

# Serbest Oksijen Radikal Temizleyici Olarak Aprotinin'in Rolü (Deneysel Çalışma)

Dr. I. Derya Yavaş\*, Dr. Mustafa Zengin\*, Dr. İslam Kaklıkaya\*, Dr. Zerrin Uzun\*\*, Dr. Asım Ören\*\*\*, Dr. M. Cengiz Elşin\*\*, Dr. Orhan Değer\*, Dr. Fahri Özcan\*

\*Karadeniz Teknik Üniversitesi Tıp Fakültesi Göğüs Kalp Damar Cerrahisi ABD

\*\* Karadeniz Teknik Üniversitesi Tıp Fakültesi Patoloji ABD

\*\*\* Karadeniz Teknik Üniversitesi Tıp Fakültesi Biyokimya ABD-Trabzon

İskemi ve reperfüzyon sonrası oluşan hasarın önlenmesi konusunda yapılan çalışmalar gittikçe artmaktadır. İskeminin kendisinin neden olduğu patolojik değişiklikler ve iskeminin tedavi fazında reperfüzyon sonrası ortaya çıkan serbest oksijen radikallerinin neden olduğu mortalite ve morbidite oranlarının yüksek oluşu çalışmaları serbest oksijen radikalleri üzerine yoğunlaştırmıştır.

Bu çalışmamızda, bir protez inhibitörü olan aprotinin'in reperfüzyondaki tavşan iskelet kası üzerindeki histolojik ve biokimyasal etkilerini saptamak, ayrıca radikal temizleyici etkileri deneysel olarak kanıtlanmış olan süperoksit dismutaz (SOD) ve katalaz (CAT)'ın etkileri ile karşılaştırılması amaçlanmıştır.

GKD Cer. Derg. 1994; 2:208-215

## The Role of Aprotinin as A Oxygen Free Radical Scavenger

Studies that are made in preventing damage after associated with ischemia and reperffuzion are incereasing rapidly. The highness of mortality and morbidity proportion which free oxygen radicals causes during reperffusion and the treatment of ischemia and the patologic changes because of ischmea, itself have concentrated on studies of free oxygen radials.

In this study, the aim is to expound the histologic and biochemical effects of Aprotinin which is a proteaz enzyme inhibitory, on the rabbit skeleton muscle in reperfusion, and to compare with the effects of superoxide dismutase (SOD) and catalase (CAT) which of their radical scavenger effects were proved experimantally.

İskemiye bağlı olarak gelişen patolojik değişiklikler ölüm nedenleri içinde birinci sırayı almaktadır<sup>(16,40,55)</sup>. Özellikle iskemik kalp hastalıkları ve serebral iskemi en ciddi komplikasyonların başında yer almaktadır. Alt ekstremitte iskemilerine seconder olarak gelişen iskemik-metabolik sendromlarda mortalite ve morbidite hızları, bu konuda kayda değer ilerlemelere karşın, hala yüksektir<sup>(4,10,25,35)</sup>. Alt ekstremitte uzun süre iskemik şartlarda kalabilir. Bu iskemi nedeniyle rabdomiyolozis oluşmakta ve reperfüzyon fazında ise serbest oksijen radikallerinin etkileri ve nekroz alanları daha da

artmaktadır<sup>(1,3,5,6,12,13,50)</sup>. Bu patolojik değişiklikler nedeniyle oluşan metabolik sendromlar ekstremitte kaybı ve ölümlerle sonuçlanabilmektedir<sup>(4,55)</sup>. Reperfüzyon fazında büyük miktarlarda serbest oksijen radikallerinin açığa çıkması ve patolojik değişikliklerin bu radikallerin miktarına bağlı olması nedeniyle sayısız çalışmalarla serbest oksijen radikal temizleyiciler (scavenger) araştırılmıştır<sup>(1,6,7,9)</sup>.

Serbest radikal, dış orbitalinde tek sayıda elektron bulunan bir atom veya moleküldür. Dış orbitalde iki ile bölünmeyen elektron varlığı, atom veya molekülü reaktif kılar<sup>(9)</sup>. Canlılığın

devamının zorunlu bir parçası olan serbest oksijen radikalleri, sayısız enzimatik reaksiyon ve biyolojik fonksiyon için gereklidir. Ancak reperfüzyon gibi bazı patolojik durumlarda aşırı miktarlarda ortaya çıkarak hücresel hedeflere zararlı etkilerde bulunurlar. Serbest radikallerin başlıca kaynağı moleküler oksijendir<sup>(2,9)</sup>. Oksijenin redüksiyonu ile, negatif yüklü bir ara ürün olan süperoksit radikali ortaya çıkar. Bu radikalden spontan ya da enzimatik dismutasyon ile, ikinci bir ara ürün, hidrojen peroksit ortaya çıkar. Yine bir dizi reaksiyon sonucu hidroksil radikali meydana gelir<sup>(9,14)</sup>.

Bu çalışmada, bir protez inhibitörü olan aprotinin'in reperfüzyondaki tavşan iskelet kası üzerindeki histolojik ve biyokimyasal etkilerini saptamak, ayrıca radikal temizleyici etkileri deneysel olarak kanıtlanmış süperoksiddismutaz (SOD) ve katalaz (CAT)'in etkileri deneysel olarak kanıtlanmış süperoksiddismutaz (SOD) ve katalaz (CAT)'in etkileri ile karşılaştırılması amaçlanmıştır.

## Materyal ve Metod

Çalışma Karadeniz Teknik Üniversitesi Tıp Fakültesi Cerrahi Araştırma ve Uygulama Laboratuvarı'nda, Yeni Zelanda türü erkek tavşanlar üzerinde yapıldı.

