

T.C.
GAZİ ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
FARMASÖTİK TOKSİKOLOJİ ANA BİLİM DALI

**ALT EKSTREMİTEDE TURNİKE UYGULANAN ORTOPEDİ HASTALARINDA
İSKEMİ-REPERFÜZYON HASARI SONUCU OLUŞAN OKSİDATİF DNA
HASARININ ARAŞTIRILMASI**

YÜKSEK LİSANS TEZİ

Selen POLAT

Tez Danışmanı
Prof.Dr. Bensu KARAHALİL

ANKARA
Eylül 2008

**T.C.
GAZİ ÜNİVERSİTESİ
Sağlık Bilimleri Enstitüsü**

**Farmasötik Toksikoloji Ana Bilim Dalı Yüksek Lisans Programı
çerçevesinde yürütölmüş olan bu çalışma aşağıdaki jüri tarafından
Yüksek Lisans Tezi olarak kabul edilmiştir.**

Tez Savunma Tarihi : 14/10/2008

**İmza
Ünvanı Adı ve Soyadı
Gazi Üniversitesi
Jüri Başkanı
Prof.Dr.Ali Esat KARAKAYA**

**İmza
Ünvanı Adı ve Soyadı
Ankara Üniversitesi
Prof.Dr.Yalçın DUYDU**

**İmza
Ünvanı Adı ve Soyadı
Gazi Üniversitesi
Prof.Dr.Bensu KARAHALİL**

İÇİNDEKİLER

İçindekiler	I
Şekiller, Resimler, Grafikler	III
Tablolar	III
1. GİRİŞ VE AMAÇ	1
2. GENEL BİLGİLER	3
2.1. Turnikenin gelişimi ve uygulanişı	3
2.2. İskemi oluşumu	4
2.3. İskemi hasarı	5
2.4. Reperfüzyon	9
2.4.1. Reperfüzyon hasarının mekanizması	9
2.4.2. Reperfüzyonda ROT'nin ortaya çıkmasındaki faktörler	10
2.4.2.1. Ksantin oksidaz yolu	11
2.4.2.2. Nötrofillerin aktivasyonu	12
2.4.2.3. Endotelial faktörler	13
2.4.2.4. Komplemanlar	14
2.4.2.5 Sitokinler	14
2.4.2.6. Platelet aktive edici faktörler	15
2.5 Reperfüzyon hasarı ve oksidatif stres	16
2.5.1. Serbast Radikaller	16
2.6. Antioksidanlar ve antioksidan savunma sistemleri	22
2.6.1. Etki mekanizmaları farklı olan ajanlar	23
2.6.1.1. Antioksidan enzimler	23
2.6.1.2. Serbest radikal toplayıcılar	23
2.7. İskemi-reperfüzyonla ilgili yapılan çalışmalar	24
2.8. Genotoksik etki	28

2.8.1. Genotoksik etki ve belirlenmesi	28
2.8.2. Comet testi	31
3. GEREÇ VE YÖNTEM	36
3.1. Çalışma grubunun seçilmesi	36
3.2. Deneklerden kan örneklerin alınması	39
3.3. Comet yöntemi	40
3.3.1. Kullanılan kimyasal maddeler	40
3.3.2. Sarf malzemeler	41
3.3.3. Kullanılan çözeltiler	42
3.3.3.1. Stok olarak hazırlanan çözeltiler	42
3.3.3.2. Taze olarak hazırlanan çözeltiler	45
3.3.4. Comet yönteminin uygulanması	48
3.4. İstatistiksel yöntemler	52
4. BULGULAR	53
4.1. Demografik bulgular	53
4.2. Comet yönteminin sonuçları	55
4.2.1. Kuyruktaki % DNA hasarı sonuçları	55
4.2.2. Sigara alışkanlığının oksidatif hasar üzerine olan etkisinin sonuçları	57
5. TARTIŞMA	59
6. SONUÇ	68
7. ÖZET	70
8. SUMMARY	72
9. KAYNAKLAR	74
10. EKLER	94
11. ÖZGEÇMİŞ	101

ŞEKİLLER

Şekil 2.1 İskemik dokularda ksantin oksidaz yolu ile serbest oksijen radikali üretimi	12
Şekil 2.2 Oksidatif stres sürecinde meydana gelen reaksiyonlar	18
Şekil 2.3 Oksidatif stresle ilişkili klinik durumlar	20
Şekil 2.4 Antioksidan savunma sistemleri	22
Şekil 2.5 Normal ve hasarlı hücrelerde deneyin yapılışı	33

GRAFİKLER

Grafik 4.1 Bireylerin 3 farklı zaman dilimindeki % kuyruk DNA hasarı	56
Grafik 4.2 Sigara içme alışkanlığına göre kuyruktaki DNA hasarları	58

RESİMLER

Resim 2.1 Görüntü analizi ile veri toplanması	35
---	----

TABLolar

Tablo 2.1 Serbest radikaller ve kaynakları	17
Tablo 4.1 Çalışma grubunun demografik özellikleri	53
Tablo 4.2 Çalışma grubunun dökümü	54
Tablo 4.3 Bireylerin 3 farklı zaman dilimindeki % kuyruk DNA hasarı	55
Tablo 4.4 Sigara alışkanlığının oksidatif hasar üzerine etkisi	57

1. GİRİŞ VE AMAÇ

Serbest oksijen radikallerinin ve lipid peroksidasyonun, birçok hastalığın patogeneğinde rol aldığını gösteren çalışmaların sayısı gün geçtikçe artmaktadır. Miyokard enfarktüsü gibi kardiyolojik hastalıklar¹, nörolojik hastalıklar², astım³, diabetes mellitus⁴, romatoid artrit gibi romatolojik hastalıklar⁵, kanser⁶ ve yaşlanma⁷ dahil birçok hastalığın oksidatif stres ile ilişkisi gösterilmiştir. Organizmada serbest radikallerin oluşum hızı ile bunların ortadan kaldırılma hızı bir denge içerisinde ve bu durum oksidatif denge olarak adlandırılır. Oksidatif denge sağlandığı sürece organizma, serbest radikallerden etkilenmemektedir. Bu radikallerin oluşum hızında artma ya da ortadan kaldırılma hızında bir düşme bu dengenin bozulmasına neden olur⁸. Serbest radikalleri de içeren endojen ya da ekzojen kaynaklı Reaktif Oksijen Türevleri (ROT) oksidatif DNA hasarına neden olmaktadır. İnsan vücudundaki her hücre günde ortalama 10000 serbest radikalın saldırısına uğramaktadır⁹. Oksidatif stres pek çok hastalığın patojenezinde rol oynamasının yanında operasyon sırasında çeşitli organlarda operasyon gereği meydana getirilen iskemi-reperfüzyon (I-R) sonucunda da oksidatif DNA hasarı ve hasara eşlik eden birtakım biyokimyasal değişiklikler meydana gelmektedir. Organizmada DNA hasarını onarmak veya elimine etmekten sorumlu pek çok gen ve onarım yolları aracılığı ile meydana gelen hasarlar önlenmektedir^{10,11}.

Günümüzde artroskopi operasyonları; menisküs yırtıklarının tedavisinde, erken dönemdeki eklem kireçlenmelerinin temizlenmesinde, ön ve arka çapraz bağları yaralanmalarında, eklem içeri kırıkların

tedavisi gibi birçok ortopedik hastalıkta uygulanmaktadır. Artroskopi ameliyatlarında turnike uygulanarak I-R oluşturulmaktadır¹²⁻¹⁵.

Turnikenin çözülmesiyle fazla miktarda ROT'nin oluşumu söz konusudur. Şimdiye kadar insan ve hayvanlarda yapılan çalışmalarda farklı dokularda meydana gelen I-R'nun metabolik etkileri ve meydana gelen ROT ile antioksidan kapasite seviyesindeki değişimler kapsamlı olarak araştırılmıştır^{16,17}.

Bu çalışmada turnike uygulanarak alt ekstremité operasyonu geçirecek olan hastalarda I-R'nun neden olabileceği düşünülen oksidatif hasarın tayin edilmesi amaçlanmıştır. Antioksidan kapasitede düşme ya da değişimler yada bir seri metabolik değişimler söz konusu olabilir ve ROT'lerinde meydana gelen artışında meydana gelmesiyle oluşan tüm bu sürecin DNA hasarına olan katkısı söz konusu operasyon koşullarında kalitatif ve kantitatif olarak belirlenmesi amaçlanmıştır. Ayrıca, uygulanan yöntem ile oksidatif baz hasarı spesifiye edilmiş, pürin yada pirimidin bazlarında meydana gelen hasarın boyutu kantitatif olarak karşılaştırılabilmiştir.

Sunulan çalışma I-R'un sebep olduğu oksidatif hasarın mekanizmasını baz düzeyinde aydınlatılmasına yönelik bir çalışma olup, I-R'dan kaynaklanan komplikasyonların riskini azaltarak insan sağlığının korunmasını amaçlamıştır.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. Turnikenin gelişimi ve kullanışı

Turnike günümüzde ortopedik cerrahide sık kullanılan bir yöntemdir. Pnömatik turnike 1904 yılında Harvey Cushing tarafından tanımlanmıştır. Ekstremitte cerrahisinde yaygın kullanımı ise Klenerman'ın 1960'lı yıllardaki çalışmalarıyla olmuştur¹⁸⁻²².

Turnikeye bağlı komplikasyonların önlenmesi için operasyon esnasında bazı kurallara uyulması gerekmektedir. Örneğin manşonun ciltle temasını önlemek için en az 2 kat yumuşak pamuk sarılır. Şişman hastalarda kaymayı önlemek için cilt ve cilt altı dokusu olabildiğince distale çekilip, sonra turnike manşonu şişirilmelidir²³. Her kullanımdan önce basınç ölçen kısmı, mutlaka kontrol edilmelidir. Manşon sarıldıktan sonra pamuklu bir elastik bandajla parmak uçlarından bağlanıp, turnike seviyesine kadar tüm kan, ekstremiteden boşaltılır. Enfeksiyon veya tümör cerrahisinde mutlaka turnike kullanılmak isteniyorsa bu tür bir boşaltma yerine, ekstremitte 5 dakika yükseltilerek turnike şişirilir^{23,24}.

Turnike basıncının ne olması gerektiği halen tartışmalıdır. Elde edilen bulgular, bugüne kadar gerekenden daha büyük basınçlar kullanıldığı yolundadır. Doğru basınç hastanın yaşı, kan basıncı ve ekstremitenin boyutuyla ilgilidir^{21,25}. Klenerman alt ekstremitede, koldan ölçülen sistolik basıncın iki katını kullanmayı önermektedir²¹.

Turnikenin şişirildiği saat mutlaka not edilmelidir. Basınç göstergesi anesteziistin görebileceği bir yere konmalı ve en küçük basınç oynamaları, cerraha iletilmelidir. Elli yaşın altındaki sağlıklı yetişkinlerde tercih edilen turnike süresi kolda maksimum 1 saat, uylukta ise 1,5 saat olmalıdır. Eğer daha fazla süre gerekliyse 10 dakikalık reperfüzyondan sonra operasyona devam etmelidir. Ancak toplam süre kesinlikle 2 saati geçirilmemelidir²⁴⁻²⁷. Ancak bazı ciddi komplikasyonlarda 2 saatlik limit aşılabilmektedir²⁸.

Turnike kalktığında iskeminin tek başına neden olduğu iskelet kası bozulmasından çok daha şiddetli hücre bozulması gözlenmiştir²⁹. Birçok araştırmacı turnike uygulamasıyla geçici dolaşım durdurulmasına dayalı yapılan çalışmalarda iskelet kasının iskemiye olan toleransı ile ilgilenmiştir. Birkaç çalışmada da turnikeli iskemi reperfüzyonun göze çarpmayan etkileri ortaya koyulmuştur. Bazı çalışmalarda ise sistemik metabolitlerin yan etkileri, lökositlerde genotoksik etki gibi durumlar rapor edilmiştir³⁰. Turnikeye bağlı ciddi komplikasyonlar ise nadir görülmekle birlikte morbiditesi yüksek olan bir uygulamadır^{31,32}. Bruner, turnike sonrası gelişen zayıflık, sertlik, ödem ve ağrıyla seyreden klinik tabloyu “post-turnike sendromu” olarak adlandırmıştır.

2.2. İskemi oluşumu

Herhangi bir dokuya giden kan akımı kesildiğinde, o dokuya ait hücrelerin fonksiyon bozukluğu ile başlayan ve hücre ölümüne kadar giden bir dizi kimyasal olay gerçekleşir. Hücresel olayların

gerçekleşebilmesi için gerekli en önemli madde oksijendir. Oksijen yetersizliği durumunda anaerobik metabolizma devreye girer. Bu da laktik asit ve toksik metabolitlerin birikimi ile sonuçlanır. Ortaya çıkan asidoz nedeniyle normal enzim kinetiği değişir ve yüksek enerjili fosfat bağlarının yapımı azalır. Bu durumda hücre kendi homeostazı için gerekli olan enerjiden yoksun kalır^{33,34,35}.

İskemik bir dokunun yeniden kanlanmasını sağlamak doku nekrozunu önlemek açısından önemlidir. Ancak iskemik dokunun reperfüzyonu sırasında ilk kez Hearse ve arkadaşları³⁶ tarafından 1973'de tanımlanmış olan doku hasarı gelişmektedir. I-R hasarı olarak adlandırılan bu fenomenin iskemik dokunun yeniden oksijenlenmesi ile ilişkili olduğu bildirilmekte ve hasarın oluşumundan ROT sorumlu tutulmaktadır^{37,38}.

Her dokunun iskemiye dayanıklılığı birbirinden farklıdır. İskelet kasları iskemiye uzun süre dayanabildiği halde nöronlarda birkaç dakika içinde geri dönüşümsüz yıkımlar ortaya çıkabilir. Hücresel homeostaz için gerekli olan enerji kaynaklarının, özellikle adenosin trifosfatın (ATP) tüketimi, hücre membranında iyon dengesizliğine yol açar. Bunu asidoz ve ozmotik şok gibi klinik bulgular takip eder^{33,34,35,39}.

2.3. İskemi hasarı

İskemi sırasında hücre içinde aerobik metabolizma hızla anaerobik metabolizmaya dönüşür. ATP ve ADP gibi yüksek enerjili fosfatlar birkaç dakika içinde yıkılır. Hücre içinde proton, laktat ve

inorganik fosfatlar birikir. Hücre içi asidozu, $\text{Na}^+ - \text{K}^+$ ATPaz gibi hücre içi iyon dengesini sağlayan pompaların bozulmasına neden olur. İskemi sırasında hücre içine kalsiyum girişinin artması, endojen fosfolipazların aktive olmasına ve hücre membran bütünlüğünün bozulmasına neden olur. Endotel hücrelerinde membran bütünlüğünün bozulması komplemanı aktive eder. Bu da nötrofillerin endotel hücrelerine adezyonunu kolaylaştırır^{33,40}. Membran bütünlüğünün bozulması ayrıca hücre içinde bulunan süperoksit dismutaz, katalaz ve glutatyon peroksidaz gibi antioksidan enzimlerin kaybını da hızlandırmaktadır. Bu durumdaki hücre reperfüzyon sırasında oluşumu artan oksijen radikallerinin etkisine daha duyarlı hale gelecektir. Bu nedenle iskemi ne kadar uzarsa meydana gelen reperfüzyon hasarı da o derece ciddi olmaktadır^{41,42}.

İskemi boyunca homeostatik fonksiyonları sürdürmek için hücreler enerji stoklarını tüketme girişiminde bulunurlar. Yapılan bir çalışmada iskeminin uzun periyotları aerobik sistem aracılığıyla ATP oluşum kapasitesinde dramatik bir düşüşe yol açmıştır. İskemik kasta pirüvat hızla tükenip ve glukoz konsantrasyonu azalmaktadır. AMP yıkılması, bundan başka hipoksantin ve ürik asit azalması muhakkak ATP'nin yeniden üretimi içindir. Hipoksantin ise hipoksi ve iskeminin belirleyicisi olarak kullanılır^{43,44}. Çünkü oksijen yetersizliğinde, ksantin oksidaz aktivitesinin ve adenin nükleotitlerinin yıkılımının artmasının önemli olduğu dokularda birikmektedir^{44,45}.

Reperfüzyonda ksantin oksidaz aktivitesinin plazma seviyesinde hızlı bir artış vardır^{46,47}. Birikmiş hipoksantin kas

hücrelerinden salınır. Reperfüzyon hasarı teorisine göre, ksantin oksidaz ile artmış süperoksit radikalleri için sübstrat vazifesi yapabilir³⁷.

Ekleme bağılı organdaki iskelet kası iskemiye en fazla maruz kalan dokudur⁴⁸. Kas nekrozu kasın orta kısmında fazla gibi görünür ve klinikte iskemik hasarın derecesinin yüzeysel değerlendirilmesinde güvenilir değildir⁴⁹. Kas ölümünün takibinde uzun bir zaman büyük ve mikroskopik değişiklikler minimaldir. Fiber tipi iskemik hasarın önemli bir anatomik belirleyicisidir⁵⁰. Kas fiberleri kasın miyoglobin içeriğinin birikimine dayanarak sınıflandırılır. Tip I fiberleri genelde enerji kaynakları gibi trigliseritlerin oksidatif metabolizmasına sahiptirler ve iskemiye Tip II fiberlerinden daha açıktırlar. Bir çok kas tipinde iki fiber tipi bir arada bulunur ama belirli kaslarda (örneğin bacağın arterier komplemanı gibi) genellikle Tip I fiberler, gastro sistemde ise Tip II fiberler baskındır⁵¹.

Post-iskemik dönemde, iskemik dokudaki serbest radikallerin en belirgin kaynağı ksantin oksidaz enzimidir. Bu enzim “dehidrojenaz” ve “oksidaz” aktivitesine sahip iki şekilde bulunur. Çalışmalarda iskemi sırasında ksantin dehidrojenaz enziminin kalsiyum aracılı bir proteaz katalizörlüğünde ksantin oksidaza dönüşmesi, intestinal dokuda 10 saniye, kardiyak kasta 8 dakika, karaciğer, dalak, böbrek ve akciğerde 30 dakika sürmektedir. Bu da değişik dokuların I-R hasarına neden farklı oranlarda cevap verdiği konusunda açıklayıcı olmaktadır. Hipoksantin ve ksantin oksidasyonu serbest radikallerin oluşumuna yol açar^{33,52,53}.

Serbest radikaller hücrelerin lipid, protein, DNA, karbohidratlar gibi tüm önemli bileşiklerine etki ederler ve de yapılarının bozulmalarına neden olurlar. Biyolojik sistemlerdeki ROT, süperoksit anyonu ($2O_2^-$), hidroksil radikali (HO^-), nitrik oksit (NO^-), peroksil radikali (ROO^-), ve radikal olmayan hidrojen peroksit (H_2O_2) gibi serbest radikaller oksidatif stresin en önemli nedenlerinden birini oluştururlar⁵⁴. Serbest radikal zincir reaksiyonları genellikle, moleküllerden H^- 'nin uzaklaştırılmasıyla başlar. Lipid peroksidasyonu serbest radikal zincir reaksiyonu için iyi bir örnektir. Bu reaksiyonun özellikle aterosklerozun gelişiminde çok önemli olduğu araştırmacıların savları arasında bulunmaktadır⁵⁵. Mitokondriyal elektron transport zincirinde oksijenin tamamlanmamış redüksiyonu, sigara içimi, radyasyon gibi çeşitli faktörler oksidatif strese neden olabilirler⁵⁵.

Uzamış iskemi hücrede metabolik ve yapısal değişikliklere neden olur. İskemi nedeniyle hücresel oksidatif fosforilizasyon azalır. Hücre membranında ATP bağımlı iyon pompası fonksiyonunun bozulması sonucu hücre içine kalsiyum (Ca^{++}), sodyum (Na^+) ve su girişi artar. İskemi sırasında adenin nükleotid katabolizması sonucu hücre içine hipoksantin birikir. Bu arada endotelde bazı proinflamatuvar ürünlerin (lökosit adhezyon molekülleri, sitokinler) ve biyoaktif ajanların (endotelin, tromboksan A_2) yapımı artarken, diğer bazı koruyucu ürünlerin ve biyoaktif ajanların (prostosiklin, NO) yapımı baskılanır. Böylece iskemi, daha sonraki reperfüzyon döneminde doku zedelenebilirliğini arttıran proinflamatuvar bir durum başlatır⁵⁶.

İskemik dokuların reperfüzyonu ile iskeminin şiddetine ve süresine bağlı olarak, bir kısım hücre nekroz veya apoptozis ile ölmeye devam eder. Etkilenen dokularda sıklıkla nötrofil infiltrasyonu gözlenir. Parenkimal hücreler, endotel hücreleri ve lökositlerce ROT yapımı artar. Bu arada hasarlı mitokondrilerde oksijen yetersizliği veya alternatif yollardan oksijenin indirgenmesi ile de ROT oluşabilir. Hücrel antioksidan savunma sistemleride iskemi nedeniyle zayıflar⁵⁷.

2.4. Reperfüzyon

Reperfüzyon ise iskemiye neden olan etkenin ortadan kaldırılarak dokuya yeniden kan akımının ulaşmasıdır. Reperfüzyonun, iskemik dokuda enerji ihtiyacının sağlanması ve toksik metabolitlerin uzaklaştırılması gibi iki olumlu etkisi vardır. Böylelikle reperfüzyon iskemik hasarın düzeltilebilmesi için gerekli bir süreçtir. Ancak oksijenlenmiş kanın iskemik dokuya dönüşü dokuyu daha fazla zedeleyen bir reaksiyon sürecini başlatmaktadır^{34,58,59}.

2.4.1. Reperfüzyon hasarının mekanizması

Reperfüzyon sonucu meydana gelen hasar, hasarlı doku yada organlardaki inflamatuvar cevap nedeniyle meydana gelmektedir. Oksijenlenmiş kanın tekrar dokuya dönmesiyle beyaz kan hücreleri bu bölgede birikir ve interlökinler gibi inflamatuvar faktörler aynı zamanda doku hasarı sonucu oluşan serbest radikaller salınır. Tekrar normale dönen kan akışı ile hücrel proteinler, DNA ve plazma membranı hasar

görmektedir. Hücre membranına verilen zarar çok daha fazla serbest radikalin salınımına neden olmaktadır⁶⁰.

