyon yükseltgenir (50). GSH-Px, fagositik hücrelerde önemli fonksiyonlara sahiptir. Diğer antioksidanlarla birlikte GSH-Px, solunum patlaması sırasında serbest radikal peroksidasyonu sonucu, fagositik hücrelerin zarar görmesini engeller. Eritrositlerde de GSH-Px oksidan strese karşı en etkili antioksidandır. GSH-Px aktivitesindeki azalma, H_2O_2 ' in artmasına ve şiddetli hücre hasarına yol açar (49).

2.5.4. Glutasyon-S Transferaz (GST)

Organizmaya giren ksenobiyotiklerin biyotransformasyonunda görev almaktadırlar. Başta araşidonik asit ve linoleat hidroperoksitleri olmak üzere lipid hidroperoksitlere karşı GST' ler "Selenyum" bağımsız aktivite göstermektedirler (49).

2.5.5. Glutasyon Redüktaz

Glutasyon peroksidaz tarafından H_2O_2 ve diğer lipid peroksitlerin yükseltgenmesi sırasında glutasyon, okside glutatyona dönüşmektedir. Oksidasyona uğramış bu yapıyı tekrar kullanmak için redükte glutatyona dönüştüren enzim glutasyon redüktazdır (49).

2.5.6. Mitokondriyal Sitokrom Oksidaz

Solunum zincirinin son enzimi olan sitokrom oksidaz süperoksit radikalini suya çevirerek etki göstermektedir (49).

2.5.7. Malondialdehit (MDA)

Malondialdehit, poliansatüre yağ asitlerinin peroksidasyonu sonucu meydana gelir ve tiyobarbitürik asit reaktif substans (TBARS) olarak ölçülmektedir. MDA, spesifik olmamakla birlikte lipid peroksidasyonunun derecesiyle iyi korelasyon göstermektedir. Serbest radikallere bağlı hücre hasarındaki en önemli mekanizmalardan biri lipid peroksidasyonudur. MDA gibi

lipit peroksidasyonu son ürünleri, aterosklerozun geç komplikasyonlarının gelişiminde önemli role sahiptir (49,51).

2.6. Bacopa Monnieri

İ/R yaralanmasının doğasını anlama ve etkilerini önleme veya iyileştirme tedavileri geliştirme konusunda birçok madde araştırma yapılmıştır. Bunlara tıbbi Ayurvedik bitkiler de dahildir.

B. Monnieri, geleneksel Hint tıbbında (Ayurveda) kullanılan bir bitkidir (Resim 1). Genellikle Brahmi olarak bilinen B. Monnieri, nemli bölgelerde yetişir ve Scrophulariaceae ailesine aittir (52).



Resim-1. Bacopa Monnieri Bitkisi

B. monnieri bitkisinin deneysel çalışmalarda kardiyoprotektif, antihipertansif, antioksidan, anti-aging, anti-inflamatuar, hepatoprotektif, nefroprotektif etkilerinin olduğuna dair bulgular elde edilmiştir (4). Üç hafta boyunca oral B. Monnieri verilen ratlarda B. Monnieri tedavisinin miyokart antioksidan enzimlerini arttırırken ve miyokardiyal apoptotik sinyal proteinlerini azaltarak I/R kaynaklı biyokimyasal ve histopatolojik bozulmaları azalttığı saptanmıştır (53). B. monnieri'nin sistemik vasküler fonksiyonu geliştirdiğine dair bazı kanıtlar da vardır. Vasküler düz kasta sarkoplazmik retikulumdan Ca^{2+} akımı ve Ca^{2+} salımını inhibe ederek ve kısmen endotelial NO salınımını sağlayarak arterleri genişlettiğine dair bulgular elde edilmiştir (54). Dahası, nöroprotektiftir ve etki mekanizması esas olarak antioksidan ve anti-inflamatuar özellikleri ile ilişkilidir (55, 56). B. Monnieri, antioksidan mekanizma üzerine olası etkileri nedeniyle birçok bilimsel çalışmaya konu olmuştur.

3. GEREÇ VE YÖNTEM

Çalışmamızda yirmi dört adet erişkin, yaşça (10-12 haftalık) ve ağırlıkça (170-222 gr) eşleşen Winstar albino cinsi erkek rat kullanılmıştır. G.Ü.ET-17.078 kod numaralı deneysel araştırmamızın protokollerinin ilkelere uygunluğu Gazi Üniversitesi Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu Başkanlığı tarafından onaylanmıştır. Tüm hayvanlar için Ulusal Bilimsel Araştırmalar Derneği tarafından hazırlanan Laboratuvar Hayvan Bakımının İlkeleri ve Ulusal Bilim Akademisi tarafından hazırlanan ve Ulusal Sağlık Enstitüleri tarafından yayınlanan Laboratuvar Hayvanlarının Bakımı ve Kullanımı Kılavuzu ile uyumlu olarak insani bakım sağlanmıştır (NIH yayın no. 85e23, revize 1985). Ratlar, G.Ü. Laboratuvar Hayvanları Yetiştirme ve Deneysel Araştırmalar Merkezinden sağlanmış olup burada deney öncesi ve deney süresince serbest yem ve su ile beslenerek barındırılmışlardır. Tüm deneysel işlemler ratların sirkadyan ritmine (12 saat aydınlık 12 saat karanlık) uygun olacak şekilde gerçekleştirilmiştir. Çalışmamız Gazi Üniversitesi Bilimsel Araştırmalar Projeleri Birimi tarafından desteklenmiştir. (Proje Kodu: 01/2018-2)

3.1. Çalışma Dizaynı

Deney hayvanları rastgele 4 gruba ayrılmıştır:

- I.** Sham Kontrol Grubu (Gr I, n=6): Bu gruba 10 gün boyunca günde bir kez oral gavaj uygulaması ile sadece normal salin solüsyonu verilmiştir. 10 günlük bakım sonrasında aortik klemp uygulanmaksızın laparotomi uygulanarak diseksiyon gerçekleştirilmiştir.
- II.** Bacopa monnieri ekstraktı ile tedavi altında olan Sham Grubu (Gr II, n=6): Bu gruptaki ratlara 10 gün boyunca günde bir kez oral gavaj uygulaması ile Bacopa monnieri ekstraktı (300mg/kg p.o) verilmiştir (57). 10 günlük bakım sonrasında aortik klemp uygulanmaksızın laparotomi uygulanarak diseksiyon gerçekleştirilmiştir.
- III.** İskemi / Reperfüzyon Grubu (Gr III, n=6): Bu gruptaki ratlara 10 günlük bakım süresince ek madde verilmemiştir. 10 günlük bakım sonrasında laparotomi gerçekleştirilerek abdominal aortaya infra-renal bölgeden nontravmatize kross klemp uygulaması ile 120 dakika iskemi oluşturulmuş ve devamında abdominal aortadan kross klemp kaldırılarak 120 dakika boyunca reperfüzyon sağlanmıştır (58).
- IV.** Bacopa monnieri ekstraktı ile tedavi altında olan İskemi/Reperfüzyon Grubu (Gr IV, n=6): Bu gruptaki ratlara 10 gün boyunca günde bir kez oral gavaj uygulaması ile Bacopa monnieri ekstraktı (300mg/kg p.o) verilmiştir. 10 günlük bakım sonrasında laparotomi gerçekleştirilerek abdominal aortaya infra-renal bölgeden nontravmatize kross klemp

uygulamasý ile 120 dakika iskemi oluřturulmuř ve devamýnda abdominal aortadan kross klemp kaldýrýlarak 120 dakika boyunca reperfúzyon saęlanmýřtır.

Bacopa monnieri ekstraktý (300mg/kg) 0.5 ml salin solúsyonunda çözdürölerek oluřturulan süspansiyon Grup II ve IV'e 10 gün boyunca yirmi dört saatte bir oral gavaj uygulamasý ile verilmiřtir. Deney sırasında yapılan tüm cerrahi iřlemler ketamin ve ksilazin anestezisi altında steril kořullarda gerçekteřtirilmiřtir.

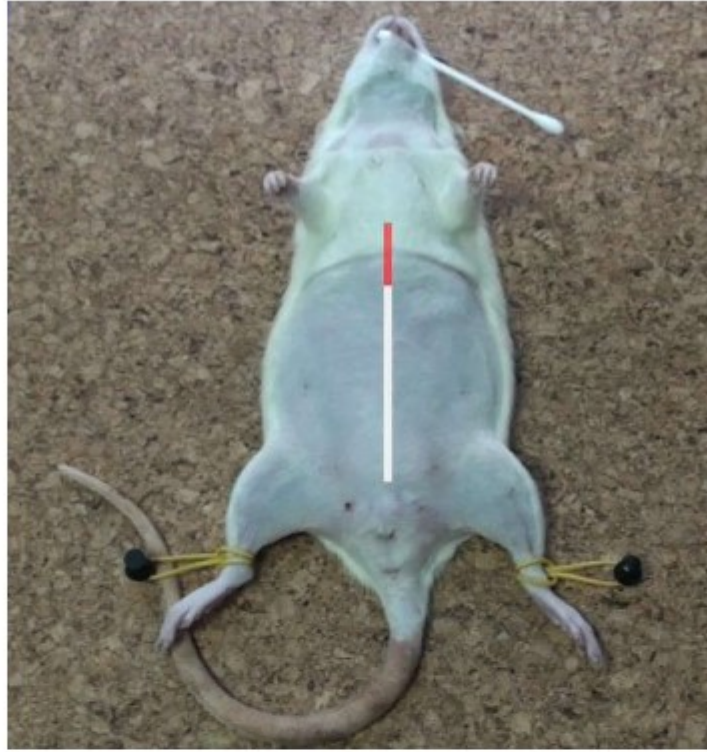
3.2. Aortik Oklüzyon ve İskemi-Reperfúzyon Protokolü

Çalışmamız sırasında cerrahi uygulama öncesinde prosedüre uygun genel anestezi verildi. Anestezi öncesi 2 saatlik açlık sağlandı ve 60 dk öncesi deney hayvanlarının su içmeleri engellendi. Tüm hayvanlara cerrahi prosedürün 30 dk öncesinde ketamin (ketamine hydrochloride, Ketalar, 45 mg/kg,İ.M.; Parke-Davis Eczacibasi, Istanbul, Turkey) ve ksilazin (xylazine hydrochloride, Alfazyne, 2%, 5 mg/kg, İ.M.; Ege Vet, Izmir, Turkey) uygulandı. Perioperatif dönem boyunca ratların anestezi derinliği monitorizasyonu sağlandı. Refleks monitorizasyonu, kas tonusu, solunum paterni, hızý ve derinliği, kalp atım hızý ve derinliği periyodik olarak değerlendirildi. Anestezi süresince tüm hayvanlarda spontan solunum sağlandı ve ısı kaybını önlemek için intra-operatif alt gövde ısıtma battaniyesi kullanıldı. Bu sürede sıvı-elektrolit stabilitesini sağlayabilmek için periyodik intraperitoneal salin kullanıldı.

Cerrahi prosedürler, bir ısıtma lambası altında ratlar supin pozisyona yerleşik haldeyken gerçekleştirildi. Deneklerin karın bölgeleri traş edildi ve deri aseptik olarak hazırlandı (Resim 2). Abdominal orta hattın yapılan insizyon ile cilt-cilt altı geçildi, periton açıldı, karın duvarı laterale ekarte edildi, bağırsaklar salinle ıslatılmış steril nemli spanç üzerine laterale deviye olacak şekilde intestinal bölge dışına alındı (Resim 3). Abdominal aort çevre dokulardan diseke edilerek non-travmatik aortik klemp infrarenal bölgeye tam kat uygulanarak distal sirkülasyon oklüzyonu sağlandı. Oklüzyon takibi distal aorta ve her iki femoral arter palpe edilerek periyodik olarak kontrol edildi. Muayene edilen nabızlardaki pulsasyon kaybı ile oklüzyon ve iskemi doğrulandı. Distal iskemi modeli için aortik klemp uygulamasına 2 saat boyunca devam edildi (58). Devamında aortik klemp kaldırıldı ve tekrar distal sirkülasyon sağlandı. Reperfüzyon takibi distal aorta ve her iki femoral arter palpe edilerek periyodik olarak kontrol edildi. Muayene edilen nabızlardaki pulsasyon varlığı ile sirkülasyon ve reperfüzyon doğrulandı. Distal reperfüzyon modeli için uygulamaya 2 saat boyunca devam edildi. İskemi-reperfüzyon prosedürü süresince ısıtma battaniyesi ile vücut ısısı stabil tutuldu. Vücut sıcaklığında intraperitoneal salin periyodik olarak verilerek sıvı-elektrolit stabilizesi sağlandı. Anestezi, cerrahi prosedüre uygun derinlikte takip edildi ve spontane solunum devamlılığı sağlandı.

Reperfüzyon döneminin sonunda tüm ratlardan anestezi altında önce kardiak puncture (delme) ile kan örnekleri alınarak ötenazi sağlandı. Alt ekstremité kas, böbrek, karaciğer ve akciğer dokuları diseke edilerek alındı. Dokular moleküler analizler yapılmak üzere serum fizyolojik ile yıkandıktan sonra izole edilerek sıvı

nitrojende dondurularak ve deney gününe kadar -80 °C’de saklandı. Kontrol ve deney gruplarından alınan doku örnekleri, % 10’luk nötral formalin solüsyonunda 72 saat oda sıcaklığında tespit edildikten sonra, rutin histolojik işlemlerden geçirildi.



Resim 2. Rat cerrahi pozisyonu



Resim 3. Rat Cerrahi prosedür

3.3. ELISA Analizleri

Oksidan ve antioksidan mekanizmaların değerlendirilmesi amacıyla standart ELISA yöntemlerinin kullanıldı.

3.3.1. İntinsik Antioksidan Enzimler Üzerine Olan Etkisi

3.3.1.1. Katalaz (KAT) Aktivitesi:

KAT aktivitesi kit protokolü esas alınarak uygulandı. Alt ekstremite kas, karaciğer, böbrek ve akciğer doku örnekleri, 1X PBS ile yıkanarak 500 µl 1X hücre

parçalama çözeltisi ile süspande edildi. 96lık kültür kaplarına aktarıldıktan sonra her bir kuyucuğa 50 µL hidrojen peroksit çalışma çözeltisi (12 mM) ilave edilerek 1 dakika bekletildi. Reaksiyonu durdurmak üzere her bir kuyucuğa 50 µL “Catalase Quencher” eklendi. Ardından her bir kuyucuktan 5 µL alınarak yeni kuyucuklara aktarıldı ve üzerine 250 µL kromojenik çalışma çözeltisi ilave edildi. 40-60 dakika 370C’de inkübe edildikten sonra 520 nm’de absorbans değerleri okunarak kontrol grupları ile karşılaştırıldı.

3.3.1.2. Glutasyon Peroksidaz (GPx) Aktivitesi:

Alt ekstremite kas, karaciğer, böbrek ve akciğer doku örnekleri, 1X PBS ile yıkanarak 500 µl 1X hücre parçalama çözeltisi ile süspande edildi. Süspande hücreler 1.5 mL’lik tüplere aktarılarak 12000-14000g, 2 - 8° C’de 5 dakika santrifüj edildi. Süpernatandan 100 µL alınarak 50 mM potasyum fosfat (pH 7.0), 1mM EDTA, 1mM sodyum azid, 0.2 mM NADPH, 1 U/ml glutasyon redüktaz ve 1 mM GSH içeren reaksiyon karışımının 0.8 ml’si ile karıştırılarak oda sıcaklığında 5 dakika inkübe edildi ve 0.1 ml 0.25 mM H₂O₂ çözeltisi ile reaksiyon başlatıldı. Absorbans değerleri 340 nM’de 5 dakika içerisinde okutuldu ve aktivite, mol başına dakikada okside olan NADPH düzeylerine göre belirlendi. Kör grup olarak distile su ile benzer işlemler uygulandı. GPx aktivitesi U/mg protein olarak ifade edildi.

3.3.2. Nitrozatif Stres ve İnflamatuvar Belirteçler Üzerine Olan Etkisi

3.3.2.1. 3- Nitrotirozin (3-NT) Düzeylerinin Belirlenmesi:

Alt ekstremitte kas, karaciğer, böbrek ve akciğer doku örnekleri, 1X PBS ile yıkanarak 1X hücre parçalama çözeltisi ile parçalandı. Elde edilen lizatlar, 1.5 mL'lik tüplere aktarılarak 12000-14000g, 2 - 8° C'de 20 dakika santrifüj edildi. Supernatant kısmından 50 µL alınarak kit protokolü esas alınarak 96lık kültür kaplarına aktarıldı ve 2 saat oda sıcaklığında inkübe edilerek kültür kabı yüzeyine yapışması sağlandı. Ardından 50 µL 3-NT primer antikoru ilave edilerek 1 saat oda sıcaklığında inkübe edildikten sonra yıkama işlemi yapılarak 1 saat sekonder antikor ile muamele edildi ve HRP-substrat ile muamele edildikten 15 dakika içinde 600 nm'de veya stop çözeltisi ilavesi sonrası 450 nm'de mikropilaka okuyucuda okutulularak standartlar ile optik dansiteleri kıyaslandı.

3.3.2.2. iNOS Düzeylerinin Belirlenmesi:

Alt ekstremitte kas, karaciğer, böbrek ve akciğer doku örnekleri, 1X PBS ile yıkanarak 1X hücre parçalama çözeltisi ile parçalandı. Elde edilen lizatlar, 1.5 mL'lik tüplere aktarılarak 12000-14000g, 2 - 8° C'de 20 dakika santrifüj edildi. Supernatant kısmından 50 µL alınarak kit protokolü esas alınarak 96lık kültür kaplarına aktarıldı ve 2 saat oda sıcaklığında inkübe edilerek kültür kabı yüzeyine yapışması sağlandı. Ardından 50 µL 3-NT primer antikoru ilave edilerek 1 saat oda sıcaklığında inkübe edildikten sonra yıkama işlemi yapılarak 1 saat sekonder antikor ile muamele edildi ve HRP-substrat ile muamele edildikten 15 dakika içinde

600 nm’de veya stop çözeltisi ilavesi sonras 450 nm’de mikrolaka okuyucuda okutularak standartlar ile optik dansiteleri kıyaslandı.

3.3.2.3. IL 1 beta Düzeylerinin Belirlenmesi:

Alt ekstremite kas, karaciğer, böbrek ve akciğer doku örnekleri, 1X PBS ile yıkanarak 1X hücre parçalama çözeltisi ile parçalandı. Elde edilen lizatlar, 1.5 mL’lik tüplere aktarılarak 12000-14000g, 2 - 8° C’de 20 dakika santrifüj edildi. Supernatant kısmından 50 µL alınarak kit protokolü esas alınarak 96lık kültür kaplarına aktarıldı ve 2 saat oda sıcaklığında inkübe edilerek kültür kabı yüzeyine yapışması sağlandı. Ardından 50 µL 3-NT primer antikoru ilave edilerek 1 saat oda sıcaklığında inkübe edildikten sonra yıkama işlemi yapılarak 1 saat sekonder antikor ile muamele edildi ve HRP-substrat ile muamele edildikten 15 dakika içinde 600 nm’de veya stop çözeltisi ilavesi sonras 450 nm’de mikrolaka okuyucuda okutularak standartlar ile optik dansiteleri kıyaslandı.

3.3.2.4. TNF alfa Düzeylerinin Belirlenmesi:

Alt ekstremite kas, karaciğer, böbrek ve akciğer doku örnekleri, 1X PBS ile yıkanarak 1X hücre parçalama çözeltisi ile parçalandı. Elde edilen lizatlar, 1.5 mL’lik tüplere aktarılarak 12000-14000g, 2 - 8° C’de 20 dakika santrifüj edildi. Supernatant kısmından 50 µL alınarak kit protokolü esas alınarak 96lık kültür kaplarına aktarıldı ve 2 saat oda sıcaklığında inkübe edilerek kültür kabı yüzeyine yapışması sağlandı. Ardından 50 µL 3-NT primer antikoru ilave edilerek 1 saat oda sıcaklığında inkübe edildikten sonra yıkama işlemi yapılarak 1 saat sekonder

antikor ile muamele edildi ve HRP-substrat ile muamele edildikten 15 dakika içinde 600 nm’de veya stop çözeltisi ilavesi sonrası 450 nm’de mikropilaka okuyucuda okutularak standartlar ile optik dansiteleri kıyaslandı.

3.4. İmmünohistokimyasal Değerlendirme

Alınan doku örnekleri fiksatife konulup Histoloji embriyoloji laboratuvarında Hematoksilen-Eozin (H/E) ile boyanarak ödem, nekroz ve infiltrasyon düzeyleri incelenerek apoptag parametreleri Histoloji Anabilim dalında çalışıldı.

3.4.1. Hematoksilen-Eozin Boyama Yöntemi

Gruplara ait tüm doku örnekleri ışık mikroskopik inceleme için ilk olarak %10’luk nötral formaldehit solüsyonunda en az 72 saat olacak şekilde tespit edildi. Tespit işleminden sonra doku örnekleri kasetlere konularak akarsu altında 24 saat süresince yıkandı. Suyun uzaklaştırılması için dokular artan derecelerde alkol serilerinden (%70, %80, %90, %100) geçirildi. Sonrasında dokular parlatılmak amacıyla ksilolden geçirildi ve ardından erimiş parafine gömüldü. Hazırlanan parafin bloklardan 4-5 mikron kalınlığında kesitler alındı. Deney gruplarından alınan kesitler 60°C etüvde 30 dakika bekletildikten sonra, 2x15 dakika ksilole alınarak parafinden arındırılmaları sağlandı. Daha sonra lamalar sırasıyla azalan alkol serilerinden geçirilip (%100, %96, %80, %70, %50) havada kurutuldu. 10 dakika akar suda yıkandıktan sonra, Harris Hematoksilen’de 10-15 dakika boyandı

ve 10 dakika akar suda yıkandı. %70 alkol + 2 – 3 damla glasiyel asetik asit karışımına batırılıp tekrar 10 dakika akar suda yıkandı. Lamlar 15 dakika Eozin’de bekletilip 10 dakika daha akar suda yıkandıktan sonra artan dereceli alkol serilerinden geçirilerek (%50, %70, %80, %96, %100), 2 x 15 dakika ksilole alındı ve entellan ile kapatıldı.