Çalışmamızda, Rektus Femoris kasının medial kısmında iskemi ve reperfüzyon

oluşturdu. 30 tavşan denek olarak kullanıldı. Tavşanların ağırlığı 2.6-3.4 kg arasında ve ortalama 3.1 kg idi. Tüm tavşanların sağ alt ekstremitesinde çalıştı. Tavşanlar 6 gruba ayrıldı (Tablo 1). Tavşanların Rektus Femoris adelesi, Medial ve anterolateral, parça olarak iki kısımdan meydana gelir<sup>(57)</sup>. Rektus Femoris kasına sartorius kası rezeke edilerek ulaşılır. Çalıştığımız Medial parçanın arteriyel akımı Femoral arterden gelen küçük bir dalla sağlanır (Çapı 0.8 mm). Resim 1'de Rektus Femoris kasının medial kısmı görülmektedir. Tavşanların anestezisi, 20 mg/kg ketamin ve 20 mg/kg pentotal, intraperitoneal enjekte edilerek sağlandı. İzotonik NaCl solusyonu 3 ml/kg/saat hızda intravenöz verildi. Tavşanlar cerrahi girişim sırasında heparinize (400 ü/kg) edildi. Çalışmamız oda sıcaklığında yapıldı. Tavşanlar, abdomen ortasından dize kadar traş edildi. Cerrahi saha povidon (%10 polivinil piroidon-iyot kompleksi) ile boyandı. Sağ uyluğun venteromedialinde uzunluğuna insizyon yapıldı. Fasia geçildikten sonra, Rektus Femoris kasının medial kısmı, sadece damar sinir paketi korunarak, insersiyosu kesildi ve çevre dokudan serbestleştirildi. Distal tendon tekrar insersiyosuna dikildi. Kasa ait arter ven ve sinir hasarı oluşturmadan, oklude edildi (Resim 2). İskemi süresinin sonunda kasa ait arter tekrar eksplore edilerek okluzyona son verildi. Reperfüzyon süresi bitiminde, kas eksplore edilerek, histolojik ve biyokimyasal amaçlı kas ve kan numuneleri alındı. Alınan kas numunesinin biyokimyasal analiz amaçlı bir kısmı likit hitrojenle dolduruldu, analiz hemen yapıldı. Alınan iskelet kası biyopsisinde, ATP, Laktat, Malondialdehid (MDA), ksantin oksidaz (XO), kreatin kinaz, laktat dehidrogenaz (LDH) tayinleri yapıldı.

MDA, Laktat ve ATP tayini için 0.400 gr kuru doku tartılarak, 4 ml 2 molar perklorik asitle 30 saniyede ekstrakte edildi. Metil timol blue indikatör olarak kullanılarak K HCO<sub>3</sub> ile homojenat nötralize edildi. Homojenat +4

Tablo 1. Deneç Grubları

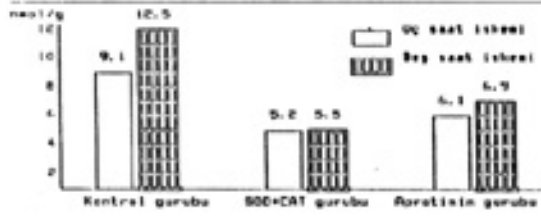
1. Grup:	Kontrol Grubu (3 Tavşan) Üç Saat iskemi + Üç saat reperfüzyon
2. Grup:	Kontrol Grubu (3 Tavşan) Beş saat iskemi + Üç saat reperfüzyon
3. Grup:	SOD+CAT Grubu (6 Tavşan) Üç saat iskemi + Üç saat reperfüzyon
4. Grup:	SOD+CAT Grubu (6 Tavşan) Beş saat iskemi + Üç saat reperfüzyon
5. Grup:	APROTININ Grubu (6 Tavşan) Üç saat iskemi + Üç saat reperfüzyon
6. Grup:	APROTININ Grubu (6 Tavşan) Beş saat iskemi + Üç saat reperfüzyon



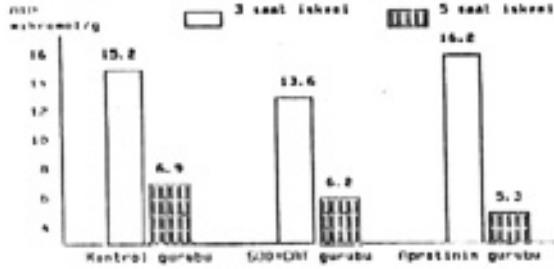
Resim 1. Rectus Femoris kasının medial kısmı (x1)



Resim 2. Medial Rectus Femoris kas arterinin okluzyonu (x1)



**Tablo 2. Malondialdehid (MDA) Aktivitesi**



**Tablo 4. ATP Düzeyleri**

derecede 30 dakikada santrifüje edildikten sonra süpernatantta enzim analizleri yapıldı.

Ksantin oksidaz, laktat dehidrogenaz ve kreatin kinaz ölçümleri için 0.400 gr kuru doku tartılıp 2.5 ml 0.1 molar pH 7.4 fosfat tamponunda 14 derecede 30 saniyede ekstraksiyon yapıldı. 30 dakika santrifugasyondan sonra süpernatantta enzim analizleri yapıldı.

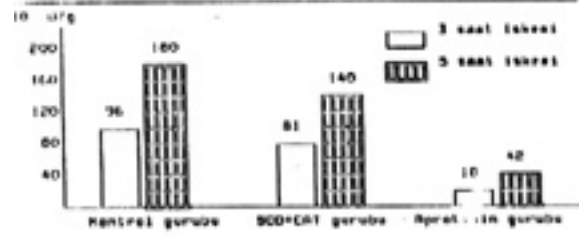
ATP ve laktat tayininde, Sigma diagnostics'in kantitatif, spektrofotometrik yöntemi kullanıldı. Malondialdehid (MDA) tayini, Thio-barbitürükasid metodu kullanılarak spektrofotometrik olarak yapıldı (60). Ksantin oksidaz tayini Bergmeyer yöntemi ile enzimatik olarak yapıldı (3). Kreatin kinaz ve laktat dehidrogenaz tayinleri ise sclavo kitleri ile manuel olarak yapıldı.

Deneyden sonra histolojik incelemeye alınacak dokular %10 tamponlu nötral formalin fiksyonundan sonra rutin işlemlerden geçirilerek parafine gömüldü. Örnekler kas liflerinin enine ve boyuna kesitlerini görebilecek şekilde alındı. 5-6 mikron kalınlığındaki kesitler Hemotoxylin ve Eosin, Phosphotungstic acit hemotoxylin (PTAH), Van Gieson ve PAS (Periodic Acid Schiff) ile boyandı. Daha sonra preparatlar ışık mikroskobu ile incelendi.

Biyokimyasal verilen istatistiksel analizi Student's t-test kullanılarak yapıldı.