Kısa iskemik ataklar miyositler tarafından tolere edilirler, belirgin bir hasar oluşmaz. Örneğin köpeklerde 15 dakikaya kadar olan total proksimal koroner tıkanmalar geri dönüşümlü hasara yol açar. 15 dakikadan fazla süren iskemik durumlar geri dönüşümsüzdür. Kısa iskemik periyotlarda kalp kasında fonksiyon bozuklukları olabildiği gibi uzamış iskemik periyotlarda nekroza kadar giden hasar oluşabilmektedir^{61,62,63}.

Reperfüzyon hasarına doğrudan veya dolaylı olarak katılan pek çok madde ve biyokimyasal reaksiyon tanımlanmıştır. Bu maddelerin birbiriyle etkileşimi sonucunda I-R hasarının reperfüzyon kısmının medyatörleri olan ROT ortaya çıkar.

2.4.2. Reperfüzyonda ROT'nin ortaya çıkmasındaki faktörler

I- Ksantin oksidaz

II- Nötrofillerin aktivasyonu

III- Endotelial faktörler

1-Araşidonik asit metabolitleri

a-Prostasiklin (PGI₂)

b-Tromboksen A₂(TxA₂)

c-Lökotrien B₄

2-Nitrik Oksit

3- Endotelin

IV-Komplemanlar

V-Sitokinler

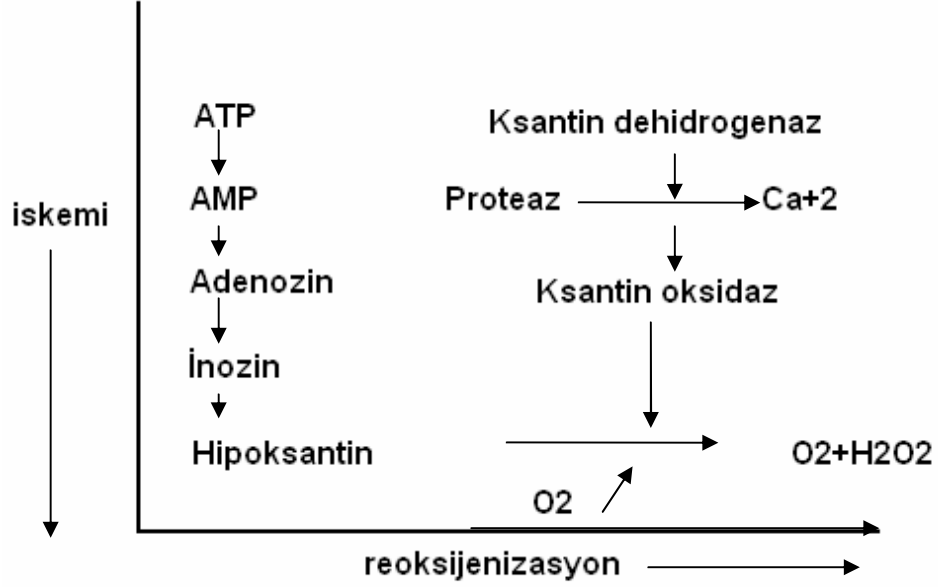
VI-Prostaglandinler

VII-Katekolamin oksidasyonu

VIII-Platelet aktive edici faktör (PAF)

2.4.2.1. Ksantin oksidaz yolu

İskemi sonrası, dokuda süperoksit radikallerinin büyük kısmının kaynağı ksantin oksidaz enzim sistemidir⁶⁴. Doku oksijenizasyonunun azalması ile birlikte düşen ATP üretimi enerji depolarının azalmasına neden olur ve hücre membranında bozulan iyon transportu hücre içi Ca^{+2} nin birikimine yol açar. Artan Ca^{+2} konsantrasyonu da ksantin dehidrogenazı ksantin oksidaza dönüştürecek proteazları aktive eder. Bu arada ATP miktarının azalıp AMP miktarının artması ile birlikte hücre içinde adenosin hipoksantin dönüşümünün olduğu bir süreç belirir⁶⁵.



Şekil 2.1 İskemik dokularda ksantin oksidaz yolu ile serbest oksijen radikali üretimi⁶⁵.

2.4.2.2. Nötrofillerin aktivasyonu

I-R'nun yol açtığı mikrovasküler hasar için nötrofil ve endotelial hücre ilişkisi gerekmektedir. İskemi sırasında ve daha ağırlıklı olarak bunu takip eden reperfüzyon döneminde postkapillerde endotele artmış nötrofil adhezyonu görülür ki bunun I-R'na bağlı barsak disfonksiyonunda önemli rolü vardır³³.

2.4.2.3 Endotelial faktörler

Vasküler endotelial çeper pek çok lokal hormon salgılayarak vasküler düz kas tonusunu düzenler³³.

1) Araşidonik asit metabolitleri

a) Prostatiklin (PGI₂): Endotel hücrelerinden salınan ilk vazoaaktif ajan olan PGI₂ endotelial yüzeylerde trombosit agregasyonunu önleyen güçlü bir vazodilatatördür.

b) Tromboxan A₂ (TXA₂): Araşidonik asitten siklooksijenaz yardımı ile oluşan TxA₂ trombositleri agreste eder ve vazokonstrüktör etkisi vardır. Reperfüzyon, prostaglandin üretiminin en güçlü uyarandır. TXA₂, iskemi-reperfüzyonda endotelyuma nötrofil adezyonunu indükleyen güçlü bir maddedir.

c) Lökotrien B₄ (LB₄): Lökotrienler, I-R boyunca endotelial disfonksiyonda önemli rol oynayan ve lipooksijenaz yoluyla oluşan araşidonik asit metabolitleridir. LB₄ nötrofil yüzeyindeki spesifik reseptörlere bağlanır. Üç saatlik iskemik periyodu mukozal LB₄ seviyelerini değiştirmezken, reperfüzyonun izlediği aynı süreli iskemi mukozal LB₄ seviyelerinde %200-600 oranında artışa yol açmaktadır⁵⁹.

2) Nitrik Oksit (NO)

Endotel türevli nitrik oksit olarak bilinen NO, asetil kolin uyarısı, hipoksi, endotoksin, hücresel zedelenme veya mekanik kesilme

stresine yanıt olarak dolaşıma salınabilmektedir. Yarı ömrü bir kaç saniye olan bir maddedir. NO kendiliğinden nitrat ve nitrite ayrışır. Septik şok ve travmada, nitrit ve nitrat metabolitleri ile ölçülen NO düzeyleri yüksekliğinin, düşük sistemik vasküler direnç ve yükselmiş endotoksin düzeyleri ile ilişkili olduğu kanıtlanmıştır³⁴.

3) Endotelin

Endotel hücrelerinin damar tonusunun düzenlemesi, koagülasyon, hücre büyümesi ve ölümü, lökosit migrasyonu gibi çeşitli olaylarda rol oynar⁶⁶. Arter ve venlerde kontraksiyona neden olan en güçlü vazokonstrüktördür. İskemik kalmış bir barsağın ürettiği endotelinin, intestinal I-R hasarının sistemik bir hasara dönüşmesinden sorumlu olabilecek güçlü bir aday olduğu ileri sürülmektedir³⁴.

2.4.2.4 Komplemanlar

Nötrofiller üzerindeki etkileri endotele adhezyonun artışı, ROT'lerinin üretim ve salınmasını sağlamaktır³³.

2.4.2.5 Sitokinler

Reperfüzyon sonrası, dolaşımda IL-1, IL-6 ve Tümör Nekrozis faktör-a (TNF-a) gibi sitokinler gözlenir. I-R'da sitokin salınımının bilinmesine rağmen bu sitokinlerin permeabilite üzerine olan etkilerinin direk mi yoksa hücre adhezyon molekülleri ekspresyonu ve nötrofil adhezyon aktivasyonu yoluyla mı olduğu bilinmemektedir.

2.4.2.6 Platelet aktive edici faktörler

Fosfolipaz A2'nin etkisiyle endotel hücreleri tarafından membran fosfolipidlerinden üretilir. Trombositlerin şekil değişikliğine, agregasyonuna, ve granül içeriğinin salınmasına yol açan oldukça kuvvetli bir ajandır. Ek olarak PAF kuvvetli bir aktivatör maddedir ve TNF-a üretiminde önemli bir rol oynar. Dokuların reperfüzyonu sonucu lökositlerin aktivasyonuna, adhezyon ve aynı zamanda vasküler permeabilitede artışa yol açar. PAF'ın, reperfüzyon sonucu gerçekleşen kemotaksisin bir düzenleyicisi olduğu düşünülmektedir⁶⁷.

2.5 Reperfüzyon hasarı ve oksidatif stres

2.5.1 Serbest Radikaller

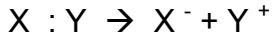
Yapılarında eşleşmemiş elektron içeren atom veya bileşikler serbest radikaller olarak tanımlanmaktadır^{68,69}. Diğer bir deyişle serbest radikaller; yapılarında tek sayıda elektron içeren, açık elektron kabuğu konfigürasyonuna sahip atom veya moleküllerdir⁶⁸. Serbest radikaller fazlasıyla reaktif, kısa ömürlü ve stabil olmayan moleküllerdir. Moleküler oksijenin indirgenmesi ile değişik oksijen serbest radikalleri üretilebilirler^{33,34,69}.

Serbest radikalın meydana gelmesi 3 şekilde gerçekleşmektedir⁷⁰:

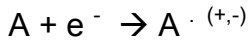
1. Kovalent bağ taşıyan normal bir molekülün homolitik yıkımı sonucu her bir parçada ortak elektronlardan biri kalarak meydana gelirler.



2. Normal bir molekülden tek bir elektronun kaybı ya da bir molekülün heterolitik olarak bölünmesi ile oluşurlar. Heterolitik bölünmede kovalent bağı oluşturan her iki elektron, atomlardan birisinde kalmaktadır.



3. Normal bir moleküle tek bir elektronun eklenmesi ile oluşurlar.



Serbest radikaller, pozitif yüklü, negatif yüklü ya da nötral olabilirler. Biyolojik sistemlerde en fazla elektron transferi ile oluşurlar⁷¹.

Hücreler ROT'nin hasarına bağışık değildir. Ancak genellikle glutatyon ve katalaz ile oksijen hasarına karşı korunmuşlardır. İskemik dokularda, ROT üreten intrasellüler mekanizmalar tam aktive edilmiş durumdadır. Ancak oksijen sağlanmasındaki eksiklikten dolayı fonksiyon görmezler. Kan akımı ve oksijen sağlanmasının restorasyonu ile büyük miktarlardaki ROT üretilerek reperfüzyon hasarı indüklenir³⁴. Organizmada ROT ortaya çıktıktan sonra radikal reaksiyon dizileri başlar. Eğer bir serbest radikal, radikal olmayan bir molekülle reaksiyona girerse, binlerce reaksiyondan oluşan reaksiyon zincirlerini başlatır. ROT paylaşılmamış elektronlarından dolayı lipid, protein, karbonhidrat, nükleik asit gibi çeşitli makromoleküllerin oksidatif hasarına neden olurlar⁶⁹.

Süperoksid anyonu	O_2^-	Sitokrom P450E Mitokondrial solunum zinciri Ksantin oksidaz Aldehid oksidaz Fagosit
Hidroksil radikal	OH^*	Hidrojen peroksidin demir aracılığıyla degradasyonu
Nitrik oksid	NO	Hepatosit, kupfer ve endotel hücrelerinde nitrik oksit sentezi
Peroksinitrit	$ONOO^*$	NO ile O_2^- reaksiyonu
α -hidroksietil radikal	CH_3C^*HOH	Etanolün CYP2E1'de oksidasyonu O_2^- 'in OH^* ile reaksiyonu
Metilkarbonil radikal	CH_3C^*O	Kupfer hücreleri Ksantin oksidaz veya asetaldehid oksidaz tarafından asetaldehidin oksidasyonu

Tablo 2.1 Serbest radikaller ve kaynakları⁷²

Öncelikle O_2^- , $OH^\cdot$ ve NO ve H_2O_2 gibi ROT'lar aerobik metabolizma sırasında fizyolojik şartlar altında oluşur. Oksijen radikallerinin üretimi artmışsa veya hücrel antioksidan savunma sisteminde kusur varsa proteinler, lipidler ve nükleik asitler ile tepkiye girerek hücrede fonksiyon bozukluğuna sebep olurlar^{53,73}.

Şekil 2.2 Oksidatif stres sürecinde meydana gelen reaksiyonlar⁷²

proteinlerin değişimiyle sağlarlar^{75,76}. Oksidatif strese maruz kalınmasıyla hücrelerde DNA hasarının meydana geldiği iyi bilinmektedir⁷⁷.

Nörolojik bozukluklardan kalp hastalığına ve kansere kadar pek çok hastalıkta oksidatif stres meydana gelmektedir. Mitokondrial solunum zinciriyle ROT'lerinin serbest kalmasının ve devamlı üretiminin üstesinden gelinmesi gerekmektedir. Bu nedenle oluşacak olan antioksidan savunmasının lipitler, proteinler ve nükleik asitler gibi biyomoleküllere zarar vermeden önce yavaş yavaş oluşması gerekmektedir. Hasarın olmayacağı kesin seviyenin bilinmesi önemlidir. " Oksidatif stres " denge nerede altüst olduysa yani serbest radikal üretimi nerede arttıysa, antioksidan üretimi yetersiz kaldıysa orada oluşur⁷⁸.

Lipit peroksidasyonu ürünleri büyük olasılıkla felç, koroner kalp hastalıkları, trombozis ve diğer vasküler hasarlara neden olan arteriyal plaka içermektedir⁷⁹. Diyabetlilerde düşük dansiteli lipoproteinler ateroskleroz riskine katkıda bulunurlar⁸⁰. Örneğin güneş ışığındaki uv'nin sebep olduğu oksidatif hasar gözde katarakta sebep olabilmektedir⁸¹.



Şekil 2.3 Oksidatif stresle ilişkili klinik durumlar⁸²

Serbest radikaller kaçınılmaz şekilde yan etkileriyle zarar verirler. Kanseri ve oksidatif hasar arasında ilişkiyi gösteren yayınlanmış pek çok çalışma vardır⁸³. Serbest radikallerin özellikle DNA üzerinde yaptıkları hasar önemlidir. Nükleik asitler ile reaksiyona giren serbest radikaller, DNA dizininde çatlaklar meydana getirmekte ve bu hücrelerin kanser hücrelerine dönüşmesine yol açmaktadırlar⁸⁴.

Akciğer kanseri ve birçok malign hastalıkların patogeneğinde, süperoksit radikalleri ve bunların biyomoleküllerinin oluşturduğu oksidatif hasarın önemli bir rolü olduğu düşünülmektedir^{85,86}.

Tümör oluşum mekanizması üzerine yapılan son çalışmalarda tümör hücrelerinin süperoksid radikalleri üretebildiği gösterilmiştir. Bu nedenle de birçok araştırmacı, zarar görmüş tümör hücrelerinde temel antioksidan olan süperoksit dismutaz (SOD) ve katalazın düzeyini araştırmaya yönelmiştir⁸⁷⁻⁹¹. Günümüzde kansere bağlı ölümlerin en sık sebebi akciğer kanseridir ve bu dokudaki temel kanser oluşum mekanizması aydınlatılmaya çalışılmaktadır. Klinik çalışmalar yanında hayvan modelleri ve son zamanlarda doku kültürleriyle de çalışmalar devam etmektedir⁹¹.

Oksidatif hasarın çoğunlukla biyomoleküllere katkıda bulunduğu ve hatta yaşlanmaya sebep olduğu düşünülmektedir. Antioksidan savunmanın bizi gelecek nesillere kadar yaşamamız için yeterli olması gerekmektedir. Ama daha sonra hasarın yavaşça birikmesi neticesinde organlarımızın kötüye gitmesi ve eskimesi kaçınılmaz bir hipotezdir⁹². Oksidatif hasarın DNA'da oluşturduğu değişiklikler şaşırtıcı bir durum değildir. Alzheimer ve diyabetli hastalarda DNA baz hasarı daha da yüksektir^{3,93,94}. Burada da baz oksidasyonunun normal seviyesini bilmek çok önemlidir.

Oksidatif stres geri dönüşümlü yada geri dönüşümsüz hücre hasarına yol açar. Oksidatif stres akut ya da kronik olabilir. I-R'da, akut enflamasyonda ve hiperoksi'de kısa süreli bir oksidatif stres varken, kronik enflamasyonda uzun süreli bir oksidatif stres vardır⁹⁵⁻⁹⁹. Bu uzun süreli oksidatif stres kanser gelişiminde rol oynar¹⁰⁰⁻¹⁰⁵.

2.6. Antioksidanlar ve antioksidan savunma sistemleri

ROT'nin oluşumunu ve bunların meydana getirdiği hasarı önlemek için vücutta savunma mekanizmaları vardır. Bunlar antioksidan savunma sistemleri olarak bilinirler.



Şekil 2.4 Antioksidan savunma sistemleri¹⁰⁶

Antioksidan moleküller endojen ve ekzojen kaynaklı yapılar olup, oluşan oksidan moleküllerin neden olduğu hasarı hem hücre içi hem de hücre dışı savunma ile etkisiz hale getirilirler. Hücre dışı savunma, albümin, bilirubin, transferrin, seruloplazmin, ürik asit gibi çeşitli molekülleri

içermektedir. Hücre içi serbest radikal toplayıcı enzimler asıl antioksidan savunmayı sağlamaktadır. Bu enzimler SOD, glutatyon-S-transferaz, glutatyon peroksidaz, glutatyon redüktaz, katalaz ve sitokrom oksidazdır. Bakır (Cu) , çinko (Zn) ve selenyum (Se) gibi eser elementler ise bu enzimlerin fonksiyonları için gereklidir¹⁰⁷.

Organizmada sürekli serbest oksijen radikalleri oluşmasına rağmen antioksidan savunma sistemleri ile oksidasyon arasındaki dengeden dolayı zararlı etkiler ortaya çıkmaz. Fizyolojik veya patolojik olaylar sonucu bu dengenin oksidasyon lehine değişmesi durumunda oksidatif hasar gelişebilmektedir. I-R hasarını inhibe eden pek çok endojen mekanizma bulunmakla beraber, ekzojen olarak da hasarı engelleyebilen birçok ilaç tanımlanmıştır.

2.6.1 Etki mekanizmaları farklı olan ajanlar

2.6.1.1 Antioksidan enzimler: SOD, glutatyon peroksidaz, katalaz bu gruptan olup primer antioksidanlardır. Serbest radikalleri, biyolojik önemi olan moleküllerle etkileşmeden önce daha zararsız bileşiklere dönüştürerek veya başka moleküllerden radikal üretimini engelleyerek etkilerini gösterirler^{33,42}.

2.6.1.2 Serbest radikal toplayıcılar (scavenger): Vitamin E, vitamin C, β -karoten, ürik asit, bilirubin, albümin bu gruptandır ve sekonder

antioksidanlar olarak bilinir. Bunlar serbest radikalleri yakalayarak oluşabilecek zincir reaksiyonlarını engeller^{39,53,108}.

2.7. İskemi-reperfüzyonla ilgili yapılan çalışmalar

I-R hasarıyla ilgili yapılmış pek çok çalışma vardır. Christian ve arkadaşları I-R hasarından sonra lökositlerde meydana gelebilecek DNA hasarını belirlemek için bir çalışma yaptılar. Bu çalışmaya yaşları 19-53 arasında (ortalama 30) olan 20 hasta dahil edildi. Operasyon öncesinde, iskemiden 45 dakika sonra ve turnike çözülmesinin 0-2, 5, 15, 30 ve 120. dakikalarında hastaların kan örnekleri toplandı. Anestezinin etkisini bertaraf etmek için bu hastalardan 5 kişiye endotrakeal anestezi ve geri kalan hastalara da spinal anestezi uygulandı. Ayrıca operasyon travması ve anestezisiz I-R'nun hasarının sebep olduğu etkileri araştırmak için 35 yaşında gönüllü sağlıklı bir kişiye 10 defa 1 saat süren turnike uygulandı. Çalışmada hastalar 2 ayrı gruba bölündü. İlk grup alt ekstremitede I-R uygulanan 10 hasta, ikinci grup ise üst ekstremitede I-R uygulanan 10 hasta olarak belirlendi. Çalışmanın sonucunda iskemi esnasında tail momentte anlamlı bir yükselme olmadı. Turnike çözüldükten hemen sonra beyaz kan hücrelerinde DNA göçü arttı. Turnike çözüldükten 5-30 dakika sonra tail moment belirgin şekilde yükseldi ve daha sonraki 2 saatlik periyotta düştü. Ancak iskemi öncesi ana değerlere geri dönmedi. Yani bu çalışmayla I-R'den kaynaklanan genotoksik etki belirlendi¹⁰⁹.

Bo Westman ve arkadaşlarının yaptığı başka bir çalışmada iskelet kasında I-R'nin etkileri araştırıldı. Diz replasmanı operasyonu

geçiren yaşları 63-76 arası (ortalama 71) olan 15 hastadan kendi isteğiyle operasyon esnasında iskeminin maksimum olduğu zamanda ve reperfüzyondan 24 saat sonra kas biyopsileri alındı. Bu hastalar sigara kullanmayan, kortikosteroid tedavisi almayan ve metabolik olarak sağlıklı kişilerdi. Epidural anestezi kullanılarak anestezinin etkileri bertaraf edildi. İskemi süresi ise ortalama 83 dakika sürdü. Biyopsilerden glutatyon, aminoasit, fosfokreatin ve laktat gibi maddelerin analizi yapıldı. Sonuçta laktat ve kreatin seviyeleri arttı ve fosfokreatin seviyesinde azalma gözlemlendi. Kas ATP konsantrasyonu ise değişmedi. İskeminin maksimum olduğu zamanda kasta tGSH değişmemesiyle birlikte GSH'ta %10 artma gözlemlendi. Bu artışın fizyolojik önemi tam olarak belli değildi ama az da olsa ROT'nin ortaya çıktığını gösterdi. Operasyon süresince maksimum iskemide serbest amino asit miktarı farklı değildi¹¹⁰. Ama normal vasküler ameliyatlarda boyunca hemen reperfüzyondan önce alanin haricinde serbest amino asit konsantrasyonları düşmektedir^{111,17}. Sonuçta turnike iskemisi ve devamında gelişen değişiklikler oksidatif stresi gösterdi. Glutatyon ve aminoasit durumundaki değişiklikler ise ameliyat travması olarak nitelendirildi¹¹⁰.