3.4.2. TUNEL Yöntemi

DNA parçalanması ve apoptotik hücre ölümünün belirlenmesi için in situ apoptozis saptama kiti kullanıldı (Millipore Plus Peroxidase In Situ Apoptosis Detection Kit, Lot: 2199001. Temecula, CA 92590). Parafin bloklardan elde edilen kesitler 37°C’deki etüvde bir gece tutuldu, daha sonra deparafinizasyonu kolaylaştırmak için etüv ısısı 57 °C’ye çıkarılarak bu ısıda 1 saat inkübe edildi. Camlar deparafinizasyonu tamamlamak amacıyla 2 kez 15’er dakika ksilol’e etkin bırakıldı. Daha sonra 10’ar dakika sırasıyla %100, %96 ve % 80’lik etil alkol serilerinden geçirildiler. Kesitler alkolden arındırılmak amacıyla iki kez 5’er dakika distile sudan geçirildikten sonra 15 dakika 20 µg/ml proteinaz K ile inkübe edildiler. Distile su ile yıkama aşamasından sonra 5 dakika %3 ’lük hidrojen peroksit ile etkin bırakılan dokularda endojen peroksidaz aktivitesi bloke edildiler. PBS ile yıkanan kesitler 5 dakika dengeli tamponda ve 60 dakika 37°C nemli ortamda TdT enziminde (77 µL Reaksiyon Buffer + 33 µL TdT Enzim, 1 µl TdT enzim) inkübe edildiler. Ardından oda sıcaklığında önceden ısıtılmış durdurma/yıkama tamponunda 10 dakika bekletildiler ve Anti-Digoxigenin’de 30 dakika inkübe edildiler. Her aşamada PBS ile dikkatle yıkama yapıldı. Yıkamanın

ardından TUNEL pozitif hücreleri belirleyebilmek için DAB ile boyama yapıldı. Zemin boyaması için 5-10 dakika süreyle Metil yeşili uygulandı. Boyanan camlar artan alkol serilerinden geçirilerek suyu alındıktan sonra 20 dakika şeffaflaştırmak için ksilolde bekletildi. Ardından entellan ile kapatıldı. Dokuda apoptozise giden hücreler saptandı ve hücreler 1 merkez, 5 perifer bölgede olmak üzere toplam 6 bölge için tüm grup ve tüm hayvanlarda sayılarak, istatistik uygulaması için veriler oluşturuldu.

3.5. İstatistiksel Analiz

İstatistik değerlendirme SPSS 20.0 bilgisayar programında sıralanan testler kullanılarak gerçekleştirildi. İstatistiksel analiz verileri [Ortalama $\pm$ standart sapma] olarak sunuldu. Yapılan tüm istatistiksel analizlerde anlamlılık sınırı olarak $p < 0.05$ değeri anlamlı kabul edildi. Ölçülebilen parametrelere Kolmogorov-Smirnov testi uygulanarak dağılımın normal ya da anormal olup olmadığı belirlendi. Normal dağılım gösterenler için gruplar arasında fark olup olmadığını belirlemede bağımsız gruplarda Kruskal-Wallis testi ile değerlendirildi. Farklılık olması durumunda gruplar arası Mann-Whitney U testi ile karşılaştırılma yapıldı.

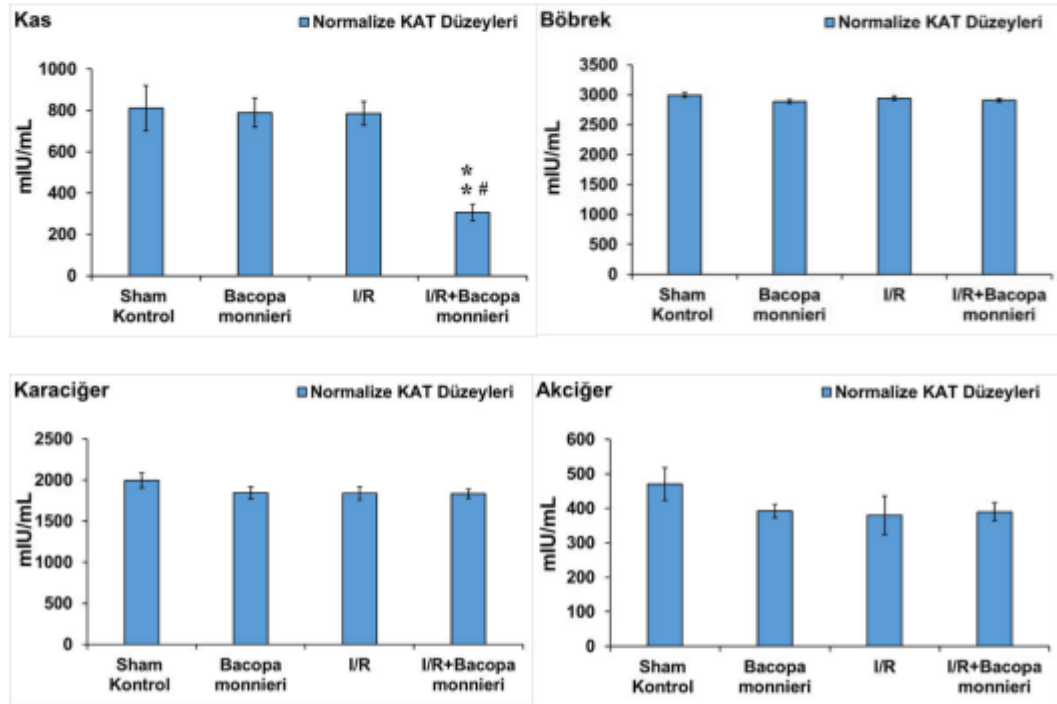
4. BULGULAR

4.1. ELISA Analizleri

4.1.1. İntresik Antioksidan Enzimler Üzerine Olan Etkisi

4.1.1.1. Katalaz (KAT) Aktivitesi:

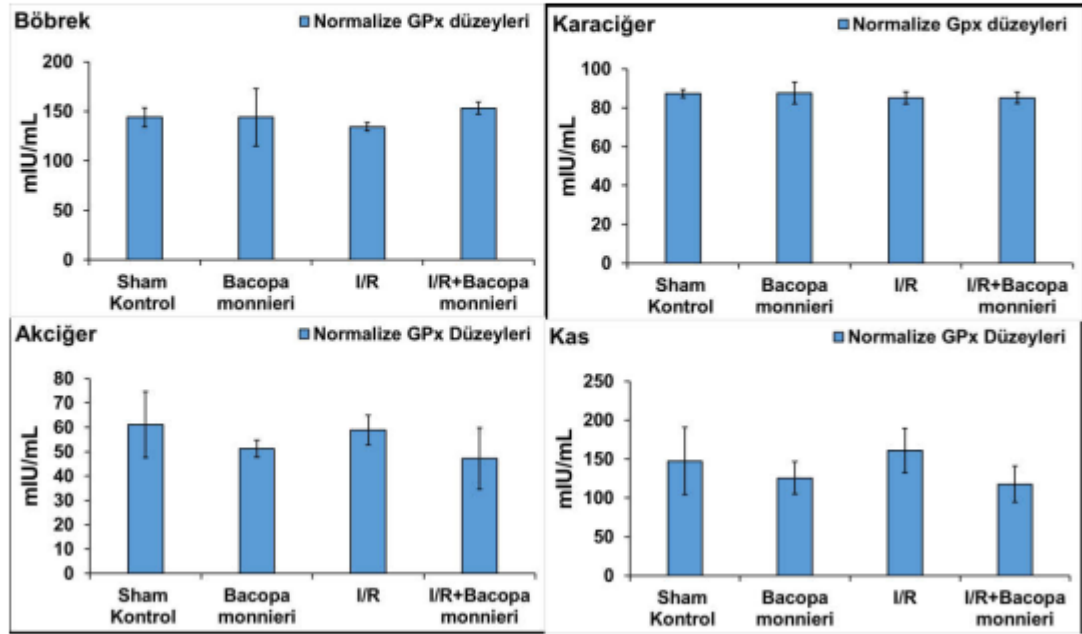
10 gün boyunca 1 x 300 mg/kg p.o. B. Monnieri ekstresi uygulanmış ratlarda oluşturulan alt ekstremitte İ/R modeli sonucunda ratlara ait kas dokusunda katalaz düzeylerinde Sham kontrol ve İ/R grubuna kıyasla anlamlı bir azalma gözlenmiştir. Öte yandan B. Monnieri ekstresi uygulanmış ratlarda oluşturulan alt ekstremitte İ/R modeli sonucunda ratlara ait böbrek, karaciğer ve akciğer dokularındaki katalaz düzeyleri düzeylerinde, Sham kontrol ve İ/R grubuna kıyasla anlamlı bir değişiklik olmadığı gözlenmiştir (Grafik-1).



Grafik 1. Alt Ekstremitte I/R modeli oluşturulmuş ratlarda B. Monnieri uygulanmasının kas, böbrek, karaciğer ve akciğer dokusu KAT düzeyleri üzerine olan etkisi. Veriler ortalama $\pm$ standart sapma şeklinde verilmiştir (n=6). **p < 0.01 sham kontrol grubuna göre; #p < 0.05, I/R grubuna göre. KAT: katalaz, I/R: iskemi- reperfüzyon.

4.1.1.2. Glutasyon Peroksidaz (GPx) Aktivitesi :

10 gün boyunca 1 x 300 mg/kg p.o. B. Monnieri ektresi uygulanmış ratlarda oluşturulan alt ekstremit  İ/R modeli sonucunda ratlara ait kas, böbrek, karaciğer ve akciğer dokusunda Glutasyon Peroksidaz düzeylerinde Sham kontrol ve İ/R grubuna kıyasla anlamlı bir anlamlı bir değişiklik olmadığı gözlenmiştir. Analizi yapılan dokularda tek başına B. Monnieri ektresi uygulanması veya İ/R modeli oluşturulmasının kontrol grubuna kıyasla Glutasyon Peroksidaz düzeylerinde istatistiksel anlamda herhangi bir değişiklik meydana getirmediği saptanmıştır (Grafik-2).

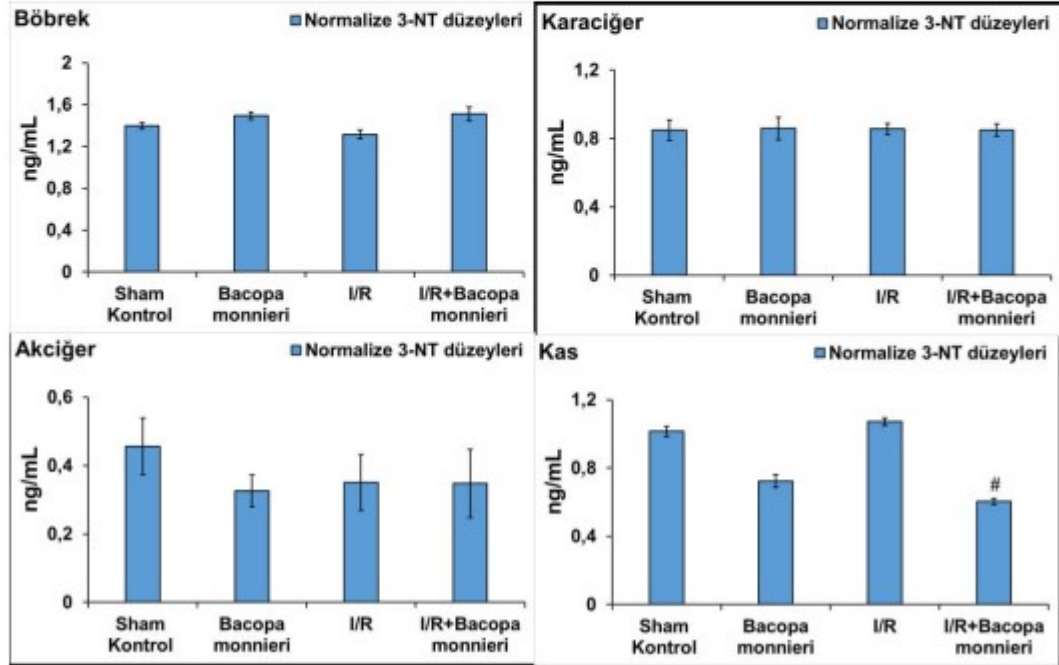


Grafik 2. Alt Ekstremitte I/R modeli oluşturulmuş ratlarda B. Monnieri uygulanmasının kas, böbrek, karaciğer ve akciğer dokusu GPx düzeyleri üzerine olan etkisi. Veriler ortalama $\pm$ standart sapma şeklinde verilmiştir (n=6). GPx: Glutatyon Peroksidaz, I/R: iskemi- reperfüzyon.

4.1.2. Nitrozatif Stres ve İnflamatuvar Belirteçler Üzerine Olan Etkisi

4.1.2.1. 3- Nitrotirozin (3-NT) Düzeylerinin Belirlenmesi:

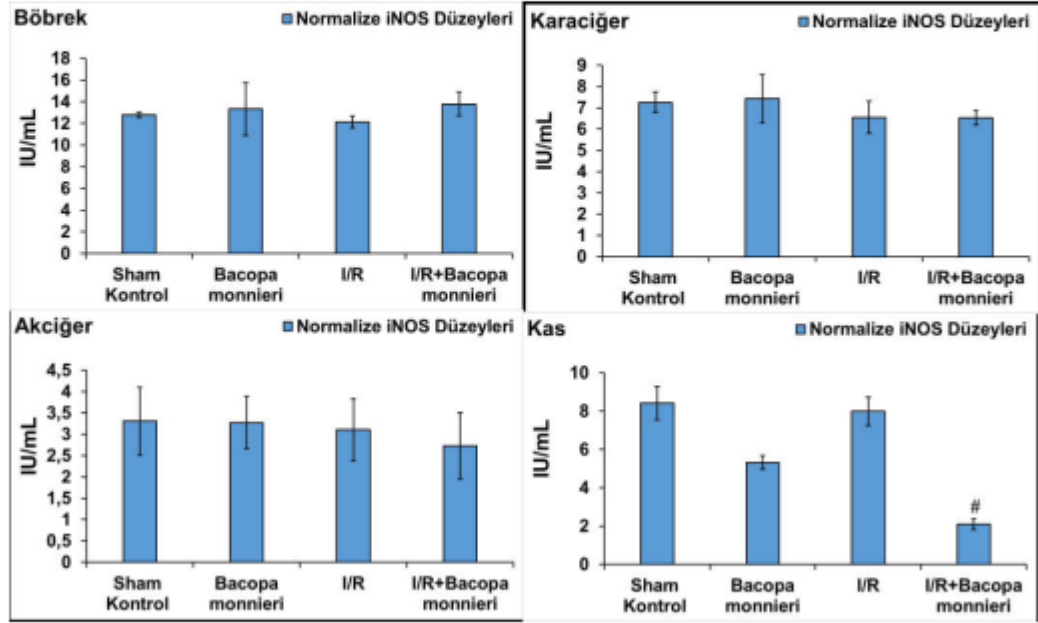
10 gün boyunca 1 x 300 mg/kg p.o. B. Monnieri ekstresi uygulanmış ratlarda oluşturulan alt ekstremité İ/R modeli sonucunda ratlara ait böbrek, karaciğer ve akciğer dokusunda dokularındaki 3-NT düzeylerinde sham kontrol ve İR grubuna kıyasla anlamlı bir değişiklik olmadığı gözlenmiştir. Öte yandan B. Monnieri ekstresi uygulanmış ratlarda oluşturulan alt ekstremité İ/R modeli sonucunda ratlara ait kas dokusunda 3-NT düzeylerinde düzeylerinde, Sham kontrol ve İR grubuna kıyasla anlamlı bir azalma gözlenmiştir (Grafik 3).



Grafik 3. Alt Ekstremitte I/R modeli oluşturulmuş ratlarda B. Monnieri uygulanmasının kas, böbrek, karaciğer ve akciğer dokusu 3-NT düzeyleri üzerine olan etkisi. Veriler ortalama±standart sapma şeklinde verilmiştir (n=6). * $p < 0.05$, sham kontrol grubuna göre; # $p < 0.05$, I/R grubuna göre. 3-NT: 3- Nitrotirozin, I/R: iskemi- reperfüzyon.

4.1.2.2. iNOS Düzeylerinin Belirlenmesi

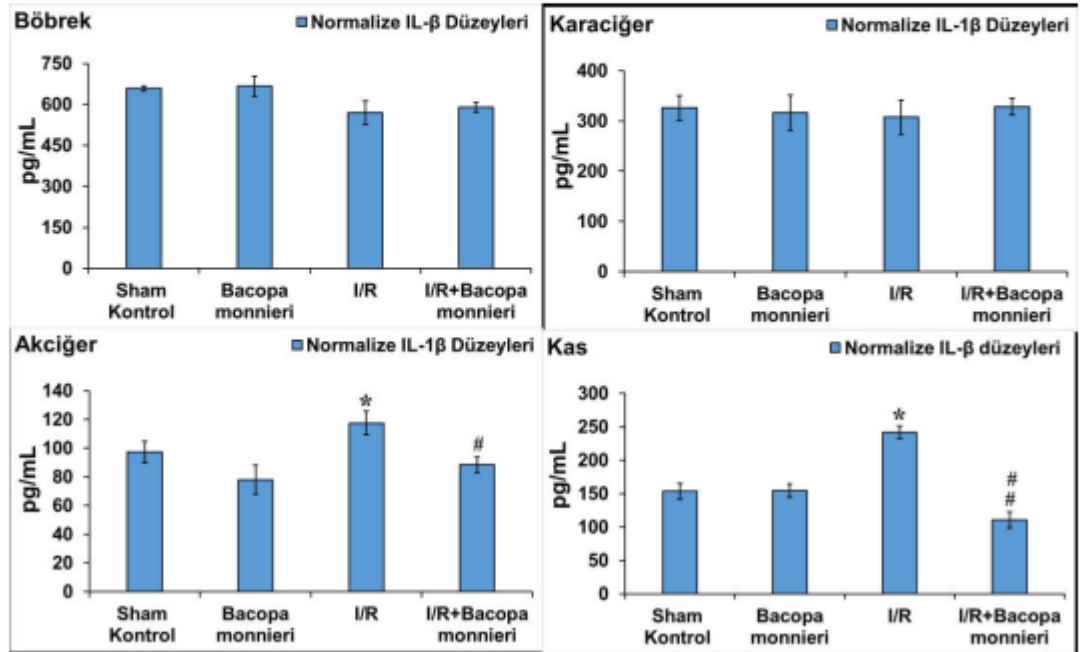
10 gün boyunca 1 x 300 mg/kg p.o. B. Monnieri ekstresi uygulanmış ratlarda oluşturulan alt ekstremité İ/R modeli sonucunda ratlara ait kas dokusunda iNOS düzeylerinde Sham kontrol ve İ/R grubuna kıyasla anlamlı bir azalma gözlenmiştir. Öte yandan B. Monnieri ekstresi uygulanmış ratlarda oluşturulan alt ekstremité İ/R modeli sonucunda ratlara ait böbrek, karaciğer ve akciğer dokularındaki iNOS düzeyleri düzeylerinde, Sham kontrol ve İ/R grubuna kıyasla anlamlı bir değişiklik olmadığı gözlenmiştir (Grafik 4).



Grafik 4. Alt Ekstremitte I/R modeli oluşturulmuş ratlarda B. Monnieri uygulanmasının kas, böbrek, karaciğer ve akciğer dokusu iNOS düzeyleri üzerine olan etkisi. Veriler ortalama±standart sapma şeklinde verilmiştir (n=6). * $p < 0.05$, sham kontrol grubuna göre; # $p < 0.05$, I/R grubuna göre iNOS: indüklenabilir nitrik oksit sentaz, I/R: iskemi- reperfüzyon.