## Bulgular

**Malondialdehid Aktivitesi:** Hidroksil radikal monitarizasyonu, malondialdehid



**Tablo 3. Ksantin Oksidaz Aktivitesi**

yöntemi ile yapıldı<sup>(62)</sup>. Deoksiriboz'dan hidroksil radikali etkisiyle oluşan malondialdehid spektrofotometrik olarak ölçüldü. MDA aktivitesi, kontrol gruplarına göre SOD+CAT tedavi gruplarında %49 azalmış, aprotinin verilen gruplarda %39 azalmış olduğu saptandı (p<0.05) (Tablo 2).

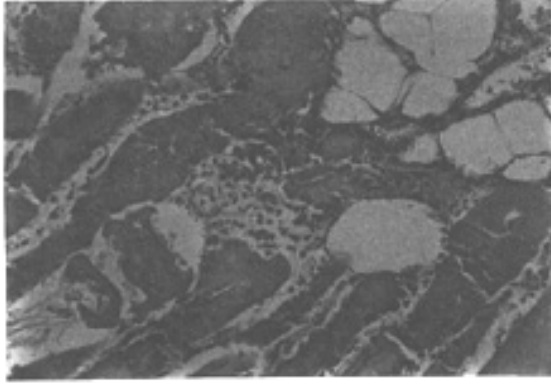
**Ksantin Oksidaz Aktivitesi:** Kontrol grupları, SOD+CAT grupları, Aprotinin grupları arasında anlamlı bir fark olduğu görüldü (p<0.05). Ksantin oksidaz aktivitesi, kontrol gruplarına göre SOD+CAT gruplarında %21 oranında azalmış saptanırken aprotinin gruplarında %77 oranında azalmış olarak bulundu. Bu sonuçlarla aprotinin, iskemik kas dokusunda ksantin oksidaz oluşumunu önlemede yüksek derecede etkili olduğu saptanmış oldu (Tablo).

**ATP Düzeyi:** ATP düzeyleri, beş saatlik iskemi gruplarında üç saatlik iskemi gruplarına göre %59 oranında azalmış olarak saptandı (p<0.01). SOD+CAT ve aprotinin'in ATP düzeyine etkili olmadığı görüldü. Deney gruplarının reperfüzyon sonrası iskelet kası numunesinde saptanan ATP düzeyleri Tablo 4'de görülmektedir.

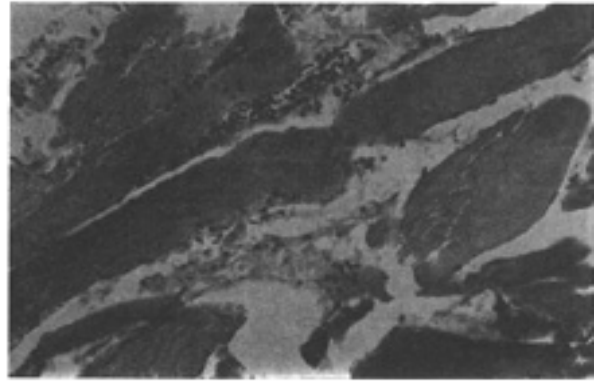
**Laktat Aktivitesi:** Grupların iskelet kas dokusu laktat düzeyleri tablo 5'de görülmektedir. Üç beş saatlik iskemi sürelerinin laktat düzeyinde anlamlı bir değişiklik oluşturmadığı saptandı.

Gruplar arasında iskelet kas dokusundaki kreatin Fosfokinaz (CPK), Laktat dehidrogenaz (LDH) ölçüm sonuçlarının anlamlı olmadığı gözlemlendi.

**Üç saatlik iskemi+reperfüzyon gruplarının ışık mikroskopisi incelenmesinde:** Beş saatlik iskemi gruplarına göre, genellikle kas liflerinde çizgilenmenin korunduğu gözlemlendi. İnterstisyumda ödem ve lökosit birikimi her orguda saptanan bulgulardı. Histolojik olarak, SOD+CAT grubunda daha az değişiklikler saptandı. Üç saat iskemi oluşturulan kontrol grubunda, yer yer çizgilenmenin kaybı ve interstisyumda iltihabi hücre infiltrasyonu Resim 3'de görülmektedir. Aprotinin grubunda çizgilenmenin çoğunlukla korunduğu fakat



**Resim 3.** Yer yer çizgilenmenin kaybı ve interstisyumda yoğun iltihabi hücre infiltrasyonu görülmektedir. (Grup 1) (HE x 200)



**Resim 4.** Genellikle çizgilenme korunmuş, damar lümeninde lökosit birikimi izlenmektedir. (Grup 5) (HE x 200)

interstisyel ödem ve lökosit birimi saptandı (Resim 4).

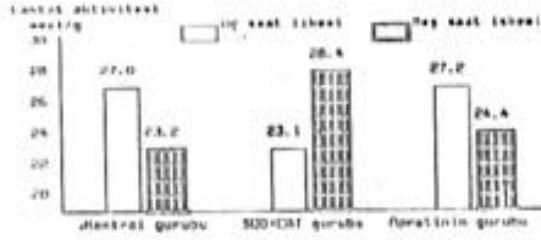
Beş saat iskemi+reperfüzyon gruplarında; Kontrol grubunda daha belirgin olmak üzere, tüm gruplarda nekroz alanları vardı. Kontrol grubuna ileri derecede kas nekrozu saptanırken, aprotinin ve SOD+CAT gruplarında nekroz alanlarının çok daha az olduğu gözlemlendi. Üç saatlik gruplara göre, beş saatlik kontrol grubunda, belirgin olarak çizgilenmenin bozulduğu, ödemin arttığı ve lökosit birikiminin arttığı saptandı (Resim5).