Ostman ve arkadaşlarının yaptığı bir çalışmada artroskopi operasyonunda I-R'na maruz kalmış 8 hastanın iskelet kaslarında invivo mikrodializle püriyat, glikoz, laktat, gliserol, hipoksantin, ürik asit ve üre değerleri ölçüldü. Ameliyattan önce femor kasına bir dializ sondası yerleştirildi. Hastalara 90-120 dakika turnike uygulanarak I-R oluşturuldu. Turnike uygulanmasından sonra 2 saat boyunca 10 dakikalık aralıklarla örnekler toplandı. İskeminin 90. dakikası %100'e oranla; %238±%38 laktat, %582±%166 hipoksantin ve %146±%46 gliserol birikmesi; %54±%9

glukoz tüketimi; 16 ± 44 pürivat tüketimi ve 78 ± 11 'lik küçük bir üre azalmasıyla sonuçlandı. Ürik asit değeri ise değişmedi¹¹². İskemi süresince fonksiyonların devamı için enerji stokları tüketilir⁴⁴. Bu çalışmada iskeminin uzun periyotları aerobik sistem aracılığıyla ATP oluşum kapasitesinde dramatik bir düşüşe yol açtı. Turnike çözülmesinden sonra 90 dakika içinde bütün değerler normale döndü. Bu durum iskemi süresinin hastalar tarafından iyi tolere edildiğini gösterdi¹¹². Yapılan bu çalışma sonucunda I-R gerektiren ortopedi operasyonları süresince metabolik olayları kontrol etmek için mikrodializ yönteminin güvenilir olduğuna da karar verildi.

Andreassi ve arkadaşlarının yaptığı diğer bir çalışmada ise perkütan translüminal koroner anjiyoplasti (PTCA) geçiren hastalarda I-R'nin patojenitesi araştırıldı¹¹³. PTCA'dan sonra serbest radikallerin oluştuğu daha önceden gözlemlenmişti¹¹⁴⁻¹¹⁷. Bu çalışmada PTCA'ya maruz kalan hastaların lenfositlerinde mikroçekirdek ve comet yöntemi kullanılarak I-R'nun neden olduğu genetik hasarın saptanması amaçlandı. Çalışmaya PTCA grubu olarak 25 bay ve 5 bayandan oluşan yaş ortalaması 61.3 ± 2 olan 30 hasta dahil edildi. Radyasyon alıp almamalarına göre de kendi içlerinde gruplandırıldılar. Ayrıca kontrol grubu da oluşturuldu. Çalışmanın sonucunda radyasyon dozu ve radyasyona maruziyet zamanı ile DNA hasarının belirgin şekilde arttığı gözlemlendi. Bu durum olası X-ray maruziyeti ve kontrast ilaç alınmasıyla DNA hasarında artışa sebep olmuş olabileceğini akla getirdi¹¹⁸. Ayrıca PTCA'dan sonra DNA bağ kırıkları ölçüldüğünde anlamlı bir artış gözlemlendi. Yani PTCA'dan sonra periferik lenfositlerde oksidatif DNA hasarı kanıtlanmış oldu¹¹³. Daha önce yapılan çalışmalar primer anjiyoplasti

süresince hasar maruziyetiyle artan bir kardiyak oksidatif stres meydana geldiğini göstermişti¹¹⁴⁻¹¹⁷. Daha sonra yapılan çalışmalarda ise PTCA'dan sonra reperfüzyon süresince lipid peroksidasyon ve ROT ürünlerinin belirgin biçimde arttığı belirlendi^{117,119-122}.

Türkiye'de yapılan bir pilot çalışmada¹²³ ise alt ekstremitte operasyonlarında pnömotik turnikeyle oluşturulan I-R hasarı araştırıldı. Alt ekstremitte operasyonu geçirecek olan 20 hasta çalışmaya dahil edildi. Birinci grubu pnömotik turnike uygulanan 10 hasta (T grubu), ikinci grubu ise iskemi ön koşul olmak şartıyla turnike uygulanan 10 hasta (IP-T grubu) oluşturdu. T grubunda pnömotik turnike kullanılarak 300 mmHg'ye kadar şişirildi ve normal ameliyat prosedürü uygulandı. IP-T grubunda ise yine pnömotik turnike kullanıldı ve 300 mmHg'ye kadar şişirildi. Ancak 5 dakika iskemiden sonra, turnike gevşetilerek 5 dakika reperfüzyon yapılmasına izin verildi. Bu durum 3 kez tekrar edildi ve son reperfüzyondan sonra normal ameliyat prosedürü uygulandı. Turnike çözüldüğünde ve turnike çözülmesinden 1, 5 ve 10 dakika sonra hastalardan kan örnekleri alındı. Birinci grupta turnike çözüldükten sonra arteriyel basıncın azaldığı, solunum sıklığının belirgin biçimde arttığı ve metabolik parametrelerde belirgin değişiklikler olduğu gözlemlendi. Ancak IP turnike uygulanan ikinci grupta belirgin bir değişiklik gözlenmedi.

Çalışma sonunda alt ekstremitte ameliyatlarında IP turnike uygulamasının hemodinamik yanıt ve lipid peroksidasyonu açısından olumsuz sonuçlar ortaya çıkarmadığı gözlemlendi. Ve sonuçta IP turnike uygulanmasının klinikte uygulanabilir bir yöntem olduğu sonucuna

varıldı¹²³. Ancak Orban ve arkadaşları¹²⁴ yaptıkları çalışmada IP turnike uygulamasının doku hasarına sebep olduğu sonucuna vardılar. Wu ve arkadaşları¹²⁵ ise yaptıkları çalışma sonucunda koroner baypas ameliyatlarında da IP turnike yöntemini önerdiler.

2.8. Genotoksik etki

2.8.1. Genotoksik etki ve belirlenmesi

Genotoksisite çeşitli kimyasal ve fiziksel ajanların DNA yapısında değişiklikler oluşturması ya da kırıklara neden olması ile oluşan hücresel değişiklikleri kapsar. Kalıtsal materyalin miktar, düzen veya içeriğinde meydana gelen kalıcı değişikliklere mutasyon denir. Kromozom yapısı ya da sayısındaki değişikliklerden doğan farklılıklar ya da DNA hasarının indüksiyonu ise mutagenesis olarak tanımlanır. Mutasyona neden olan her ajana mutajen denir. Mutasyonlar kendiliğinden meydana gelebildiği gibi mutajenler tarafından da meydana getirilebilir. Genelde mutasyonun kendiliğinden meydana gelebilme olasılığının çok düşük olmasına karşın mutajenlerin etkisiyle mutasyon frekansı oldukça yükselmektedir. Genotoksik etki ile baz çifti değişimi, çerçeve kayması gibi hasarın nükleotidlerde olduğu mikrolezyon ve makrolezyonlar oluşur. Kromozomlardaki yapısal değişiklikler kromozomal aberasyonlar olarak adlandırılırlar. Mutasyon sonucu oluşan yapıya ise mutant denilmektedir¹²⁶.

Mutasyon genellikle tek bir gende sürekli meydana gelen değişikliktir ve çoğunlukla hücre için zararlı olur. Vücuttaki hücrelerin

yeterli derecede farklılaşmaya uğramadan, kontrolsüz ve hızlı bir şekilde bölünmeleri ile kendini gösteren patolojik duruma ise kanser adı verilmektedir. Mutagenesis ve karsinogenesis arasında güçlü bir ilişki vardır. DNA hasarlarının indüklenmesi ile mutasyonların ve kromozomal bozuklukların oluşması kanser gelişiminde en önemli mekanizma olarak kabul edilmektedir¹²⁷. Gen-çevre, gen-hastalık etkileşimlerinde en yaygın araştırma alanlarından biri kanserdir. Kanser tedavisi, teşhisi ve korunmasında bir çok ilerleme kaydedilmesine karşın insanlık için halen büyük bir sorun teşkil eden, uzun ve çok basamaklı bir sürecin sonucunda ortaya çıkan bir hastalıktır. Kanser oluşumunda genler ve çevre arasında kompleks bir etkileşim söz konusudur¹²⁸. Çoğu insan karsinojeni genotoksikken tüm genotoksik ajanların insanlarda karsinojenik olduğu gösterilmemiştir. Kanser oluşumunda genotoksik hasarın en önemli faktör olduğu bilindiği için bu amaçla geliştirilen genotoksisite testleri mevcuttur. Bunlardan en sık kullanılanlar kromozomal aberasyon testi (KAT), kardeş kromatid değişimi (KKD) (Sister Chromatid Exchange; SCE), floresans in-situ hibridizasyon (FISH), mikroçekirdek (MÇ), comet yöntemi şeklinde sıralanabilir¹²⁹.

Potansiyel mutajenlere maruz kalan insan popülasyonlarının genetik biyoizlemi, farklı genetik işaretleyiciler kullanarak yapılabilir. Kardeş kromatid değişimleri, DNA hasarına neden olan ajanların erken biyolojik etkilerinin belirlenmesinde en yaygın kullanılan sitogenetik işaretleyiciler arasında yer alır^{129,130}. KKD, DNA replikasyonu sırasında kardeş kromatidlerin karşılıklı olarak yer değiştirmesidir. KKD hücre bölünmesinin normal bir özelliği olarak meydana gelebilmekle birlikte, kromozom morfolojisinde değişikliğe neden olmamakta; fakat

hücre DNA'sı genotoksik ajanlar tarafından zarar gördüğünde oranı artmaktadır¹²⁹⁻¹³².

MÇ yöntemi ise ilk defa 1970'lerin ortalarında tanıtılmıştır¹³³. Bu prosedür, anafaz safhasındaki kromatin dağılımının bozulması sonrasında oluşmuş mitotik hücrelerin incelenmesi temeline dayanır. Telofaz safhasından sonra bu yer değiştirmiş kromatin yavru hücre sitoplazması içinde çekirdekten ayrı, tekli veya çoklu MÇ olarak gözlenir. MÇ görülmesindeki sıklık kromozom kırılmalarına veya kayıplarına ve hücre bölünme oranına bağlıdır^{134,135}.

FISH yöntemi ise son yıllarda kromozomal aberasyonların analizinde uygulanan diğer yöntemlere alternatif olarak gösterilmeye başlanmıştır. FISH yöntemi, radyoaktif olmayan molekül ile kimyasal olarak değiştirilen DNA problemlerinin immünolojik ya da afinite reaksiyonlarını kullanarak kromozom veya kromozom parçalarının floresans olarak görüntülenmesine olanak sağlayan bir tekniktir. Bu yöntemle sayısal ve yapısal anomalileri hem interfaz hem de metafaz hücrelerinde saptamak mümkündür¹³⁶.

Genotoksisite testleri son zamanlarda toksikolojide çok fazla önem kazanmıştır. Bu testler mutajenik ve karsinojenik maddelere maruz kalan bireylerin izlenmesinde kullanılabilmektedir. Oksidatif DNA hasarının ölçümünde comet yöntemi oldukça hızlı, uygun, güvenilir bir yöntemdir^{121,122}.

2.8.2. Comet testi (Tek hücre jel elektroforezi - Single cell gel electrophoresis, SCGE)

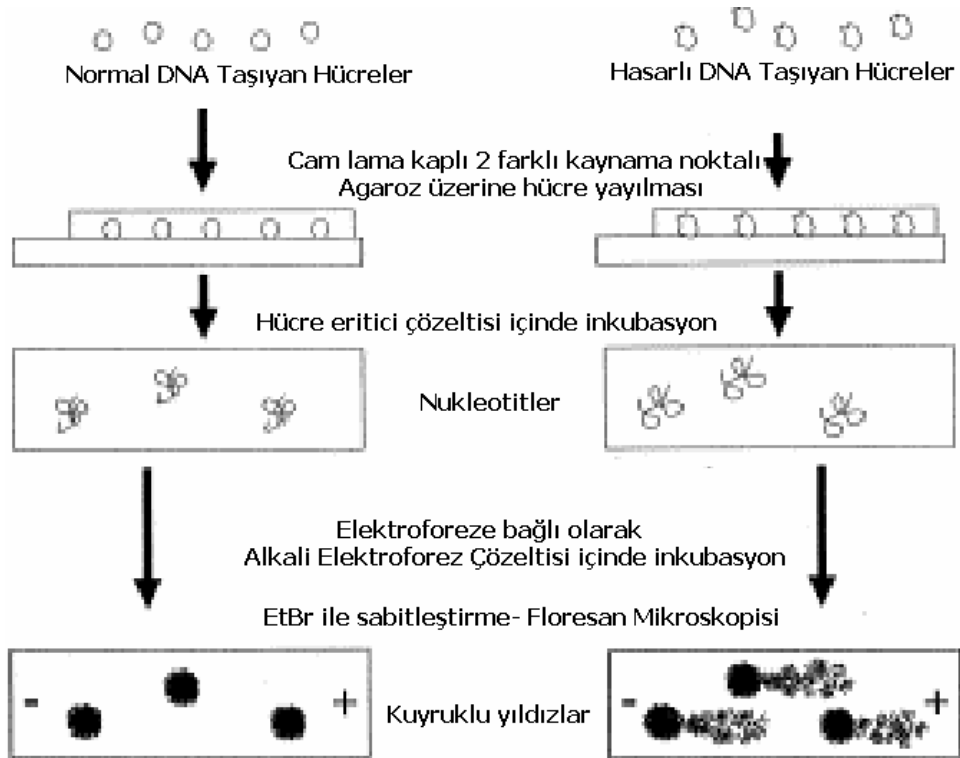
1970'li yıllarda Peter Cook ve arkadaşlarının yüksek molaritede sodyum klorid ve non-iyonik deterjanlar ile hücrelerin lizisinde nükleer yapı temelindeki incelemeler için geliştirilmiş bir yaklaşımdı¹³⁷. 1978'de ilk defa Rydberg ve Johanson tarafından DNA sarmal kırıklarının ölçülmesi amacıyla kurulmuş ve 1984 yılında Östling ve Johanson tarafından geliştirilmiş olan bu teknik nötral pH'daki lizing şartlarında uygulanarak DNA çift sarmal kırıklarını tayin etmekteydi¹³⁸. 1988 yılında Singh ve arkadaşları tarafından protokolde birtakım değişiklikler yapılarak yöntem alkali liziz koşullarında uygulandı. Böylece sadece sarmal kırıklarının değil alkali koşullarda ortaya konulabilen hasarların DNA çapraz bağlarının ve tamamlanmamış onarım bölgelerinin de saptanmasına olanak sağlandı¹³⁹. Singh ve arkadaşlarının alkali comet yöntemi küçük değişikliklerle bugün dünya genelinde en yaygın kullanılan genotoksisite protokolüdür. Alkali comet testi, tekli ve çiftli sarmal kırıkları, oksidatif DNA baz hasarı gibi DNA hasarının farklı formatlarının ve DNA onarımının belirlenmesi için teknikler geliştirilerek avantajları artırılmıştır¹⁴⁰.

Collins ve arkadaşları comet yönteminin geliştirilmesinde birçok çalışma yapmış ve spesifik enzimler kullanarak oksidatif DNA hasarının belirlenmesine olanak sağlamışlardır⁴. Klaude ve Collins kuyruk oluşturma'nın altında yatan nedenin alkali şartlarda iplikçiklerin gevşemesi olduğunu bulmuşlar ve yaptıkları çalışmalarda nötral şartlarda kuyruk

kısımında sadece gevşek iplikçikler varken DNA parçacıklarının alkali ortamda bulunduğunu göstermişlerdir. Zira alkali ortamda bağların çözülmesi ve DNA moleküllerinin denatürasyonu daha kolaydır. Bu DNA'da tek bağ hasarına neden olur. Bu nedenle son yıllarda tercih edilen yöntem alkali ortamda DNA hasarını çalışmak olmuştur^{141,142}.

Alkali comet yönteminin en önemli avantajlarından birisi çok çeşitli hücre tiplerinde çalışma olanağı sağlaması ve in-vivo/in-vitro uygulanabilmesidir¹⁴³. Comet yöntemi insan çalışmaları için uygundur. Çünkü bu çalışmalar radyoaktif madde ile ön işaretlemeyi gerektirmez, zararlı prosedürleri içermez ve beyaz kan hücrelerine kolayca uygulanabilir. Ancak bunların dezavantajları da vardır. Örneğin kanser için hedef doku değildir ve hasar tespit edilen beyaz kan hücrelerinin gerçek hasarı tam olarak yansıtmayı yansıtmadığı açık değildir¹⁴⁴.

Bu yöntem genetik toksikolojiden moleküler epidemiyolojiye kadar klinik araştırmalara kadar pek çok araştırmada kullanılmaktadır. DNA sarmal kırıklarını, çapraz bağlantılarını, alkali labil kısımlarını değerlendirerek potansiyel genotoksik etkiyi tahmin eder. DNA'nın kimyasal ajanlarla ya da metabolitleriyle direk modifikasyonu, DNA sarmal kırıklarına neden olur. DNA'nın elektrik alana göçü DNA sarmal kırıklarının sayısal olarak tahmin edilmesini sağlar^{143,145}.



Şekil 2.5 Normal ve hasarlı hücrelerde deneyin yapılışı¹⁴⁶

DNA'daki zincir kırıklarının ölçümü kısıtlı bilgiler vermektedir. Kırıklar bazı zararlı ajanların doğrudan etkisini gösterir fakat bunlar genellikle çok hızlı bir biçimde yeniden birleşir¹⁴⁴. Comet testini duyarlı olduğu kadar spesifik yapabilmek için nükleotidlerin enzimle ayrışması ve böylece bir parça zarar verip yeni kırıklar oluşturması sağlanır. Bu yüzden endonükleaz III enzimi okside pirimidinlerin¹²¹, formamidopyrimidine DNA glycosylase (FPG) ise okside olmuş büyük pürin bazlarının¹⁴⁷ tespit edilmesinde yardımcı olur.

Moller bireylerin yaş, egzersiz veya antioksidan durumunun comet testinin sonuçları üzerinde etkisinin olmadığını belirtmiştir¹⁴⁸. Ancak bireylerin yaşam tarzında bu faktörlerin aşırı etkisi olduğu durumda comet testi ile ölçülebilecek DNA hasarını indükleyebileceği sonucuna ulaşılmıştır¹⁴⁸.

Comet yönteminde hücreler izole edildikten sonra agar içine gömülerek mikroskopik lamlara yayılır. Liziz aşamasından sonra elektroforeze bırakılıp floresan boya ile boyanmak suretiyle değerlendirilir. Hasarsız hücrelerde çekirdek parlaktır ve floresan şiddeti baş tarafta yoğunudur. Ancak DNA'da kırıklar olduğunda floresan çekirdekten anoda doğru yayılarak kuyrukta daha yoğun olur. Kuyruktaki floresan yoğunluğu hasarın derecesi ile paraleldir.

Comet yöntemi ile DNA hasarının kantitatif olarak tayin edilmesinde DNA göçü gözle değerlendirilebileceği gibi, aynı zamanda bilgisayar destekli 'comet görüntülü analiz tekniği' ile sayısallaştırılabilmektedir. Kuyruk uzunluğu (Tail Length= TL), kuyruk momenti (Tail Moment= TM), kuyruktaki DNA yoğunluğu (Tail Intensity= TI) lenfosit DNA hasarının göstergesi olarak ölçülmektedir¹⁴⁹.

Görüntü Analizi ile Veri Toplanması

DNA Göçünün Uzunluğu

(Tanımlanabilen en küçük DNA)

Göç Etmiş DNA Yüzdesi

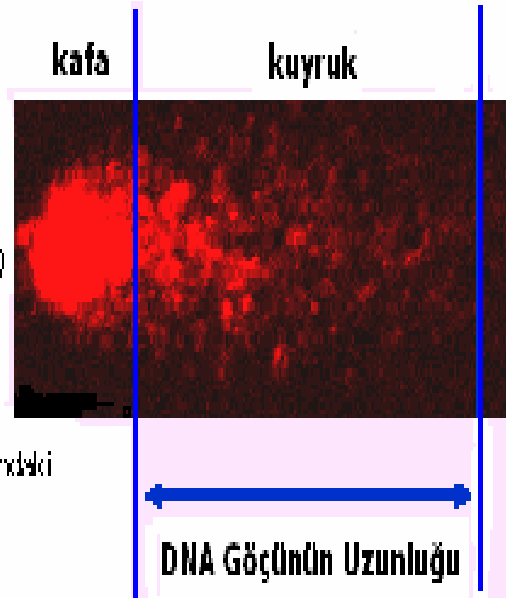
(Göç eden DNA Miktarı)

Kuyruk Momenti

(Göç etmiş DNA) $\times$ (kuyruk uzunluğu)

Çekirdek Kuyruk Momenti

(Göç etmiş DNA) $\times$ (kuyruktaki DNA yoğunluğunun merkezi ile kafa arasındaki mesafe)



Resim 2.1 Görüntü analizi ile veri toplanması¹⁴⁶

3. GEREÇ VE YÖNTEM

3.1. Çalışma grubunun seçilmesi

Alt ekstremitelerde turnike uygulanan ortopedi hastalarında iskemi-reperfüzyon sonucu oluşan oksidatif DNA hasarının araştırılması için yaş ortalaması 41.48 ± 13.83 olan Gazi Üniversitesi Tıp Fakültesi Ortopedi ve Travmatoloji Anabilim Dalında meniskopati tanısı konulmuş ve artroskopi ameliyatı geçiren 33 hasta (14 kadın, 19 erkek) çalışmaya dahil edildi.