4.1.2.3. IL-1 beta Düzeylerinin Belirlenmesi

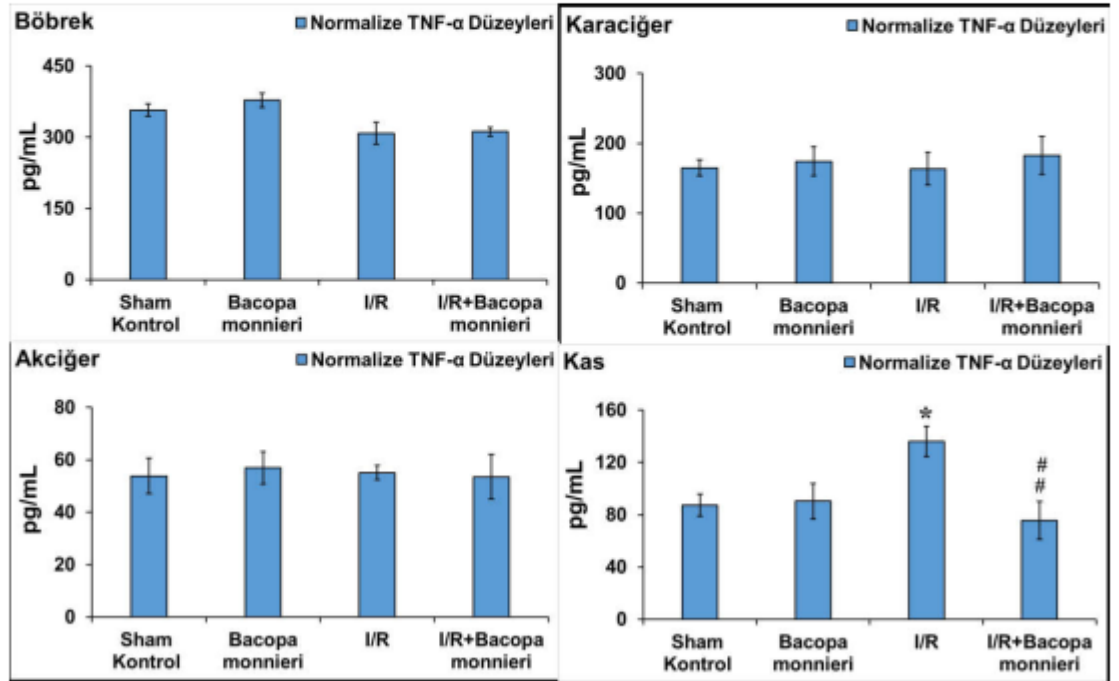
10 gün boyunca 1 x 300 mg/kg p.o. B. Monnieri ekstresi uygulanmış ratlarda oluşturulan alt ekstremité İ/R modeli sonucunda ratlara ait böbrek ve karaciğer dokularında IL-1 beta düzeylerinde Sham kontrol ve İ/R grubuna kıyasla anlamlı bir değişiklik olmadığı gözlenmiştir. Öte yandan B. Monnieri ekstresi uygulanmış ratlarda oluşturulan alt ekstremité İ/R modeli sonucunda ratlara ait kas ve akciğer dokularındaki IL-1 beta düzeylerinde, istatistiksel olarak anlamlı bir azalma olduğu gözlenmiştir. Sadece I/R modeli oluşturulan ratlarda ise kas ve akciğer dokularında IL-1 beta düzeylerinde anlamlı bir artış meydana gelmiştir (Grafik 5)



Grafik 5. Alt Ekstremitte I/R modeli oluşturulmuş ratlarda B. Monnieri uygulanmasının kas, böbrek, karaciğer ve akciğer dokusu IL-1 beta düzeyleri üzerine olan etkisi. Veriler ortalama±standart sapma şeklinde verilmiştir (n=6). *p < 0.05, sham kontrol grubuna göre; #p < 0.05, ##p < 0.01 I/R grubuna göre IL-1 beta: İnterlökin-1 beta, I/R: iskemi- reperfüzyon.

4.1.2.4. TNF alfa Düzeylerinin Belirlenmesi

10 gün boyunca 1 x 300 mg/kg p.o. B. Monnieri ekstresi uygulanmış ratlarda oluşturulan alt ekstremité İ/R modeli sonucunda ratlara ait böbrek, karaciğer ve akciğer dokusunda TNF-alfa düzeylerinde Sham kontrol ve İ/R grubuna kıyasla anlamlı bir değışiklik olmadığı gözlenmiştir. Sadece I/R modeli oluşturulan ratlara ait kas dokusunda TNF-alfa düzeylerinde istatistiksel olarak anlamlı bir artış meydana gelmiştir. Öte yandan B. Monnieri ekstresi uygulanmış ratlarda oluşturulan alt ekstremité İ/R modeli sonucunda ratlara ait kas dokusundaki TNF-alfa düzeylerinde istatistiksel olarak anlamlı bir azalma gözlenmiştir (Grafik 6).



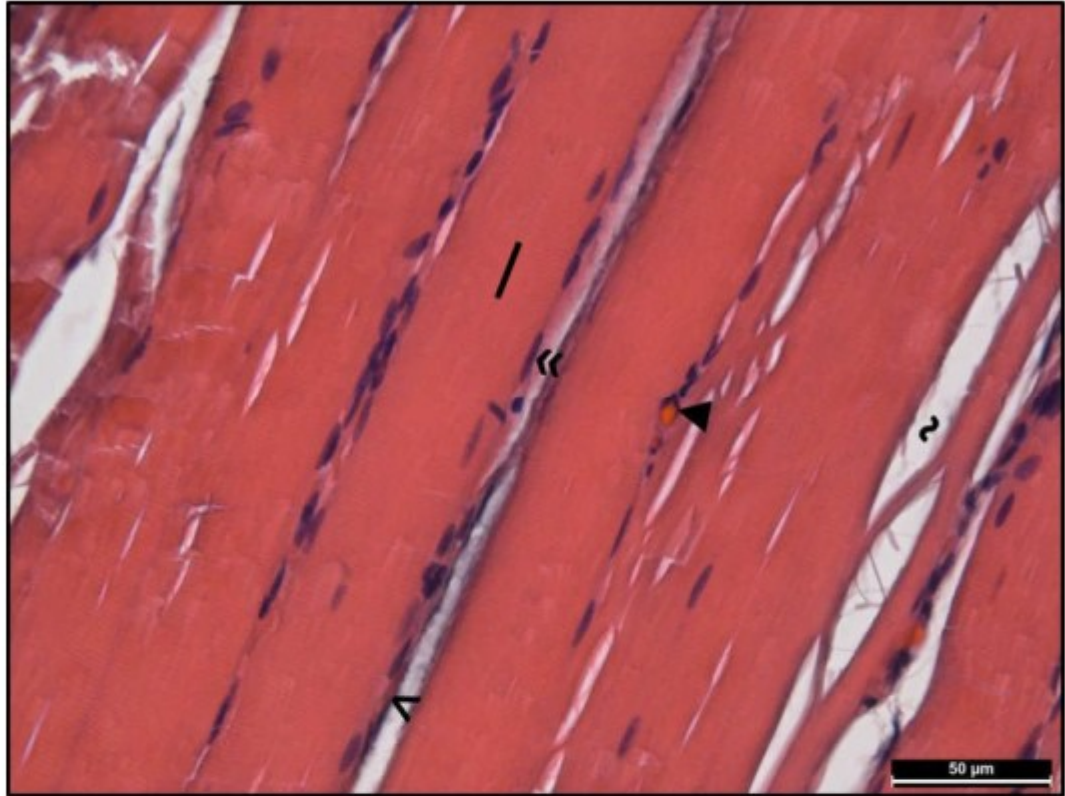
Grafik 6. Alt Ekstremitte I/R modeli oluşturulmuş ratlarda B. Monnieri uygulanmasının kas, böbrek, karaciğer ve akciğer dokusu TNF-alfa düzeyleri üzerine olan etkisi. Veriler ortalama $\pm$ standart sapma şeklinde verilmiştir (n=6). *p < 0.05, sham kontrol grubuna göre; ##p < 0.01 I/R grubuna göre TNF-alfa: Tümör nekrozis faktör alfa, I/R: iskemi- reperfüzyon.

4.2. İmmünohistokimyasal Değerlendirme

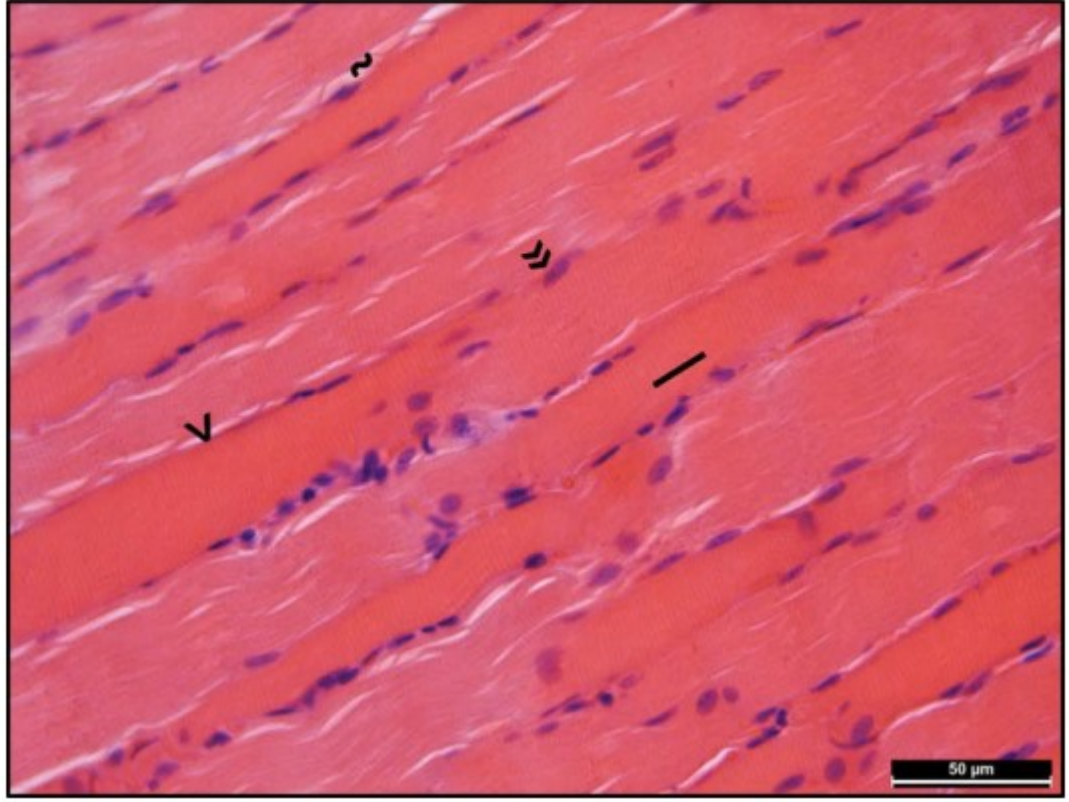
4.2.1. Hematoksilen-Eozin Boyama Yöntemi ile Değerlendirme

4.2.1.1. Kas Dokusu Hematoksilen-Eozin Bulguları

Sham kontrol grubu ve Bacopa uygulanan gruba ait gastrokinemius kası Hematoksilen-Eozin boyamalarında kas lifleri sarkolemma altına yerleşmiş kas çekirdekleri ve enine çizgilenmeleri ile normal yapıda izlendi. Kas liflerini saran endomisyumda kan damarları belirgindi (Resim 4 ve 5).

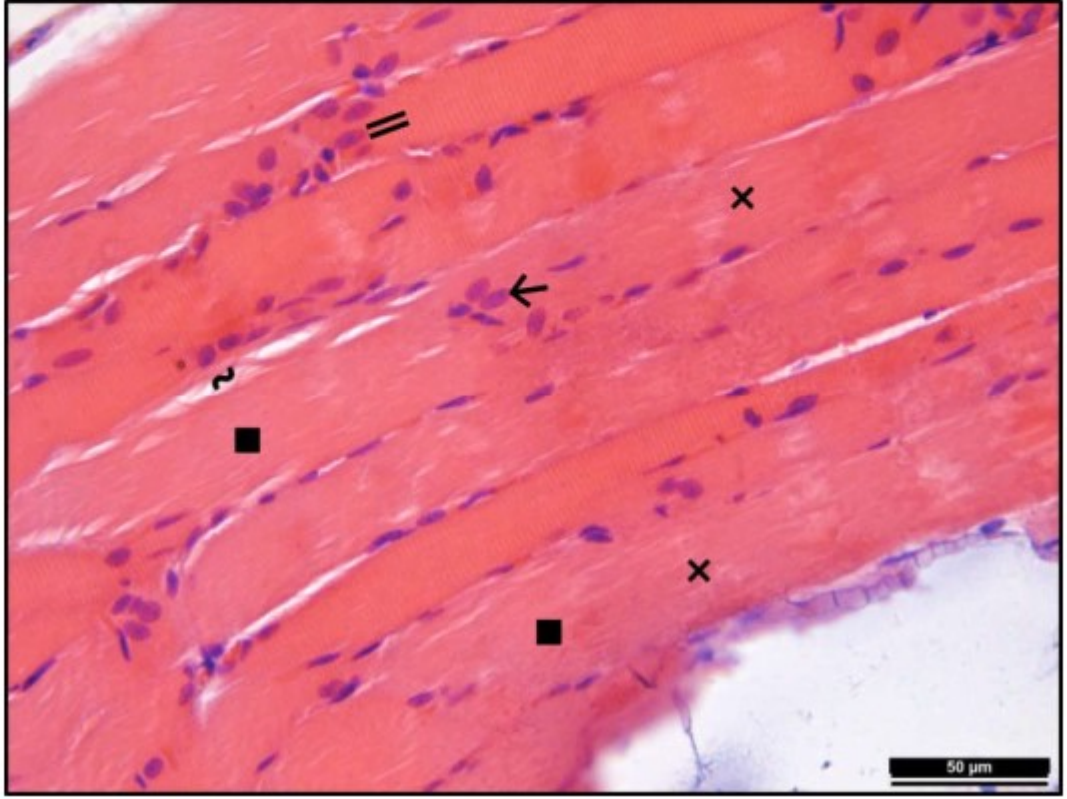


Resim 4. Sham kontrol grubuna ait resimde kas hücrelerinde sarkolemma (/), çekirdek (//), enine çizgilenme (|), endomisyum (~), kan damarları (▼) görülüyor (Hematoksilen-Eozin x400).



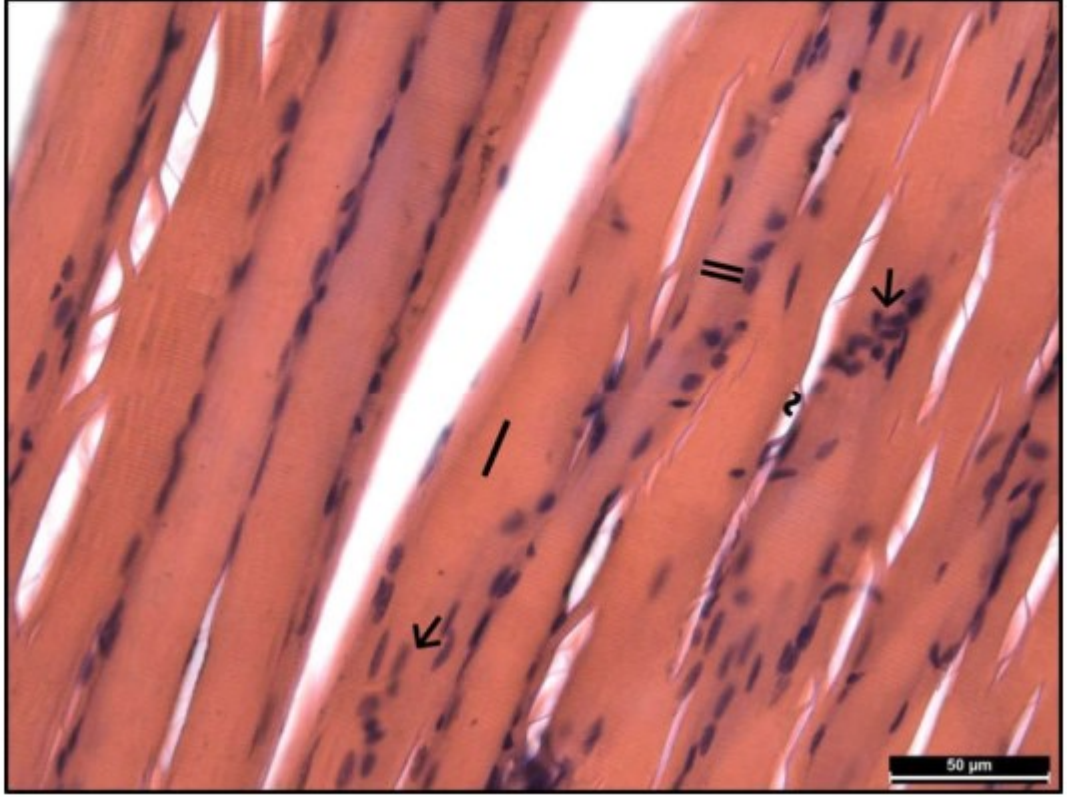
Resim 5. Bacopa kontrol grubuna ait resimde kas hücrelerinde sarkolemma (>), çekirdek (»), enine çizgilenme (|), endomisyum (~) izleniyor (Hematoksilen-Eozin x400).

İskemi-reperfüzyon uygulanan gruba ait kas kesitlerinde en dikkat çekici bulgu; kas hücre çekirdeklerindeki merkezi göç ve amitotik bölünmeydi, bu bulgu, iskemiye bağlı yetersiz kanlanma sonucu kas hücrelerinde olaylanan adaptasyon olarak değerlendirildi. Özellikle merkezi çekirdek göçü olan kas liflerinde, miyofibril organizasyonunun bozulduğu ve enine çizgilenmelerin gözlenmediği dikkati çekti. Bu liflerde göreceli hipertrofik görüntü ilgi çekiciydi. Endomisyumda herhangi bir değişiklik görülmedi (Resim 6).



Resim 6. İskemi-reperfüzyon grubuna ait resimde kas hücrelerinde merkezi çekirdek göçü (↑), amitotik bölünen çekirdekler (|), bozulmuş miyofibril organizasyonu (×), hipertrofi (■), endomisyum (~) görülüyor (Hematoksilen-Eozin x400).

İskemi-reperfüzyon ile birlikte Bacopa uygulanan gruba ait kas kesitlerinde çekirdek göçünün hala devam ettiği ancak miyofibril organizasyonu ve enine çizgilenmelerin sadece iskemi-reperfüzyon uygulanan gruba karşı daha düzenli olduğu dikkati çekti. Çekirdek proliferasyonunun (amitotik bölünme) izlenmeye devam ettiği ancak kas hipertrofisinin görülmediği tespit edildi. Endomisyum normal yapıdaydı (Resim 7).

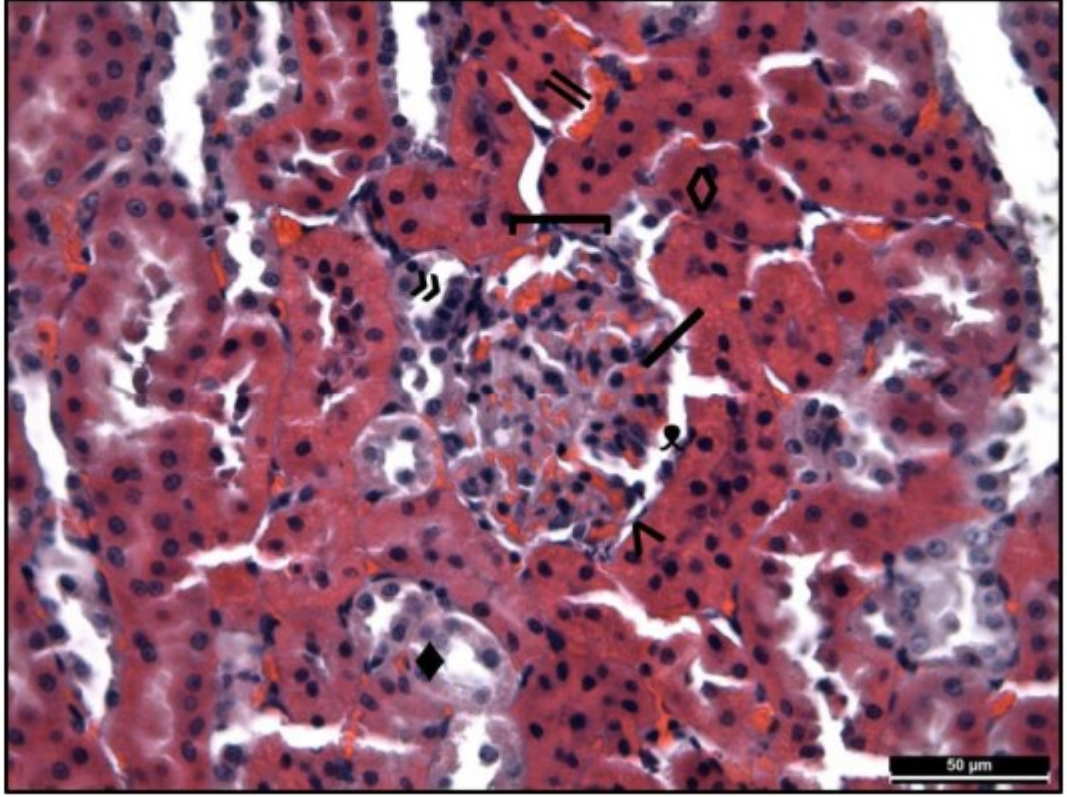


Resim 7. Bacopa-iskemi-reperfüzyon grubuna ait resimde kas hücrelerinde merkezi çekirdek göçü (↑), amitotik bölünen çekirdekler (I), endomisyum (~) izleniyor (Hematoksilen-Eozin x400).

