

TC PAMUKKALE ÜNİVERSİTESİ  
TIP FAKÜLTESİ  
GENEL CERRAHİ ANABİLİM DALI


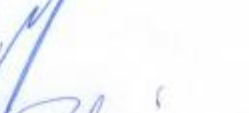

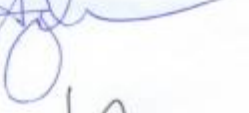

**RATLARDA SUPERİOR MEZENTERİK ARTER  
OKLÜZYONU MODELİNDE GELİŞEN İNTESTİNAL  
İSKEMİ/REPERFÜZYON HASARI ve BUNA BAĞLI  
BAKTERİYEL TRANSLOKASYONUN  
ENGELLENMESİNDE TEMPOL'UN ETKİSİ**

UZMANLIK TEZİ  
**DR. GÖKSEL KOÇBİL**

TEZ DANIŞMANI  
**DOÇ. DR. ÇAĞATAY AYDIN**

**DENİZLİ - 2008**

İş bu çalışma jürimiz GENEL CERRAHİ ANABİLİM DALI'nda  
TIPTA UZMANLIK TEZİ olarak kabul edilmiştir.

Başkan	Prof.Dr. Ergün ERDEM	
Üye	Prof.Dr. Uğur SUNGURTEKİN	
Üye	Doç.Dr. Koray TEKİN	
Üye	Doç.Dr. H. Çağatay AYDIN	
Üye	Doç.Dr. Burhan KABAY	

Yukarıdaki imzaların adı geçen öğretim üyelerine ait olduğunu onaylarım.

  
...../2008

DEKAN  
Prof.Dr.Zafer AYBEK  
Dekan

## TEŐEKKÖR

Pamukkale Öniversitesi Tıp Fakóltesi Genel Cerrahi Anabilim Dalı'ndaki Uzmanlık eğitimim süresince yetiŐmemde büyük katkı ve emekleri geçen, değerli hocalarım ve bana destek sağlayan sevgili asistan arkadaşlarıma, Anabilim Dalı Başkanımız değerli hocam sayın Prof. Dr. Ergün Erdem'in kiŐiliđinde ayrı ayrı teŐekkürlerimi sunarım.

Tezimin tüm aŐamalarında genel cerrahideki değerli bilgilerini bana aktaran ve daima teŐvik gördüğüm sayın hocam Doç. Dr. Çağatay Aydın'a teŐekkürü borç bilirim.

Dr. Göksel Koçbil

# İÇİNDEKİLER

TABLolar ÇİZELGESİ.....	IV
ŞEKİLLER ÇİZELGESİ.....	V
KISALTMALAR ÇİZELGESİ.....	VI
GİRİŞ .....	1
GENEL BİLGİLER .....	2
1) HÜCRE ZEDELLENMESİ.....	2
-Geri Dönüşlü Zedelenme.....	2
-Geri Dönüşsüz Zedelenme.....	3
2) HÜCRE ZEDELLENMESİNDE SERBEST RADİKALLER.....	3
3) SERBEST OKSİJEN RADİKALLERİ .....	4
-Serbest Radikallerin Etkileri.....	4
4) ANTiOKSİDAN SAVUNMA.....	6
-Doğal (Endojen) Antioksidanlar.....	6
-Ekzojen Antioksidanlar.....	6
5) İSKEMİ-REPERFÜZYON HASARININ FİZYOPATOLOJİSİ.....	7
-Reperfüzyon Hasarı.....	8
-Reperfüzyon Hasar Mekanizmaları.....	8
6) BAKTERİYEL TRANSLOKASYON.....	9
-Multisistem Organ Yetmezliği ve Sepsis.....	10
7) TEMPOL .....	10
-Tempol ve SOR.....	10
-Tempol ve DNA Hasarı.....	11
-Tempol ve Sitokinler.....	11
-Tempool ve İntestinal İ/R.....	11