### Tartışma

İskemi süresince gelişen karmaşık reaksiyonlarla oluşan doku hasarı reperfüzyonda daha da artmakta ve katastrofik sonuçlara neden olabilmektedir<sup>(39)</sup>. Günümüzde iskemi ve reperfüzyon hasarının patofizyolojisi ve bu hasarı azaltmak amaçlı birçok deneysel çalışmalar yapılmaktadır. Son araştırmalar, birçok dokuda, iskemi ve reperfüzyon hasarının komplement aktivasyonuna, nötrofil sekestrasyonuna ve serbest radikal oluşumuna bağlı olduğunu göstermiştir<sup>(30,36,47,52)</sup>. Bunlardan özellikle, superoksit radikali, hidroksil radikali ve hidrojenperoksit gibi reaktif oksijen ara ürünleri, birçok patofizyolojik durumların oluşmasında birinci derecede rol oynarlar<sup>(11,14,16,18,19,30,41,42)</sup>. Bu hasarın reperfüzyon komponentini azaltmak için çeşitli terapötik ve farmakolojik stratejiler üzerinde çalışmalar sürmektedir. Çalışmamızda tavşan iskelet kasına reperfüzyonunu etkisi ve SOD, katalaz, aprotinin koruyucu etkileri biyokimyasal ve histolojik olarak araştırıldı ve karşılaştırıldı.

Akut arter oklüzyonlarında, serum sodyumu genellikle normal sınırlardadır. Buna karşın serum potasyumu özellikle klemp kaldırıldıktan sonra, yüksek düzeylere ulaşır<sup>(10,22,37)</sup>. Serum

potasyumundaki bu yükselme kardiyak fonksiyonları tehlikeye sokacak kadar olabilir. Revaskülarizasyon öncesinde sistemik venöz kanda serum kreatin fosfokinaz (CPK) düzeyinde önemsiz derecede yükselme olur<sup>(5,46)</sup>. Klempin kaldırılmasını takiben CP düzeyinde yükselme saptanır<sup>(33,46)</sup>. Bu enzimin yükselmesi çizgili kas harabiyetinin iyi bir göstergesidir<sup>(21,22,31)</sup>. Çok yüksek düzeylerdeki CPK ise kas dokusundaki nekroz lehine bulgudur<sup>(6,42,46)</sup>. Hafif CPK yükseklikleri revaskülarizasyonu takiben 1-2 saat ile 1-2 gün içinde normal değerlerine düşer<sup>(46-47)</sup>. Orta derecedeki iskemik hasarda serum CPK yükselmesi ilk birkaç günlük periyotta 1000-2000 Ü'ye kadar yükselir. 1-12 günde normal seviyeye kadar düşer<sup>(21,22,46)</sup> serum laktat dehidrogenaz (LDH) ve glutamik oksaloasetik transaminaz (SGOT) seviyeleri tüm iskemik formlarda yükselir<sup>(21,22)</sup>. İleri derecede kas harabiyeti olduğunda transaminaların yüksek seviyelerini korumaları irreversibil doku değişikliğini gösterir<sup>(22)</sup>. Bu enzimlerin normal seviyelere inmeleri kas hasarının resolusyonunun düşündürür<sup>(22,46)</sup>. Revaskülarizasyon fazında çeşitli oranlarda miyoglobüri, miyoglobinemi, serum kalsiyum değişiklikleri ve akut renal yetmezlik oluşabilmektedir<sup>(23)</sup>. Reperfüzyon fazında ise serbest oksijen radikallerinin indüklenmesi ile nekroz alanları artar ve bunun sonucunda daha komplike tablolar ortaya çıkar<sup>(1,3,6,12,17,18,21)</sup>. Korthuis ve Harris uzun süreli eskimi sonrası reperfüzyonun myokard, barsak, beyin ve böbrek gibi dokularda morfolojik değişikliklere neden olduğunu göstermişlerdir<sup>(23,29,30)</sup>. Korthuis, vasküler permeabilite artmasında, spesifik oksijen radikal temizleyici kullanıldığında, aktif oksijen ürünlerinin üretiminin engellendiğini göstermiştir<sup>(30)</sup>. Bu çalışmaya göre, ATP AMP'ye iskemi süresince dönüşmekte ve MAP seviyesi arttığında, AMP hipoksantin tarafından katabolize edilmektedir. Ksantin oksidaz normalde hücrede NAD+kastin



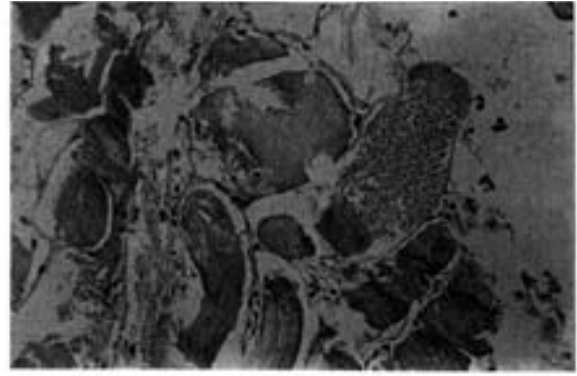
Tablo 5. Laktat Aktivitesi

dehidrogenaz şeklinde bulunur, hipoksizde bir proteaz gibi aktivite kazanır<sup>(8,27,40,41,44)</sup>.

Hayvan deneylerinde, iskelet kası iskemisi turnike ile oluşturulabilir. Alt ekstremitede turnike yapılarak iskelet kası oluşturulmasının birçok sakıncası vardır<sup>(31)</sup>. Turnike tam olarak kan akımını oklude edemeyebilir ve turnike altında kalan kasta travmatik hasar oluşabilir. Ayrıca reperfüzyona uğratan kas kitlesinin büyük hacminde olması sistematik toksisitenin oluşmasını kolaylaştırır<sup>(31)</sup>. Tavşan ya da sıçanların iliak arter ligasyonu da benzer sakıncalar içermektedir. Birçok araştırmacı, izole kas iskemisi oluşturmak için köpek gracilis kasını kullanmışlardır. Deneyimizde kullanılan rektus femoris kası kolay hazırlanması tek pediküllü olması ve analizler için yeterli kas kitlesinin olması nedeniyle, iskelet-reperfüzyon alışmaları için iyi bir izole kas modelidir.