DNA hasarına sebep olacağından ve çalışmamızı etkileyeceğinden dolayı, hastaların genel anestezi almamış olmasına dikkat edildi. Lokal anestezi olarak bütün hastalara Heavy Marcaine epidural olarak uygulandı.

Bütün hastalarda turnike uygulamasıyla iskemi-reperfüzyon oluşturuldu. Hastalardan ameliyat öncesi alınan kan kontrol grubu olarak kullanıldı. Hasarın belirlenmesi için turnike uygulaması ile meydana gelen iskemiden sonra ve turnike çözülmesinden sonra meydana gelen reperfüzyon sonrası hastalardan heparinli tüplere kan örnekleri alındı. Kanlar buzdolabında muhafaza edildi ve 2-3 saat içinde comet yöntemi için çalışmaya alındı.

Gazi Üniversitesi Tıp Fakóltesi Yerel Etik Kurulu'nun izni alındıktan sonra, çalışmaya katılan gönüllü hastalara çalışma hakkında genel bilgi verildi ve yazılı onayları alındı.

Çalışmada ölçülecek parametreleri etkileyebilecek durumları değerlendirmek amacı ile bir örneği aşağıda bulunan anket formu tüm bireylere uygulandı. Ameliyatla ilgili parametreler ise ameliyatı yapan doktor tarafından dolduruldu.

ANKET FORMU

Tarih...../...../.....

Protokol No:

- 1.Ad Soyad:
- 2.Yaş:
- 3.Adres-Telefon(mobil ve ev):
4. Cinsiyet:
5. Tanı:
6. Ağırlık:
7. Boy:
8. Meslek/çalışma süresi:
- 9.Yaşadığınız şehir ve süresi:
10. Düzenli alınan ilaçlar ve süreleri (Vitamin dahil):
11. Geçirdiği hastalık ve ameliyatlar:
- 12.Anestezi için verilen ilaçlar(Premedikasyon dahil):
13. Kullanılan profilaktik antibiyotik (varsa):
- 14.DVT profilaksisi için kullanılan ilaç (varsa):
15. Turnike Süresi:
- 16.Turnike basıncı:
17. Turnike şişirildiği andaki sistolik ve diastolik kan basıncı:
18. Postop dönemde uygulanan ilaçlar
- 19- Sigara içme alışkanlığı:
- 20-Sigara içilen ortamlarda sıkça bulunuyor musunuz?Evet ()Hayır ()
- 21-Alkol alıyormusunuz? Hayır () Evet ()
- 22-Beslenme alışkanlığınız nedir? (Et, sebze vs tüketimi)
- 23-Aile bireylerinde ve sizde genetik bir hastalık var mı?Hayır()Evet ()
- 24-Ailenizde, ortopedi rahatsızlıklarının sıklığı nedir?

3.2. Deneklerden kan örneklerin alınması

Artroskopi ameliyatı geçiren hastalardan toplam 3 t p kan  rneği alındı. Bunlardan birincisi hasta ameliyata alınmadan önce, ikincisi hastaya turnike uygulandıktan (iskemi oluşumu) sonra ve     nc  kan  rneği ise turnike çözüldükten hemen sonra (reperfüzyon oluşumu) alındı. Bu kan  rne leri alt ekstremitede turnike uygulanan bölgedeki venden 10 ml olacak şekilde steril heparinli enjektörlere alındı. Buzdolabında muhafaza edildi ve 2-3 saat içinde deneye alındı.

3.3. Comet yöntemi

3.3.1. Kullanılan kimyasal maddeler

- NaOH (Merck)
- KCl (Merck)
- NaCl (Merck)
- KOH (Merck)
- DMSO (Dimetil sülfoksit) (Merck)
- PBS (Fosfat tampon tabletleri) (Biological Industrial Company)
- LMA (Düşük kaynama dereceli agar) (Sigma)
- HMA (Yüksek kaynama dereceli agar) (Sigma)
- Trizma Base (Sigma)
- EDTA (Sigma)
- Triton X 100 (Sigma)
- Etidyum Bromide (Sigma)
- Histopaque 1077 (Sigma) (Lymphoprep)
- Albumin Bovin fraction V (Sigma)
- Hepes (Sigma)
- Fetal calf serum (Biological Ind.)
- Endo III enzimi ve formamidopirimidin (FPG) enzimi

3.3.2. Sarf malzemeler

- Dijital terazi
- Soğutmalı santrifüj
- Elektroforez tankı
- pH metre
- Manyetik karıştırıcı
- Hot plate
- Mikrodalga fırın
- Buzdolabı
- İnkübatör
- Derin dondurucu (-20°C ve -80°C'lik)
- Rodajlı lam (Superfrost)
- Lamel (Marienfeld, 24x60)
- Falkon (50 ml'lik)
- Plastik pastör pipeti
- Ependorf (1,5 ml ve 2 ml)
- Mavi pipet ucu
- Sarı pipet ucu
- Otomatik mikropipetler

- Steril enjektör (2.5 cc ve 10 cc)
- Steril latex eldiven
- Cam şale
- Parafilm
- Floresan mikroskop (Zeiss Axioscope 2)
- Comet Assay III görüntülü analiz sistemi (Perceptive Instruments, UK)

3.3.3. Kullanılan çözeltiler

3.3.3.1. Stok olarak hazırlanan çözeltiler

- Fosfat Tamponu (PBS; Phosphate Buffered Saline)
- 10 M NaOH Çözeltisi
- 0.2 M EDTA Çözeltisi
- 10 M KOH Çözeltisi
- 100 µg/ml Etidyum Bromür Çözeltisi
- Lysis Çözeltisi
- Endonükleaz III ve FPG için Enzim Buffer Çözeltisi (X10)
- Nöralizasyon tamponu

Fosfat tamponunun (PBS) hazırlanması:

1 tane PBS tableti 100 ml distile su ile karıştırıcıda çözülür. +4°C'de ağzı kapalı olarak birkaç gün saklanabilir.

10 M NaOH çözeltisinin hazırlanması:

- NaOH400 g

- Distile suym 1000 ml

Çözelti musluk suyu altında hazırlanır ve +4°C'de buzdolabında saklanır.

0.2 M EDTA çözeltisinin hazırlanması:

- EDTA74.4 g

- Distile suym 1000 ml

Çözelti hazırlandıktan sonra +4°C'de buzdolabında saklanır.

10 M KOH çözeltisinin hazırlanması:

- KOH561.1 g

- Distile suym 1000 ml

Çözelti musluk suyu altında hazırlanır ve oda sıcaklığında saklanır.

100 µg/ml Etidyum Bromür çözeltisinin hazırlanması:

- Etidyum Bromür5 mg
- Distile suym 50 ml

Karsinojen olan bu çözelti 25 ml'lik 2 kısma bölünüp falkonlara konulur. Işıktan etkilendiği için falkonlar alüminyum folyo ile kaplanır. Ve +4°C'de buzdolabında saklanır.

Stok Lysis Çözeltisinin hazırlanması:

- 2.5 M NaCl146.1 g
- 100 mM EDTA37.2 g
- 10 mM Tris1.2 g
- Distile suym 900 ml

Yukarıda listelenen kimyasal maddeler tartıldıktan sonra bir miktar distile su ile çözülür. Daha sonra 900 ml'ye distile su ile tamamlanır. Çözeltinin pH'sının 10 M olması için, gereken miktarda 10 M NaOH eklenir. Hazırlanan çözelti oda sıcaklığında 2-3 ay saklanabilir.

Endonükleaz III ve FPG için Enzim Tampon Çözeltisinin hazırlanması:

- 40 mM HEPES95.32 g
- 0.1 M KCL74.55 g
- 0.5 mM EDTA1.86 g
- BSA (0.2 mg/ml)0.2 g
- Distile suym 1000 ml

Yukarıda listelenen kimyasal maddeler bir miktar distile su ile çözüldükten sonra 1000 ml'ye distile su ile tamamlanır. Çözeltinin pH'sı 10 M KOH ilave edilerek 8'e ayarlanır. 50 ml ya da 100 ml'lik şişelere bölünerek - 20°C'de 2-3 ay saklanabilir.

Nötralizasyon tamponunun hazırlanması:

- 0.4 M TRİS48.5 g
- Distile su.....ym 1000 ml

Çözeltinin pH'ı konsantre HCl ile 7.5'e ayarlanır ve +4°C'de buzdolabında saklanır.

3.3.3.2 Taze olarak hazırlanan çözeltiler

- Yüksek kaynama dereceli agar (%65'lik HMA)
- Düşük kaynama dereceli agar (%65'lik LMA)

- Taze lysis çözeltisi
- Enzim çözeltisi (+4°C)
- Elektroforez tamponu
- Etidyum Bromür çözeltisi

HMA'nın (HMA; High Melting Agarose) hazırlanması:

100 ml distile su içine 0.65 g HMA tartılıp eklenir. Arada bir çalkalanarak mikrodalga fırında eritilir. Berraklaştıktan sonra önceden ısıtılmış sıcak tabla üzerinde alınır.

%65'lik LMA'nın (LMA; Low Melting Agarose) hazırlanması:

Uzun zaman saklanamadığı için 5-10 ml hazırlanması yeterlidir. 0.065 g LMA 10 ml PBS içine konulur ve mikrodalga fırında çalkalanarak berrak hale gelinceye kadar çözülmesi sağlanır. Kullanana kadar önceden ısıtılmış sıcak tabla üzerinde bekletilir.

Lysis çözeltisinin hazırlanması:

- Stok lysis tampon çözeltisi89 ml
- DMSO10 ml
- Triton-X1 ml

Lysis çözeltisi lamları lysis etmeden hemen önce hazırlanır. Berraklaşınca kadar karıştırıcıda karıştırılır. Kullanılınca kadar +4°C'de saklanır. Kullanıldıktan sonra kalan kısım ise saklanmaz.

Enzim tampon çözeltisinin hazırlanması:

Önceden derin dondurucudan çıkartılarak çözölmüş olan stok enzim tampon çözeltisi 1/10 oranında seyreltilir. Şale başına 70 ml seyreltilmiş çözelti kullanıldığı için, 40 ml stok enzim tampon çözeltisi alınıp soğuk distile su ile 400 ml'ye tamamlanır. 10 M KOH kullanılarak pH 8'e ayarlanır. Seyreltilmiş enzim tampon çözeltisi taze hazırlanıp, hemen kullanılmalıdır.

Elektroforez tamponunun hazırlanması (%3 NaOH + % 0.5 EDTA):

- 10 M NaOH37.5 ml
- 0.2 M EDTA6.75 ml
- Distile suym 1250 ml

Çözelti hazırlanırken kullanılan distile su soğuk olmalıdır. Büyük tank için 1192 ml taze çözelti yeterlidir. pH'ı 13'e ayarlanmalıdır.

Etidyum Bromür çözeltisinin hazırlanması:

Lamlar boyanacağı zaman stok çözelti 1/5 oranında distile su ile seyreltilir ve taze olarak kullanılır.

3.3.4. Comet yönteminin uygulanması

Çalışmaya başlamadan birkaç gün önce %65'lik HMA çözeltisi distile su ile hazırlandı ve lamlar hazırlanan agara batırılarak arka yüzleri silinip oda sıcaklığında kurutuldu. Çalışmamızda her tüp kan örneği için 6 lam kullanıldı. Bunlardan biri tamponlu (B;buffer), diğeri Endo III'lü (E) ve üçüncüsü ise FPG'li (F) lam örnekleri için kullanıldı. Her lamdan 2 adet çalışıldı. Her hastadan toplam 3 tüp kan alındığı için her bir hastada kullanılan toplam lam sayısı 18'di.

İlk olarak ependorf tüplerinin herbirine 1'er ml PBS (+4°C) konuldu. Bunların üzerine 100'er µl kan ilave edildi ve kapakları kapatıldı. Yavaşça ters düz edildi. Sonra buz içinde 10 dakika bekletildi. Herbirinin dibine 100'er µl Histopaque ilave edildi. Ancak bu yapılırken kanın karışması engellendi ve Histopaquenin dipte kalması sağlandı. Ependorf tüpleri 1060 rpm ve +4°C'de 3 dakika soğukta santrifüj edildi.

Altta kalan pembe kısmın üstündeki tabakada yer alan lenfositlerden 100'er µl alındı ve tek bir ependorfta toplandı. Daha sonra tekrar ayrı ependorflara 100'er µl olarak paylaştırıldı. Bundaki amaç lenfositlerin karışmasını sağlayarak verimliliği arttırmaktı. Daha sonra

herbir ependorfa 100'er µl LMA (sıcak tabla üzerinde bulunan ve 37°C sıcaklığı sağlanmış olan) eklendi ve iyice pipetaj yapıldı. Daha önceden HMA'lanmış ve kurutulmuş olan lamaların tam ortasına 200 µl olan karışım eklendi ve lamel 45° açıyla kapatılarak karışımın yayılması sağlandı. Lamalar kapalı bir kutuya koyularak agar donana kadar buzdolabında bekletildi.

Agarı katılaştıran lamalardan lamelleri yavaşça çekildi. Lamalar ışık görmemesi için dış yüzeyi alüminyum folyoyle kaplanmış şalelerin içine yerleştirildi. Üzerlerine soğukta hazırlanmış lysis buffer çözeltisi eklendi. Lamalar lysis çözeltisinde bir gece bekletildi. Bu aşamada stoplazmayı patlattığımız için artık karanlık ortamda çalışacağız.

Ertesi gün ilk olarak önceden -20°C'deki derin dondurucudan çıkartılarak eritilmiş enzim buffer çözeltisi 1/10 oranında seyreltildi. 50 ml olarak daha önceden hazırlanan stok çözeltisi soğuk distile suyla 500 ml'ye tamamlandı. Ve pH'sı 8'e ayarlandı. Buzdolabından çıkartılan şalelere buz aküsü üzerinde hazırlanan enzim buffer çözeltisi ilave edildi. 5 dakika bekledikten sonra çözelti dökülüp yeni çözelti ilave edildi. Bu işlem üç defa tekrarlandı. Üç kere çözeltiden geçirilen lamaların arka tarafı kağıt havluyla silinerek şalelerden çıkartıldı.

Daha önceden ependorflara bölünerek hazırlanan ve -80°C'ye koyulan Endo III ve FPG enzimleri derin dondurucudan çıkartıldı. Bunların herbirinde 10 µl enzim vardı. Ve herbirine 300 µl'ye seyreltmek

için 290 µl seyreltilmiş enzim buffer çözeltisi ilave edildi. İyice karıştırıldı. Lamlardan üzerinde B yazanlara seyreltilmiş enzim buffer çözeltisinden 50 µl, üzerinde E yazanlara 300 µl'ye seyrelttiğimiz Endo III enziminden 50 µl ve son olarak üzerinde F yazanlara 300 µl'ye seyrelttiğimiz FPG enziminden 50 µl ilave edilip üzerleri lamelle kapatıldı. Toplamda 18 adet olan lamlar B, E, F olarak gruplara ayrıldı. Bunlar süngerli ıslatılarak nemli ortam sağlanmış olan kutulara koyulup kapakları kapatıldı. Ve 37°C'de inkübatöre konuldu. B ve E grupları için 45 dakika, F grubu içinde 30 dakika inkübatörde bekletildi.

İnkübatörde bekleme esnasında elektroforez tamponu hazırlandı. Lamlar etüvden çıktıktan sonra lamelleri yavaşça çekildi ve bir süre buzdolabında bekletildi. Burada amaç reaksiyonun durmasını sağlamaktır. Daha sonra 1192 ml soğuk elektroforez tamponu ile hazırlanan elektroforez tankının altına buz kalıbı yerleştirilerek soğuk ortam sağlandı. Elektroforez tankı 25 V, 300 mA olacak şekilde 20 dakikaya ayarlandı. Voltaj 25 voltta sabitken amper 300 mA'den yüksek olunca çözelti miktarı azaltıldı, düşükse çözelti eklendi. Elektroforez tankı ışık geçirmemesi için alüminyum folyo ile kaplandı. Lamlar tank içine yerleştirildi. Çalıştırılmadan 20 dakika bekletildi. Daha sonra 20 dakika elektroforez uygulandı.

Elektroforezden çıkartılan lamlar alüminyum folyo ile kaplanarak ışıktan korunan şalelere alındı. pH'ı 7.5 olan nötralizasyon tamponu içinde 3'er kez 5'er dakika buz aküsü üzerinde bekletilerek nötrale edildi. Nötralizasyon işlemi bittikten sonra 1/5 oranında

seyreltilmiş etidyum bromürden herbir lama 65'er µl ilave edildilerek lamlar boyandı. Ve üzerlerine lamel kapatılarak kapalı kutuda buzdolabında 10 dakika bekletildi.

Hazırlanan lamlar florasan ataçmanlı mikroskopla 40X büyütmede incelendi. Her birey için 50 lenfosit sayılıp kaydedildi. Comet testinde lenfositlerdeki hasar bilgisayarda 'Comet Görüntülü Analiz Programı' ile ölçüldü. Kuyruk yoğunluğu (Tail Intensty = TI) lenfosit DNA hasarının göstergesi olarak incelendi.

3.4. İstatistiksel Yöntemler

Çalışmada kullanılan istatistiksel yöntemler:

-Tek Yönlü Varyans Analizi (ANOVA)

Üç ya da daha fazla eşleştirilmemiş grubun karşılaştırılması Anova analizi ile yapılabilmektedir. Her gruba ait veriler alt alta girilir ve karşılarına hangi gruba dahil olduğunu gösteren bir değişken açılarak grup isimleri yazılır. Ve normallik grafiği incelenir. Tek Yönlü varyans analizi testi yapıp ortalamalar hakkında bilgi verilir. Ortalamaların grafiği çizilir ve varyansların eşit olup olmadığı incelenir¹⁵⁰. Çalışmamızda sigaranın oksidatif hasar üzerine olan etkisini Anova analizi ile belirledik.

-Spearman Korelasyon Testi

Ana değişkenler arasında bir ilişkiden, yani neden ile ona bağlı çıkan sonuç arasında ilişki varlığından söz edilebilmesi için herşeyden önce ki-kare değerinin hesaplanması ve anlamlılık göstermesi ($p < 0.05$) gerekmektedir. Daha sonra bu ilişkinin derecesi korelasyon katsayısı olarak belirlenir. Ana değişkenlerin adsal, sıralı, aralıklı olmasına göre farklı yöntemlerle korelasyon katsayısı hesaplanır¹⁵¹. Çalışmamızda bireylerin yaşı ve DNA hasarı arasındaki ilişkiyi spearman korelasyon testi ile belirledik.

-Unpaired Test

Gruplar arası karşılaştırmalar bu yöntem kullanılarak yapılabilmektedir. Anlamlılık seviyesi için $p < 0.05$ olarak kabul edilir¹⁵². Çalışmamızda cinsiyet ile DNA hasarı arasındaki ilişkiyi belirlemek için bu testi kullandık.

4. BULGULAR

4.1. Demografik Bulgular

Çalışmamıza Gazi Üniversitesi Tıp Fakültesi Ortopedi Anabilim Dalı'nda turnike kullanılarak alt ekstremitte ameliyatı olan hastalar dahil edildi. Kontrol grubu olarak hastaların ameliyata girmeden önceki kanları değerlendirildi. Hastaların ve ameliyatı gerçekleştiren doktorun doldurdıkları anket formlarına dayanarak Tablo 4.1 ve Tablo 4.2 oluşturuldu. Tablo 4.1'de hastaların yaş ortalamaları, cinsiyetleri, BMI değerleri, sigara içip içmedikleri, eğer içiyorlarsa ne kadar zamandır ve günde kaç adet içtikleri son olarak yapılan ameliyatta uygulanan turnike basıncı ve turnike süresinin ortalamaları belirlendi. Tablo 4.2'de ise hastaların tüm bulgularının dökümü belgelendi.