GEREÇ VE YÖNTEM .....	12
1) HAYVANLAR.....	12
2) İLAÇLAR .....	12
3) OPERASYON DETAYLARI.....	13
4) DOKU ÖRNEKLERİNİN ALINMASI .....	14
5) MİKROBİYOLOJİK İNCELEMELER .....	14
6) BİYOKİMYASAL İNCELEMELER.....	15
-Nötrofil Birikiminin Hesaplanması.....	15
-Lipid Peroksidasyon Ölçümü.....	15
-Glutasyon Ölçümü.....	16
7) İSTATİSTİKSEL METOD.....	16
BULGULAR.....	17
1) MİKROBİYOLOJİK İNCELEMELER .....	17
-Bakteriyel Translokasyon.....	17
-İleum Bakteri Sayımları.....	17
2) BİYOKİMYASAL İNCELEMELER.....	18
-Tempol'un Dokuda Nötrofil Birikimi Üzerine Etkileri.....	18
-GSH Düzeyleri.....	20
-MDA Düzeyleri.....	20
TARTIŞMA .....	22
SONUÇLAR .....	28
ÖZET .....	29
YABANCI DİLDE ÖZET .....	30
KAYNAKLAR.....	31

## TABLolar ÇİZELGESİ

Tablo-I : Doku Örneklerinde Bakteriyel Translokasyon Sayıları ve İnsidans. .17	
Tablo-II: İleum Bakteri Sayımları .....18	
Tablo-III: İlum Glutasyon ve Malondialdehit Düzeylerinin Karşılaştırılması ...19	

## ŞEKİLLER ÇİZELGESİ

Şekil-1 : Doku Miyeloperoksidaz (MPO) Düzeyleri.....	19
Şekil-2 : Doku Glutasyon (GSH ) Düzeyleri.....	20
Şekil-3 : Doku Malondialdehit (MDA) Düzeyleri.....	21

..

## KISALTMALAR ÇİZELGESİ

ATP	: Adenozin trifosfat
AMI	: Akut mezenterik iskemi
BT	: Bakteriyel translokasyon
DNA	: Deoksiribonükleik asit
EDTA	: Etilendiamin tetra asetik asit
EMB	: Eozin metilen mavisi agar
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	: Hidrojen peroksit
HOCl	: Hipoklorik asit
GSH	: Redükte glutatyon
GSH-P <sub>x</sub>	: Glutatyon peroksidaz
GSSG	: Okside glutatyon
GST	: Glutatyon -S- transferaz
İ/R	: İskemi-reperfüzyon
IL	: İnterlökin
MCP	: Monosit kemotaktik protein
MDA	: Malondialdehit
MLN	: Mezenter lenf nodu
MODS	: Çoklu organ disfonksiyon sendromu
MPO	: Myeloperoksidaz
NO	: Nitrik oksit
OH <sup>-</sup>	: Hidroksil radikali
O <sub>2</sub> <sup>-</sup>	: Süperoksit radikali
PAF	: Trombosit aktive edici faktör
PMSF	: Fenilmetasulfonyl florür
PNL	: Polimorfonükleer lökositler
SAO	: Splanknik arter oklüzyonu
SMA	: Süperior mezenterik arter



SOD : Süperoksit dismutaz  
SOR : Serbest oksijen radikalleri  
TMB : 3,3',5,5'-tetrametil benzidinin  
TNF : Tümör nekroz faktör  
XO : Ksantin oksidaz

## GİRİŞ

Akut mezenterik iskemi (AMI), % 60-80 arasında mortaliteye yol açan vasküler bir acil durum olup potansiyel mortalitesinin yanında bu cerrahi problemin insidansının giderek arttığı bildirilmektedir (1-5). AMI'nin uygun tedavisi için patolojinin erken tanınması ve barsak nekrozunu önlemek için mezenterik kan akımının yeterli restorasyonunu sağlayacak terapötik yöntemlerin acil olarak uygulanmasına gereksinim vardır (3,6,7).

Mezenterik iskeminin etyolojisi ne olursa olsun, sonuçlar birbirine benzerdir ve barsak fonksiyonunda hafif bozukluklardan transmural nekroz ve gangrene kadar değişebilir (8). Mezenterik kan akımının oklüzyonuyla oluşan bu doku yıkımı, sıklıkla tedaviye yönelik girişimleri takip eden reperfüzyona bağlı hücresel hasarın bir sonucudur (9). Hasarlanmış mukoza endojen mikroorganizmalara karşı direncini kaybeder ve bunun sonucunda bakterilerin mezenterik lenf nodları, karaciğer, dalak ve kan dolaşımı gibi ekstraintestinal alanlara translokasyonu gerçekleşir (10).