Artmış iskelet sürelerinde iskelet kasında hücrelerde enerji depoları boşalır ve ATP resepteğinde yetmezlik oluşur 45 dakikalık reperfüzyonu takiben, enerji depolarının kısmen dolduğunu göstermişlerdir<sup>(36)</sup>. Rubin ise reperfüzyonun ikinci gününde bile CTP, ATP, ECP gibi yüksek enerji fosfatlarının bazal seviyenin altında olduklarını saptamışlardır<sup>(46)</sup>. Hayes ve arkadaşları, MgCl+ATP tedavisi ile iskelet kasında nekroz alanlarını azalttığını fakat ATP düzeyini yükseltmediğini saptamışlardır<sup>(24)</sup>. Altı saatlik iskeminin irreversibil doku hasarı yaptığı ve reperfüzyonda adenin nükleotidlerin reseptezinin olmadığı gösterilmiştir<sup>(63)</sup>. Çalışmamızda, beş saatlik iskelet sürelerinde, üç saatlik iskelet sürelerine göre %59 oranında azalma saptandı. Eşit iskelet süreli kontrol grupları ile tedavi grupları arasında anlamlı bir fark bulunmadı. İskelet süresinin ATP düzeyi üzerindeki olumsuz etkisinin çalışmamızda saptanması derin iskemiyi sağlandığını göstermektedir.

Kaliteli sikluslar sırasında birçok enzim serbest radikallerin ortaya çıkmasını sağlar. Bunlar arasında üzerinde en çok çalışılan ksantin

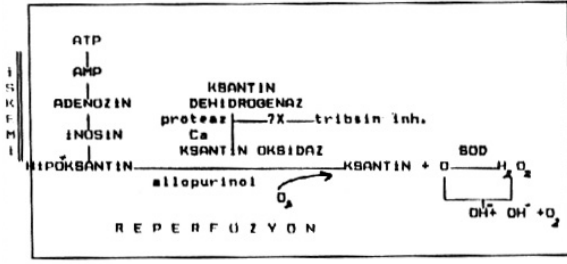


Resim 5. İleri derecede kas nekrozu yanı sıra çizgilenmenin kaybı ve interstisyel ödem. (Grup 2) (HE x 200)

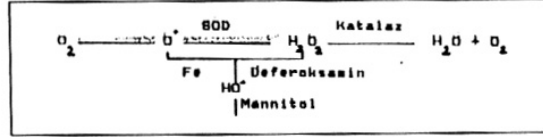
oksidaz olup iskemide ksantin dehidrogenaz formundan oksidaz formuna dönüşürken süperoksid radikali ortaya çıkar<sup>(2,9,40)</sup>. Ksantin oksidaz, serbest radikal oluşumunda önemli bir basamaktır (Şekil 1, Şekil 2). Roy ve arkadaşları, sıçan barsağında, iskemiyi ilk dakikasında ksantin dehidrogenazın tamamen ksantin oksidaz'a dönüştüğünü göstermişlerdir<sup>(44)</sup>.

Ksantin oksidaz bilinen ilk süperoksid radikali kaynağıdır<sup>(39)</sup>. Bu enzimin doğal formu olan ksantin dehidrogenaz, süperoksid radikali oluşturmaz<sup>(2)</sup>. İskemiyeye bağlı olarak ksantin dehidrogenaz'dan ksantin oksidaz'a dönüşüm deneysel olarak sıçanların birçok organında gösterilmiştir<sup>(26,39)</sup>. Allopurinol'ün ksantin oksidaz iskelet kasında enzimatik olarak ölçüldü. Ksantin oksidaz, kontrol grubuna göre, aprotinin kullanılan deneklerde %77 oranında azalmış olarak saptandı. SOT+CAT grubunda ise azalma %21 kadardı. Bu sonuçla, iskelet kasındaki reperfüzyon hasarının oluşmasında ksantin oksidaz kaynaklı serbest radikallerin etkili olduklarını göstermekle birlikte, başka kaynaklı serbest radikal olabileceğini de ortaya koymaktadır. Aktive lökositlerden kaynaklanan serbest radikaller iskelet kası hasarını oluşturmada etkili olabilirler, ancak bu konuda henüz yeterli araştırma yoktur.

Ksantin dehidrogenaz moleküler oksijenden serbest radikal oluşumu için gerekli elektron transferini yapamaz. İskelet nedeniyle hücre enerji üretimi azalmakta ve bozulan membran fonksiyonları, hücre içi kalsiyum düzeyinin artmasına neden olmaktadır. Hücre içi yüksek kalsiyum düzeyi, proteaz'ı aktive ederek ksantin dehidrogenaz'ı ksantin oksidaz'a dönüştürür<sup>(28,65)</sup>. Diğer dokularda kısa sürede ksantin oksidaza dönüşüm olurken, iskelet kasında bu dönüşüm iskelet hasarında çok daha yavaş olmaktadır<sup>(40,44)</sup>. İskelet kasının bu özelliği iskemiyeye daha dayanıklı olmasını açıklamaktadır.



Şekil 1. İskemi ve reperfüzyonda Ksantin Oksidaz oluşumu



Şekil 2. Serbest oksijen radikallerinin oluşumu

Serbest radikaller protein, nükleik asit ve DNA'da yapısal bozukluklara neden olurlar<sup>(9)</sup>. Hücre membran lipidleri ile reaksiyona girerek peroksidasyon oluştururlar. Lipid peroksidasyonun, membran geçirgenliğini bozması sonucunda, radikallerin diğer hücre hasarlarına neden olduğu düşünülmektedir<sup>(11,60)</sup>. Membran poliansature yağ asit ve enzimleri, oksijen serbest radikallerinin hasarına kolaylıkla uğrayabilirler<sup>(32)</sup>. Bu hasar sonucu, membranın permeabilite ve ATP kullanımı gibi intrinsek özellikleri değişir<sup>(13)</sup>. Radikal temizleyici (scavenger) olarak adlandırılan birçok madde üzerinde yapılan araştırmalarda, scavenger'ların membran permeabilitesi üzerine olumlu etkilerinin olduğu saptanmıştır<sup>(58)</sup>. Süperoksid dismutaz (SOD), allopurinol, katalaz (CAT), mannitol ve alfatoko-ferol'ün deneysel olarak radikal temizleyici etkinlikleri kanıtlanmıştır<sup>(10,11,15,20,24,48,52)</sup>. Tüm bu maddeler kasın iskemik hasarını çeşitli derecelerde önleyebilmektedirler. Hiperosmolar bir madde olan mannitol'ün iskemik hücre şişmesini önleyerek nekrozu azalttığı düşünülmektedir<sup>(21,22)</sup>. Spesifik kompetitif ksantin oksidaz inhibitörü olan alopurinol'ün en az SOD kadar reperfüzyon hasarını önlediği gösterilmiştir<sup>(36,41,42)</sup>. İskemide, ksantin dehidrogenaz'dan ksantin oksidaz'a hızlı dönüşüm proteaz inhibitörleri ile tamamen önlenmektedir<sup>(7)</sup>. Dadoukis ve arkadaşları, köpeklerde splenik arter oklüzyonunda, tripsin inhibitörünün mukozal lezyonu azalttığını, kedilerde ise vasküler permeabilite artışını önlediğini saptamışlardır<sup>(9)</sup>. Parks ve arkadaşları, kedi ince barsak iskemisinde, vasküler permeabilite artışının SOD, allopurinol, dimetilsülfoksit (DMSO) ve tripsin antagonisti tedavisi ile önlediğini göstermişlerdir<sup>(42,43,56)</sup>.