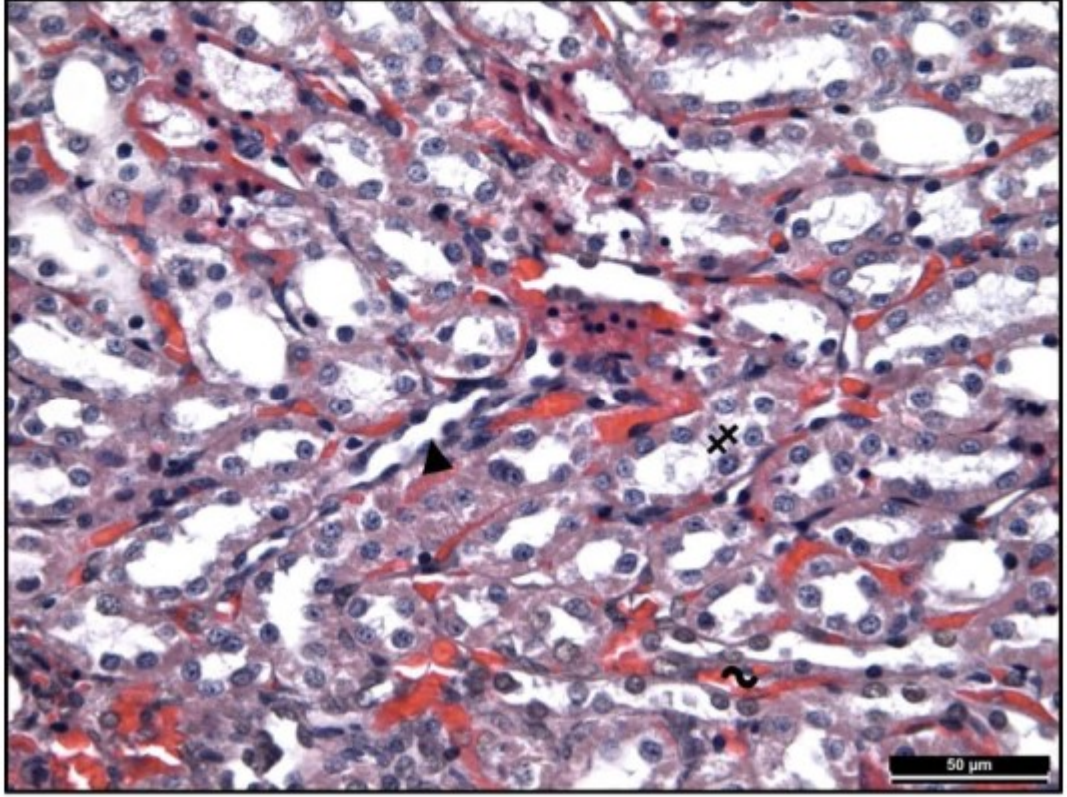
Sonuç olarak iskemi-reperfüzyon uygulamasının kas dokusunda amitotik çekirdek bölünmesi ve göçüne yol açtığı, buna bağlı miyofibril organizasyonunda bozulmaya neden olduğu tespit edildi. İskemi-reperfüzyon ile birlikte uygulanan Bacopa'nın, kas dokusunda meydana gelen dejenerasyonları kısmen engellediği izlendi.

4.2.1.2. Böbrek Dokusu Hematoksilen-Eozin Bulguları

Sham kontrol grubu Hematoksilen-Eozin boyamaları böbrek korteksinde, böbrek cisimciği glomerüler kapiller ve Bowman kapsülü ile normal yapısında izlendi. İdrar boşluğu ve tek katlı yassı epitel yapısı ile Bowman kapsülünün paryetal yaprağı normal morfolojik özellik sergiliyordu. Böbrek cisimciği çevresinde nefrona ait proksimal tübüller eozinofilik yapısı ile, distal tübüller ise daha zayıf boyanmış özellikleri ile belirgindi. Makula densa yapısı bazı nefronlarda belirgin olarak izlendi. Peritübüler kapillerler olağan görünümünde idi (Resim 8). Böbrek medullasında Henle kulbunun ince parçası, toplama kanalları ve kapillerler normal yapıları ile ayırt edildi (Resim 9).

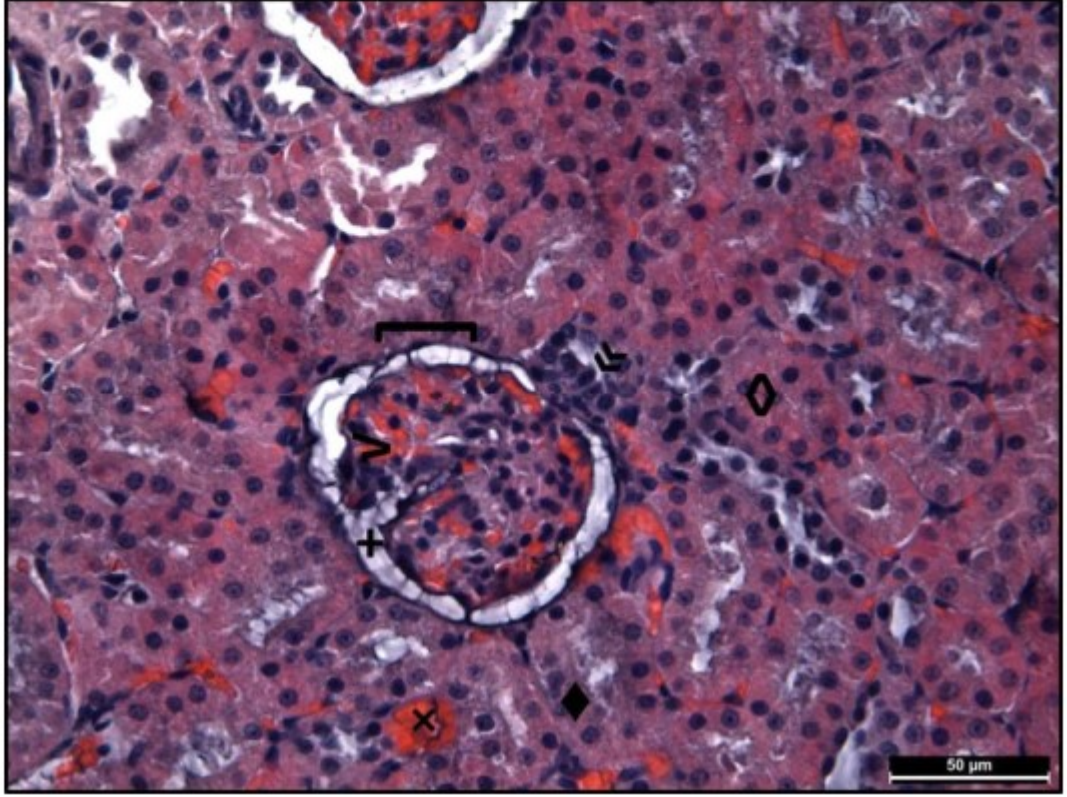


Resim 8. Sham kontrol grubuna ait resimde böbrek korteksinde böbrek cisimciği ([), glomerüler kapillerler (|), Bowman kapsülünün paryetal yaprağı (>), idrar boşluğu (•), proksimal tübüller (◈), distal tübüller (♦), makula densa (»), peritübüler kapillerler (I) görülüyor (Hematoksilen-Eozin x400).

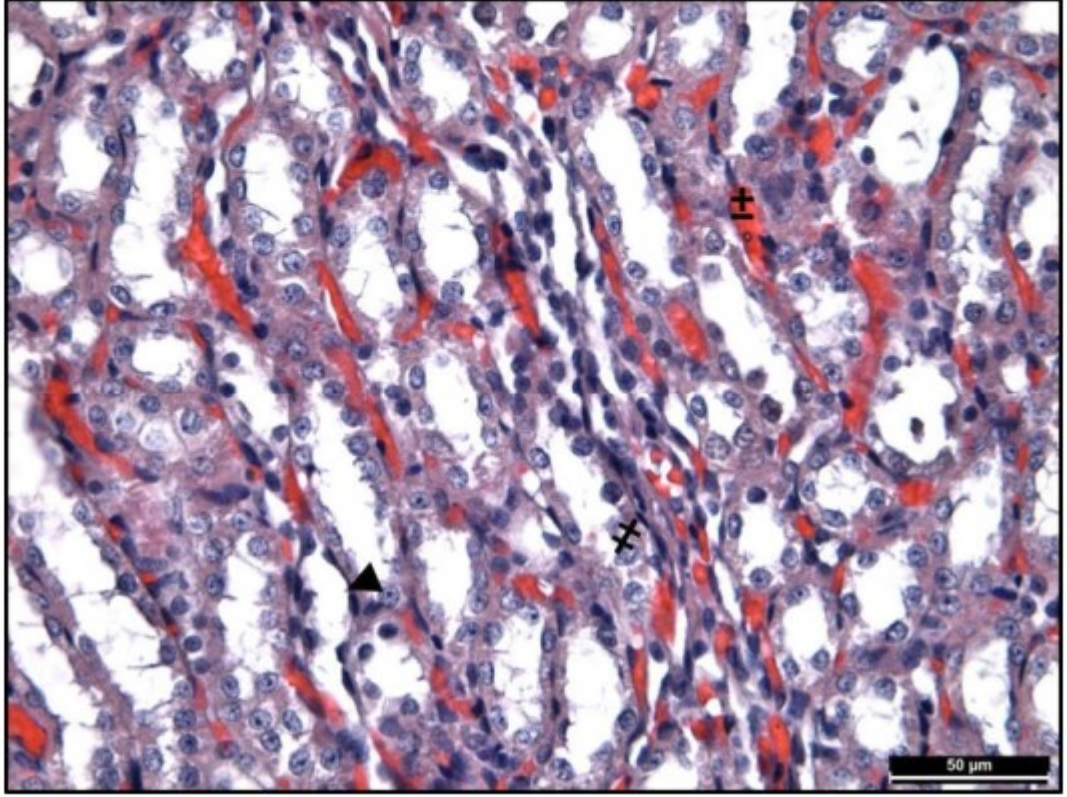


Resim 9. Sham kontrol grubuna ait resimde böbrek medullasında Henle kulbunun ince parçası (▼), toplama kanalları (#), medullar kapillerler (~) izleniyor (Hematoksilen-Eozin x400).

Bacopa uygulanan gruba ait böbrek dokusu Hematoksilen-Eozin boyamalarında; böbrek korteksinde yer alan böbrek cisimciklerinde en tipik bulgu, göreceli glomerüler kapiller dilatasyonuydu. Ayrıca, idrar boşluğunda hiyalinizasyon belirgindi, hiyalinizasyona bağlı olarak Bowman kapsülü paryetal yaprağını oluşturan yassı epitel hücreleri çok net izlenemedi. Nefrona ait tübüller incelendiğinde, proksimal ve distal tübüller normal yapıları ile izlenirken, distal tübülün oluşturduğu makula densa yapısı belirgin olarak gözlendi. Glomerüllerde olduğu gibi, peritübüler kapillerlerde de belirgin dilatasyon ayırt edildi (Resim 10). Böbrek medullasında, medullar kapillerlerde dilatasyon mevcuttu, Henle kulbunun ince parçası ve toplama kanalları ise normal yapısında ayırt edildi (Resim 11).

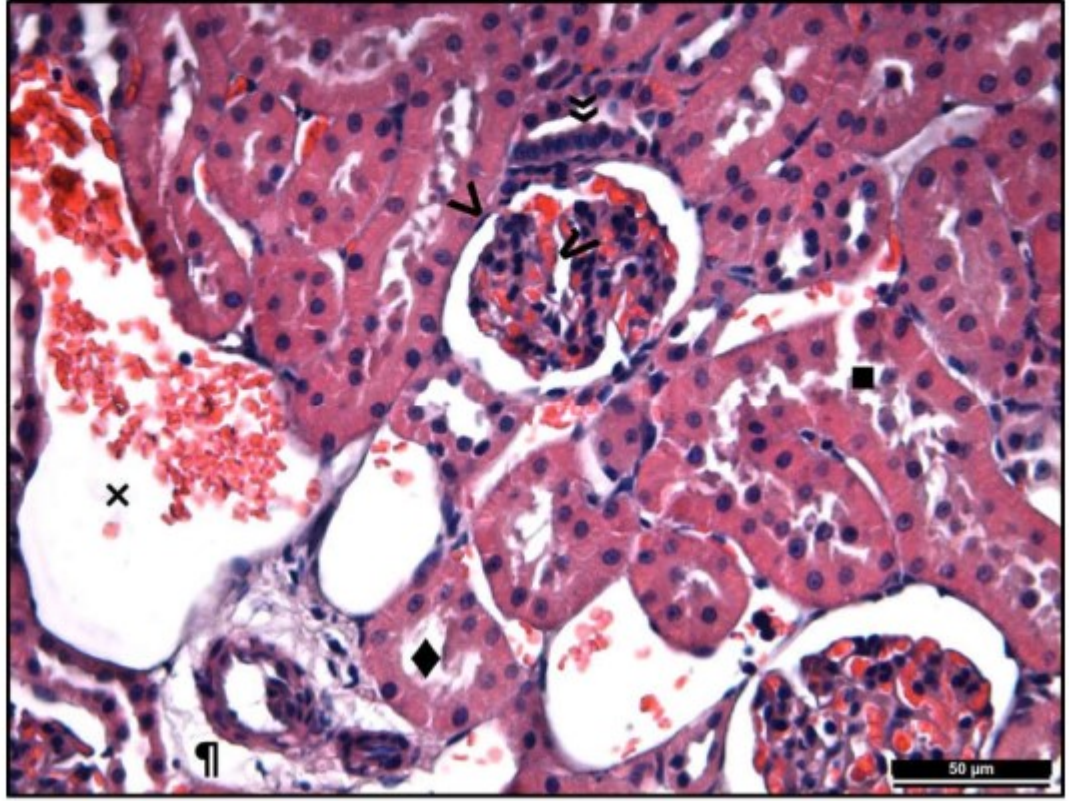


Resim 10. Bacopa grubuna ait resimde böbrek korteksinde glomerüler kapillerlerde dilatasyon (✓), idrar boşluğunda hiyalinizasyon (+), proksimal tübüller (◇), distal tübüller (◆), makula densa (»), peritübüler kapillerlerde dilatasyon (×) görülüyor (Hematoksilen-Eozin x400).

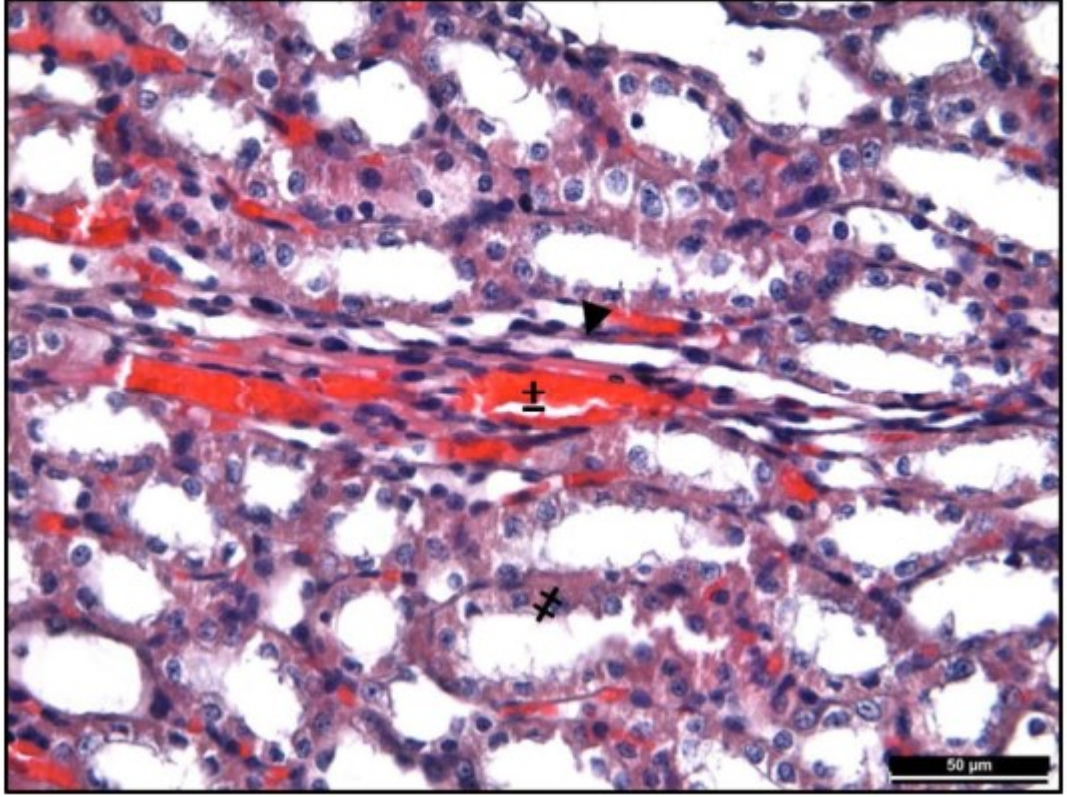


Resim 11. Bacopa grubuna ait resimde Böbrek medullasında medullar kapillerlerde dilatasyon (±), Henle kulbunun ince parçası (▼), toplama kanalları (x) izleniyor (Hematoksilen-Eozin x400).

İskemi-reperfüzyon grubu Hematoksilen-Eozin boyamalarında böbrek korteksinde böbrek cisimciğinde, Bacopa grubunda gözlenen glomerüler kapiller ağdaki dilatasyon bu grupta da dikkati çekti. Bowman kapsülü paryetal yaprağı yassı epitel hücreleri ile belirgindi. Nefrona ait tübüller değerlendirildiğinde, distal tübüller ve gözlemlenen alanlardaki makula densa yapıları normal olarak izlenirken, proksimal tübüllerde tübül lümeninin apikal sitoplazmasında lümen içerisine kopma ve dökülmeler belirgin olarak ayırt edildi. Peritübüler kapillerlerde çok yoğun ve yaygın dilatasyon, bu grubun en dikkat çekici özelliği olarak tespit edildi. Ayrıca periarteriyal ödem de dikkat çekti (Resim 12). Böbrek medullasında yapılan incelemelerde, medullar kapiller dilatasyonu görüldü, Henle kulbunun ince parçası ve toplama kanalları ise normal yapılarıyla izlendi (Resim 13).

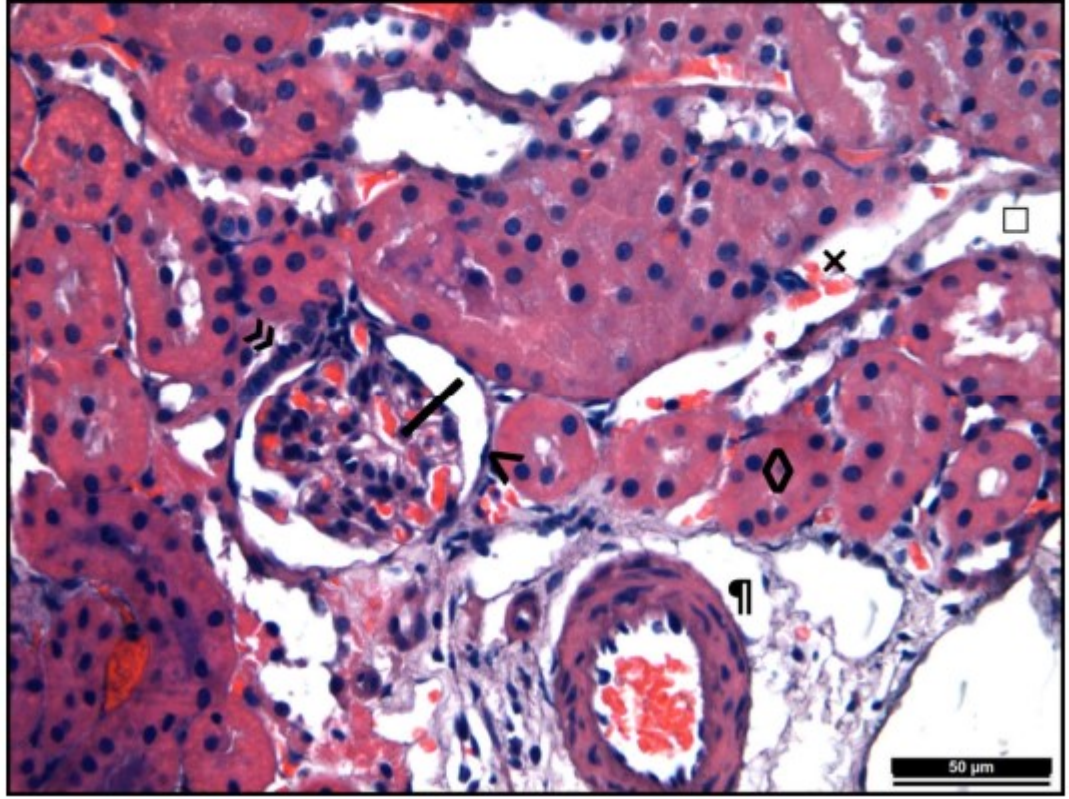


Resim 12. İskemi-reperfüzyon grubuna ait resimde böbrek korteksinde glomerüler kapillerlerde dilatasyon (✓), Bowman kapsülünün paryetal yaprağı (>), distal tübüller (◆), makula densa (>>), proksimal tübüllerde tübül lümeni içerisine kopma ve dökülmeler (■), peritübüler kapillerlerde dilatasyon (×), periarteriyal ödem (¶) görülüyor (Hematoksilen-Eozin x400).