Tablo 4.1 Çalışma grubunun demografik özellikleri

Yaş (Ort±SD)	41.48±13.83
Cinsiyet	
Kadın (n)	14
Erkek (n)	19
BMI (kg/cm2)	27.46±5.59
Sigara Alışkanlığı	
Sigara içmeyen bireyler*	21
Sigara içen bireyler	12
Sigara miktarı (adet/gün)	17±8,83
Sigara içme süresi (yıl)	15.08±10.34
Turnike uygulama süresi (dak)	71.36±28.07
Turnikenin Basıncı(mm/Hg)	366.67±23.94

*Sigara içmeyenlere son 3 ayda sigara içmeyen bireyler dahildi

Tablo 4.2 Çalışma grubunun dökümü

No	Ad Soyad	Yaş	Cinsiyet (K/E)	BMI (kg/cm2)	Sigara alışkanlığı (-/+)	İçilen sigara miktarı (adet/gün)	Sigara içme süresi (yıl)	Ne kadar süre önce bıraktığı
1	ZA	47	K	32.03	+	2-3	5	
2	YA	45	E	35.49	-	20	1	27 yıl
3	CTÖ	21	E	23.62	-	-	-	
4	SK	50	K	31.21	-	-	-	
5	SD	28	E	21.61	+	2	4	
6	PB	70	K	34.89	-	-	-	
7	SÜ	53	E	35.91	+	20	20	
8	ÖB	23	E	24.16	+	12	6	
9	Dİ	25	K	22.58	-	-	-	
10	HG	36	E	24.96	+	15	8	
11	UÇ	42	E	26.29	-	20	15	19 ay
12	NA	45	K	26.56	-	-	-	
13	TA	50	E	20.2	+	12	30	
14	SK	50	K	33.2	-	-	-	
15	MÇ	35	E	24.48	-	-	-	
16	HT	54	E	21.45	+	20	30	
17	VB	59	K	32.46	-	-	-	
18	NK	55	K	26.17	-	-	-	
19	HY	52	E	22.79	+	20	20	
20	GŞ	26	E	30.61	-	20	10	8 ay
21	SY	53	K	35.15	-	-	-	
22	VY	24	E	23.45	-	-	-	
23	MK	27	E	20.3	+	20	8	
24	ZK	43	K	26.81	-	-	-	
25	SG	29	K	25.84	+	30	10	
26	ES	29	E	26.7	-	-	-	
27	AG	22	E	23.45	-	-	-	
28	AOÇ	52	E	21.6	+	30	30	
29	BA	19	K	21.63	-	-	-	
30	FA	59	K	31.25	-	-	-	
31	TY	50	K	33.98	-	-	-	
32	HÇ	38	E	23.45	+	20	10	
33	CE	58	E	41.8	-	12	20	10 yıl

*E; erkek, K; kadın, (+); sigara içiyor, (-) sigara içmiyor

4.2. Comet yönteminin sonuçları

4.2.1 Kuyruktaki % DNA hasarı sonuçları

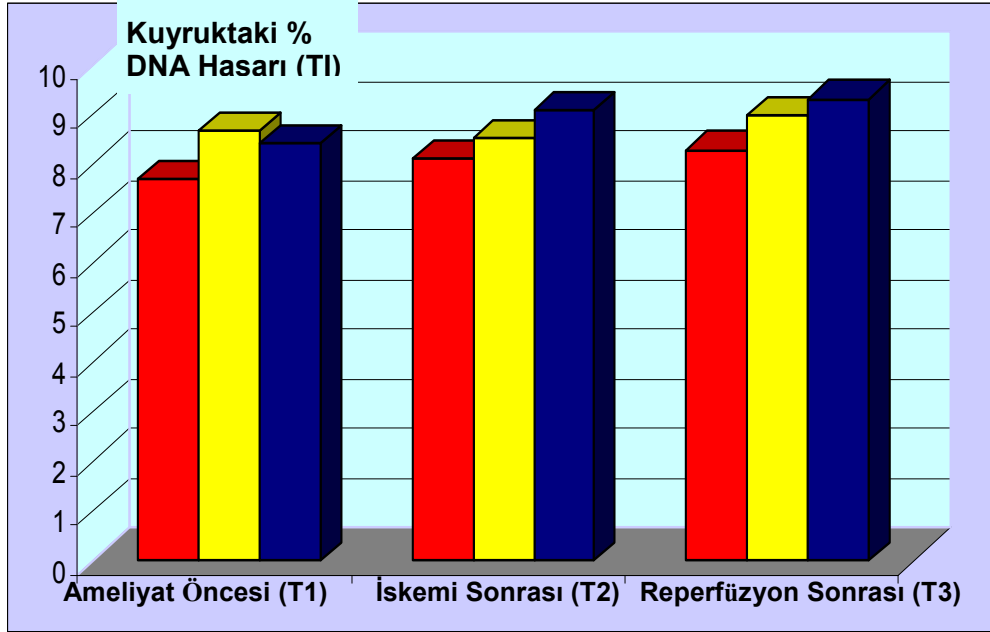
Ameliyat öncesi (T1), iskemi sonrası (T2) ve reperfüzyon sonrası (T3) üç farklı zaman diliminde alınan kan örneklerinde DNA hasarının tayini için uygulanan Comet Testinin sonuçları aşağıdaki Tablo 4.3'te sunulmuştur. Bu kan örneklerinin herbirinde bazal DNA hasarına (B), pirimidin baz hasarına (E) ve pürin baz hasarına (F) kendi içlerinde bakılmış ancak istatistiksel olarak anlamlı bulunmamıştır ($p>0.05$).

Tablo 4.3 Bireylerin 3 farklı zaman dilimindeki % Kuyruk DNA hasarı

Comet Yönteminin Uygulandığı Zaman Dilimleri	Kuyruktaki % DNA (Ortalama $\pm$ SD)			
	Bazal DNA Hasarı (B)	Pirimidin Baz Hasarı (E)	Pürin Baz Hasarı (F)	p
Operasyon öncesi (T1)	7.71 $\pm$ 2.042	8.66 $\pm$ 2.575	8.41 $\pm$ 2.948	p>0.05
İskemi sonrası (T2)	8.11 $\pm$ 2.131	8.5 $\pm$ 1.99	9.06 $\pm$ 2.61	
Reperfüzyon sonrası (T3)	8.27 $\pm$ 1.57	8.98 $\pm$ 2.19	9.29 $\pm$ 3.54	

*Kuyruktaki % DNA; TI kuyruk yoğunluğu (Tail İntensity) $\pm$ SD, B; sadece Buffer ilave edilerek bulunan sonuçlar, E; Endo III ilave edilerek bulunan sonuçlar, F; FPG ilave edilerek bulunan sonuçlar.

*ANOVA testi uygulanmıştır.



- Bazal DNA Hasarı (B)
- Pirimidin Baz Hasarı (E)
- Pürin Baz Hasarı (F)

Grafik 4.1 Bireylerin 3 farklı zaman dilimindeki % Kuyruk DNA hasarı

T1, T2 ve T3 zamanlarında bazal DNA hasarı (B), pirimidin baz hasarı (E) ve pürin baz hasarı (F)'nin histogramı Grafik 4.1'de gösterilmiştir. T2 ve T3 zamanlarında çok anlamlı olmasada E'de oluşan DNA hasarındaki artış F'de daha da fazlalaşmıştır.

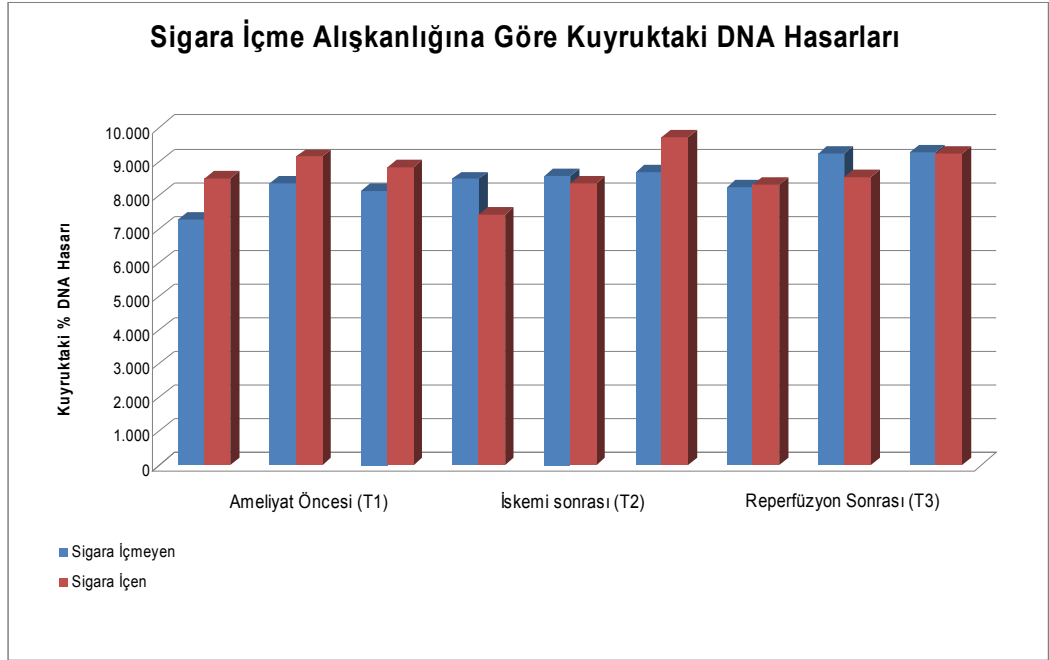
4.2.2 Sigara alışkanlığının oksidatif hasar üzerine etkisinin sonuçları

Tablo 4.4 Sigara alışkanlığının oksidatif hasar üzerine etkisi

Comet Yönteminin Uygulandığı Zaman Dilimleri	Kuyruktaki % DNA (Ortalama $\pm$ SD)			
	Bazal DNA Hasarı (B)	Pirimidin Baz Hasarı (E)	Pürin Baz Hasarı (F)	p
Operasyon öncesi (T1) Sigara içmeyenler Sigara içenler	7.286 $\pm$ 1.887 8.508 $\pm$ 2.175	8.380 $\pm$ 1.654 9.158 $\pm$ 3.727	8.157 $\pm$ 2.205 8.860 $\pm$ 4.013	p>0.05
İskemi sonrası (T2) Sigara içmeyenler Sigara içenler	8.496 $\pm$ 1.578 7.433 $\pm$ 2.809	8.580 $\pm$ 1.785 8.364 $\pm$ 2.386	8.684 $\pm$ 1.421 9.732 $\pm$ 3.921	
Reperfüzyon sonrası (T3) Sigara içmeyenler Sigara içenler	8.241 $\pm$ 1.654 8.323 $\pm$ 1.478	9.22 $\pm$ 1.623 8.558 $\pm$ 2.987	9.302 $\pm$ 2.251 9.268 $\pm$ 5.220	

*ANOVA testi uygulanmıştır.

T1, T2 ve T3 zamanlarında alınan örnekler sigara içenler ve içmeyenler arasında ve Buffer, Endo III ve FPG uygulanmış halleriyle karşılaştırıldığında istatistiksel olarak anlamlı bulunmamıştır (p>0.05)



Grafik 4.2 Sigara içme alışkanlığına göre kuyruktaki DNA hasarları

T1, T2 ve T3 zamanlarında alınan örnekler sigara içenler ve içmeyenler arasında ve Buffer, Endo III ve FPG uygulanmış halleriyle karşılaştırıldığında oluşturulan histogram Grafik 4.2’de gösterilmiştir.

Bireylerin yaşı ile DNA hasarında arasında bir korelasyon bulunmadı ($r^2 = 0.05411$, $r = -2326$, $P=0.2001$, Spearman Korelasyon Testi). Cinsiyet ile DNA hasarı arasında da korelasyon bulunmadığından cinsiyetin bazal DNA hasarına etkisinin olmadığı sonucuna vardık. (Unpaired Test, $p > 0.05$)

5. TARTIŞMA

Serbest radikallerin biyolojik materyallerdeki varlığı yaklaşık 50 yıldır bilinmektedir¹⁵³. 1956 yılında serbest radikallerin büyük çaplı hücrel hasar, mutajenezis, kanser ve biyolojik yaşlanmanın dejeneratif sürecinden sorumlu olabileceği ileri sürülmüştür¹⁵⁴. Çok sayıda araştırmacı günümüzde serbest radikallerin DNA, proteinler, lipitler ve hücrenin diğer bileşenleri üzerinde sebep olduğu oksidatif hasarı araştırmaktadır. Yaşlanmış beyinde sıklıkla görülen oksidatif hasar Alzheimer hastalığına, akciğerde oluşan oksidatif hasar kronik akciğer hastalığına¹⁵⁵, böbrekte oluşan oksidatif hasar ise böbrek hastalığının ilerlemesine sebep olmaktadır¹⁵⁶.

Organizmada ROT ortaya çıktıktan sonra radikal reaksiyon dizileri başlar. Eğer bir serbest radikal, radikal olmayan bir molekülle reaksiyona girerse, binlerce reaksiyondan oluşan reaksiyon zincirlerini başlatır. ROT paylaşılmamış elektronlarından dolayı lipid, protein, karbonhidrat, nükleik asit gibi çeşitli makromoleküllerin oksidatif hasarına neden olurlar⁶⁹.

O_2^- , $OH^\cdot$ ve NO ve H_2O_2 gibi ROT'lar aerobik metabolizma sırasında fizyolojik şartlar altında oluşur. Oksijen radikallerinin üretimi artmışsa veya hücrel antioksidan savunma sisteminde problem varsa proteinler, lipidler ve nükleik asitler ile tepkiye girerek hücrede fonksiyon bozukluğuna sebep olurlar^{53,73}.

ROT'ne karşı oluşan belirgin cevaplar makrofajlar vasıtasıyla oluşmaktadır. Makrofajlar asıl koruyucu rolü harekete geçirirken serbest radikaller kaçınılmaz şekilde yan etkileriyle zarar verirler. Kansere vakalarında ise oksidatif hasarla ilişkinin olduğuna dair kanıtlar mevcuttur. Nedeni, 8-oksiguanin (8-oxo Gua) gibi potansiyel mutajenik bir baz olabilir¹⁵⁷. Kanserin birçok türünde kritik genlerde somatik mutasyon yapan bir neden olduğu kanıtlanmıştır. Kanserin bir önceki enflamasyon, enfeksiyon veya hasarın yerinde meydana geldiğine dair epidemiyolojik kanıtlar vardır. Bu nedenle oksidatif stres kronik dejenere durumlarda sebep olarak görülebilir¹⁵⁸.

Oksidatif hasarın ardından organlarımızın kötüye gitmesi kaçınılmaz ve çarpıcı bir hipotezdir. Hasar sonucu olası kanser riski ve DNA'da oluşan hasar şaşırtıcı bir durum değildir. Eğer bu oksidatif DNA hasarı DNA onarım mekanizmalarıyla onarılmaz ise mutasyonlar, hücre transformasyonları ve kanser başlar. ROT'nin oluşturduğu DNA baz hasarını oluşturan major onarım yolunun, baz çıkarma onarım yolu olduğu düşünülmektedir¹⁵⁹. Collins ve arkadaşları, Kadioğlu ve arkadaşlarının yaptığı çeşitli çalışmalarda Alzheimerlı ve diyabetik hastalarda DNA baz hasarının yükseldiği gözlemlenmiştir^{4,94,160}. Ayrıca yapılan birkaç çalışmada DNA'daki 8-oxo Gua seviyesi kanserli hastalar ve sağlıklı bireyler arasında karşılaştırılmıştır. Çünkü baz oksidasyonunun normal seviyesini bilmek çok önemlidir^{161,162}. Ortaya çıkan kanıtlar tümör hücrelerinin yayılmasında ve malign özellik kazanmasında ROT'nin önemli rolü olduğunu göstermektedir. Serbest radikaller kanser gelişiminde 3 basamakta (başlatma, gelişme, ilerleme) stimülasyon yaparlar. Bu nedenle

endojen ve ekzojen ROT'nin nedenlerinin azaltılması karsinojenizisten korunmada önemli bir yoldur¹⁶³.

Turnike uygulaması sonucu çeşitli biyokimyasal değişiklikler ve hasar meydana gelmektedir. Turnike uygulanmasına bağlı olan nöromüsküler hasar basınç ve doku deformasyonu ile ilgili olduğu kadar iskemi ve iskemi sonrası reperfüzyon hasarıyla da yakından ilişkilidir¹⁶⁴. Uygulanan turnike, manşonun altındaki ve distalindeki dokuların kan akımını engeller. Az miktarda kan akımı olsa da bu kaslardaki aerobik metabolizmanın devamını sağlayamaz. 30 dakikadan 4 saate kadar uzayan iskelet kas iskemisini takiben reperfüzyon sonucu yaygın doku ödemi gelişir¹⁶⁶. Oluşan bu ödem reperfüzyonla geri sağlansa da hücre beslenmesini daha da bozar¹⁶⁵. İskelet kasında meydana gelen I-R hasarında esas olarak ksantin oksidaz ve NADPH enzimlerinin etkileri sonucu açığa çıkan, sitotoksik potansiyele sahip ROT'lar sorumlu tutulmaktadır¹⁶⁶. İskemi oluşunca mitokondriyal oksijen düzeyleri ve aerobik metabolizma azalır. Hücre fonksiyonlarını devam ettirebilmek için ATP gibi bileşikler yıkar ve bunun sonucunda hipoksantin birikimine neden olur. Reperfüzyon olmadığı sürece biriken hipoksantin ksantine dönüştürülemez. Ayrıca iskemi süresince mikrovasküler endotelyumda bulunan ksantin dehidrojenaz enzimi ksantin oksidaz enzimine dönüştürülür¹⁶⁷. Reperfüzyonla reoksijenasyonun sağlanmasıyla iskemi sırasında oluşan ksantin oksidaz enzimi biriken hipoksantini ksantine dönüştürürken çok sayıda ROT'nin ortaya çıkmasına neden olur^{37,168}. HO⁻, ROO⁻, H₂O₂ ve 2O₂⁻ gibi ROT'lar I-R patojenitesinde rol oynuyor gibi görünmektedir⁷⁴.

Serbest radikaller sitotoksik etkilerini membranda veya plazma lipoproteinlerinde mitokondriyal enzimlerin direk inhibisyonu, membran sodyum kanallarının inaktivasyonu ve diğer proteinlerin değişimi gibi bazı metabolik disfonksiyonlarla sağlarlar^{75,76}. DNA ise, ROT hücumu için potansiyel bir hedeftir. İnsanlarda DNA hasarının en önemli nedeninin oksidasyon olduğu gösterilmiştir¹⁶⁹. ROT'lar modifiye bazların oluşumu, kromozomal hasar, memeli hücrelerinde mutasyon gibi DNA'da birçok hasara sebep olurlar^{170,171}. İskemik hasarda bazı deneysel modeller DNA hasarında oksijen radikalleriyle ilgili reperfüzyonun etkisini göstermiştir ve bu çalışmalarda hayvanlarda I-R'nin DNA hasarına neden olduğu kanıtlanmıştır¹⁷²⁻¹⁷⁴.

Ortopedi operasyonlarında I-R uygulanması oksidatif hasara sebep olabilmektedir. Çalışmamızda bunun araştırmasını Comet yöntemini kullanarak yaptık. Comet yöntemi DNA bağ kırıklarını, apuridik/apirimidinik bölgeleri (AP bölgeleri) ölçer. Spesifiklik için bu yöntemin kendine özgü bakteriyel onarım endonükleazları vardır. Bu enzimlerden biri endonükleaz III (Endo III)'tür. Bu enzim glikozilaz gibi davranır ve DNA'da okside pirimidinlerin değişikliğini belirler. Onları kesip ayrı bir AP bölgesi bırakır ve AP-endonükleaz aktivitesiyle ilişkili DNA'da bir kırık yaratır. Böylece DNA'da oluşan hasar tespit edilir¹⁷⁵. İkinci bir enzim ise FPG'dır. Bu enzim ise pirimidinlerde oluşan hasarı tespit etmekte kullanılır.

Oksidatif DNA Hasarında Avrupa Standartları Komitesi (ESCODD; European Standards Committee on Oxidative DNA Damage), Comet yönteminde oksidatif DNA hasarını belirlerken hassasiyeti arttırmak

için Endo III ve FPG enzimlerinin kullanıldığını açıklamıştır. Yapılan çalışmalarda bu enzimlerin aktivitelerine bakılmış ve her iki enziminde oksidatif DNA hasarını ve alkilasyon hasarını tanıdığına ve comet çalışmalarında DNA kırıklarını belirleyeceği kararına varılmıştır¹⁷⁶.

Sunulan çalışmada, turnike uygulanan hastalarda DNA hasarı operasyon öncesi, iskemi sonrası ve reperfüzyon sonrası alınan kan örneklerinde tayin edilmiştir. Bireylerin 3 farklı zaman dilimindeki % tail intensity değerleri arasında istatistiksel olarak anlamlılık bulamadık. Ancak iskemi sonrası ve reperfüzyon sonrası zamanlarında çok anlamlı olmasa da Endo III'te oluşan DNA hasarındaki artış FPG'de daha da fazlalaşmıştır.

Ayrıca çalışmamızda sigara içen ve içmeyen hastaları da alt gruplara ayırarak sigaranın DNA hasarına olan etkisini inceledik. Sigara alışkanlığının oksidatif hasar üzerine olan etkisinde operasyon öncesindeki örneklerde bir artış tespit etmemize rağmen, iskemi sonrası ve reperfüzyon sonrası değerlerle karşılaştırdığımızda istatistiksel olarak anlamlı bir sonuç bulamadık.

Speit ve arkadaşları 2003 yılında 20 sigara kullanan ve 20 sigara kullanmayan sağlıklı erkeğin kan örnekleriyle, Comet yöntemini kullanarak sigaranın etkisini araştırmışlardır. DNA hasar tespiti için Benzo[a]pyrene diolepoxide (BPDE)'i taze alınmış kan örnekleriyle muamele etmişlerdir. Bütün deneylerde doğru sonucu alabilmek için

referans standart olarak V79 hücrelerini kullanmışlardır. Çalışma 4 ay sürmüştür. Çalışma sonucunda sigara içen ve içmeyen grup arasında belirgin bir farklılık tespit edememişlerdir. Bu verilerine göre, daha doğru kararlar verebilmeleri için daha fazla veriye ihtiyaçları olduğu sonucuna varmışlardır¹⁷⁷.

Hoffmann ve arkadaşları Comet ve SCGE yöntemleri kullanılarak sigaranın genotoksik etkilerini belirlemek için meta-analiz çalışması yapmışlardır. Bu meta-analiz çalışmasında 37 yayından 38 çalışmayı incelemişlerdir. Değerlendirme sonucunda, sigara içenlerde sigara içmeyenlere oranla DNA hasarının yüksek olduğunu göstermişlerdir (SMD; standardized mean difference, standart ortalama farklılık = 0.55, % 95)¹⁷⁸.

Dinçer ve arkadaşları¹⁷⁹ yaptıkları bir çalışmada erkeklerde sigara kullanımının güçlü bir endojen antioksidan olan indirgenmiş glutatyon (GSH) düzeyi ve DNA hasarı üzerine etkisinin incelenmesini amaçlamıştır. Günde 20 adet sigara içen 27 ve sigara alışkanlığı olmayan 23 sağlıklı erkeği olgu çalışma kapsamına almışlardır. Olgulardan heparinli venöz kan örnekleri alınarak, tam kanda GSH düzeyi ve lökosit DNA'sında DNA hasarının göstergesi olarak DNA zincir kırıkları sıklığını gözlemişlerdir. GSH düzeyi spektrofotometrik yöntemle, DNA zincir kırıkları sıklığı Comet yöntemi ile ölçmüştür. Sigara kullanan erkeklerde sigara kullanmayan erkeklere göre GSH düzeyinin anlamlı olarak düşük ($p<0.001$), DNA zincir kırıkları sıklığının ise anlamlı olarak yüksek ($p<0.001$) olduğu belirlemiştir. DNA zincir kırıkları sıklığı ile GSH arasında

negatif bir korelasyon bulmuşlardır ($r: - 0.62$, $p<0.01$) ve sonuçta sigara kullanan erkek olgularda GSH düzeyinin azalması nedeniyle DNA hasarının arttığını göstermişlerdir. Sunulan çalışmada sigaranın oksidatif hasar üzerine olan etkisini araştırdık. Ancak bulduğumuz sonuçlarda istatistiksel olarak bir anlamlılık tespit edemedik.