Malondialdehid, oluşan serbest oksijen radikallerinin iyi bir göstergesidir<sup>(19,35,64)</sup>. Ma-

londialdehid yükselmesi, serbest oksijen radikallerinin atkesi ile artmış lipid peroksidasyonunu gösterir<sup>(6)</sup>. Lipid peroksidasyon, organik yapılar ve membranların fonksiyonları üzerine çok zararlı etkilerine bağlı olarak, hücre ölümüne kadar ilerleyen değişiklikler oluşturur. Çalışmamızda malondialdehid, kontrol grubuna göre aprotinin verilen grupta %39, SOD+CAT grubunda %49 oranında azalmış olarak saptandı.

Laktat, iskemi süresince artar ve reperfüzyonun 15. dakikasından itibaren düşme eğilimi gösterir<sup>(46)</sup>. Kuzon ve arkadaşları, yedi saatlik iskemi ve dört saatlik reperfüzyon süresince, doku laktat seviyesini iki saat ara ile takibinde, laktat seviyelerinin kararlı seyretmediğini göstermişlerdir<sup>(31)</sup>. Çalışmamızda, her grupta üç saatlik reperfüzyon sonrasında dokuda laktat seviyesi ölçüldü. Gruplar arasında anlamlı laktat düzeyi farkı saptanmadı. Laktat hücre hasarının major bir determinantı olmadığı ve yapılan cerrahi girişimin laktat seviyesini çok değiştirebileceği düşünüldü.

Rubin ve arkadaşları, iskelet kası reperfüzyonunda progressif CPK artışının, serbest radikal ve lökosit sekestrasyonuna bağlı olarak devam eden kas hücre harabiyetini gösterdiği savunulmaktadır<sup>(6,33,47)</sup>. Çalışmamızda iskelet kas dokusunda CPK aktivitesi ölçüldü. Sonuçlar istatistiksel olarak anlamlı bulunmadı.

Elektron mikroskopisinde, hücre şişmesi ve sarkoplasm ile endomysium ayrılması miyofibriler alanda genişleme, glikojen granüllerin kaybı ve mitokondria dejenasyonu görülmüştür<sup>(24,31,41)</sup>. Nekroz, interstisyel ödem ve lökosit birimi, kas liflerinde çizgilenmenin kaybı, iskemi ve reperfüzyonun iskelet kası hasarının ışık mikroskopisi bulgularıdır<sup>(22)</sup>. Reperfüzyon çalışmalarında elektron mikroskopisinin değeri tartışılmaz. Biz çalışmamızda ışık mikroskopisi kullandık. İnterstisyel ödem iskemide ve reperfüzyonda mikrovasküler permeabilite değişikliğini gösterir<sup>(41)</sup>. Çalışmamızda, her grupta interstisyel ödem saptandı. Beş saatlik iskemi gruplarında, üç saatlik gruplara göre belirgin ödem artışı saptanırken, kontrol grupları ile tedavi grupları arasında belirgin fark görülmedi. İskelet kası nekrozu iskemi ve reperfüzyonun uzamış sürelerinde ortaya çıkmaktadır<sup>(34)</sup>. Rubin ve arkadaşları çalışmalarında, nekroz miktarının, adenin nükleotid resentezindeki yeterlilikle ilişkili olduğunu göstermişlerdir<sup>(13,46)</sup>. Çalışmamızda, üç saatlik iskemi gruplarında nekroz saptanmadı. Bu

gruplarda minimal interstisiyel ödem ve lökosit birikimi saptadığımız patolojik bulgulardı.

SOD+CAT grubu ve aprotinin grubunda bu mikroskopik bulguları daha az olarak saptadık. Beş saatlik iskele gruplarında, özellikle kontrol grubunda geniş nekroz alanları gözlemlendi. Kas dokusu malondialdehid ve ATP düzeyleri nekroz mikra ile korelasyon gösterdi. Kontrol ve aprotinin gruplarımızda, interstisium ve damar lümeninde bol lökosit saptanırken, SOD+CAT gruplarında minimal lökosit artışı görüldü.

## Sonuçlar

1. Tavşan Rectus Femoris'in medial kısmı iskele+reperfüzyon çalışmaları için iyi kas modelidir.
2. İskele süresi, kas hasarını birinci derecede etkiler.
3. Ksantin Oksidaz kanaklı serbest radikallere iskele kası reperfüzyon hasarı oluşmasında etkindir.
4. İskele kasında diğer serbest radikal kaynaklarının etkinliği olasıdır.
5. Süperoksiddismutaz ve katalaz radikal bağlayıcılarıdır.
6. Aprotinin, ksantin oksidaz aktivitesini azaltır. Bu etkisi ile reperfüzyon hasarını önlemede etkindir.
7. SOD, CAT ve Aprotinin ATP sentezini hızlandırmazlar.
8. Kas dokusunda ölçülen laktat, kreatinfosforokinaz ve laktat dehidrogenaz seviyeleri reperfüzyon hasarı için gösterge değillerdir.