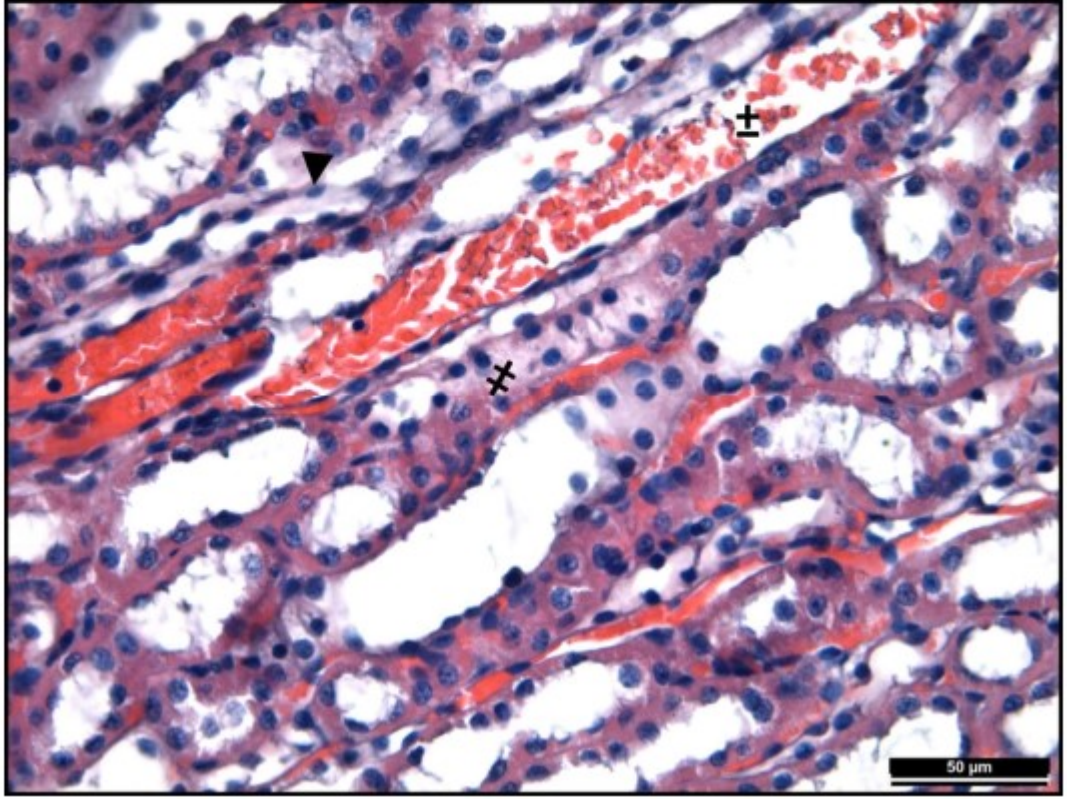


Resim 13. İskemi-reperfüzyon grubuna ait resimde böbrek medullasında medullar kapillerlerde dilatasyon (±), Henle kulbunun ince parçası (▼), toplama kanalları (≠) izleniyor (Hematoksilen-Eozin x400).

İskemi-reperfüzyon ile birlikte Bacopa uygulanan gruba ait böbrek dokusu Hematoksilen-Eozin boyamaları böbrek korteksinde; glomerüler kapillerler, Bowman kapsülünün paryetal yaprağı, makula densa ve proksimal tübüller normal yapılarında izlendi. Glomerüler kapillerlerde dilatasyon ve proksimal tübüllerde dökülme tespit edilmedi. Periarteriyal kapillerlerde azalmış ödem, distal tübüllerde dilatasyon ve peritübüler kapillerlerde yoğun dilatasyon izlendi (Resim 14). Böbrek medullasında, medullar kapillerlerde dilatasyon mevcuttu, Henle kulbunun ince parçası ve toplama kanalları ise normal yapısındaydı (Resim 15).



Resim 14. Bacopa-iskemi-reperfüzyon grubuna ait resimde böbrek korteksinde glomerüler kapillerler (|),Bowman kapsülünün paryetal yaprağı (>), makula densa (»), proksimal tübüller (◇), periarteriyal ödem (|), distal tübüllerde dilatasyon (□), peritübüler kapillerlerde yoğun dilatasyon (×) görülüyor (Hematoksilen-Eozin x400).

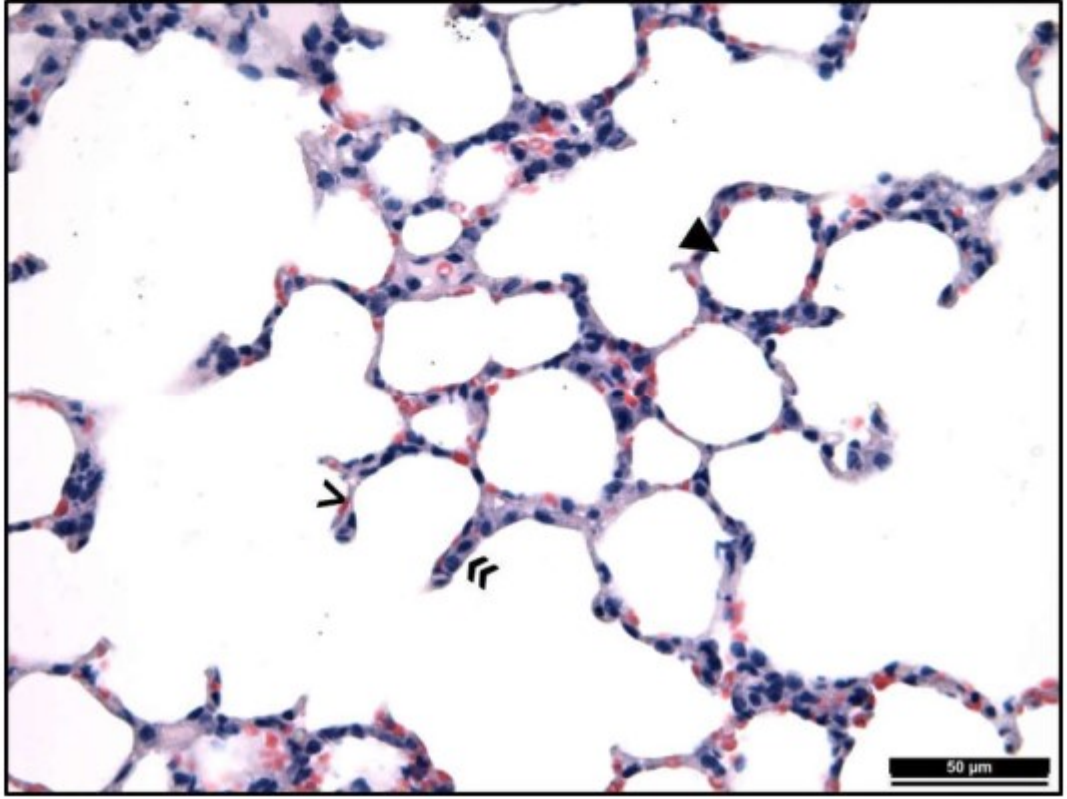


Resim 15. Bacopa-iskemi-reperfüzyon grubuna ait resimde böbrek medullasında medullar kapillerlerde dilatasyon (±), Henle kulbunun ince parçası (▼), toplama kanalları (≠) izleniyor (Hematoksilen-Eozin x400).

Sonuç olarak, Hematoksilen-Eozin bulgularına göre iskemi-reperfüzyon uygulamasının glomerüler ve peritübüler kapillerlerde vasküler dilatasyona neden olduğu, uygulamanın periarteriyal ödem oluşturduğu ve proksimal tübüllerde hücresel kayıp şeklinde gözlenen dejeneratif değişikliklere yol açtığı gözlemlendi. İskemi-reperfüzyon ile birlikte uygulanan Bacopa'nın glomerüler ve peritübüler kapiller dilatasyonu üzerinde koruyucu olamadığı, ancak periarteriyal ödemi azaltıp, böbrek tübüllerindeki doku kaybını engellediği tespit edildi.

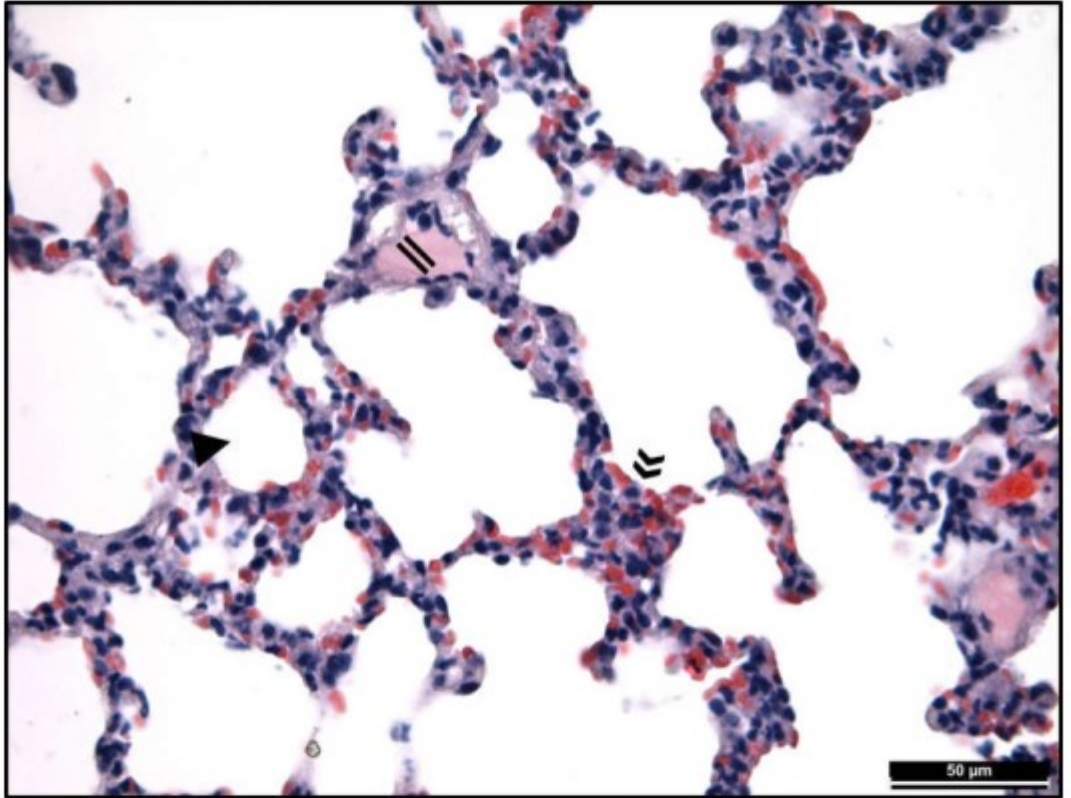
4.2.1.3. Akciğer Dokusu Hematoksilen-Eozin Bulguları

Sham kontrol grubu akciğer kesitlerinde akciğer solunum alanında, alveoller ve interalveolar septa normal yapısı ile gözlemlendi. İnteralveolar septadaki kapillerler normal yapıları ile izlendi (Resim 16).



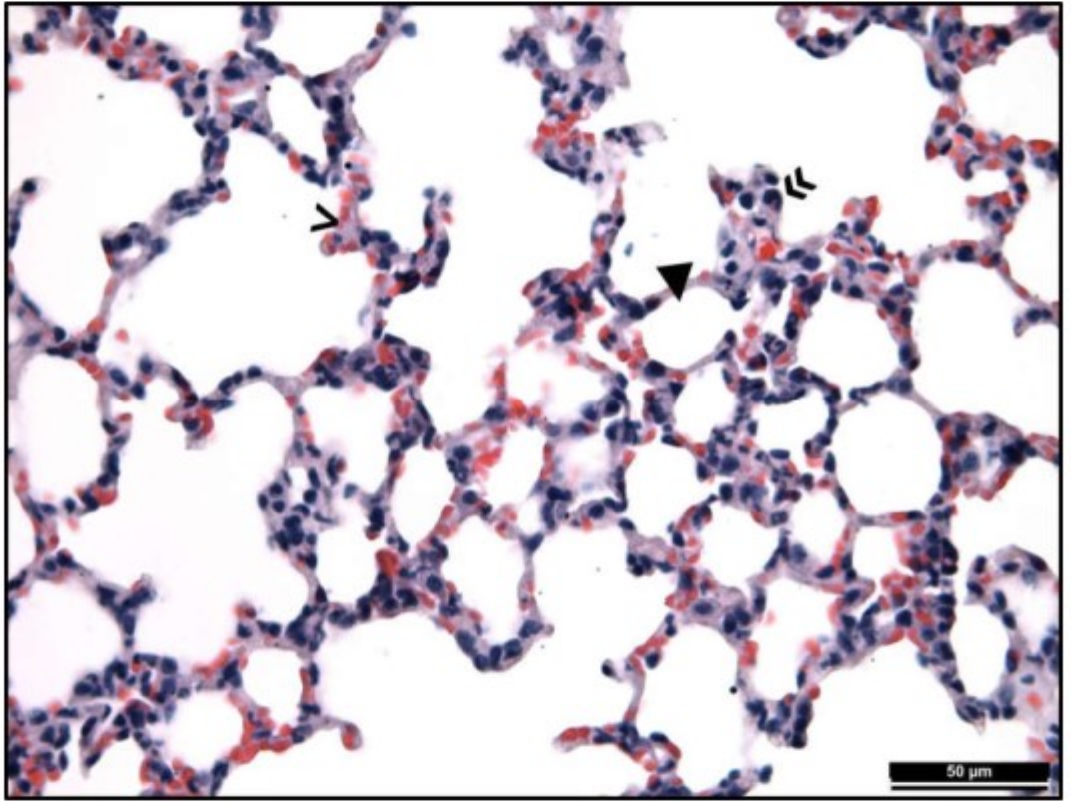
Resim 16. Sham kontrol grubuna ait akciğer kesitlerinde alveoller (▼), interalveolar septa (») ve kapillerler (>) görülüyor (Hematoksilen-Eozin x400).

Bacopa uygulanan grupta interalveolar septanın göreceli olarak kalınlaştığı, buraya ait kapillerlerin dilate olduğu izlendi. Alveoller ise normal yapıları ile ayırt edildi (Resim 17).



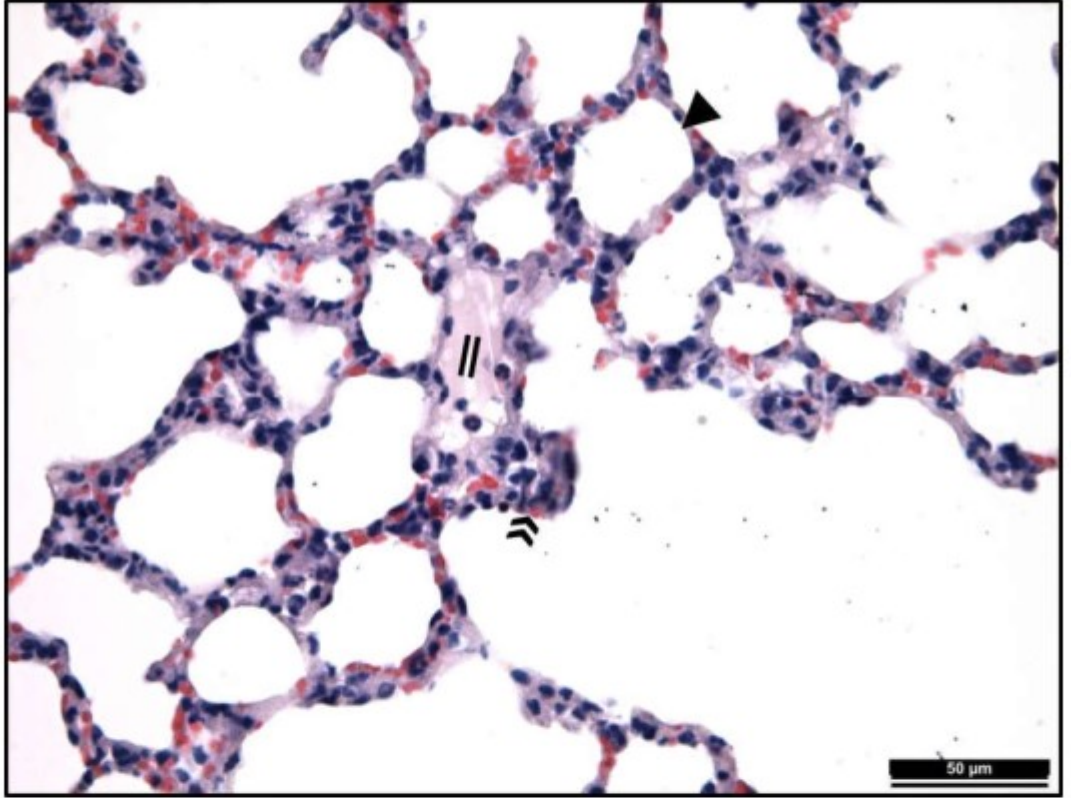
Resim 17. Bacopa grubuna ait akciğer kesitlerinde alveoller (▼), interalveolar septa (») ve kapiller dilatasyonu (I) izleniyor (Hematoksilen-Eozin x400).

İskemi-reperfüzyon uygulanan gruba ait akciğer kesitlerinde genel yapı normaldi ancak interalveoler septada göreceli kapiller artışı dikkati çekti (Resim 18).



Resim 18. İskemi-reperfüzyon grubuna ait akciğer kesitlerinde alveoller (▼), interalveolar septa (») ve kapillerler (>) görülüyor (Hematoksilen-Eozin x400).

İskemi-reperfüzyon ile birlikte Bacopa uygulanan gruba ait akciğer kesitlerinde alveol duvarları normal yapıları ile gözlenirken, yer yer interalveolar septadaki kapiller dilatasyonu Bacopa grubuna benzer olarak izlendi. İnteralveolar septa göreceli olarak yer yer kalındı (Resim 19).



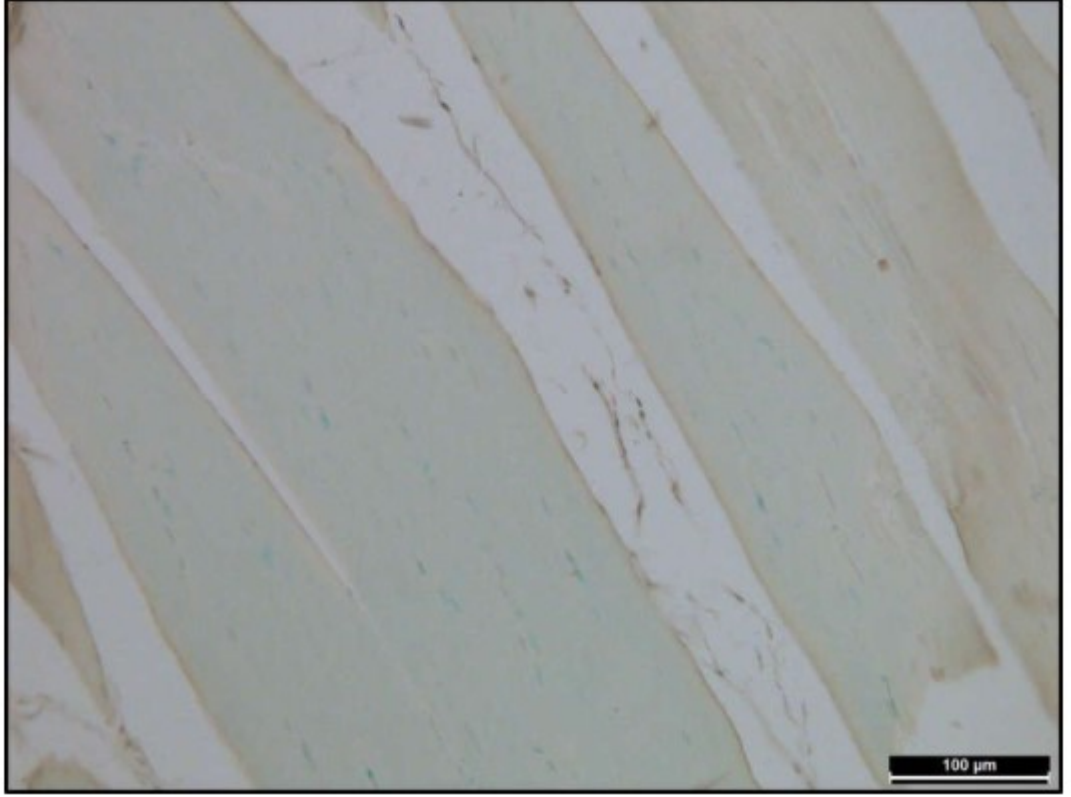
Resim 19. Bacopa-iskemi-reperfüzyon grubuna ait akciğer kesitlerinde alveoller (▼), interalveolar septa (») ve kapiller dilatasyonu (I) izleniyor (Hematoksilen-Eozin x400).

Sonuç olarak, Hematoksilen-Eozin bulgularına göre iskemi-reperfüzyon uygulamasının uzak doku hasarında solunum alanında dejenerasyona yol açmadığı ancak sistemik uygulanan Bacopa'nın alveol duvarında kalınlaşma ve kapiller dilatasyonu gibi yapısal değişimlere neden olduğu ve bu etkisini iskemi-reperfüzyon ile de gösterdiği görüldü.