İyonizan radyasyona maruziyetin genotoksik hasarı arttırdığı bilinmektedir¹⁸⁰. Bu nedenle çalışmamıza artroskopi operasyonu uygulanacak hastaları dahil ettik. Bu hastalara günümüzde yaygın olarak kullanılan manyetik rezonans görüntüleme (MRG) uygulanmaktadır. MRG'de kontrast madde ve iyonizan radyasyon kullanıldığı için çocuk ve gebelerde dahi güvenli uygulanabilen alternatif bir yöntemdir¹⁸¹.

I-R hasarında oksidatif hasarın bakıldığı çalışmalar azdır. Genellikle antioksidan kapasite, biyokimyasal parametreler gibi değerler ölçülmüştür. Bu çalışmalarda Pürivat, laktat, hipoksantin değerleri ölçülmüş ve bunlar üzerine değerlendirmeler yapılmıştır¹⁸². Ostman ve arkadaşları I-R uygulanan artroskopi operasyonuna maruz kalmış 8 hastadan ameliyat öncesi femor kasına yerleştirdikleri bir diyaliz sondasıyla örnek toplayarak çeşitli biyokimyasal parametreleri ölçmüşlerdir. Turnike uygulanmasından sonra 2 saat boyunca 10 dakikalık aralıklarla örnek toplamışlardır. Yaptıkları çalışmanın neticesinde I-R gerektiren ortopedi operasyonları süresince metabolik olayları kontrol etmek için uygun ve güvenilir yöntemler tespit etmişlerdir¹¹².

Westman ve arkadaşları yaptıkları bir çalışmada ise alt ekstremité operasyonu uygulanan 15 hastadan operasyon öncesi, operasyon esnasında iskeminin maksimum olduğu zamanda ve reperfúzyondan 24 saat sonra kas biyopsileri alınmışlardır. Örneklerden glutatyon, aminoasit gibi parametreleri analiz etmişlerdir. Çalışmanın sonucunda ortopedi operasyonlarında I-R boyunca kas dokusunda oluşan biyokimyasal parametrelerde oluşan değışiklikler operasyon travması olarak adlandırılmıştır. Ayrıca bu çalışmada turnikenin çözülmesinden sonra ROT üretiminde bir artış olmuş ancak reperfúzyonun 24. saatinde bu değęerler kendini tolere edebilmiştir¹¹⁰.

Yapılan çalışmaların çoğunluğunda genel anestezinin etkilerini ortadan kaldırmak için epidural ya da lokal anestezi uygulanmıştır. Çünkü anesteziklerin potansiyel mutajenik veya karsinojenik etkileri vardır. Bununla ilgili yapılan çalışmalarda genel anestezinin DNA hasarına neden olduğu kanıtlanmıştır. Alleva ve arkadaşları¹⁸³ genel anestezi uygulanarak yapılan ortopedi operasyonlarından sonra DNA hasarını incelemişlerdir. Anesteziden 15 dakika sonra izole edilen lenfositlerde DNA kırığı haricinde okside pürin ve pirimidin bazlarında da önemli bir artış gözlenmiştir (26 ± 8 ; 44 ± 14 arbitrary unit, $p < 0.05$) ve operasyondan 24 saat sonra okside olan bazların çoğu onarılmıştır.

I-R uygulanan operasyonlar ile ilgili yapılan diğęer çalışmalar ise lökositlerde DNA hasarı üzerine olmuştur. Willy ve arkadaşlarının³⁰ 2000 yılında comet yöntemini kullanarak yaptıkları çalışmada; lökositlerde

oksidatif stres sonucunda I-R' nin genotoksik etkilere neden olduğu gösterilmiştir. I-R'nin etkileri çoğunlukla turnike çözüldükten 5-30 dakika sonra ortaya çıkmıştır ve 2 saatlik periyottan sonra eski haline geri döndüğünü göstermişlerdir ($p < 0.05$). Ancak biz çalışmamızda 3 farklı zaman dilimindeki (operasyon öncesi, iskemi sonrası ve reperfüzyon sonrası) alınan kanlardan izole edilen lenfositlerde % tail intensity değerleri arasında istatistiksel olarak anlamlılık bulamadık.

Chandrasekhar ve arkadaşları¹⁸⁴ yaşın, cinsiyetin, alkol tüketiminin comet testi ile gösterilen DNA hasarı ile anlamlı korelasyon göstermediğini ancak MN sıklığı ile anlamlı korelasyon gösterdiğini belirtmişlerdir. Ancak yaşlanmayla ilgili olarak öne sürülen teorilerden biri olan serbest radikal teorisinde canlının yaşam boyunca etkilendiğı ROT'ların oksidatif hasara neden olabileceğı öne sürölmektedir. Kümülatif ve potansiyel olarak artan miktardaki hasar yaşlanmadaki fonksiyonel ve patolojik bozukluklara yol açmaktadır¹⁸⁵. Çalışma grubumuzda yaşın DNA hasarı ile olan bu ilişkisinden dolayı korelasyon olup olmadığını analiz ettik ancak anlamlı bir farklılık bulamadık, bunun sebebinin hasta grubumuzda çok yaşlı bireylerin bulunmadığına bağladık.

6. SONUÇ

Sunulan çalışmada turnike uygulanarak alt ekstremitte operasyonu geçiren hastalarda I-R sonucunda oluşan DNA hasarını operasyon öncesi, iskemi sonrası ve reperfüzyon sonrası alınan kanlardan izole edilen lenfositlerde ölçtük. Oluşan kuyruk yoğunluğu değerini baz alarak sonuçları karşılaştırdık. Bireylerin 3 farklı zaman dilimindeki % kuyruk DNA hasarı arasında istatistiksel olarak anlamlılık bulamadık. Ancak iskemi sonrası ve reperfüzyon sonrası zamanlarında çok anlamlı olmasa da Endo III'te oluşan DNA hasarındaki artış FPG'de daha da fazlalaşmıştır.

Sigara içenlerde ve içmeyenlerde; operasyon öncesi, iskemi sonrası ve reperfüzyon sonrası alınan kanlarla DNA hasarlarını ayrı ayrı Anova testini kullanarak ölçtük. Sigara alışkanlığının oksidatif hasar üzerine olan etkisinde, elde ettiğimiz tüm sonuçları karşılaştırdığımızda istatistiksel olarak anlamlı bir sonuç bulamadık.

Çalışmamıza katılan 14 kadın ve 19 erkek arasında bir korelasyon testi uyguladık ancak cinsiyetin bazal DNA hasarına etkisinin olmadığı sonucuna vardık.

Çalışma grubumuzda yaşın DNA hasarı ile olan bu ilişkisinden dolayı korelasyon olup-olmadığını analiz ettik ancak anlamlı bir farklılık bulamadık, bunun sebebinin hasta grubumuzda çok yaşlı bireylerin bulunmadığına bağladık.

Sonuç olarak; yaptığımız bu çalışmada turnike uygulanarak alt ekstremitte operasyonu geçiren hastalarda iskemi-reperfüzyonun neden olabileceği düşünülen beklediğimiz oksidatif hasarı tespit edemedik.

Şimdiye kadar turnike uygulanan operasyonlarda I-R hasar mekanizmasının ortaya çıkartılması için yapılan çalışmalarda oksidatif stres ürünleri, antioksidan seviye ve biyokimyasal parametreler ölçülmüştür. Bundan sonra yapılacak çalışmalarda turnike uygulama zamanları farklı olan gruplar karşılaştırılarak turnike süresinin oksidatif hasar üzerine olan etkisi tespit edilebilir. Ayrıca biyokimyasal parametre olarak farklı ölçümler yapılabilir. Örneğin süperoksit anyonunun etkilerini ortadan kaldıran SOD aktivitesi ölçülebilir. Tüm yapılan ilave deneyler turnikenin neden olduğu düşünülen I-R'nin mekanizmasını ortaya çıkartılmasını ve koruyucu önlemler alınarak mevcut komplikasyonlar minimize edilebilir.

7. ÖZET

Alt Ekstremitede Turnike Uygulanan Ortopedi Hastalarında İskemi-Reperfüzyon Hasarı Sonucu Oluşan Oksidatif DNA Hasarının Araştırılması

Serbest oksijen radikallerinin ve lipid peroksidasyonun birçok hastalığın patojenezinde rol oynamaktadır. Serbest radikalleri de içeren endojen ya da ekzojen kaynaklı Reaktif Oksijen Türleri (ROT) oksidatif DNA hasarına neden olmaktadır. Turnike uygulanarak yapılan ortopedi ameliyatlarında turnikenin çözülmesiyle fazla miktarda ROT'lerinin oluşumu söz konusudur.

Çalışmamıza alt ekstremitede turnike uygulanan ortopedi hastalarından yaş ortalaması 41.48 ± 13.83 olan Gazi Üniversitesi Tıp Fakültesi Ortopedi ve Travmatoloji Anabilim Dalında meniskopati tanısı konulmuş ve artroskopi ameliyatı geçiren 33 hasta (14 kadın, 19 erkek) dahil edildi.

Tüm hastaların operasyon öncesi, iskemi sonrası (turnike uygulamasından sonra) ve reperfüzyon sonrası (turnikenin çözülmesinden sonra) kanları alındı. İskemi sonrası ve reperfüzyon sonrası alınan kanlardan elde edilen periferik kan lenfositlerinde, comet görüntülü analiz tekniği kullanılarak belirlenen kuyruk yoğunluğu (Tail Intensity=TI) operasyon öncesi belirlenen kuyruk yoğunluğu ile (tampon, Endo III ve FPG kullanılarak) kıyaslandığında istatistiksel olarak anlamlı bir fark

gözlenmedi (7.71 ± 2.042 ; 8.11 ± 2.131 ve 8.27 ± 1.57 bazal DNA, $p > 0.05$). Endo III ve FPG enzimleri kullanılarak yapılan analizlerde de benzer şekilde anlamlı bir fark gözlenmedi (pirimidin hasarı için 8.66 ± 2.575 ; 8.5 ± 1.99 ve 8.98 ± 2.19 , pürin hasarı için 8.41 ± 2.948 ; 9.06 ± 2.61 ve 9.29 ± 3 . $p > 0.05$). Ayrıca sigara alışkanlığının oksidatif hasar üzerine olan etkisi de gözönüne alınarak sigara içmeyen ve içenler arasında yine operasyon öncesi, iskemi sonrası ve reperfüzyon sonrasında ayrı ayrı karşılaştırıldığında istatistiksel olarak bir anlamlılık bulunmamıştır ($p > 0.05$).

Hastaların yaş ve cinsiyeti ile DNA hasarı arasında korelasyon olup-olmadığı analiz edildiğinde yaş ve cinsiyetin bazal DNA hasarına etkisinin olup olmadığı gözlenmiştir. ($r^2 = 0.054$, $r = -0.232$, $P = 0.20$. Spearman Korelasyon Testi)

Bu çalışmadan elde edilen sonuçlar, turnike uygulanarak alt ekstremitte operasyonu geçiren hastalarda oluşan iskemi-reperfüzyonun oksidatif DNA hasarına neden olmadığı gösterilmiştir. İskemi-reperfüzyonun neden olduğu DNA hasarının mekanizmasının açıklığa kavuşturulabilmesi için daha kapsamlı çalışmaların yapılması gerekmektedir.

Anahtar Kelimeler : Comet testi . Turnike . İskemi-Reperfüzyon

8. SUMMARY

Investigation of oxidative DNA damage from tourniquet-induced ischemia-reperfusion injury in orthopedic patients.

Free oxygen radicals and lipid peroxidation play an important role in a number of biological processes. Reactive oxygen species (ROS) produced either endogenously or exogenously cause oxidative DNA damage. Oxidative DNA damage in cells was caused by endogenously and exogenously reactive oxygen species (ROS), involving free radicals.

Thirty-three orthopedic patients (age; 41.48 ± 13.83) who applied to Gazi University Faculty of Medicine, Orthopedic and Traumatology Department for meniscopathy surgery were included.

Peripheral blood lymphocytes were collected in heparinized glass tubes at the following stages of the intervention: the reference level was obtained immediately before operation. The second sample was taken after tourniquet (ischemia) and third sample was taken after the release of tourniquet (reperfusion). Oxidative DNA damage in peripheral lymphocytes was evaluated by comet assay using specific enzymes (Endo III and FPG). We could not find statistically significant difference was not observed when all stages were compared to each other for tail intensity (7.71 ± 2.042 ; 8.11 ± 2.131 and 8.27 ± 1.57 for basal DNA, $p > 0.05$). We also obtained similar results when it was used Endo III and FPG (8.66 ± 2.575 ; 8.5 ± 1.99 and 8.98 ± 2.19 for pyrimidine damage, 8.41 ± 2.948 ; 9.06 ± 2.61

and 9.29 ± 3.54 for purine damage, respectively). Furthermore, we compared to smoker patients to non-smoker patients to detect the effect of smoking status on DNA damage. There was no statistically significant increase in smoker patients compared to non-smokers ($p > 0.05$). When it was analyzed the effects of age and gender on DNA damage, there were no correlation observed. ($r^2 = 0.054$, $r = -0.232$, $p = 0.20$. Spearman Correlation test)

Our data showed that tourniquet-induced ischemia-reperfusion injury in orthopedic patients did not cause oxidative DNA damage. It needs to be done further studies to detect mechanism of ischemia-reperfusion induced DNA.

Key Words : Comet assay . Tourniquet . Ischemia-Reperfusion

9. KAYNAKLAR

1. Esterbauer H, Wag G, Puhl H, et al. Lipid peroxidation and its role in atherosclerosis. *Br. Med. Bull.* 1993; 49: 566–576.
2. Lohr BJ. Oxygen radicals and neuropsychiatric illness. Some speculations. *Arch. Gen Psychiatry* 1991; 48: 1097-1104.
3. Barnes PJ. Reactive oxygen species and airway inflammation. *Free Radic Biol Med* 1990; 9: 235-43.
4. Collins AR, Raslova K, Somorovska M, Petrovska H, Ondrusova A, Vohnout B, Fabry R, Dusinska M, et al. DNA damage in diabetes: correlation with a clinical marker. *Free Radic. Biol. Med.* 1998; 25: 373–377.
5. Yardım-Akaydın S, Sepici A, Özkan Y, Torun M, Şimşek B, Sepici V, et al. Oxidation of Uric Acid in Rheumatoid Arthritis: Is Allontoin a Marker of Oxidative Stress? *Free Radic. Research.* 2004; 38(6): 623-628.
6. Coussens LM, Werb, Z. Inflammation and cancer. *Nature.* 2002; 420: 860–867
7. Humphreys V, Martin R.M, Ratcliffe B, Duthie S, Wood S, Gunnell D, Collins A.R, et al. Age-related increases in DNA repair and antioxidant protection:a comparison of the Boyd Orr Cohort of elderly subjects with a younger population sample. *Age Ageing.* 2007; 36: 521–526
8. Halliwell B, Gutteridge JMC, editors. *Free Radicals in Biology and Medicine.* Third Edition. England: Oxford Science Publications; 2001.
9. Poulsen HE, Prieme H, Loft S, et al. Role of oxidative DNA damage in cancer initiation and promotion. *Eur J Cancer Prev.* 1998; 79: 16.

10. Shigenaga MK, Ames BN. Assays for 8-hydroxy-2-deoxyguanosine: a biomarker of in vivo oxidative DNA damage. *Free Radic. Biol. Med.* 1991; 10: 211-6.
11. Dizdaroglu M. Chemical determination of free radical-induced damage to DNA. *Free Radic. Biol. Med.* 1991; 10: 225-42.
12. Chiu D, Wang HH, Blumenthal MR, et al. Creatine phosphokinase release as a measure of tourniquet effect on skeletal muscle. *Arch Surg.* 1976; 111: 71-74.
13. Heppenstall R.B, Balderston R, Goodwin C, et al. Pathophysiologic effects distal to a tourniquet in the dog. *J Trauma.* 1979; 19: 234-238.
14. Klenerman L. Tourniquet time: How long? *Hand.* 1980; 12: 231-234.
15. Klenerman L. The tourniquet in operations on the knee: A review. *J R Soc Med.* 1982; 75: 31-32.
16. Westman B, Johansson G, Söderlund K, Wernerman J, Hammarqvist F, et al. Muscle glutathione metabolism during ischemia and reperfusion in patients undergoing aorto-bifemoral bypass surgery. *Acta Anaesth.* 2006; 50: 699-705.
17. Westman B, Johansson G, Söderlund K, et al. Effects on skeletal muscle glutathione status of ischemia and reperfusion following abdominal aortic aneurysm surgery. *Ann. Vasc. Surg.* 2006; 20: 99-105.
18. Klenerman L. The tourniquet in surgery. *J Bone Joint Surg* 1962; 44-B: 937-943.
19. Klenerman L, Biswas M, Hulands GH, Rhodes AM, et al. Systemic and local effects of the application of a tourniquet. *J Bone Joint Surg.* 1980; 62-B: 385-388.

20. Klenerman L, Crawley J, Lowe A, et al. Hyperemia and swelling of a limb upon release of a tourniquet. *Acta Orthop Scand*. 1982; 53: 209-213.
21. Klenerman L, Hulands GH. Tourniquet pressure for the lower limb. *J Bone Joint Surg*. 1979; 61-B: 124-128.
22. Klenerman L, Lowe N, Miller I, Freyer R, Green J, Jackson MJ, et al. Dantrolene sodium protects against experimental ischemia and reperfusion damage tourniquet skeletal muscle. *Acta Orthop Scand*. 1995; 66: 352-358.
23. Krackow KA. A maneuver for improved positioning of a tourniquet in the obese patient. *Clin Orthop* 1982; 168: 80-2.
24. Crenshaw AH. Surgical techniques. In: Crenshaw AH. Ed. *Campbells operative orthopaedics*. 8th ed. St Louis: CV Mosby Company; 1992.
25. Crenshaw AH, Hargens AR, Gershuni DH, Rydevik BL et al. Wide tourniquet cuffs more effective at lower inflation pressures. *Acta Orthop Scand*. 1988; 59: 447-451.
26. Pedowitz RA, Gershuni DH, Schmid AH, Friden J, Rydevik BL, et al. Muscle injury induced beneath and distal a pneumatic tourniquet:A quantitative study of tourniquet pressure and duration. *J Hand Surg*. 1991; 16-A: 610-621.
27. Sapega AA, Heppsentall B, Chance B, Park Y.S, Sokolow D, et al. Optimizing tourniquet application and release times in extremity surgery. *J Bone Joint Surg*. 1985; 67-B: 303-314.
28. Santavirta S, Kauste A, Rindell K. Tourniquet ischaemia: Clinical and biochemical observations. *Ann Chir Gynaecol*. 1978; 67: 210-213.

29. Heppenstall RB, Scott R, Sapega A, Park YS, Chance B, et al. A comparative study of the tolerance of skeletal muscle to ischemia: Tourniquet application compared with acute compartment syndrome. *J Bone Joint Surg A*. 1986; 68: 820–828.
30. Willy C, Dahouk S, Starck C, et al. DNA damage in human leukocytes after ischemia/reperfusion injury. *Free Radic Biol Med*. 2000; 28: 1–12.
31. Abdel-Salam A, Eyres KS. Effects of tourniquet during total knee arthroplasty. *J Bone Joint Surg*. 1995; 77-B: 250-253.
32. Aho K, Sainio K, Kianta M, Varpanen E, et al. Pneumatic tourniquet paralysis. *J Bone Joint Surg*. 1983; 65-B: 441-443.
33. Grace PA. Ischaemia-reperfusion injury. *British J of Surgery*. 1994; 81: 637- 647.
34. Lin E, Lowry SF, Calvano SE, et al. The systemic response to injury. 7th Edition. Mc Graw-Hill: Principles of Surg;1999.
35. Semenza GL. Cellular and molecular dissection of reperfusion injury ROS within and without. *Circ Res*. 2000; 86: 117-118.
36. Hearse DJ, Humphrey SM, Chain EB, et al. Abrupt reoxygenation of the anoxic potassium-arrested perfused rat heart: a study of myocardial enzyme release. *J. Mol. Cell Cardiol*. 1973; 5 (4): 395-407.
37. McCord JM. Oxygen-derived free radicals in postischemic tissue injury. *N. Engl. J. Med*. 1985; 312 (3): 159-163.
38. Cross CE, Halliwell B, Borish ET, Pryor WA, Ames BN, Saul RL, McCord JM, Harman D, et al. Oxygen radicals and human disease. *Ann. Intern. Med*. 1987; 107 (4): 526-545.
39. Girotti AW. Lipid hydroperoxide generation, turnover, and effector action in biological systems. *J Lipid Res*. 2000; 39:1529-1542.

40. Harris K, Walker PM, Mickle DAG, Harding R, Gatley R, Wilson GJ, Kuzon B, McKee N, Romaschin A.D, et al. Metabolic response of skeletal muscle tourniquet ischemia. *Am J Physiol.* 1986; 250: 213-220.
41. Menger MD, Steiner D, Messmer K, et al. Microvascular ischemia-reperfusion injury in striated muscle: significance of "no reflow". *Am J Physiol.* 1992; 263: 1982-1990.
42. Tajima T. Considerations on the use of the tourniquet in surgery of the hand. *J Hand Surg.* 1982; 8:799-802.
43. Lindsay TF, Liauw S, Romaschin AD, Walker PM, et al. The effect of ischemia/reperfusion on adenine nucleotide metabolism and xanthine oxidase production in skeletal muscle. *J Vasc Surg.* 1990; 12: 8–15.
44. Kleihues P, Kobayashi K, Hossmann KA, et al. Purine nucleotide metabolism in the cat brain after one hour of complete ischemia. *J Neuroischem.* 1974; 23: 417–425.
45. Siesjö BK, Wieloch T. Cerebral metabolism in ischaemia: Neurochemical basis for therapy. *Br J Anaesth.* 1985; 57: 47–62.
46. Balcells J, Guada JA, Peiro JM, Parker DS, et al. Simultaneous determination of allantoin and oxypurines in biological fluids by high-performance liquid chromatography. *J Chromatogr.* 1992; 575: 153–157.
47. Friedl HP, Smith DJ, Till GO, et al. Ischemia-reperfusion in humans: Appearance of xanthine oxidase activity. *Am J Pathol.* 1990; 136: 491–495.
48. Bruner JM. Safety factor in the use of the pneumatic tourniquet for hemostasis in surgery of the hand. *J Bone Joint Surg* 1951; 33-A: 221-224.