## Kaynaklar

1. Ambrosio G, Weisfeldt ML, Jacobus WE, Flaherty JT: Evidence for a reversible oxygen radical-mediated component of reperfusion injury. Reduction by recombinant human superoxide dismutase administered at the time of reflow. *Circulation* 75:282-291, 1987.
2. Battelli MC, Corte ED, Stirpe F: Xanthine oxidase type D (dehydrogenase) in the intestine and other organs of the rat. *FEBS Lett* 126:747-9, 1972.
3. Bergmeyer HU: Methods of enzymatic analysis 3-4. New York: Academic, 1974. Burton KI: Superoxide dismutase enhances recovery following myocardial ischemia. *Am J Physiol* 248 (Heart Circ Physiol) 17: H637-H643, 1985.
4. Cambria RP, Abbott W: Acute arterial thrombosis of the lower extremity: Its natural history contrasted with arterial embolism. *Arch Surg* 119:784-7, 1984.
5. Chang C, Rubin BB, Romaschin AD, Walker PM: Conjugated diene levels in postischemic skeletal muscle. *FASEB J* 4: A 1603, 1990.
6. Chittur M, Marini C, Conaro M, Ascor E: The value and limitation of iliofemoral infusion in decreasing skeletal muscle necrosis. *J Vasc Surg* 2:216-268, 1992.
7. Dadoukis J, Angouridakis K, Aletras H: The action of the basic trypsin inhibitor, Trasylol, on shock resulting from occlusion of the superior mesenteric artery: Experimental study. *J Int Med Res* 9:31-8, 1981.
8. Del Maestro RF: An approach to free radicals in medicine and biology. *Acta Physiol Scand*, Suppl. 492:153-68, 1980.
9. Erden M: Serbest Radikaller. *T Klin Top Bilimleri* 12:201-207, 1992.
10. Esato K, Nakaho H, et al: Methods of suppression of myoneuropathic metabolic syndrome. *J Cardiovasc Surg* 26:673, 1985.
11. Fantini GA, Minci JP, Perry MO, Shiono S and Shires GT: Reperfusion with superoxide dismutase improves cellular membrane function in postischemic skeletal muscle. *Surg Forum* 38:317-319, 1987.
12. Forrest I, Lindsay T, Romaschin AD, Walker PM: The rate and distribution muscle blood flow after prolonged ischemia. *J Vasc Surg* 10:83-88, 1989.
13. Freeman BA, Crapo JD: Biology of disease. Free radicals and tissue injury. *Lab Invest* 47:412-426, 1982.
14. Fridovich I: Superoxide radical: An endogenous toxicant. *Annu Rev Pharmacol Toxicol*, 23:239-57, 1983.
15. Gardner TJ, Steward JR, et al: Reduction of myocardial ischemic injury with oxygen derived free radical scavengers. *Surgery* 94:423, 1983.
16. Gragory BB: The role of oxygen free radicals in human disease processes. *Surgery* 94:3, 407, 1983.
17. Granger DN: Role of xanthine oxidase and granulocytes in ischemia-reperfusion injury. *Am J Physiol* 255. (Heart Circ Physiol) 24: H269-H275, 1988.
18. Granger DN, Hollwarth ME, Parks DA: Ischemia-reperfusion injury: Role of oxygen-derived free radicals. *Acta Physiol Scand*: 548:47-63, 1986.
19. Grill HP, Flaherty JT, Weisfeldt ML, Zweifler JL: Direct measurement of free radicals in an in vivo model of regional ischemia and reperfusion. *Circulation* 76. Suppl. 4:196, 1987.
20. Grover AK, Samson SE: Protection of Ca pump of coronary artery against inactivation by superoxide radical. *Am J Physiol* 256 (Cell Physiol) C 666-C 673, 1989.
21. Haimovici H: Metabolic complication of acute arterial occlusion. *J Cardiovasc Surg* 20:340, 1979.
22. Haimovici H: Muscular renal and metabolic complication of acute arterial occlusion: Myoneuropathic-metabolic syndrome. *Surgery* 85:451, 1979.
23. Harris K, Walter PM, et al: Metabolic response of skeletal muscle to ischemia. *Am J Physiol* 250:H213, 1986.
24. Hayes PC, Liauw S, Smith A, Romaschin AD, Walker PM: Exogenous magnesium chloride-adenosine triphosphate administration during reperfusion reduces the extent of necrosis in previously ischemic skeletal muscle. *J Vasc Surg* 11:144-7, 1990.
25. Hollier L: Acute arterial occlusion. *Cardiovasc Clin* 13:3, 1983.
26. Hiroki O, Ichiara K, Abiko Y: Role of oxygen radicals in canine myocardial metabolic derangement during regional ischemia. *Am J Physiol* 262 (Heart Circ Physiol) 31: H1553-H1561, 1992.
27. Kim MS, Akera T: Oxygen free radicals: Cause of ischemia-reperfusion injury to cardiac Na-K-ATPase. *Am J Physiol* 252 (Heart Circ Physiol) 21: H252 - H257, 1987.
28. Kishimoto A, Kajikawa N, Tabuchi H, Shiota M, Nishizuka Y: Calcium dependent neutral proteases, widespread occurrence of a species of protease, active at lower concentrations of calcium. *J Biochem*, 90:889-92, 1981.
29. Korthuis RJ, Grisham MB, Zimmerman BJ, Granger ND, Taylor AE: Vascular injury in dogs during ischemia/reperfusion: Improvement with ATP-MgCl pretreatment. *Am J Physiol* 254: H1702-8, 1988.
30. Korthuis RJ, Granger DN, et al: The role of oxygen derived free radicals in ischemia induced increases in canine skeletal muscle vascular permeability. *Cir Res* 57:599, 1985.
31. Kuzon W, Walker PM, Mickle D, Harris K, Pynn B, McKee N: An isolated skeletal muscle model suitable of acute ischemic studies. *J Surg Res* 41:24-32, 1986.
32. Kramer JH, Mak IT, Wegglicki WB: Differential sensitivity of canine cardiac sarcolemmal and microsomal enzymes to inhibition by free radical induced lipid peroxidation. *Cir Res* 55:120-124, 1984.