Serbest oksijen radikallerinin reperfüzyon hasarında rol oynadıkları, N-asetilsistein, selenyum, vitamin E ve C, süperoksit dismutaz, katalaz ve melatonin gibi antioksidanlar ve serbest radikal tutucularının varlığında doku hasarının azalmasıyla gösterilmiştir (11,12). Tempol, nitroksit grubunda yer alan antioksidan bir ajan olarak süperoksitleri ve olasılıkla diğer toksik radikalleri in vivo olarak detoksifiye eder ve oksidatif strese bağlı hasarların engellenmesinde terapötik potansiyele sahiptir (13-15). Daha da fazlası, aynı zamanda hücre içi serbest radikal tutucusu olan Tempolun splenik arter oklüzyonuna maruz bırakılmış ratlarda intestinal hasarı azalttığı da gösterilmiştir (16). Yakın zamanlarda yapılan çalışmalarda melatonin ve selenyumun ratlarda intestinal iskemi/reperfüzyon hasarına bağlı bakteriyel translokasyonu önlediği gösterilmiştir (17,18). Bu çalışmada, ratlarda intestinal iskemi/reperfüzyonu takiben gelişen bakteriyel translokasyonun engellenmesinde Tempol'un etkinliğinin araştırılması amaçlandı.

## GENEL BİLGİLER

### HÜCRE ZEDELLENMESİ

İskemi vücudun bir bölgesinin kanlanmasının yavaşlaması ve durması olarak tanımlanır (19,20). İskemik doku ya da organın yeterince kanlanamaması sonucu, doku ya da organ gerekli besin maddelerinden, oksijenden yoksun kalır ve iskemik bölgede oluşan toksik metabolitler uzaklaştırılmaz. Bunun sonucunda iskemi dokularda ciddi hasara yol açar. Dokularda iskemiye bağlı oluşan hasar hücresel düzeyde birbirini izleyen moleküler ve yapısal olaylarla gerçekleşir (20,21).

İskeminin süresine ve şiddetine bağlı olarak iki türlü hücresel zedelenme ortaya çıkar.

A-Geri dönüşlü zedelenme

B-Geri dönüşsüz zedelenme

#### A-Geri Dönüşlü Zedelenme

Hipoksinin ilk zarar verdiği yer, hücrenin aerobik solunumudur. Mitokondriumdaki oksidatif fosforilasyonu engeller, adenosin trifosfat (ATP) oluşumunu durdurur. ATP kaybı hücre içinde çeşitli sistemleri yaygın olarak etkiler. Özellikle hücre zarının aktif sodyum pompasının yetersizliğine yol açarak hücre içinde sodyum birikmesine ve hücreden potasyum kaybedilmesine yol açar. Solid materyalin birikimine izoozmotik su birikimi eşlik ederek hücrede akut şişme oluşur (22). İskeminin ilk dakikalarında aşırı stimüle olan glikolitik yol, ortamda sitrat, laktat, nikotinamid adenin dinükleotid birikimi ve doku asidozunun gelişmesiyle inhibe olur. İskemik dokuda bulunan oksijen ise oksidatif fosforilasyonu desteklemek için yetersiz kalır ve glikolizis sonucu oluşan piruvat Krebs siklusuna girmeyerek laktata dönüşür. Böylece glikojenden ATP oluşumu ile hücrenin enerji kaynakları korunur. Glikoliz, laktik asit ve fosfat türevlerinin hidrolizi sonucunda inorganik fosfat birikimine neden olur ve hücre içi pH'yı düşürür. Hipoksi devam ederse, zar geçirgenliği artar, hücre yüzeyinde tomurcuklanmalar oluşur. Bu sırada mitokondriyumlar yoğunlaşmış,

endoplazmik retikulum genişlemiş ve tüm hücre belirgin olarak şişmiştir. Tüm bu bozukluklar oksijen verilince geri dönüşümlüdür. Buna rağmen eğer iskemi sürerse, geri dönüşsüz zedelenme oluşur (22).