49. Blaisdell FW. The pathophysiology of skeletal muscle ischemia and the reperfusion syndrome: A review. *Cardiovasc Surg.* 2002; 10: 620–630.
50. Labbe R, Lindsay T, Walker PM, et al. The extent and distribution of skeletal muscle necrosis after graded periods of complete ischemia. *J Vasc Surg.* 1987; 6: 152–157.
51. Petrasek PF, Homer-Vanniasinkam S, Walker PM, et al. Determinants of ischemic injury to skeletal muscle. *J Vasc Surg.* 1994; 19: 623–631.
52. Terzi C, Kuzu A, Tanık A, Kale T, Aşlar K, Elhan A, et al. Sıçanlarda intestinal iskemi modelinde profilaktik kısa ve uzun süreli yüksek doz Allopurinol kullanımının mortaliteye etkisi. *Klinik ve Deneysel Cerrahi* 2000; 1: 10-16.
53. Ertan T, Soran A, Kılıç M, Aşlar AK, Koç M, Cengiz Ö, et al. Kan Malondialdehid ve total antioksidan seviyesinin (TAS) önemi. *Cerrahi Tıp Bülteni* 2001; 4: 154-167.
54. Babior BM. Phagocytes and oxidative stress. *The American Journal of Medicine.* 2000; 109 (1): 33-44.
55. Kuyvenhoven JP. Oxidative stress and diabetes mellitus, Pathogenesis of long-term complications. *European Journal of Internal Med.* 1999; 10 (1): 9-19.
56. Chamoun F, Burne M, O'Donnel M, Rabb H, et al. Pathophysiologic role of selectins and their ligands in ischemia reperfusion injury. *Front. Biosci.* 2000; 5: 103-109.
57. Cuzzocrea S, Riley DP, Caputi A. P, Salvemini D, et al. Antioxidant Therapy: a new pharmacological approach in shock, inflammation, and ischemia/reperfusion injury. *Pharmacol. Rev.* 2001; 53: 135-159.

58. Kuzu MA, Köksoy C, Kale İT, Tanık A, Terzi C, Elhan AH, et al. Reperfusion injury delays healing of intestinal anastomosis in a rat. *Am J of Surg.* 1998; 176: 348-351.
59. Zimmerman BJ, Granger DN. Reperfusion injury. *Surg. Clin. of North America* 1992; 72: 65-83.
60. Verma S, Fedak PW, Weisel RD, Butany J, Rao V, Maitland A, et al. Fundamentals of reperfusion injury for the clinical cardiologist. *Circulation* 2002; 100: 2332-6.
61. Kloner RA, Bolli R, Marban E, Reinlib L, Braunwald E, et al. Medical and cellular implications of stunning, hibernation, and preconditioning. *NHLBI workshop circulation.* 1998; 97 (18): 1848-67.
62. Kloner RA, Jennings RB. Consequences of brief ischemia: stunning, preconditioning, and their clinical implications: part 1. *Circulation.* 2001; 104 (24): 2981-9.
63. Kloner RA, Jennings RB. Consequences of brief ischemia: stunning, preconditioning, and their clinical implications: part 2. *Circulation* 2001; 104 (25): 3158-67.
64. Tomur A, Etlik O, Gundogan NU. Hyperbaric oxygenation and antioxidant vitamin combination reduces ischemia-reperfusion injury in a rat epigastric island skin-flap model. *J Basic Clin Physiol Pharmacol.* 2005; 16 (4):275-85.
65. Adanali G, Ozer K, Siemionow M, et al. Early and late effects of ischemic preconditioning on microcirculation of skeletal muscle flaps. *Plast Reconstr Surg.* 2002 ;109 (4): 1344-51.
66. Dzau VJ. Tissue Angiotensin and Pathobiology of Vascular Disease. A Unifying Hypothesis. *Hypertension.* 2001; 37: 1047-1052.
67. Basım S. Alt ekstremitede iskemi reperfüzyon oluşturulan ratlarda Ginkgo Biloba EGB 761'in barsak anastomoz iyileşmesi

üzerine etkisi. Tıpta uzmanlık tezi. Ankara: Taksim Eğitim ve Araştırma Hastanesi; 2005.

68. Kopáni M, Celec P, Danisovic L, Michalka P, Biro C, et al. Oxidative stress and electron spin resonance. Clin Chim Acta. 2006; 364: 61-66.
69. Staroverov VN, Davidson ER. Distribution of effectively unpaired electrons. Chem Phys Lett. 2000; 330: 161-168.
70. Halliwell B, Gutteridge JMC. Free Radicals in Biology and Medicine. Oxford Science Publications. 2001; 3: 22-24.
71. Akkuş İ. Serbest Radikaller ve Fizyopatolojik Etkileri. 38. Konya: Mimoza Yayınları; 1995.
72. Şentürk H. Serbest Radikal Hasarının Hepato-Biliyer Sistem Hastalıklarındaki Rolü. Kocatepe Tıp Dergisi. 2004; 5: 1-8.
73. Turk HM, Sevinç A, Camcı C, et al. Plasma lipid peroxidation products and antioxidant enzyme activities in patients with type 2 diabetes mellitus. Acta Diabetol. 2002; 39: 117-122.
74. Zweier JL, Tanerty JT, Weisfeldt ML, et al. Direct measurement of free radical generation following reperfusion of ischemic myocardium. Proc Natl Acad Sci. 1987; 84: 1404-7.
75. Gardner HW. Oxygen radical chemistry of polyunsaturated fatty acids. Free Radic Biol Med. 1989; 7: 65-9.
76. Kowaltowski AJ, Vercesi AE. Mitochondrial damage induced by conditions of oxidative stress. Free Radic Biol Med. 1999; 26: 463-71.
77. Halliwell B, Chirico S. Lipid peroxidation: Its mechanism, measurement, and significance. Am J Clin Nutr. 1993; 57: 715S-725S.
78. Collins AR. Investigating oxidative DNA damage and its repair using the comet assay. Mutat. Res. 2007; 7859: 1-9.

79. Esterbauer H, Wag G, Puhl H, et al. Lipid peroxidation and its role in atherosclerosis. *Br. Med. Bull.* 1993; 49: 566–576.
80. Lyons TJ. Glycation and oxidation: a role in the pathogenesis of atherosclerosis. *Am. J. Cardiol.* 1993; 71: 26–31.
81. Vinson JA. Oxidative stress in cataracts. *Pathophysiology* 2006; 13: 151-162.
82. Emerce Tufan E. DNA onarım enzimi OGG1 SER326CYS polimorfizmi ile akciğer kanseri ilişkisinin Türk popülasyonunda araştırılması ve oksidatif hasarın biyogöstergesi 8-OHdG ölçümü. Yüksek lisans tezi. Ankara: Gazi Üniversitesi; 2007.
83. Grollman AP, Moriya M. Mutagenesis by 8-oxoguanine: an enemy within, *Trends Genet.* 1993; 9: 246–249
84. Kökoğlu E. Serbest radikal reaksiyonlarının kanserdeki rolü. *Klinik Gelişim.* 1998; 11: 358-64.
85. Martilla RJ, Röyttä M, Lorentz H, et al. Oxygen toxicity protecting enzymes in the human brain. *J Neural Transm.* 1988; 74: 87-95.
86. McCord JM. Human disease, free radicals and the oxidant/antioxidant balance. *Clin Biochem.* 1993; 26: 351-357.
87. Gonzales R, Auclair C, Voisin E, et al. Superoxide dismutase, catalase, and glutathione peroxidase in red blood cells from patients with malign diseases. *Cancer Res.* 1984; 44: 4137-4139.
88. Oberley LW, Buettner G.R. Role of superoxide dismutase in cancer: a review. *Cancer Res.* 1979; 39: 1141-1149.
89. Otamiri T, Sjödaahl R. Increased lipid peroxidation in malignant tissues of patients with colorectal cancer. *Cancer.* 1989; 64: 422-425.
90. Westman NG, Marklund SL. Copper and Zinc-containing superoxide dismutase and manganese-containing superoxide

- dismutase in human tissues and human malignant tumors. *Cancer Res.* 1981; 41: 2962-2966.
91. Güner G, İşlekel H, Oto Ö, Hazan E, Açikel Ü, et al. Evaluation of some antioxidant enzymes in lung carcinoma tissue. *Cancer Letters.* 1996; 103: 233-239.
 92. Humphreys V, Martin RM , Ratcliffe B, Duthie S, Wood S, Gunnell D, Collins AR, et al. Age-related increases in DNA repair and antioxidant protection: a comparison of the Boyd Orr Cohort of elderly subjects with a younger population sample. *Age Ageing* 2007; 36 :521–526.
 93. Morocz M, Kalman J, Juhasz A, Sinko I, McGlynn AP, Downes CS, Janka Z, Rasko I, et al. Elevated levels of oxidative DNA damage in lymphocytes from patients with Alzheimer's disease. *Neurobiol.* 2002; 23: 47–53.
 94. Kadioglu E, Sardas S, Aslan S, Isik E, Karakaya AE, et al. Detection of oxidative DNA damage in lymphocytes of patients with Alzheimer's disease, *Biomarkers.* 2004; 9 : 203–209.
 95. Skrzydlewska E, Stankiewicz A, Sulkowska M, et al. Antioxidant status and lipid peroxidation in colorectal cancer. *J.Toxicol. Environ.Health A* 2001; 64 (3): 213-22.
 96. Knight JA. Disease related to oxygen-derived free radicals. *Ann .Clin. Lab. Sci.* 1995; 25 (2): 111-21.
 97. Tez M. Sıçanlarda hepatektomi sonrası oluşturulan iskemi reperfüzyon hasarına-tokoferolün etkisi. *UzmanlıkTezi. İstanbul: Marmara Üniversitesi; 1999.*
 98. Halliwell B. Free radical, antioxidants and human disease. *Lancet.* 1993; 341 (8859): 1538.

99. Breimer LH. Molecular mechanisms of oxygen radical carcinogenesis and mutagenesis: the role of DNA base damage. *Mol Carcinogenesis* 1990; 3 (4): 188-97.
100. Dreher D, Junod AF. Role of oxygen free radicals in cancer development. *Eur.J.Cancer.* 1996 ; 32A(1): 30-8.
101. Bulger EM, Helton WS. Nutrient antioxidants in gastrointestinal disease. *Gastroenterol. Clin. North Am.* 1998; 27(2): 403-19.
102. Halliwell B, Auroma OI. DNA damage by oxygen derived species. Its mechanisms of action and measurements in mammalian system. *FEBS Lett.* 1991 ;281 (1-2): 9-19.
103. Lindhal T. Instability and decay of the primary structure of DNA. *Nature* 1993; 362: 709.
104. Toyokuni S, Okamoto K, Yodoi J, Hiai H, et al. Persistent oxidative stress in cancer. *FEBS Lett.* 1995 ; 358 (1):1-3.
105. Klaunig JE, Xu Y, Isenberg JS, et al. Toxicological defence mechanisms and the shape of dose response relationships. *Environ. Health. Perspect.* 1995; 106 (1): 289.
106. Altan N, Sepici DA, Koca C, et al. Diabetes Mellitus and Oxidative Stress. *Turk J Biochem.* 2006; 31 (2): 51–56.
107. Halliwell B. Antioxidant characterization. Methodology and mechanism. *Biochemical Pharm.* 1995; 49 (10): 1341-1348.
108. Huang HY, Helzlsouer KJ, Appel LJ, et al. The effects of vitamin C and vitamin E on oxidative DNA damage: Results from a randomized controlled trial. *Cancer Epidemiology Biomarkers & Prevention* 2000; 9: 647-652.
109. Willy C, Dahouk S, Starck C, Kaffenberger W, Gerngrob H, Plappert U, et al. DNA damage in human leucocytes after

- ischemia/reperfusion injury. *Free Radical Biology & Medicine*. 2000; 28 (1): 1–12.
110. Westman B, Weidenhielm L, Rooyackers O, Fredriksson K, Wennerman J, Hammarqvist F, et al. Knee replacement surgery as a human clinical model of the effects of ischaemia/reperfusion upon skeletal muscle. *Clinical science*. 2007; 113: 313-318.
 111. Westman B, Johnsson G, Söderlund K, Wennerman J, Hammarqvist F, et al. Muscle glutathione metabolism during ischemia and reperfusion in patients undergoing aorta-bifemoral bypass surgery. *Acta Anaesth. Scand*. 2006; 50: 699-705.
 112. Ostman B, Michaelsson K, Rahme H, Hillered L, et al. Tourniquet-Induced Ischemia and Reperfusion in Human Skeletal Muscle. *Clin Orthop*. 2004; 418, 260-265.
 113. Andreassi M, Botto N, Rizza A, Colombo M, Palmieri C, Berti S, et al. Deoxyribonucleic acid damage in human lymphocytes after percutaneous transluminal coronary angioplasty. *JACC*. 2002; 40 (5): 862-8.
 114. Roberts MJ, Young IS, Trouton TG, et al. Transient release of lipid peroxides after coronary artery balloon angioplasty. *Lancet*. 1990; 336:143-5.
 115. Coghlan JG, Flitter WD, Hooley AAE, et al. Detection of free radicals and cholesterol hydroxiperoxides in blood taken from the coronary sinus of man during percutaneous transluminal coronary angioplasty. *Free Radic Biol Med*. 1991; 14: 409-17.
 116. Blann A, Midgley H, Burrows G, et al. Free radicals, antioxidants and endothelial cell damage after percutaneous transluminal coronary angioplasty. *Coron Artery Dis*. 1993; 4: 905-10.

117. Buffon A, Santini S, Ramazzotti V, et al. Large, sustained cardiac lipid peroxidation and reduced antioxidant capacity in the coronary circulation after brief episodes of myocardial ischemia. *J Am Coll Cardiol* 2000; 35: 633-9.
118. Norman A, Cochran ST, Sayre JW, et al. Meta-analysis of increases in micronuclei in peripheral blood lymphocytes after angiography or excretory urography. *Radiat Res* 2001; 155: 740-3.
119. Fenech M. The cytokinesis-block micronucleus technique: a detailed description of the method and its application to genotoxicity studies in human populations. *Mutat Res.* 1993; 285: 35-44.
120. Gedik C, Wood S, Collins AR, et al. Measuring oxidative damage to DNA: HPLC and the comet assay compared. *Free Radic Res.* 1998; 29: 609-15.
121. Collins AR, Duthie S, Dabson V, et al. Direct enzymic detection of endogenous oxidative base damage in human lymphocyte DNA. *Carcinogenesis.* 1993; 14: 1733-5.
122. Collins AR, Dusinska M, Gedik C, Stetina R, et al. Oxidative damage to DNA: do we have a reliable biomarker? *Environ Health Perspect.* 1996; 104 (3): 465-9.
123. Van M, Olguner Ç, Şişman A.R, Muratlı K, Karcı A, Kilercik H, et al. Ischaemic preconditioning attenuates haemodynamic response and lipid peroxidation in lower-extremity surgery with unilateral pneumatic tourniquet application: a clinical pilot study. *Adv Ther.* 2008; 25 (3): 37-7.
124. Orban JC, Levraut J, Gindre S, et al. Effects of acetylcysteine and ischemic preconditioning on muscular function and postoperative pain after orthopaedic surgery using a pneumatic tourniquet. *Eur J Anaesthesiol.* 2006; 23: 1025–1030.

125. Wu ZK, Tarkka MR, Eloranta J, et al. Effect of ischemic preconditioning on myocardial protection in coronary artery bypass graft patients: can the free radicals act as a trigger for ischemic preconditioning? *Chest*. 2001; 119: 1061–1068.
126. Klaassen CD, Amdur MO, Doull J. Caserett and Doull's Toxicology. Fifth edition. New York: The Basic Science for Poisons; 1996.
127. Fenech M. Chromosomal biomarkers of genomic instability relevant to cancer. *Drug Discov Today*. 2002; 7 (22): 1128-37.
128. Audeh W. Genetic predisposition to cancer: Malfunction or maladaptation? IGoldspiel BR. *Horizons in Cancer Therapeutics*. 1st ed. Pennsylvania: Meniscus Educational Institues; 2003. s 3-19.
129. Albertini RJ, Anderson D, Douglas GR, Hagmar L, Hemminki K, Merlo F, Natarajan AT, Norppa H, Shuker DE, Tice R, Waters MD, Aitio A, et. al. IPCS guidelines for monitoring of genotoxic effects of carcinogens in humans. *International Programme on Chemical Safety. Mutat Res*. 2000; 463 (2): 111-72.
130. Hagmar L, Strönberg U, Tinnerberg H, Mikoczy Z, et al. The usefulness of cytogenetic biomarkers as intermediate endpoints in carcinogenesis. *Int J Hyg Environ Health*. 2001; 204: 43-47.
131. Crossen PE, Morgen WF. Analysis of human lymphocyte cell cycle time in culture measured by sister chromatid differential staining. *Exp Cell Res*. 1977; 104: 453-57.
132. Teggi A, Lastilla MG, de Rosa F, et al. Therapy of human hydatid disease with mebendazole and albendazole. *Antimicrobial Agents Chemother* 1993; 37 (8): 1679-1684.

133. Countryman P, Heddle J. The production of micronuclei from chromosome aberrations in irradiated cultures of human lymphocytes. *Mutat Res.* 1976; 41: 321-332.
134. Acar H, Caliskan U, Demirel S, Largaespada DA, et al. Micronucleus incidence and their chromosomal origin related to therapy in acute lymphoblastic leukemia (ALL) patients: detection by micronucleus and FISH techniques. *Teratog Carcinog Mutagen.* 2001; 21 (5) :341-347.
135. Peace E.B. An investigation of chromosomal content and origin of micronuclei. Doctorate. Pennsylvania: In philosophy in the department of environmental health of the collage medicine; 1998.
136. McNeil N, Ried T. Novel molecular cytogenetic techniques for identifying complex chromosomal rearrangements: technology and applications in molecular medicine. *Expert Rev Mol Med* 2000; 2000: 1-14.
137. Cook PR, Brazell IA, Jost E, et al. Characterization of nuclear structures containing superhelical DNA. *J. Cell Sci.* 1976; 22: 303–324.
138. Ostling O, Johanson KJ. Microelectrophoretic study of radiation-induced DNA damages in individual mamalian cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 1984;123: 291-98.
139. Singh NP, McCoy MT, Tice RR, Schneider EL, et al. A simple technique for quantitation of low lewels of DNA damage in individual cells. *Exp Cell Res* 1988; 175 (1):184-91.
140. Faust F, Kassie F, Knasmuller S, Boedecher RH, Mann M, Mersch-Sundermann V, et al. The use of the alkaline comet assay with lymphocytes in human biomonitoring studies. *Mutat Res.* 2004; 566 (3): 209-29.

141. Klaude M, Eriksson S, Nygren J, Ahnström G, Mutation Research/ DNA repair. *Mutat Res / DNA rep.* 1996; 363 (2): 89-96.
142. Collins AR, Dobson VL, Duinska M, Kennedy G, Tina R, et al. Mutation Research/ Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis. *Mutat Res.* 1997; 375 (2): 183-193.
143. Tice RR, Agurell E, Anderson D, Burlinson B, Hartmann A, Kobayashi H, Miyamae Y, Rojas E, Ryu JC, Sasaki YF, et al. Single cell gel / Comet assay: guidelines for in vitro and in vivo genetic toxicology testing. *Environ. Mol. Mutagen.* 2000; 35; 206-21.
144. Collins AR. The Comet Assay for DNA Damage and Repair: principles, applications, and limitations. *Mol. Biotech.* 2004; 26; 249-261.
145. Moller P, Knudsen LE, Loft S, Wallin H, et al. The comet assay as a rapid test in biomonitoring occupational exposure to DNA-damaging agents and effects of confounding factors. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev.* 2000; 9 (3):1005-15.
146. Başaran AA. Farmakognozide tek hücre jel elektroforezi uygulamaları [online]. 2004 [cited 2008 24 Oct]. Available from: URL: <http://documents.anadolu.edu.tr/bihat/ekitap/aba%C5%9Faranpdf.pdf>
147. Dusinská M, Collins AR. Detection of oxidised purines and UV-induced photoproducts in DNA of single cells, by inclusion of lesion-specific enzymes in the comet assay. *Altern. Lab. Anim.* 1996; 24: 405–411.
148. Moller P. Genotoxicity of environmental agents assessed by the alkaline comet assay. *Basic Clin Pharmacol Toxicol.* 2005; 96(1): 1-42.
149. Collins AR. The Comet Assay. Principles, applications, and limitations. *Methods Mol. Biol.* 2002; 203: 163-77.

150. Steel R.D, Tome J.H. Principles and procedures of statistics: a biometrical approach. 15th ed. New York:McGraw-Hill; 1980. p. 663-65.
151. Spearman C. The proof and measurement of association between two things. *Amer.J. Psychol.* 1904; 15: 72–101.
152. Daniel, Wayne W. Biostatistics. 6th ed. New York: John Wiley & Sons. 1995.
153. Commoner B, Townsend J, Pake GE, et al. Free radicals in biological materials. *Nature.* 1954; 174: 689-691.
154. Harman D. Anging: a theory based on free radical and radiation chemistry. *J Gerontol.* 1956; 11: 298-300.
155. Dalle-Donne I, Giustarini D, Colombo R, Rossi R, Milzani A, et al. Protein carbonylation in human diseases. *Trends in Mol Med.* 2003; 9:169-176.
156. Mayer B, Zitta S, Greilberger J, Holzer H, Reibnegger G, Hermetter A, Oettl K, et al. Effects of hemodialysis on the antioxidative properties of serum. *Biochim Biophys Acta.* 2003; 1638: 267-272.
157. Grollman AP, Moriya M. Mutagenesis by 8-oxoguanine: an enemy within. *Trends Genet.* 1993; 9: 246-249.
158. Coussens LM, Werb Z. Inflammation and cancer. *Nature* 2002; 420: 860-867.
159. Langie SA, Knaapen AM, Houben JM, et al. The role of glutathione in the regulation of nucleotide excision repair during oxidative stress. *Toxicol Lett.* 2007;168 (3): 302-9.
160. Morocz M, Kalman J, Juhasz A, Sinko I, McGlynn AP, Downes CS, Janka Z, Rasko I, et al. Elevated levels of oxidative DNA damage in lymphocytes from patients with Alzheimer's disease. *Neurobiol. Aging.* 2002; 23: 47–53.