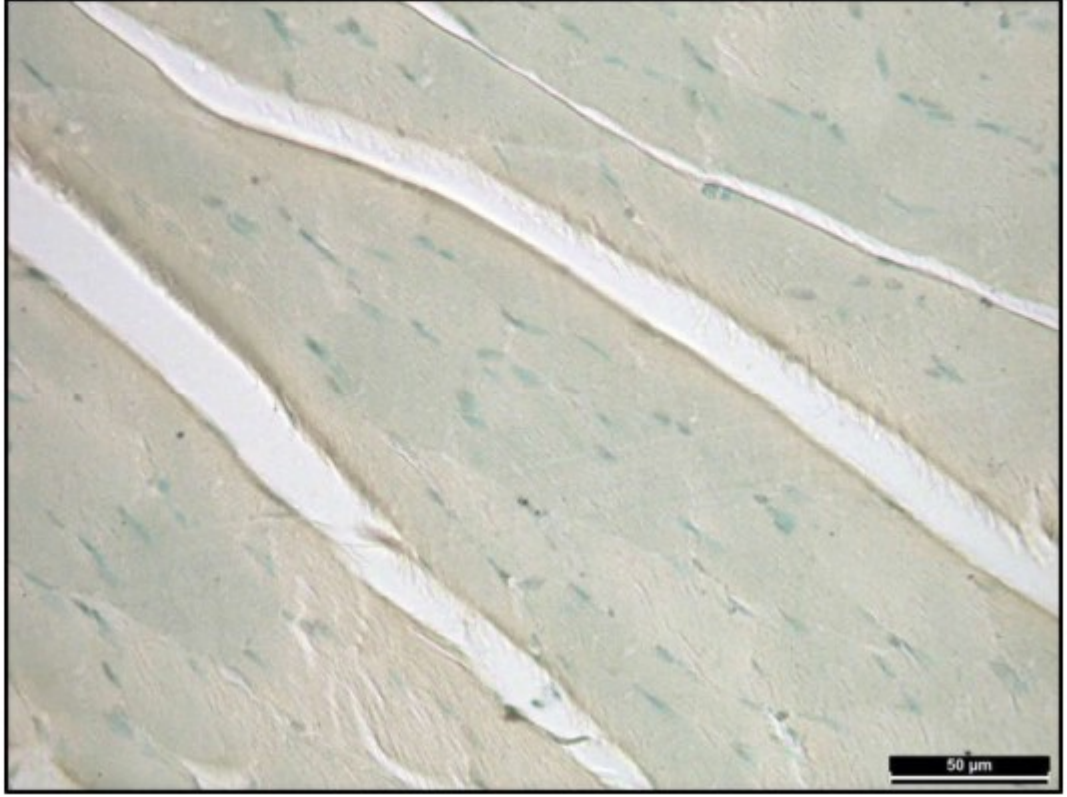
4.2.2. TUNEL Yöntemi ile Değerlendirme

4.2.2.1. Kas Dokusu TUNEL Bulguları

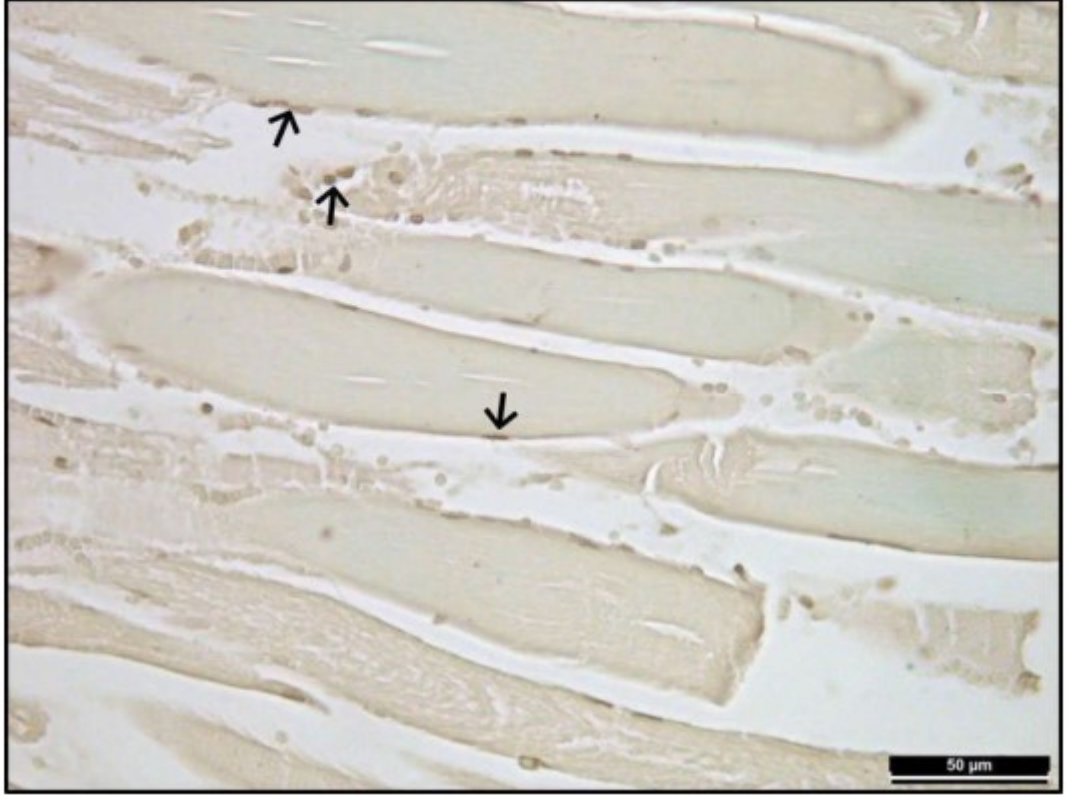
TUNEL boyama sonucunda sham kontrol, Bacopa ve Bacopa-iskemi-reperfüzyon gruplarına ait kas dokularında apoptotik hücrelerin bulunmadığı tespit edildi. İskemi-reperfüzyon grubunda ise az sayıda kas hücresi çekirdeğinin TUNEL pozitif olduğu izlendi (Resim 20, 21, 22 ve 23).



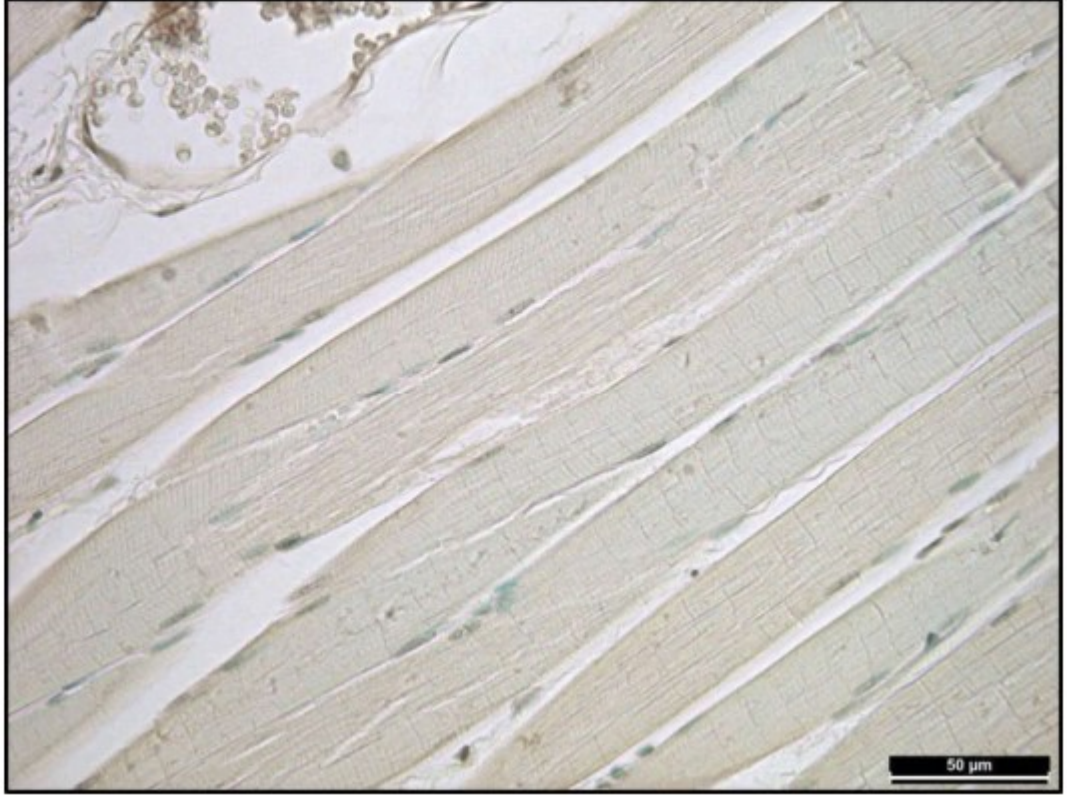
Resim 20. Sham kontrol grubuna ait kas dokularının TUNEL boyamalarında pozitif tutulum gösteren hücre görülmüyor (TUNEL-metilen yeşili x400).



Resim 21. Bacopa grubuna ait kas dokularının TUNEL boyamalarında pozitif tutulum gösteren hücre görülmüyor (TUNEL-metilen yeşili x400).



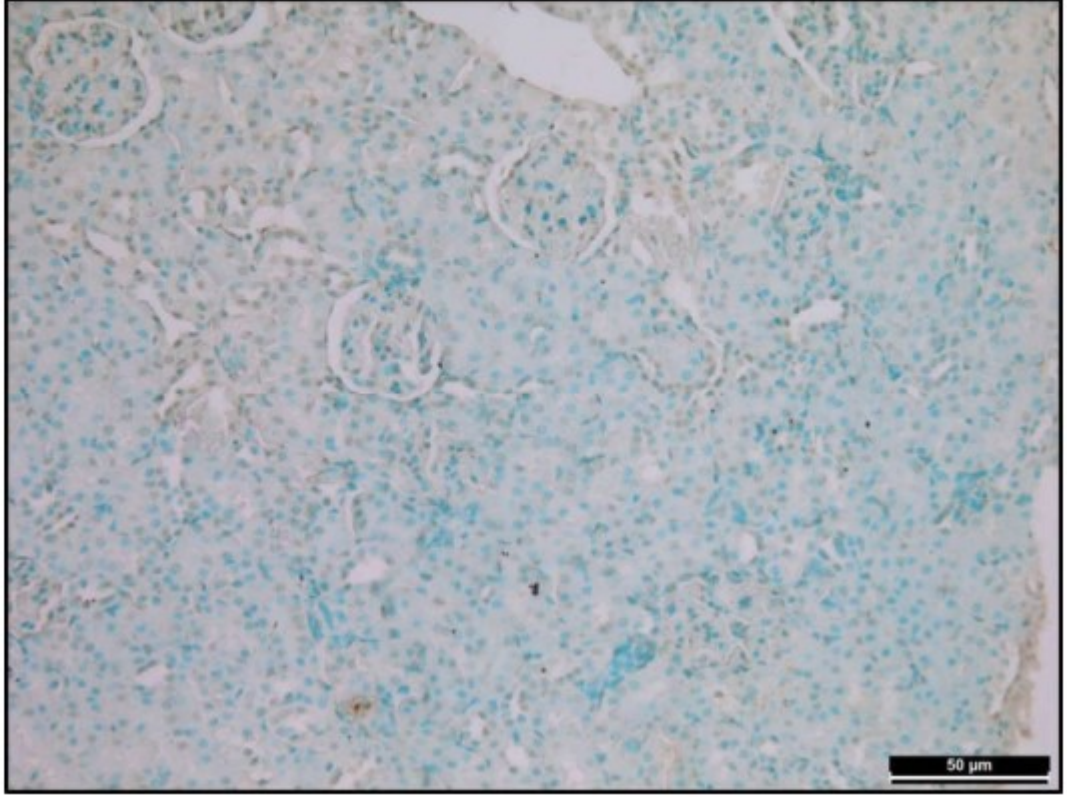
Resim 22. İskemi-reperfüzyon grubuna ait kas dokularının TUNEL boyamalarında kas hücrelerinde pozitif tutulum gösteren çekirdekler (↑) izleniyor (TUNEL-metilen yeşili x400).



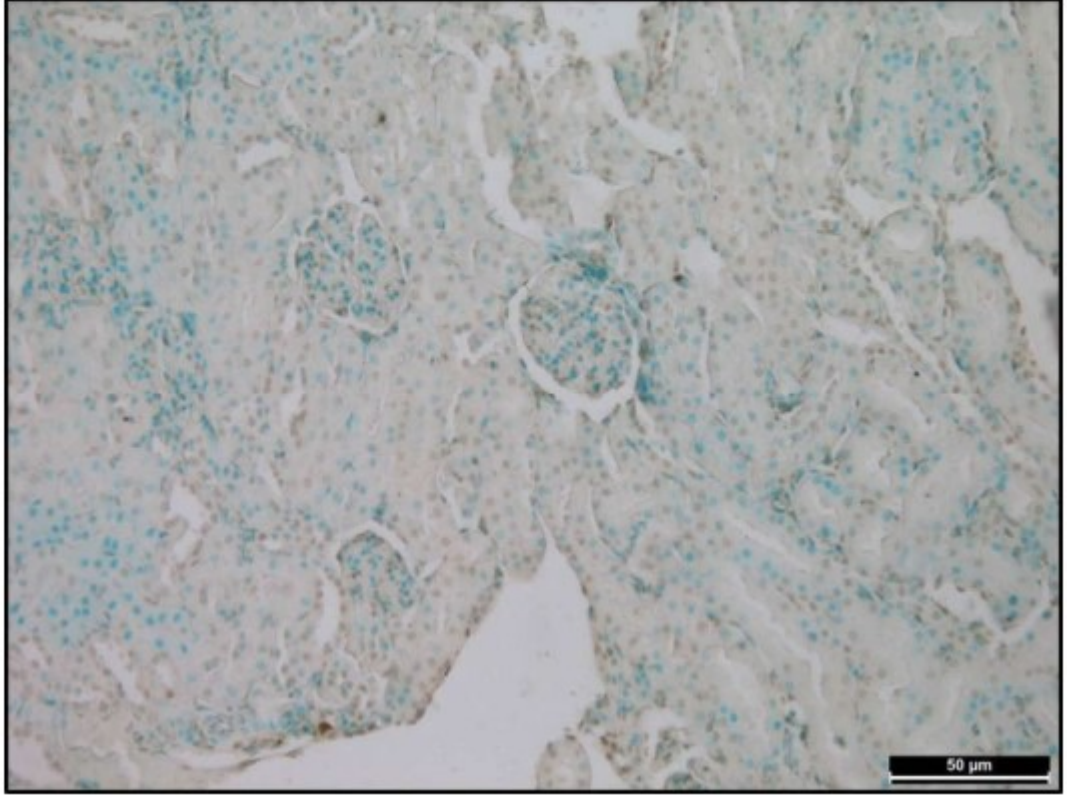
Resim 23. Bacopa-iskemi-reperfüzyon grubuna ait kas dokularının TUNEL boyamalarında pozitif tutulum gösteren hücre görülmüyor (TUNEL-metilen yeşili x400).

4.2.2.2. Böbrek Dokusu TUNEL Bulguları

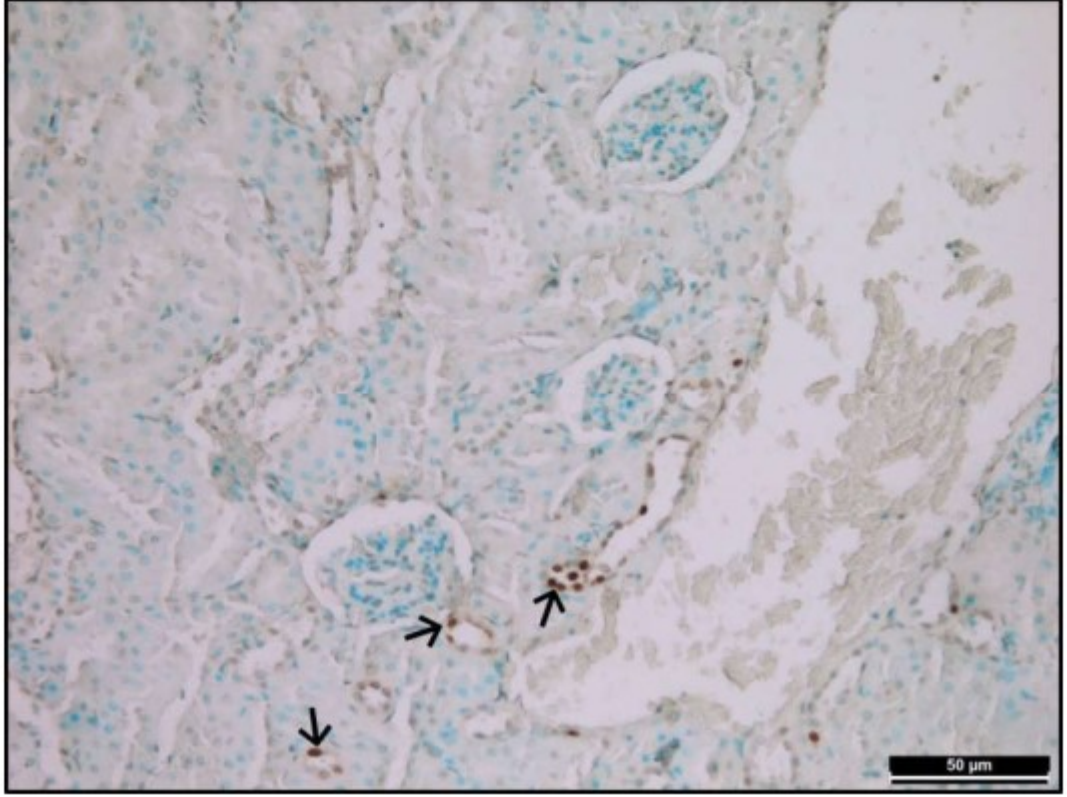
Apopitozisi değerlendirmek için TUNEL ile boyanan sham kontrol, Bacopa ve Bacopa-iskemi-reperfüzyon gruplarının böbrek dokularında yapılan incelemelerde kortekse ait yapılarda tutulum gözlenmedi. İskemi-reperfüzyon grubuna ait böbrek kesitlerinde distal tübül hücrelerinde TUNEL pozitif hücreler ayırt edildi (Resim 24, 25, 26 ve 27).



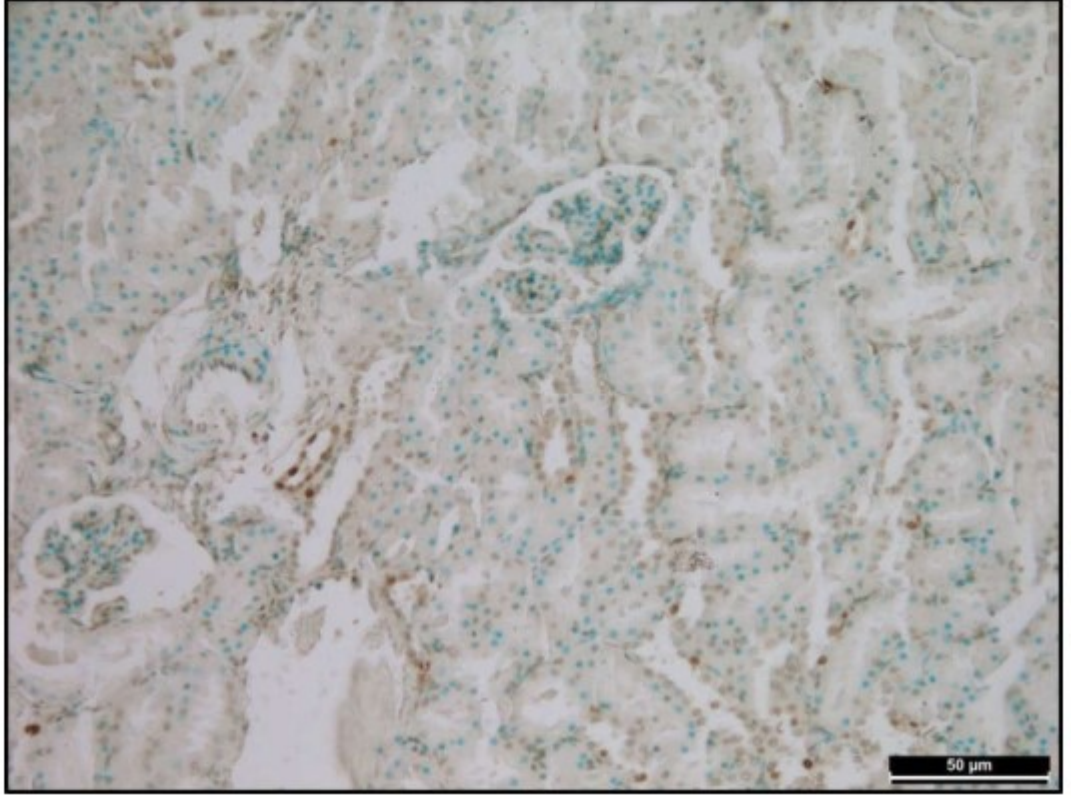
Resim 24. Sham kontrol grubuna ait böbrek dokularının TUNEL boyamalarında pozitif tutulum gösteren hücre görülüyor (TUNEL-metilen yeşili x400).



Resim 25. Bacopa grubuna ait böbrek dokularının TUNEL boyamalarında pozitif tutulum gösteren hücre görülüyor (TUNEL-metilen yeşili x400).



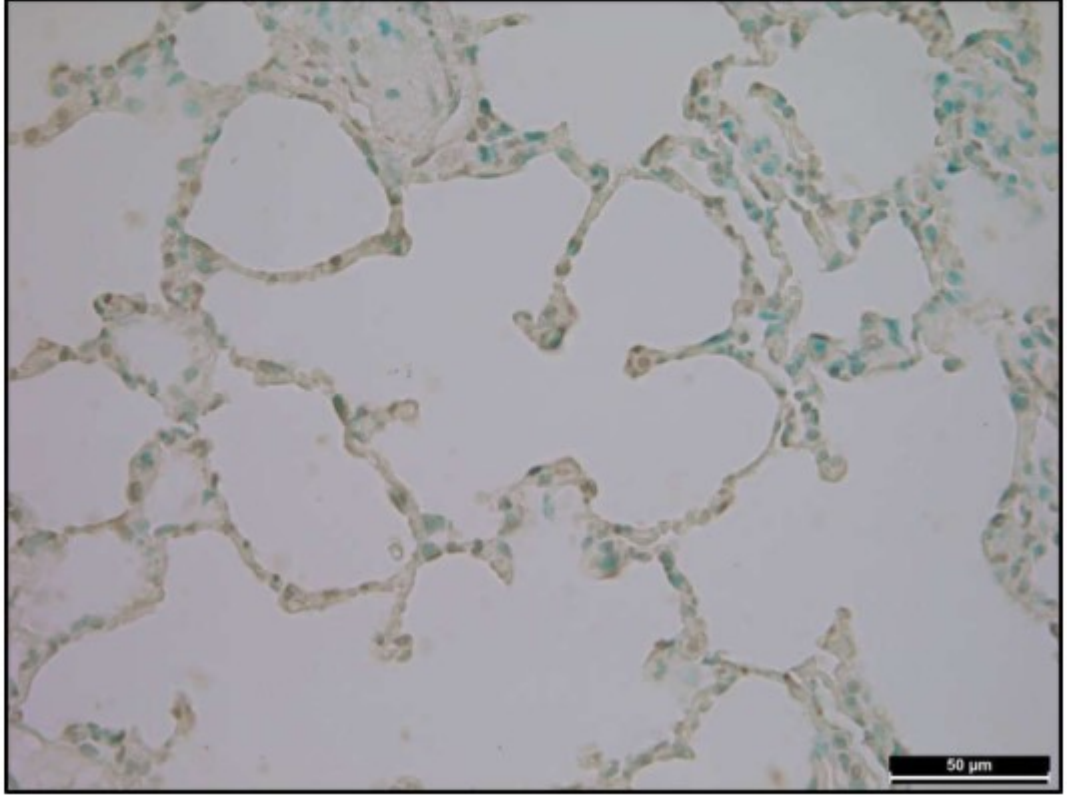
Resim 26. İskemi-reperfüzyon grubuna ait böbrek dokularının TUNEL boyamalarında distal tübüllerde pozitif tutulum gösteren hücreler (↑) izleniyor (TUNEL-metilen yeşili x400).