### **B-Geri Dönüşsüz Zedelenme**

Morfolojik olarak geri dönüşsüz zedelenmeye mitokondrilerin daha şiddetli vakoulizasyonu ve mitokondri matriksinde şekilsiz, kalsiyumdan zengin cisimciklerin birikimi eşlik eder. Burada sitoplazma membranlarında yaygın hasar ve lizozomlarda şişme de vardır. Özellikle iskemik alan yeniden kanlandırılırsa hücre içine masif kalsiyum akışı olur. Aşırı geçirgen membranlardan proteinlerin, esansiyel koenzimlerin ve ribonükleik asitlerin kaybı devam eder. Lizozomal membranların zedelenmesi enzimlerin sitoplazma içine sızmasına yol açar. Asit hidrolazlar, iskemik hücrenin azalmış hücre içi pH'sında aktifleşerek sitoplazmik ve nükleer elemanları parçalar. Hücresel enzimlerin hücre dışına yaygın olarak sızması yanısıra interstisyumdaki hücre dışı makromoleküllerin de hücre içine geçişi söz konusudur. Hücre içi proteinlerin parçalanmış hücre membranından geçerek periferik dolaşıma sızması, kan serum örneklerinde dokuya özgül hücre zedelenmesi ve ölümünü gösterdiğinden değerli bir bulgudur. Kalp kası kreatin kinaz enzimi dolaşıma geçen hücre içi proteinlere örnektir. Sistemik dolaşımda hücre içi protein düzeylerinin artışı dokularda irreversibl zedelenme ve hücre ölümünü yansıtır (23).

### **HÜCRE ZEDELLENMESİNDE SERBEST RADİKALLER**

Günümüzde moleküler oksijen tarafından oluşan doku hasarı ve hücre ölümünün, birçok metabolik reaksiyonun sonucu olarak oluşan serbest radikallerin yeterli uzaklaştırılmamasından dolayı olduğu kabul edilmektedir (24,25). Serbest radikaller, dış yörüngelerinde bir ya da daha fazla eşlenmemiş elektron taşıyan moleküllerdir. Eşlenmemiş elektronlar molekülleri kararsız hale getirdiğinden stabil moleküller değildir ve bir başka moleküle etkileşerek, bu elektronu eşlemek ve böylece kararlı hale gelmek eğilimindedirler. Bu nedenle son derece reaktif moleküllerdir ve yarı ömürleri çok kısadır (24).

## SERBEST OKSİJEN RADİKALLERİ

Biyolojik sistemlerdeki en önemli serbest radikaller, oksijenden oluşan radikallerdir. Serbest oksijen radikali (SOR) biyokimyasında anahtar rolü oynayan maddeler oksijenin kendisi, süperoksit, hidrojen peroksit geçiş metallerin iyonları ve hidroksil radikalleridir (26).

**Süperoksit Radikali;** Hemen tüm aerobik hücrelerde oksijenin bir elektron alarak indirgenmesi sonucu serbest süperoksit radikal anyonu ( $O_2^-$ ) meydana gelir. Süperoksit bir radikal olmakla birlikte, kendisi direkt olarak zarar vermez. Asıl önemi, hidrojen peroksit kaynağı olması ve geçiş metalleri iyonlarının indirgeyicisi olmasıdır (27).

**Hidrojen Peroksit;** Moleküler oksijenin çevresindeki moleküllerden iki elektron alması veya süperoksitin bir elektron alması sonucu peroksit oluşur. Peroksit molekülü 2 hidrojen atomu ile birleşerek hidrojen peroksiti ( $H_2O_2$ ), oluşturur. Hidrojen peroksit serbest bir radikal olmadığı halde, reaktif oksijen türleri içine girer ve serbest radikal biyokimyasında önemli bir rol oynar (28,29).

**Hidroksil Radikali;** Hidroksil radikali ( $OH^-$ ) hidrojen peroksitin geçiş metallerin varlığında indirgenmesiyle (Fenton reaksiyonu) meydana gelir (29). Suyun yüksek enerjili iyonize edici reaksiyona maruz kalması sonucunda da hidroksil radikali oluşur. Son derece reaktif bir oksidan radikaldir. Oluştığı yerde büyük hasara neden olur.

**Nitrit Oksit;** Nitrik oksit (NO), çoğunlukla vasküler tonusun regülasyonunda adı geçen, multipotent, haberci bir moleküldür. Nitrik oksitin, enfeksiyonlarla savaşmak, damarları kan pıhtısı oluşumundan korumak, sinir sisteminde sinyal molekülü olarak rol almak ve organlarda kan akımını kontrol etmek gibi birçok düzenleyici rolü üstlendiği bulunmuştur (30).