33. Kviety PR, Inaven W, Bacon BR, Grisham MB: Xanthine oxidase induced injury to endothelium: Role of intracellular iron and hydroxyl radical. *Am J Physiol* 257 (Heart Circ Physiol 26) H1640-H1646, 1989.
34. Labbe R, Gaitley R, Lindsay T, Romaschin AD, Mickle D, Wilson G, Howle S, Walker PM: Quantitation of postischemic skeletal muscle necrosis: Histochemical and radioisotope techniques. *J Surg Res* 44:45-56, 1987.
35. Lindsay T, Walker PM, Mickle D, Romaschine AD: Measurement of hydroxy-conjugated dienes after ischemia-reperfusion in canine skeletal muscle. *Am J Physiol* 254 (Heart Circ Physiol 23) H1578-H1583, 1988.
36. Lindsay T, Liauw AD, Romaschin AD, Walker PM: Effect of ischemia/reperfusion on adenine nucleotide metabolism and xanthine oxidase production in skeletal muscle. *J Vasc Surg* 12:8-15, 1990.
37. Littooy FN, Baker WH: Acute aortic occlusion: A multifaceted catastrophe. *J Vasc Surg* 4:24, 1986.
38. McCord JM, Fridovich I: Superoxide dismutase: An enzymic function for erythrocyte protein (hemocytin). *J Biol Chem* 244:6049, 55, 1969.
39. McCord JM: Oxygen-derived free radicals in postischemic tissue injury. *N Engl J Med* 312:159, 1985.
40. Nakaha H, Tahse N, Nanno M: Electrophysiological derangements induced by lipid peroxidation in cardiac tissue. *Am J Physiol* 253 (Heart-Circ. Physiol 22), H1089-H1097, 1987.
41. Park DA, Granger DN: Ischemia-induced microvascular changes: Role of xanthine oxidase and hydroxyl radicals. *Am J Physiol*
42. Parks DA, Bulkley GB, Granger DN: Role of oxygen free radicals in digestive tract disease. *Surgery* 415-422 sep 1983
43. Parks M, Shires E, Albert S: Cellular changes with graded limb ischemia and reperfusion. *J Vasc Surg* 1:536-540, 1984.
44. Roy RS: Mobile Ala: University of South Alabama: Role of xanthine oxidase in superoxide mediated ischemic injury, 1984.
45. Roy RS, McCord JM: Superoxide and ischemia: Conversion of xanthine dehydrogenase to xanthine oxidase. In Greenwald R, Cohen C, editors: Proceedings of the Third International Conference on Superoxides and Superoxidedismutase. New York, 1983, Elsevier/North Holland Biomedical Press, pp:145-53.
46. Rubin BB, Shinta L, Jacques T, Romaschin AD, Walker PM: Prolonged adenine nucleotide resynthesis and reperfusion injury in postischemic skeletal muscle. *Am J Physiol* 262 (Heart-circ. physiol 31) H1531-H1547, 1992.
47. Rubin BB, Smith A, Liauw S, Iseman DE, Romaschin AD, Walker PM: Complement activation and white cell sequestration in postischemic skeletal muscle. *Am J Physiol* 259 (Heart Circ. Physiol 28) H1525-H1531, 1990.
48. Robak J: Flavonoids are scavengers of superoxide anions. *Biochem. Pharmacol* 1988.
49. Rubanyi GM: Vascular effect of oxygen derived free radicals. *Free Radicals Biol Med* 4:107-120, 1988.
50. Rutherford R: Nutrient bed protection during lower extremity arterial reconstruction. *J Vasc Surg* 5:529-553, 1987.
51. Sexton WL, Korthuis RJ, Laughling MH: Ischemia-reperfusion injury in isolated rat hindquarters. *J Appl Physiol* 68:387-392, 1990.
52. Smith JK, Grisham MB, Granger DN, Korthuis RJ: Free radical defence mechanisms and neutrophil infiltration in postischemic skeletal muscle. *Am J Physiol* 256 (Heart Circ Physiol 25) H1789-H1793, 1989.
53. Suzuki YJ, Ford GD: Inhibition of the Ca-ATPase of the vascular smooth muscle sarcoplasmic reticulum by reactive oxygen intermediates. *Am J Physiol* 261 (Heart Circ Physiol 30) H1568-H1574, 1991.
54. Suzuki YJ, Ford GD: Superoxide stimulated IP3-induced Ca release from vascular smooth muscle sarcoplasmic reticulum. *Am J Physiol* 262: H114-H116, 1992.
55. Walker PM: Pathophysiology of acute arterial occlusion. *Can J Surg* 29:340-342, 1986.
56. Walker PM, Lindsay T, Labbe R, et al: Salvage of skeletal muscle with free radical scavengers. *J Vasc Surg* 5:68-75, 1987.
57. Terris JK, Sweet RC, et al: Recovery of function in free muscle transplants using microvascular anastomosis. *J Hand Surg* 3:57-59, 1978.
58. Zawieja DC, Garcia C, Granger HJ: Oxygen radicals, enzymes, and fluid transport through pericardial interstitium. *Am J Physiol* 262 (Heart Circ Physiol 31) H136-H143, 1992.
59. Yokota J, Chiao JJ, Shires GT: Oxygen free radicals affect cardiac and skeletal cell membrane potential during hemorrhagic shock in rats. *Am J Physiol* 262 Jan P182-90, 1992.
60. Yokota J, Mizel JP, Fantini GA, Shires GT: Role of leukocytes in reperfusion injury of skeletal muscle after partial ischemia. *Am J Physiol* 257 (Heart-Circ Physiol 26) H1068-H1075, 1989.
61. Yogi K: Assay for serum lipid peroxide level and its clinical significance. In: Yogi K: Lipid peroxides in biology and medicine. New York: Academic Press, 223, 1982.
62. Smith JK, Cardon DL, Korthuis RJ: Role of xanthine oxidase in post ischemic microvascular injury in skeletal muscle. *Am J Physiol* 257 (Heart-Circ Physiol) Dec. H1782-9, 1989.
63. Idstrom JP, Soussi B, Elander A, Bylund-Fellenius AC: Purine metabolism after in vivo ischemia and reperfusion in rat skeletal muscle. *Am J Physiol* 258 P H1668-73, Jun 1990.
64. Rochette L, Mauviel V: Free radicals, lipid peroxidation and muscular ischemia. *CR Soc Seances Soc Biol Fil*: 186 (3), p252-62, 1992.
65. Sanhueza J, Valdes J, Campos R, Garrido A, Valenzuela A: Changes in xanthine dehydrogenase/xanthine oxidase ratio in rat kidney subjected to ischemia-reperfusion stress: Preventive effect of some flavonoids. *Res Commun Chem Pathol. Pharmacol* 78(2) Nov. p211-8, 1992.