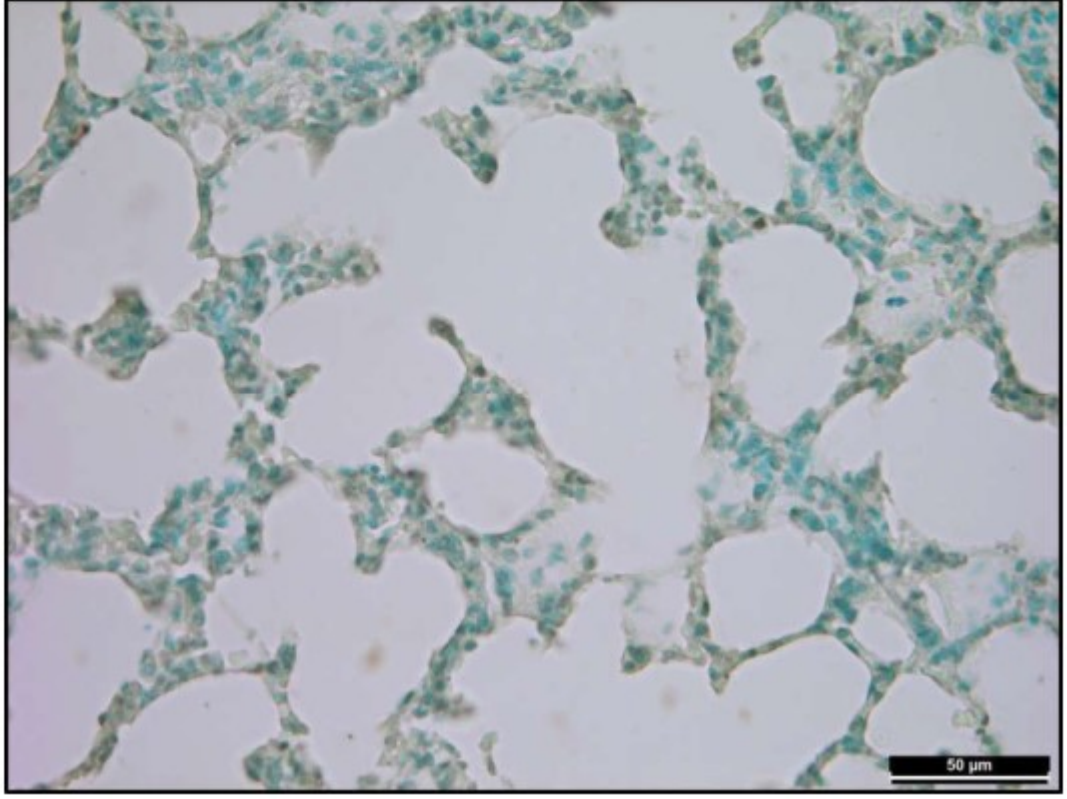
Resim 27. Bacopa-iskemi-reperfüzyon grubuna ait böbrek dokularının TUNEL boyamalarında pozitif tutulum gösteren hücre görülmüyor (TUNEL-metilen yeşili x400).

4.2.2.3. Akciğer Dokusu TUNEL Bulguları

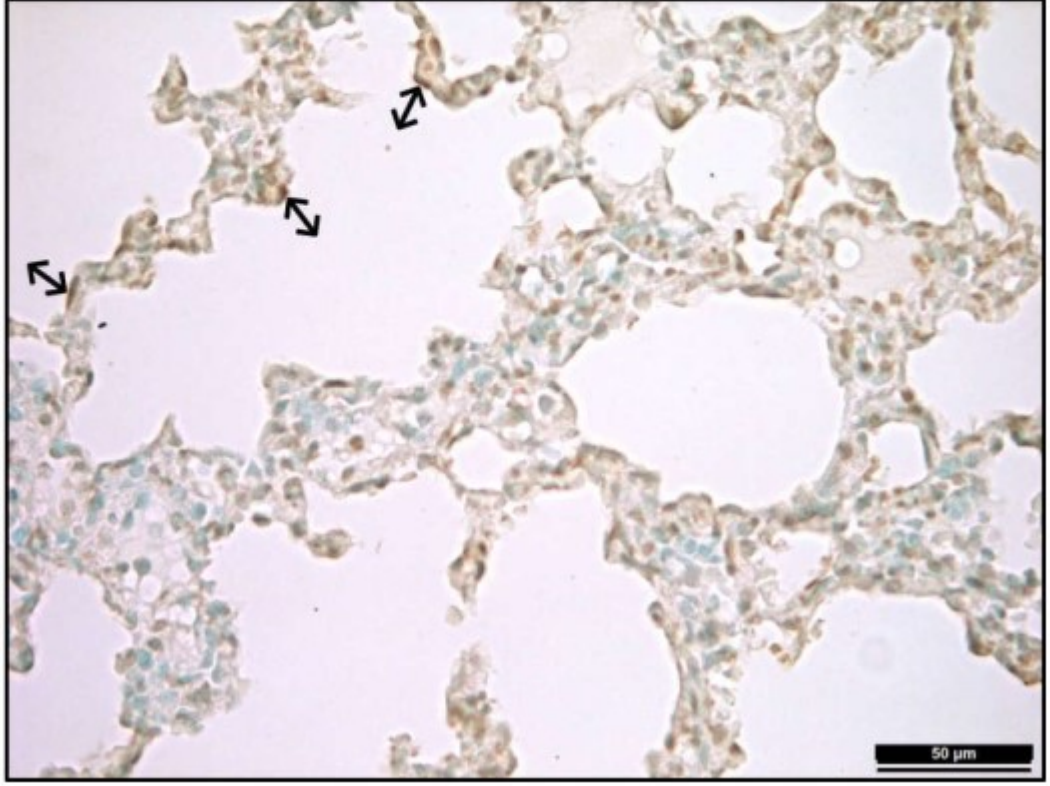
Sham kontrol, Bacopa ve Bacopa-iskemi-reperfüzyon gruplarının akciğer dokularında yapılan incelemelerde solunum alanlarında tutulum izlenmedi. İskemi-reperfüzyon grubuna ait akciğer kesitlerinde az sayıda tip 1 alveolar hücrenin TUNEL pozitif olduğu ayırt edildi (Resim 28, 29, 30 ve 31).



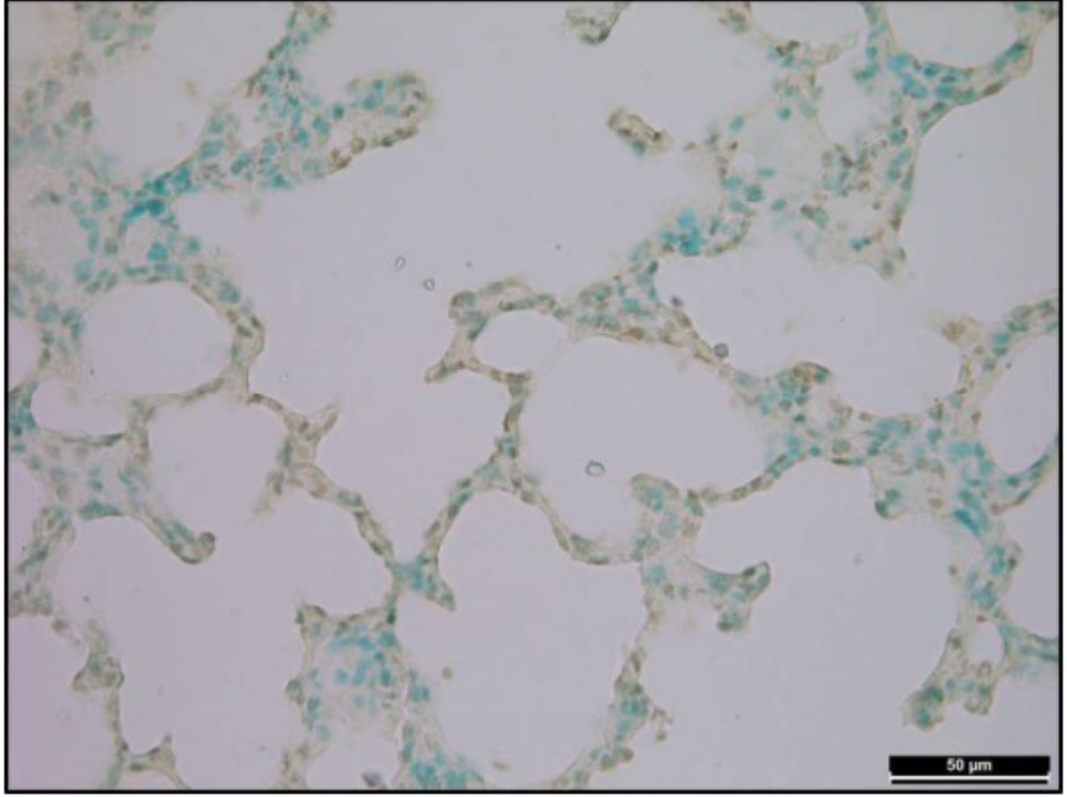
Resim 28. Sham kontrol grubuna ait akciğer dokularının TUNEL boyamalarında pozitif tutulum gösteren hücre görülüyor (TUNEL-metilen yeşili x400).



Resim 29. Bacopa grubuna ait akciğer dokularının TUNEL boyamalarında pozitif tutulum gösteren hücre görülmüyor (TUNEL-metilen yeşili x400).



Resim 30. İskemi-reperfüzyon grubuna ait akciğer dokularının TUNEL boyamalarında alveol duvarında pozitif tutulum gösteren tip 1 alveolar hücreler (↑) izleniyor (TUNEL-metilen yeşili x400).



Resim 31. Bacopa-iskemi-reperfüzyon grubuna ait akciğer dokularının TUNEL boyamalarında pozitif tutulum gösteren hücre görülmüyor (TUNEL-metilen yeşili x400).

Sonuç olarak; iskemi-reperfüzyon uygulamasının böbrek, akciğer ve kas dokusuna ait bazı bölgelerde farklı derecelerde dejenerasyona yol açtığı ve az sayıda olmakla birlikte hücrelerde apoptozisi indüklediği tespit edildi. Bacopa uygulamasının özellikle böbrek ve akciğer dokularında tek başına uygulanmasının da çeşitli dejenerasyonlara neden olduğu belirlendi. İskemi-reperfüzyon ile birlikte uygulanan Bacopa'nın, iskemi-reperfüzyon uygulaması ile ortaya çıkan dejenerasyonların engellenmesi üzerinde kısmen etkili olduğu, ancak tek başına yapılan uygulamalarında da doku hasarına yol açtığı göz önünde bulundurularak, etkili bir koruma sağlayamadığı kanısına varıldı.

5. TARTIŞMA

Ekstremitenin akut iskemisi ve devamında dolaşımın tekrar sağlanması hem lokal hem de sistemik hasar meydana gelmesine neden olur. İskemik dokuda oluşan serbest oksijen radikallerinin, endotel ve nötrofillerle etkileşerek, lipid peroksidasyonunu artırması, lokal ve sistemik birçok etkinin ortaya çıkmasına neden olur. Hücre şişmesi, ödem, toksin ve myoglobulin salınımı ile beraber, serbest oksijen radikallerinin etkisi ile akut böbrek yetersizliği, akciğer ödemi, akut sıkıntılı solunum sendromu, şok karaciğeri gibi sistemik hasarlar gelişebilir. Bundan dolayı bu olayın negatif sonuçlarını azaltmak amacıyla yeni ilaçların geliştirilmesi önem arz etmektedir. Damarı klempleme veya turnike uygulaması, bazı ameliyatlarda, ameliyat bölgesinde mümkün olduğunca kansız bir ortam sağlamak ve böylece cerrahın çalışmasını kolaylaştırmayı amaçlayan bir yöntemdir. Ancak bu yöntemin İ/R hasarına yol açabilme gibi bir sakıncası vardır.(59,60)

Kalp ve damar cerrahisi prosedürlerinde mecbur kalınan iskeminin ve reperfüzyonun hasarlarını azaltabilmek adına birçok maddenin koruyucu / önleyici etkisi araştırılmıştır. Reperfüzyon sırasında etkilenen alandaki hasarın dışında, tam olarak netleşmemiş mekanizmalara bağlı olarak uzak organlarda da ciddi hasarlar meydana gelmektedir. Hasara uğrayan bu organların başında akciğer, karaciğer ve böbrek gelmektedir. Bu organlarda oluşan hasarlar postoperatif safhadaki önemli mortalite ve morbidite nedenleridir. Reperfüzyon hasarından serbest oksijen radikallerinin büyük oranda sorumlu olmaları nedeniyle, iskemik alanda bu moleküllerin azaltılması oluşacak olan doku hasarını da azaltabilecektir. Herhangi

bir nedene bağlı olarak iskemi ve takiben reperfüzyon gelişirse, genelde iskeminin süresi ile ilgili olarak antioksidan savunma mekanizmaları yetersiz kalır ve hücrelerde miktarları yükselen SOR'ler çeşitli derecelerde hasar meydana getirir (61).

Kas hücresinde İ/R sonucu önce geri dönüşümlü, sonrasında iskeminin ileri evrelerinde geri dönüşümsüz hücre hasarı ortaya çıkar. Hücrede geri dönüşümlü zedelenmede akut hücresel şişme, nükleer kromatin kümeleşmesi, mikrovillusların kaybı, endoplazmik retikulum ve mitokondri şişmesi gibi değişiklikler ortaya çıkar. endoplazmik retikulumda şişme sonucu protein sentezi bozulur. Hipoksi düzelmez ise mitokondri fonksiyonlarının daha da kötüleşmesi ve membran permeabilitesinin artması daha fazla morfolojik bozulmaya neden olur. Geri dönüşümsüz zedelenmeye, mitokondrilerin daha şiddetli şişmesi ve mitokondri matriksinde şekilsiz, kalsiyumdan zengin yoğunlukların birikimi eşlik eder. Lizozomal membranların zedelenmesi, enzimlerin sitoplazma içine sızmasına yol açar. endoplazmik retikulum da lizis, fosfolipitlerin kaybı, hücre iskelet değişiklikleri, SOR oluşumu, lipidlerin yıkımı, protein sindirimi, kreatin kinaz ve LDH gibi enzimlerin ortaya çıkışı gözlenir. Çekirdekte ise kromatin bazofilisinde azalma (karyolizis), nükleer büzülme (piknoz) ve piknotik çekirdeğin parçalanması (karyorhekzis) gözlenir. İ/R hasarının ilerleyen döneminde hücre ölümü, "nekroz" ortaya çıkar.(62,63)

Bugüne kadar, çok az insan çalışmasında reperfüzyona yardımcı olarak uygulanan bir farmakolojik maddenin I / R hasarını azaltabileceğine dair kanıt sağlanmıştır. Bacopa Monnieri (B. Monnieri), deneysel çalışmalarda

kardiyoprotektif, antihipertansif, antioksidan, anti-aging, anti-inflamatuar, hepatoprotektif, nefroprotektif etkilerinin olduğuna dair bulgular elde edilmiş olan geleneksel Hint tıbbında (Ayurveda) kullanılan bir bitkidir (4). Daha önce yapılmış olan çalışmalarda 3 hafta boyunca oral B. Monnieri verilen ratlarda B. Monnieri tedavisinin miyokard antioksidan enzimlerini arttırırken ve miyokardiyal apoptotik sinyal proteinlerini azaltarak I/R kaynaklı biyokimyasal ve histopatolojik bozulmaları azalttığı saptanmıştır (52). B. monnieri'nin sistemik vasküler fonksiyonu geliştirdiğine dair bazı kanıtlar da vardır. Vasküler döz kasta sarkoplazmik retikulumdan kalsiyum (Ca^{2+}) akımı ve Ca^{2+} salımını inhibe ederek ve kısmen endotelial nitrik oksit (NO) salınımını sağlayarak arterleri genişlettiğine dair bulgular elde edilmiştir (53). Dahası, nöroprotektiftir ve etki mekanizması esas olarak antioksidan ve anti-inflamatuar özellikleri ile ilişkilidir (54, 55). B. Monnieri, Pubmed yayınlı 217 çalışmaya konu olmuştur. Deneysel çalışmalarda kardiyoprotektif, antihipertansif, antioksidan, anti-aging, anti-inflamatuar, hepatoprotektif, nefroprotektif etkilerinin olduğuna dair bulgular elde edilmiştir (4). Çalışmamızda yaptığımız ELISA Analizlerimizde BM & I/R Grubunda kas dokusunda katalaz ve 3-NT düzeylerinde Sham kontrol ve İ/R grubuna kıyasla anlamlı bir azalma gözlenmiştir. Öte yandan böbrek, karaciğer ve akciğer dokularındaki katalaz ve 3-NT düzeyleri düzeylerinde, Sham kontrol ve İ/R grubuna kıyasla anlamlı bir değişiklik olmamıştır. Glutasyon Peroksidaz düzeyleri ise BM & I/R Grubunda kas, böbrek, karaciğer ve akciğer dokusunda Sham kontrol ve İ/R grubuna kıyasla anlamlı bir anlamlı bir değişiklik olmadığı gözlenmiştir. Analizi yapılan dokularda tek başına B. Monnieri ekstresi uygulanması veya İ/R

modeli oluşturulmasının kontrol grubuna kıyasla Glutatyon Peroksidaz düzeylerinde istatistiksel anlamda herhangi bir değişiklik meydana getirmediği saptanmıştır. iNOS düzeylerinde BM & I/R Grubunda kas dokusunda Sham kontrol ve İ/R grubuna kıyasla anlamlı bir azalma gözlenirken böbrek, karaciğer ve akciğer dokularındaki iNOS düzeyleri düzeylerinde, Sham kontrol ve İ/R grubuna kıyasla anlamlı bir değişiklik olmadığı gözlenmiştir. IL-1 beta düzeylerinde BM & I/R Grubunda böbrek ve karaciğer dokularında anlamlı bir değişiklik olmamıştır. Öte yandan B. Monnieri ekstresi uygulanmış ratlarda oluşturulan alt ekstremitte İ/R modeli sonucunda ratlara ait kas ve akciğer dokularındaki IL-1 beta düzeylerinde, istatistiksel olarak anlamlı bir azalma olduğu gözlenmiştir. Sadece I/R modeli oluşturulan ratlarda ise kas ve akciğer dokularında IL-1 beta düzeylerinde anlamlı bir artış meydana gelmiştir. TNF-alfa düzeyleri BM & I/R Grubunda böbrek, karaciğer ve akciğer dokusunda anlamlı bir değişiklik olmadığı gözlenmiştir. I/R modeli oluşturulan ratlara ait kas dokusunda TNF-alfa düzeylerinde istatistiksel olarak anlamlı bir artış meydana gelmiştir. Öte yandan B. Monnieri ekstresi uygulanmış ratlarda oluşturulan alt ekstremitte İ/R modeli sonucunda ratlara ait kas dokusundaki TNF-alfa düzeylerinde istatistiksel olarak anlamlı bir azalma gözlenmiştir.

Deneysel çalışmamızın sonucunda ratlara ait dokuların immünohistokimyasal incelemeleri sonucunda I/R uygulamasının kas dokusunda amitotik çekirdek bölünmesi ve göçüne yol açtığı, buna bağlı miyofibril organizasyonunda bozulmaya neden olduğu tespit edildi. İskemi-reperfüzyon ile birlikte uygulanan Bacopa'nın, kas dokusunda meydana gelen dejenerasyonları

kısmen engellediği izlendi. Hematoksilen-Eozin bulgularına göre iskemi-reperfüzyon uygulamasının glomerüler ve peritübüler kapillerlerde vasküler dilatasyona neden olduğu, uygulamanın periarteriyal ödem oluşturduğu ve proksimal tübüllerde hücrel kayıp şeklinde gözlenen dejeneratif değişikliklere yol açtığı gözlemlendi. İskemi-reperfüzyon ile birlikte uygulanan Bacopa'nın glomerüler ve peritübüler kapiller dilatasyonu üzerinde koruyucu olamadığı, ancak periarteriyal ödemi azaltıp, böbrek tübüllerindeki doku kaybını engellediği tespit edildi.

Sonuç olarak Hematoksilen-Eozin bulgularına göre iskemi-reperfüzyon uygulamasının uzak doku hasarında solunum alanında dejenerasyona yol açmadığı ancak sistemik uygulanan Bacopa'nın alveol duvarında kalınlaşma ve kapiller dilatasyonu gibi yapısal değişimlere neden olduğu ve bu etkisini iskemi-reperfüzyon ile de gösterdiği görüldü.