### Serbest Radikallerin Etkileri

Serbest radikaller elektronlardan dolayı çok reaktif moleküller olduğundan; hücrenin herhangi bir bölümünü doğrudan oksitleme özelliğine sahiplerdir. Ancak, membran lipidleri, proteinler, deoksiribonükleik asit (DNA) zincirleri ve karbonhidratlar serbest radikallerin saldırısına en duyarlı moleküllerdir. Serbest radikaller mitokondirideki aerobik solunumu ve kapiller permeabilityyi bozar, hücrenin potasyum kaybını ve trombosit agregasyonunu artırır (25,31).

### **A-Membran Lipitlerine Etkileri**

Membran yapısında yeralan doymamış yağ asitlerinin, serbest radikaller tarafından, peroksitler, aldehitler, alkoller, hidroksi yağ asitleri, etan ve pentan gibi çeşitli ürünlere yıkılmasına lipid peroksidasyonu denir (32). Membran yapısındaki proteinlerle etkileşime girebilen bu ürünler, proteinlerin çapraz bağlanmasına ve agregasyonuna neden olmakta; böylece, membran permeabilitesini artırarak, hücrenin iyon dengesini bozmakta, membran akışkanlığını azaltmakta, membrana bağlı reseptörlerin ve enzimlerin inaktivasyonuna yol açmaktadırlar. Ayrıca, mitokondri, mikrozoim gibi hücreyel organellerin fonksiyonları da bozan bu ürünler, hücreyel bütünlüğün kaybolmasına neden olurlar (33). En toksik peroksidasyon ürünlerinden olan malondialdehit (MDA), yukarıda verilen toksik etkilerinin yanısıra; kolay difüze olabildiğinden, DNA'nın nitrojen bazlarıyla da reaksiyona girebilmekte ve DNA zincirinde mutasyonların oluşmasına neden olmaktadır (34).

### **B-Proteinlere Etkileri**

Serbest radikallerin ansatüre ve sülfür içeren moleküllerle olan reaktivitesi sebebiyle, triptofan, tirozin, fenil alanin, histidin, metiyonin ve sistein gibi amino asit içeren proteinler serbest radikallerden kolayca etkilenirler. Özellikle sülfür radikalleri ve karbon merkezli radikaller oluşur (35). Bu reaksiyonlar sonucu immunglobulin G ve albumin gibi çok sayıda disülfid bağı bulunduran proteinlerin üç boyutlu yapıları bozular. Böylece normal fonksiyonlarını yerine getiremezler (27).

### **C-Nükleik Asit ve DNA'ya Etkileri**

İyonize edici radyasyonla oluşan serbest radikaller DNA'yi etkiliyerek hücrede mutasyona ve ölüme yol açarlar. Sitotoksite büyük oranda, nükleik asit baz modifikasyonundan doğan kromozom değışikliklerine veya DNA'daki diğey bozukluklara bağıdır (27,36). Aktivite olmuş nötrofillerden kaynaklanan H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> membranlardan kolayca geçerek ve hücre çekirdeğine ulaşarak DNA hasarına, hücre disfonksiyonuna ve hatta ölümüne yol açabilir (27).

### **D-Karbonhidratlara Etkileri**

Monosakkaridlerin otooksidasyonu sonucu oluşan hidrojen peroksit, peroksitler ve okzalaldehidler meydana gelirler. Okzalaldehidler DNA, ribonükleik asit ve proteinlere bağlanabilme ve aralarında çapraz bağlar oluşturma özelliklerinden dolayı antimitotik etki gösterir. Böylece kanser ve yaşlanma olaylarında rol oynarlar (27).

## ANTIÖKSİDAN SAVUNMA

Reaktif oksijen türlerinin oluşumu ve bunların meydana getirdiği hasarı önlemek için vücutta birçok savunma mekanizmaları gelişmiştir. Bunlar antitoksidan savunma sistemleri veya kısaca antioksidanlar olarak bilinir.

### A-Doğal (Endojen) Antioksidanlar;

#### 1- Enzimler

**a) Süperoksit dismutaz(SOD):** Bu enzim süperoksitin, hidrojen peroksit ve moleküler oksijene dönüşümünü katalizler (35,36). Enzimin fizyolojik fonksiyonu oksijeni metabolize eden hücreleri süperoksit serbest radikallerinin zararlı etkilerine karşı korumaktır. Böylece lipid peroksidasyonunu inhibe eder.

**b) Katalaz :** Dört tane hem grubu bulunan bir hemoproteindir. Peroksizomlarda lokalizedir (36). Hidrojen peroksiti oksijen ve suya parçalar (27).