161. Shao L, Lin J, Huang M, Ajani JA, Wu X, et al. Predictors of esophageal cancer risk: assessment of susceptibility to DNA damage using comet assay. *Genes Chromosomes Cancer*. 2005; 44: 415–422.
162. Smith TR, Miller MS, Lohman KK, Case LD, Hu JJ, et al. DNA damage and breast cancer risk. *Carcinogenesis*. 2003; 24: 883–889.
163. Loft S, Poulsen HE. Cancer risk and oxidative DNA damage in man. *J Mol Med*. 1996; 74 (6) : 297-312.
164. Padowitz RA. Tourniquet-induced neuromuscular injury. A recent review of rabbit and clinical experiments. *Acta Orthop Scand* 1991; 245: 1-33.
165. Blaisdell FW. The pathophysiology of skeletal muscle ischemia and the reperfusion syndrome: a review. *Cardiovasc Surg* 2002; 10: 620-30.
166. Gute DC, Ishida T, Yarimizu K, et al. Inflammatory responses to ischemia and reperfusion in skeletal muscle. *Mol Cell Biochem*. 1998; 179: 169-87.
167. Lindsay TF, Liauw S, Romaschin AD, et al. The effect of ischemia/reperfusion on adenine nucleotide metabolism and xanthine oxidase production in skeletal muscle. *J Vasc Surg* 1990; 12: 8-15.
168. Concannon MJ, Kaster CG, Walsh CF, et al. Patterns of free-radical production after tourniquet ischemia: implications for the hand surgeon. *Plast Reconstr Surg* 1992; 89: 846-52.
169. Ames BN. Endogenous DNA damage as related to cancer and ageing. *Free Radic Res Commun* 1989 ; 7: 121-8.
170. Floyd RA, Schneider JE. Hydroxy free radical damage to DNA. In: Vigo-Pelfrey C, editor. *Membrane Lipid Oxidation*. Boca Raton FL: CRC Press. 1990; 1: 69-90.

171. Botto N, Rizza A, Colombo MG, et al. Evidence for DNA damage in patients with coronary artery disease. *Mutat Res* 2001; 493: 23-30.
172. Li Y, Chopp M, Jiang N, Zhang ZG, Zaloga C, et al. Induction of DNA fragmentation after 10 to 120 minutes of focal cerebral ischemia in rats. *Stroke*. 1995; 26: 1252-8.
173. Murakami K, Kondo T, Chan PH, et al. Reperfusion following focal cerebral ischemia alters distribution of neuronal cells with DNA fragmentation in mice. *Brain Res*. 1997; 751: 160-4.
174. Cordis GA, Maulik G, Bagchi D, Riedel W, Das DK, et al. Detection of oxidative DNA damage to ischemic reperfused rat hearts by 8-hydroxydeoxyguanosine formation. *J Mol Cell Cardiol*. 1998; 30: 1939-44.
175. Doetsch PW, Henner WD, Cunningham RP, Toney JH, Helland DE, et al. A highly conserved endonuclease activity present in *Escherichia coli*, bovine, and human cells recognizes oxidative DNA damage at sites of pyrimidines. *Mol. Cell Biol*. 1987; 7: 26–32.
176. Smith CC, O'Donovan MR, Martin EA, et al. hOGG1 recognizes oxidative damage using the comet assay with greater specificity than FPG or ENDIII. *Mutagenesis*. 2006; 21 :185–190.
177. Speit G, Witton-Davies T, Heepchantree W, Trenz K, Hoffmann H, et al. Investigations on the effect of cigarette smoking in the comet assay. *Mutation Research* 2003; 542: 33–42.
178. Hoffmann H, Högel J, Speit G, et al. The effect of smoking on DNA effects in the comet assay: a meta-analysis. *Mutagenesis*. 2005; 20: 455–466.

179. Dinçer Y, Saygılı Eİ, Akçay T, et al. Sigaranın DNA Hasarı ve Kan Glutasyon Düzeyi Üzerine Etkisi. T Klin Tıp Bilimleri 2003; 23: 108-111.
180. Soldatov SK, Ushakov IB. Low doses of ionizing radiation and short- and long-term hematologic changes. Med Tr Prom Ekol 1995; 9:20-23.
181. Evans HJ, Wollin TA. The menagement of urinary calculi in pregnancy. Curr Opin Urol. 2001; 11: 379-84.
182. Girardis M, Milesi S, Donato S, et al. The hemodynamic and metabolic effects of tourniquet application during knee surgery. Anesth Analg. 2000; 91: 727–731.
183. Alleva R, Tomasetti M, Solenghi MD, Stagni F, Gamberini F, Bassi A, Fornasari PM, Fanelli G, Borghi B, et al. Lymphocyte DNA damage precedes DNA repair or cell death after orthopaedic surgery under general anaesthesia. Mutagenesis. 2003; 5(18): 423-428.
184. Chandrasekhar M, Rekhadevi PV, Sailaja N, Rahman MF, Reddy JP, Mahboob M, Grover P, et al. Evaluation of genetic damage in operating room personel exposed to anaesthetic gases. Mutagenesis. 2006; 21 (4): 249-54.
185. Butterfield DA, Koppal T, Howard B, Subramaniam R, Hall N, Hensley K, Yatin S, Allen K, Aksenov M, Aksenova M, Carney J, et al. Structural and functional changes in proteins induced by free radical-mediated oxidative stress and protective action of the antioxidants N-tert-butylalpha-phenylnitrone and vitamin E. Ann N Y Acad Sci. 1998; 854: 448-462.

10. EKLER

Teşekkür

Çalışmam süresince benden her türlü desteğini esirgemeyen, bilgisine sürekli başvurduğum, çalışmama yön veren ve ilgisini her zaman hissettiğim çok değerli tez danışmanım sayın Prof. Dr. Bensu KARAHALİL'e; ayrıca her zaman değerli bilgilerine başvurduğum hocalarım sayın Prof. Dr. Ali Esat KARAKAYA'ya, sayın Prof. Dr. Sema BURGAZ'a ve sayın Prof. Dr. İsmet ÇOK'a, Yrd. Doç. Dr. Gonca ÇAKMAK DEMİRCİGİL'e;

Deneylerim süresince her zaman yardımını esirgemeyen ve büyük desteğini gördüğüm Arş. Gör. Esra EMERCE TUFAN'a, Arş. Gör. Ela KADIOĞLU'na,

Tezim süresince manevi desteğini hiçbir zaman esirgemeyen değerli annem ve babam Numan POLAT ve Sevim POLAT'a, arkadaşlarım Biyolog Deren ERAYDIN'a, Ecz. Mehtap ÖZBEK ÖZTÜRK'e,

Çalışmama gönüllü olarak katılmayı kabul eden tüm hastalara,

En içten teşekkürlerimi sunuyorum.

GAZİ ÜNİVERSİTESİ TIP FAKÜLTESİ

GENETİK MATERYAL ÜZERİNDE YAPILACAK ARAŞTIRMALAR BİLGİLENDİRİLMİŞ GÖNÜLLÜ OLUR FORMU

Araştırma Projesinin Adı: Ekstremitede İskemi-Reperfüzyon Hasarı Sonucu Oluşan Oksidatif DNA Hasarının Araştırılması

Sorumlu Araştırmacının Adı: Prof. Dr. Selçuk Bölükbaşı

Diğer Araştırmacıların Adı: Prof. Dr. Bensu Karahalil, Yrd. Doç. Dr. Alpaslan Şenköylü, Ecz. Selen Polat

Destekleyici (varsa):-

“Ekstremitede İskemi-Reperfüzyon Hasarı Sonucu Oluşan Oksidatif DNA Hasarının Araştırılması.” isimli bir çalışmada yer almak üzere davet edilmiş bulunmaktasınız. Bu çalışma, araştırma amacı ile yapılmaktadır. Çalışmaya katılma konusunda karar vermeden önce araştırmanın neden ve nasıl yapıldığını, sizinle ilgili bilgilerin nasıl kullanılacağını, çalışmanın neler içerdiğini, olası yararlarını, risklerini ve rahatsızlıklarını bilmeniz önemlidir. Lütfen aşağıdaki bilgileri dikkatlice okumak için zaman ayırın ve bu bilgileri ailenizle ve/veya doktorunuzla tartışın. Çalışma hakkında tam olarak bilgi sahibi olduktan sonra ve sorularınız cevaplandıktan sonra eğer katılmak isterseniz sizden bu formu imzalamanız istenecektir.

1. Genetik çalışmanın amacı ve dayanağı nelerdir; benden başka kaç kişi bu çalışmaya katılacak?

a. Neden özellikle bu kişi / hasta seçilmiştir?

Rahatsızlığınız nedeniyle alt ekstremitte operasyonu geçireceksiniz. Operasyon uygulaması esnasında meydana gelecek olan iskemi-reperfüzyonun neden olabileceği düşünülen hasar/komplikasyonlar ve buna karşı göstereceğiniz direnç yada hassasiyetiniz (bireysel duyarlılık) tayin edilecektir. Bu araştırma ile bu komplikasyonların minumuma indirilmesine yönelik, bireye özgü uygulamalar gerçekleştirilecektir.

b. Çalışmanın önemi ve gerekliliği nelerdir?

Oksidatif hasar ile doğrudan ilişkili olan, oksidatif hasarın onarımda rol oynayan polimorfik enzimin genotiplemesi yapılarak oksidatif hasarın onarımda enzimin rolü tespit edilecektir.

c. Çalışmaya toplam kaç kişinin katılması planlanmaktadır?

40 bireyin katılması hedeflenmektedir.

2. Bu genetik çalışmaya katılmalı mıyım?

Bu çalışmada yer alıp almamak tamamen size bağlıdır. Eğer katılmaya karar vererseniz bu yazılı bilgilendirilmiş olur formu imzalanmak için size verilecektir. Şu anda bu formu imzalarsanız bile istediğiniz herhangi bir zamanda bir neden göstermeksizin çalışmayı bırakmakta özgürsünüz. Böyle bir karar vermeniz durumunda tıbbi bakımınız bu durumdan etkilenmeyecektir.

3. Genetik araştırma nasıl yapılacaktır?

a. Hangi örnek (ler) alınacak ve nasıl alınacak ? 3-5 ml kan farklı zaman aralıklarında ve farklı günlerde alınacaktır.

b. Örnekte neler araştırılacak ? Örnekte operasyon sırasında oksidatif bir hasarın oluşup- oluşmadığı tayin edilerek, bu hasarı onaran enzimle arasında ki ilişkiye bakılacaktır..

c. Örnekler nerede çalışılacaktır? G. Ü. Eczacılık Fakültesi Farmasötik Toksikoloji laboratuvarında çalışılacaktır.

d. Genetik örneğin gelecekte nasıl imha edilmesi planlanıyor ? Elde edilen DNA örneği F. Toksikoloji Anabilim Dalının DNA envanterinde saklanacaktır. Deneyin uygulanması sırasında herhangi terslikle karşılaşp, deneyin tekrar edilmesi durumunda kullanılacaktır.

4. Tarafımdan alınan örnekler gelecekte de kullanılabilecek mi?

Tarafınızdan alınan örneğin saklanması ve ileride yapılacak diğer çalışmalarda kullanımı ancak sizin izninize tabidir. Bu örnekler uzun yıllar isminiz (kimlik bilgileriniz) korunmak ya da yok edilmek kaydı ile saklanabilir. Lütfen aşağıdaki seçeneklerden size uygun olan bir tanesini işaretleyiniz.

- 1- Tarafımdan alınan kodlanmış* örneğin yalnızca önerilen çalışma için kullanımını onaylıyorum; ileride yapılması olası diğer çalışmalar için onay vermiyorum.
- 2- Tarafımdan alınan kodlanmış örneğin yalnızca önerilen çalışma için kullanımını onaylıyorum; ileri çalışmalar için tekrar bilgilendirilmek ve yeni onay vermek istiyorum.
- 3- Tarafımdan alınan kodlanmış örneğin, araştırma konusuyla bağlantılı diğer çalışmalarda kullanımını onaylıyorum, ancak farklı çalışmalar için tekrar bilgilendirilmek ve yeni onay vermek istiyorum.

4- Tarafımdan alınan kodlanmış örneğin önerilen çalışma için kullanımını onaylıyorum, ve gelecekte de her türlü genetik çalışmada anonim (kimliğim ile bağlantısız) olarak kullanılmasını onaylıyorum.

*Kodlanmış örnek: Sizden alınan örneğe bir kod numarası verilir. Kod numarasını yalnızca araştırmacı bilir ve sizin kimlik bilgilerinize yalnızca araştırmacı ulaşabilir. Böylece kimlik bilgileriniz gizli tutulmuş olur.

5. Çalışmanın riskleri nelerdir? Herhangi bir risk söz konusu değildir. Zaten örnek alınımı operasyon öncesi gerekli testler esnasında ve operasyon sırasında alınacaktır.

6. Çalışmanın yararları nelerdir? Sunulan çalışma konusu, bu tip operasyonlarda bireye yönelik ve komplikasyonları minimuma indirebilecek yöntemlerin geliştirilmesini sağlayarak, daha az komplikasyonlu operasyonlara olanak sağlayacaktır. Mevcut çalışma sonucu komplikasyonların azaltılmasına yönelik uygulamalar yapılarak hem zaman hemde parasal kayıpların önüne geçilerek toplum ekonomisine katkıda bulunulacaktır.

7. Kişisel bilgilerim nasıl kullanılacak ?
(Bu bölüm aynen korunacaktır)

Çalışma doktorunuz, araştırmada yer alan diğer araştırmacılar ve destekleyici (varsa, *firma adını belirtiniz*) kişisel bilgilerinizi, araştırmayı ve istatistiksel analizleri yürütmek için kullanacaktır ancak kimlik bilgileriniz gizli tutulacaktır. Size ait bulgular üçüncü kişilere, onayınız dışında hiçbir şekilde açıklanmayacaktır. Çalışmanın sonunda, size ait tüm sonuçlar hakkında bilgi istemeye hakkınız olduğu gibi böyle bir bilgiyi öğrenmeyi reddetme hakkınız da vardır. Lütfen aşağıdaki kutucuklardan size uygun olanı işaretleyiniz:

Bu çalışmada elde edilecek kendimle ilgili bilgileri öğrenmek istiyorum

Bu çalışmada elde edilecek kendimle ilgili bilgileri öğrenmek istemiyorum.

Kendinizle ilgili genetik bilgiyi öğrenmeyi seçmeniz durumunda size (varsa) sağaltım ile ilgili bilgiler ve genetik danışmanlık hizmeti verilecektir.

Çalışma sonuçları çalışma bitiminde tıbbi literatürde yayınlanabilecektir ancak kimliğiniz açıklanmayacaktır.

8. Bu çalışmaya katılmamın maliyeti nedir ?

Aşağıdaki seçeneklerden uygun olan kullanılmalıdır: Çalışmaya katılmakla parasal yük altına girmeyeceksiniz ve size de herhangi bir ödeme yapılmayacaktır.

9. Çalışmanın ticari bir yönü var mıdır?

Gönüllülerden elde edilen bilgilerden, tıbbi testler ya da tedaviler geliştirilebilmesi gibi ticari bir fayda sağlanabilir. Böyle bir durum olursa, gönüllüler herhangi bir şekilde ticari gelir temin etmeyeceklerdir.

10. Göreceğim olası bir zarar durumunda ne yapılacak ? Araştırmadan dolayı katılımcının göreceği olası bir zararda bunun sorumluluğunun ve giderilmesi için gerekli her türlü tıbbi müdahalenin yapılacağını çalışmada yer alan tüm araştırmacılar temin etmektedir.

11. Daha fazla bilgi, yardım ve iletişim için kime başvurabilirim ?

Araştırma ile ilgili bir sorunuz olduğunda ya da çalışma ile ilgili ek bilgiye gereksinim duyduğunuzda aşağıdaki kişi ile lütfen iletişime geçiniz.

ADI : Prof. Dr. Selçuk Bölükbaşı
GÖREVİ : Ortopedi ve Trav. A.D. Başkanı
TELEFON : (0312) 202 55 07

(Katılımcının/Hastanın Beyanı)

GÜTF “Ortopedi ve Travmatoloji” Anabilim dalında, Prof. Dr. Selçuk Bölükbaşı Tarafından genetik bir araştırma yapılacağı belirtilerek bu araştırma ile ilgili yukarıdaki bilgiler bana aktarıldı ve ilgili metni okudum. Bu bilgilerden sonra böyle bir araştırmaya “katılımcı” olarak davet edildim.

Araştırmaya katılmam konusunda zorlayıcı bir davranışla karşılaşmış değilim. Eğer katılmayı reddedersem, bu durumun tıbbi bakımına ve hekim ile olan ilişkiye herhangi bir zarar getirmeyeceğini de biliyorum. Projenin yürütülmesi sırasında herhangi bir neden göstermeden araştırmadan çekilebilirim. *(Ancak araştırmacıları zor durumda bırakmamak için araştırmadan çekileceğimi önceden bildirmemim uygun olacağının bilincindeyim)*. Ayrıca tıbbi durumuma herhangi bir zarar verilmemesi koşuluyla araştırmacı tarafından araştırma dışı da tutulabilirim.

İster doğrudan, ister dolaylı olsun araştırma uygulamasından kaynaklanan nedenlerle meydana gelebilecek herhangi bir sağlık sorununun ortaya çıkması halinde, her türlü tıbbi girişimin sağlanacağı konusunda gerekli güvence verildi. (Bu tıbbi girişimlerle ilgili olarak parasal bir yük altına girmeyeceğim).

Araştırma sırasında bir sağlık sorunu ile karşılaştığımda; herhangi bir saatte, Prof. Dr. Selçuk Bölükbaşı, 202 55 07 nolu telefondan arayabileceğimi biliyorum.

Bana yapılan tüm açıklamaları ayrıntılarıyla anlamış bulunmaktayım. Bu koşullarla söz konusu genetik araştırmaya kendi rızamla, hiç bir baskı ve zorlama olmaksızın, gönüllülük içerisinde katılmayı kabul ediyorum.

İmzalı bu form kağıdının bir kopyası bana verilecektir.

Katılımcı

Adı, soyadı:

Adres:

Tel:

İmza:

Tarih:

Görüşme tanığı

Adı, soyadı:

Adres:

Tel:

İmza:

Tarih:

Katılımcı ile görüşen hekim

Adı soyadı, unvanı:

Adres:

Tel:

İmza:



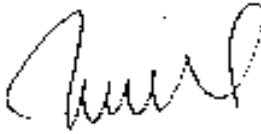
T.C.
GAZİ ÜNİVERSİTESİ TIP FAKÜLTESİ
YEREL ETİK KURULU

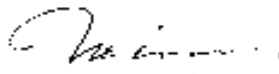
Tarih
30.01.2007

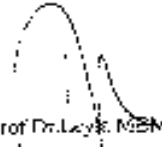
Sayı
41

Konu
Prof. Koray Karadağ Ek

Fakültemiz Öğretim Üyesi Prof.Dr. Selçuk Bölükbaşı'nın sorumlu araştırmacısı olduğu **"Ekstremitelerde İskemi-Reperfüzyon Hasarı Sonucu Oluşan Oksidatif DNA Hasarının Araştırılması"** başlıklı çalışması, Etik Kurulumuzca incelenerek uygun bulunmuştur.


Prof.Dr.Tugay GÜRSEL
BAŞKAN


Prof.Dr.Candan TÜNCER
ÜYE

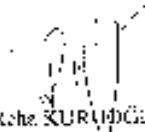

Prof.Dr.Leyla NEMS
ÜYE

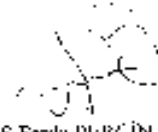

Prof.Dr.Ceyda KARADENİZ
ÜYE

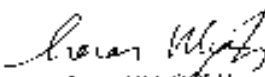
Prof.Dr. Ayşe AALIOĞLU
ÜYE(Katılmadı)


Prof.Dr.Ayşe GÜLEK
ÜYE

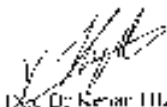

Prof.Dr.Feride ASAR
ÜYE


Prof.Dr.Rıza KURUOĞLU
ÜYE


Prof.Dr.E.Ferda PERÇİN
ÜYE


Prof.Dr.Canan HILUOĞLU
ÜYE

Prof.Dr.Nesrin ÇOBANOĞLU
ÜYE(Katılmadı)


Prof.Dr.Kenar HIZAL
ÜYE

11.ÖZGEÇMİŞ

Adı ve soyadı :Selen Polat
Ünvanı : Eczacı
Doğum yeri, tarihi : İzmir, 7 Kasım 1981
Yabancı dili : İngilizce
Medeni hali : Bekar
İş Adresi : Hacettepe Üniversitesi Hastaneleri B Katı
Büyük Eczanesi, Sıhhiye, Ankara
Ev adresi :Erzurum Kongresi cad. Altay Mah. KC
Metrokent Konutları A1/41 Eryaman,
Ankara
Telefon : (iş) 0312 305 12 81
(ev) 0312 281 28 23
(cep) 0536 255 09 94
e-mail : selenplt@mynet.com
EĞİTİM:
1988-1993 :İlköğrenim
Cumhuriyet İlköğretim Okulu, Bandırma
1993-1996 :Ortaöğretim
Bandırma Ortaokulu, Bandırma
1996-2000 :Lise öğrenimi
Ziya Gökalp Yabancı Dil Ağırlıklı Lisesi,
Diyarbakır
2001-2005 :Gazi Üniversitesi Eczacılık Fakültesi,
Ankara
2005- :Gazi Üniversitesi Eczacılık Fakültesi
Farmasötik Toksikoloji Anabilim Dalı, Ankara