TUNEL yöntemi apoptozisin bir göstergesi olan DNA fragmanlarının (kırıklarının) in situ olarak saptanması için kullanılan bir boyama yöntemidir. Apoptotik sinyaller DNA üzerinde kırıklar oluşturmaktadır. Açığa çıkan DNA parçacıklarının serbest 3'-OH uçlarına TdT aracılığı ile biotin ile işaretlenmiş ve işaretlenmemiş deoksinekleotidler eklenir. Daha sonra biotin ile işaretlenmiş nükleotidler, streptavidin-horseradish peroksidaz konjugatı ile tespit edilir. Diaminobenzidine, işaretlenmiş örnek ile tepkimeye girerek DNA kırığı bölgesinde çözünemeyen bir substrat oluşturur. Metil yeşili ile ters boyama yapılarak işlem sonlandırılır. Kahverengi-siyah nükleer-perinükleer boyanma pozitif reaksiyon olarak değerlendirilir.

I/R uygulamasının böbrek, akciğer ve kas dokusuna ait bazı bölgelerde farklı derecelerde dejenerasyona yol açtığı ve az sayıda olmakla birlikte hücrelerde apoptozisi indüklediği tespit edildi. Bacopa uygulamasının özellikle böbrek ve akciğer dokularında tek başına uygulanmasının da çeşitli dejenerasyonlara neden olduğu belirlendi. İskemi-reperfüzyon ile birlikte uygulanan Bacopa'nın, iskemi-reperfüzyon uygulaması ile ortaya çıkan dejenerasyonların engellenmesi üzerinde kısmen etkili olduğu, ancak tek başına yapılan uygulamalarında da doku hasarına yol açtığı göz önünde bulundurularak, etkili bir koruma sağlayamadığı kanısına varıldı.

6. SONUÇ

Bacopa Monnieri bitkisinin kanıtlanmış olan antioksidan etkileri göz önünde bulundurularak iskemi reperfüzyon hasarını önleyici/tedavi edici olası etkilerini araştırdığımız çalışmamız sonucunda Bacopa Monnieri bitki ekstresi iskemi oluşturduğumuz kas dokuda katalaz, 3-NT, IL-1 beta ve TNF-alfa düzeylerinde anlamlı bir azalmayı sağlamıştır. Ayrıca reperfüzyona bağlı uzak doku hasarı görmeyi beklediğimiz akciğer dokusunda da IL-1 beta düzeylerinin azalmasını sağlamıştır. Ancak Bacopa uygulamasının özellikle böbrek ve akciğer dokularında tek başına uygulanmasının da çeşitli dejenerasyonlara neden olduğu belirlendi. İskemi-reperfüzyon ile birlikte uygulanan Bacopa'nın, iskemi-reperfüzyon uygulaması ile ortaya çıkan dejenerasyonların engellenmesi üzerinde kısmen etkili olduğu, ancak tek başına yapılan uygulamalarında da doku hasarına yol açtığı göz önünde bulundurularak, etkili bir koruma sağlayamadığı kanısına varıldı. Bacopa Monnieri ekstraktı tedavisinin iskemi ve reperfüzyon hasarı üzerine olan olası koruyucu etkilerinin mekanizmasının tam olarak anlaşılabilmesi için daha ileri çalışmalara gerek olduğu düşünülmektedir.

7. KAYNAKLAR

1. J. Pan, A.A. Konstas, B. Bateman, G.A. Ortolano, J. Pile-Spellman, Reperfusion injury following cerebral ischemia: pathophysiology, MR imaging, and potential therapies, *Neuroradiology*, 49 (2007), pp. 93-102
2. G. Gutierrez, H.D. Reines, M.E. Wulf-Gutierrez, Clinical review: hemorrhagic shock, *Crit. Care*, 8 (2004), pp. 373-381
3. E. Murphy, C. Steenbergen, Mechanisms underlying acute protection from cardiac ischemia-reperfusion injury, *Physiol. Rev.*, 88 (2008), pp. 581-609
4. Shahid, M., Subhan, F., Ahmad, N., & Ullah, I. (2017). A bacosides containing *Bacopa monnieri* extract alleviates allodynia and hyperalgesia in the chronic constriction injury model of neuropathic pain in rats. *BMC Complementary and Alternative Medicine*, 17(1), 293. <http://doi.org/10.1186/s12906-017-1807-z>
5. H.K. Eltzschig, T. Eckle, Ischemia and reperfusion--from mechanism to translation *Nat. Med.*, 17 (2011), pp. 1391-1401
6. Haimovici H: Arterial embolism with acute massive ischemic myopathy and myoglobinuria: evaluation of a hitherto unreported syndrome with report of two cases. *Surgery* 47:739–747, 1960.
7. Cerra FB, et al: Hemorrhagic infarction: a reperfusion injury following prolonged myocardial ischemic anoxia. *Surgery* 78:95–104, 1975.

8. Casale GP, Pipinos II. Ischemia-Reperfusion [Internet]. Eighth Edi. Rutherford's Vascular Surgery. Elsevier Inc.; 2014. 114 s. Available at: <https://books.google.com/books?id=YcY0AwAAQBAJ&pgis=1>
9. E. Murphy, C. Steenbergen, Mechanisms underlying acute protection from cardiac ischemia-reperfusion injury, *Physiol. Rev.*, 88 (2008), pp. 581-609
10. Kumar V, Abbas A. Cellular Responses to Stress and Toxic Insults: Adaptation, Injury, and Death. Robbins and Cotran Pathologic Basis of Disease. 9 th ed. Philadelphia: Elsevier; 2015. P 31-68
11. Olding M, et al: Ischemic tolerance of canine jejunal flaps. *Plast Reconstr Surg* 94:167–173, 1994
12. Wilhelm J. Metabolic aspects of membrane lipid peroxidation. *Acta Univ Carol Med Monogr* 1990; 137:1-53.
13. Green CJ, Gower JD, Healing G, Cotterill LA, Fuller BJ, Simpkin S. The importance of iron, calcium and free radicals in reperfusion injury: an overview of studies in ischaemic rabbit kidneys. *Free Radic Res Commun* 1989;7: 255-6.
14. Ege T. Kalp ve damar hastalıklarında iskemi/reperfüzyon hasarı. Duran E (Ed). Kalp ve damar cerrahisi. I. Baskı. İstanbul: Çapa Tıp Kitabevi, 2004: 197-215.
15. Newmeyer DD, Ferguson-Miller S. Mitochondria: releasing power for life and unleashing the machineries of death. *Cell*. 2003;21;112(4):481-90

16. Zhao, Z.-Q. and J. Vinten-Johansen, Postconditioning: reduction of reperfusion-induced injury. *Cardiovascular research*, 2006. 70(2): p. 200-211.
17. Woodfin A, Voisin MB, Nourshargh S. PECAM-1: a multi-functional molecule in inflammation and vascular biology. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2007; 27: 2514- 2523
18. Akkuş Ş, 1995, Serbest Radikaller ve Fizyopatolojik Etkileri, Mimoza Yayınları, Konya.
19. Mc Cord JM. The evolution of free radicals and oxidative stres. *Am J Med* 2000; 108: 652-659.
20. Stahl W, Sies H. Introduction: Reactive oxygen species. *Research Monographs*, 2002; 1-2.
21. Henry LEA, Halliwell B and Hall DO. The superoxide dismutase activity of various photosynthetic organisms measured by a new and rapid assay technique. *Febs Letters* 1976; 66: 2.
22. Davies L A, He H, Pham-Huy C. Free Radicals, Antioxidants in disease and health *Int J Biomed Sci* 2008; 4: 89-96.
23. Davies SJ, Reichardt-Pascal SY, Vaughan D, Russell GI. Differential effect of ischaemia-reperfusion injury on anti-oxidant enzyme activity in the rat kidney. *Experimental nephrology* 1995; 3: 348-354.
24. Anaya-Prado R, Toledo-Pereyra LH, Lentsch AB, Ward PA. Ischemia/ reperfusion in jury. *The Surg Res* 2002; 105: 248-258.

25. Springer TA. Traffic signals for lymphocyte recirculation and leukocyte emigration: the multistep paradigm. *Cell* 1994; 76: 301-314.
26. Phillips L, Toledo AH, Lopez-Neblina F, Anaya-Prado R, Toledo-Pereyra LH. Nitricoxide mechanism of protection in ischemia and reperfusion injury. *J Invest Surg* 2009; 22: 46-55.
27. Yavaş D, Zengin M, Kaklıkaya İ, Uzun Z, Ören A, Elşin M C, Değer O, Özcan F Serbest oksijen radikal temizleyici olarak aprotininin rolü (deneysel çalışma). *GKD Cer Derg* 1994; 2: 208-215.)
28. Serizawa A, Nakamura S, Suzuki S, Baba S, Nakano M. Involvement of platelet activating factor in cytokine production and neutrophil activation after hepatic ischemia-reperfusion. *Hepatology* 1996; 23: 1656-1663.
29. Reffelmann T, Hale SL, Dow JS, Kloner RA. No-reflow phenomenon persists long- term after ischemia/reperfusion in the rat and predicts infarct expansion. *Circulation* 2003;108, 2911–2917
30. Majno G, Ames A III, Chiang J. No reflow after cerebral ischemia. *Lancet* 1967; 2: 569–70
31. Granger DN. Role of xanthine oxidase and granulocytes in ischemia-reperfusion injury. *Am J Physiol* 1988; 255: 1269-1275
32. Gillani S. Cao J. Suzuki T. Hak DJ. The effect of ischemia reperfusion injury on skeletal muscle Injury. *Int J Care Injured* 2011; 4590-6: 1-6

33. Gautam N, Olofsson AM, Herwald H, Iversen LF, Lundgren-Akerlund E, Hedqvist Pet al. Heparin-binding protein (HBP/CAP37): A missing link in neutrophil-evoked alteration of vascular permeability *Nat Med* 2001; 7: 1123-1127.
34. García-Villalón AL, Amezquita YM, Monge L, Fernández N, Salcedo A, Diéquez G. Endothelin-1 potentiation of coronary artery contraction after ischemia-reperfusion. *Vascul Pharmacol* 2008; 48: 109-114
35. Liu P, Yin K, Yue G, Wong P. Role of nitricoxide in hepatic ischemia-reperfusion with endotoxemia. *J Inflamm* 1995; 46: 144-154.
36. Becker M, Menger MD, Lehr HA. Heparin-released superoxide dismutase inhibits postischemic leukocyte adhesion to venular endothelium. *Am J Physiol* 1994; 297: 925-930.
37. Hayes, G., et al. Separation of reperfusion injury from ischemia-induced necrosis. in *Surg Forum*. 1988.
38. Carden, D.L. and D.N. Granger, Pathophysiology of ischaemia–reperfusion injury. *The Journal of pathology*, 2000. 190(3): p. 255-266.
39. Tassiopoulos, A.K., et al., Role of nitric oxide and tumor necrosis factor on lung injury caused by ischemia/reperfusion of the lower extremities. *Journal of vascular surgery*, 1997. 26(4): p. 647-656.
40. Homer-Vanniasinkam, S., J. Crinnion, and M. Gough, Post-ischaemic organ dysfunction: a review. *European journal of vascular and endovascular surgery*, 1997. 14(3): p. 195-203.

41. Nigwekar, S.U., et al., Off-pump coronary artery bypass surgery and acute kidney injury: a meta-analysis of randomized and observational studies. *American journal of kidney diseases*, 2009. 54(3): p. 413-423.
42. Carvalho, A.L.R.d., et al., Dexmedetomidine on renal ischemia-reperfusion injury in rats: assessment by means of NGAL and histology. *Renal failure*, 2015. 37(3): p. 526-530.
43. Skorecki, K., J. Green, and B.M. Brenner, Chronic renal failure. *Harrisons Principles of Internal Medicine*, 2005. 16(2): p. 1653.87.
44. Cemeli, E., A. Baumgartner, and D. Anderson, Antioxidants and the Comet assay. *Mutation Research/Reviews in Mutation Research*, 2009. 681(1): p. 51-67.
45. Halliwell, B., *Free Radicals and Other Reactive Species in Disease*, eLS. 2001, John Wiley & Sons, Ltd.
46. Matough, F.A., et al., The role of oxidative stress and antioxidants in diabetic complications. *Sultan Qaboos University Medical Journal*, 2012. 12(1): p. 5.
47. (Vincent, A.M., et al., Oxidative stress in the pathogenesis of diabetic neuropathy. *Endocrine reviews*, 2004. 25(4): p. 612-628.94.
48. Halliwell, B., Reactive species and antioxidants. Redox biology is a fundamental theme of aerobic life. *Plant physiology*, 2006. 141(2): p. 312-322.

49. Wijnberger, L.D., et al., Early neonatal antioxidant capacity after preexisting impaired placental function. *Early human development*, 2003. 71(2): p. 111- 116.
50. Niki, E., et al., Lipid peroxidation: mechanisms, inhibition, and biological effects. *Biochemical and biophysical research communications*, 2005. 338(1): p. 668-676.
51. Fenercioglu, A.K., et al., The effects of polyphenol-containing antioxidants on oxidative stress and lipid peroxidation in Type 2 diabetes mellitus without complications. *Journal of endocrinological investigation*, 2010. 33(2): p. 118- 124.
52. Uabundit N, Wattanathorn J, Mucimapura S, Ingkaninan K. Cognitive enhancement and neuroprotective effects of *Bacopa monnieri* in Alzheimer's disease model. *J Ethnopharmacol*. 2010;127(1):26–31.)
53. Mohanty IR, Maheshwari U, Joseph D, Deshmukh Y. *Bacopa monniera* protects rat heart against ischaemia-reperfusion injury: role of key apoptotic regulatory proteins and enzymes. *J Pharm Pharmacol*. 2010;62:1175–84. doi: 10.1111/j.2042-7158.2010.01155.x. -----
54. Kamkaew N, Scholfield CN, Ingkaninan K, Maneesai P, Parkinson HC, Tare M, et al. *Bacopa monnieri* and its constituents is hypotensive in anaesthetized rats and vasodilator in various artery types. *J Ethnopharmacol*. 2011;137:790–5. doi: 10.1016/j.jep.2011.06.045.
55. Limpeanchob N, Jaipan S, Rattanakaruna S, Phrompittayarat W, Ingkaninan K. Neuroprotective effect of *Bacopa monnieri* on beta-amyloid-induced cell

- death in primary cortical culture. *J Ethnopharmacol.* 2008;120:112–7. doi: 10.1016/j.jep.2008.07.039. [PubMed] [Cross Ref]
56. Rastogi M, Ojha RP, Devi BP, Aggarwal A, Agrawal A, Dubey GP. Amelioration of age associated neuroinflammation on long term bacosides treatment. *Neurochem Res.* 2012;37:869–74. doi: 10.1007/s11064-011-0681-1. [PubMed] [Cross Ref]
 57. Sireeratawong S, Jaijoy K, Khonsung P, Lertprasertsuk N, Ingkaninan K. Acute and chronic toxicities of *Bacopa monnieri* extract in Sprague-Dawley rats.
 58. Kirisci M, Oktar GL, Ozogul C, Oyar EO, Akyol SN, Demirtas CY, vd. Effects of adrenomedullin and vascular endothelial growth factor on ischemia/reperfusion injury in skeletal muscle in rats. *J Surg Res* [Internet]. 2013;185(1):56–63. Available at: <http://dx.doi.org/10.1016/j.jss.2013.05.053>
 59. Pontoppidan H, Geffin B, Lowenstein E. Acute respiratory failure in the adult. *N Engl J Med* 1972; 287:690-806.
 60. Dantzker DR, Scharf SM. *Cardiopulmonary Critical Care*. 3rd ed. Philadelphia, WB Saunders, 1998. 41-42.
 61. Robicsek F, Schaper J. Reperfusion injury: Fact or myth?, *J Cardiac Surg* 1997;12:133-7
 62. Alizan A, Khalil C, Farah A, John C. Reperfusion injury. *Plast. Reconstr Surg* 2006;117: 1024–1033
 63. Appell H J, Glöser S, Duarte JA, Zellner A, Soares JM. Skeletal muscle

damage during tourniquet-induced ischaemia. The initial step towards atrophy after orthopaedic surgery? *Eur J Appl Physiol Occup Physiol* 1993;67:342–7

ÖZET

Bacopa Monnieri Ekstrakt Tedavisinin Ratlarda Alt Ekstremitte İskemi Reperfüzyon Hasarına Karşı Etkisi; Akut iskemi ve takiben reperfüzyon etkilenen dokularda metabolik, trombotik ve inflamatuvar değişiklikler ile sonuçlanan hücre içi ve dışı yolakları içeren karmaşık bir patolojik süreç olup klinik olarak önemli sonuçlar doğurur. Geleneksel Hint tıbbında kullanılan bir bitki olan ve daha önce antioksidan etkilerine dair kanıtlar olan Bacopa Monnieri bitkisi akut alt ekstremitte İ/R hasarında koruyucu/tedavi edici olabilir. Çalışmamızda 24 adet erişkin, yaşça (10-12 haftalık) ve ağırlıkça (170-222 gr) eşleşen Wistar albino cinsi erkek rat kullanıldı. Gruplar; Sham Kontrol, I/R, BM&IR ve BM olarak belirlendi. BM&IR ve BM gruplarına 10 gün süre ile 300mg/kg p.o Bacopa monnieri ekstraktı verildi. Abdominal aort infrarenal düzeyde klempe edilerek 120 dk iskemi ve devamında klempe kaldırılarak 120 dk reperfüzyon sağlandı. Deneyin sonunda ratlar kurban edilerek dokuları ELISA ve immünohistokimyasal olarak analiz edildi.

Bacopa Monnieri bitki ekstresinin iskemi oluşturulan grubun kas dokularında katalaz, 3-NT, IL-1 beta ve TNF-alfa düzeyleri ile reperfüzyona bağlı uzak doku hasarı görmeyi beklediğimiz akciğer dokusunda da IL-1 beta düzeylerinde anlamlı bir azalma sağladığı görüldü. İmmünohistokimyasal olarak da İ/R ile ortaya çıkan dejenerasyonların engellenmesi üzerinde kısmen etkili olduğu saptandı. İleri deneysel ve klinik çalışmalar bu bulguların deneysel ve klinik öneminin ve olayın moleküler mekanizmasının değerlendirilmesi ve netleştirilmesi için gereklidir.

Anahtar Kelimeler: İskemi Reperfüzyon, Bacopa Monnieri, Alt Ekstremitte İskelet Kası

SUMMARY

Effect of Bacopa Monnieri Extract Treatment on Acute Limb Ischemia-Reperfusion Injury in Rats; Acute ischemia and subsequent reperfusion is a complex pathological process involving intracellular and extracellular pathways resulting in metabolic, thrombotic, and inflammatory changes in affected tissues and has clinically important consequences. Bacopa Monnieri, a plant used in traditional Indian medicine and evidence of previous antioxidant effects, may be protective / therapeutic in acute limb I/R injury. In our study, 24 adult male Wistar albino male rats (age 10-12 weeks) and weights (170-222 gr) were used. Groups; Sham Control, I / R, BM & IR and BM. BM & IR and BM groups were given 300 mg/kg p.o Bacopa monnieri extract for 10 days. The abdominal aorta was clamped at infrarenal level and 120 min ischemia was performed and the clamp was removed for 120 min reperfusion. At the end of the experiment, rats were sacrificed and analyzed. It was observed that Bacopa Monnieri plant extract significantly reduced catalase, 3-NT, IL-1 beta and TNF-alpha levels in muscle tissues of the ischemic group. Also similar finding was observed that IL-1 beta levels in lung tissue which we expected to see reperfusion-induced distant tissue damage. Immunohistochemically, it was also found to be partially effective in inhibiting I/R-induced degeneration. Advanced experimental and clinical studies are necessary for the evaluation and clarification of the experimental and clinical significance of these findings and the molecular mechanism of the phenomenon.

Key Words: Ischemia Reperfusion, Bacopa Monnieri, Limb Skeletal Muscle

Evrak Tarih ve Sayısı: 10/10/2017-E.143000



T.C.
GAZİ ÜNİVERSİTESİ
Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu Başkanlığı



Sayı : 66332047-604.01.02-
Konu : Değerlendirme ve Onay

Sayın Prof. Dr. Gürsel Levent OKTAR
Kalp ve Damar Cerrahisi Anabilim Dalı Başkanlığı - Öğretim Üyesi

Araştırmacı grubu Gürsel Levent OKTAR, Hilal ÖZLÜ, Çemen KARASU, Gülnur TAKE KAPLANOĞLU, Ayşe ÇAKIR GÜNDOĞDU, Zübeyde ELMAZOĞLU'dan oluşan, G.Ü.ET-17.078 kod numaralı ve "*Bacopa Monnieri Ekstrakt Tedavisinin Akut Alt Ekstremité İskemi Reperfüzyon Hasarı Üzerine Etkisi*" başlıklı araştırma öneriniz incelenmiş ve Gazi Üniversitesi Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurul Yönergesindeki ilkelere uygun olduğu saptanarak onaylanmasına oybirliği ile karar verilmiştir.

Bilgilerinizi rica ederim.

It is unanimously approved that the research project numbered G.Ü.ET-17.078 and entitled "*Effect of Bacopa Monnieri Extract Treatment on Acute Limb Ischemia-Reperfusion Injury in Rat*" is in compliance with Gazi University Animal Experiments Local Ethics Committee regulations.

With my best regards.

e-imzalıdır
Prof. Dr. Abdulkadir BEDİRLİ
Kurul Başkanı

Hayvan Türü : Rat Wistar Albino (Erkek)
Hayvan Sayısı : 24

Ek:1 Liste

Ankara
Tel:0 (312) 202 20 57 - 0 (312) 2... Faks:0 (312) 202 38 76
e-Posta :hsdyek@gazi.edu.tr İnternet Adresi :http://hsdyek.gazi.edu.tr/

Bilgi için :Burak Çitrak
Genel Evrak Sorumlusu
Telefon No 0312 229 78 00

Bu belge 5070 sayılı Elektronik İmza Kanununun 5. Maddesi gereğince güvenli elektronik imza ile imzalanmıştır.