**c) Glutasyon peroksidaz :** Glutasyon peroksidaz (GSH-P<sub>x</sub>) hidroperoksidlerin indirgenmesinden sorumlu enzimdir. Tetramerik dört selenyum atomu ihtiva eden sitozolik bir enzimdir (36). Membran fosfolipid hidroperoksitlerini alkollere indirger (27, 36).

**d) Glutasyon -S- transferazlar :** Glutasyon -S- transferaz (GST)'lar antioksidan aktivitelerine ilave olarak çok önemli biokimyasal fonksiyonlara da sahiptirler. Tüm canlı hücrelerde bulunması hayati öneminin göstergesidir.

#### 2- Enzim Olmayanlar

**a) Lipid fazda bulunanlar:** Alfa tokoferol (E-vitamini), beta karoten.

**b) Sıvı fazda (hücre sitozölü veya kan plazmasında ) bulunanlar:** Askorbik asit, melatonin, hemoglobin, myoglobulin, glutasyon, seruloplazmin, sistein.

### B- Ekzojen Antioksidanlar;

**1- Ksantin oksidaz inhibitörleri:** Allopürinol, folik asit, tungsten, pterin aldehit

**2-NADPH oksidaz inhibitörleri:** Kalsiyum kanal blokerleri, non-steroid antiinflamatuvarlar, lokal anestezikler.

**3- Demir redoks döngüsünün inhibitörleri:** Desferroksamin, seruloplazmin.

**4- Sitokinler:** Tümör Nekroz Faktör (TNF), interlökin (IL)-1

**5-Barbitüratlar**

## **İSKEMİ-REPERFÜZYON HASARININ FİZYOPATOLOJİSİ**

Bir dokunun kan desteğinin kesilerek iskemiye maruz bırakılması halinde bir takım kimyasal olaylar başlayarak hücre disfonksiyonu, interstisyel ödem, hücre hasarı ve hücre ölümü ortaya çıkar. İskemik doku hasarı olarak adlandırılabilen bu patofizyolojik sürecin oluşmasında, hücresel enerji depolarının boşalması ve toksik metabolitlerin birikmesi önemli rol oynamaktadır (37,38). İntestinal kan akımında kısa süreli, küçük miktarlarda azalmalarda bile villüslerin uçlarında ağır hipoksi oluşabilir ve iskemik doku hasarını başlatabilir. İskemik hasar mukozanın villüs tabakalarında başlar (39-41). Lezyonlar yaygın villus epitel dökülmesi, epitel nekrozu, lamina propriada düzensizlik, hemoraji ve ülserasyon ile karakterizedir (42,43). Kritik ve septik hastalarda görülen intestinal iskemi yüzeysel mukoza hasarına sebep olurken, strangülasyon, mezenter vasküler oklüzyon, non-oklüziv obstrüksiyon olarak bilinen durumlar ise daha derin doku hasarına neden olabilir (39). İskemi nedeniyle oluşan tek bir kritik faktör veya süreç öne sürülmemekle birlikte, iskemi esnasında hücre hipoksisi ve enerji krizi söz konusu olur. ATP' nin aşırı şekilde azalması dokunun enerji dengesinde bozulmaya yol açar. Hücre içi ATP sentezi azalıp hidrolizi artar, enerji metabolizmasını düzenlemek için anaerobik glikolizis hızlanarak laktik asidoz, reperfüzyonla beraber toksik serbest oksijen radikalleri artar (37,44,45). Bir saatlik bölgesel iskemi sonrasında artan kapiller permeabiliteye bağlı olarak kapiller filtrasyonda artma ve interstisyel sıvı birikimi olur (42,46). İntestinal iskemi sırasında artan kapiller permeabiliteye birçok mekanizma katkıda bulunabilir. Mukoza kapillerlerinin bakteriyel endotoksinler ve lizozomal enzimlerle karşılaşması durumunda permeabilite artışı olacağı gibi, iskemik ince barsaktan serbestleşen histamin, bradikinin, prostaglandinler gibi çeşitli vazoaktif maddeler de bu artışın patogeneze katkıda bulunmaktadır (69,37,42,46). Mukoza tabakalarındaki hasara bağlı olarak intestinal lümeninden dolaşıma proteolitik enzimler, bakteriler ve endotoksinler daha fazla miktarda geçerek kardiyak ve respiratuvar fonksiyonları olumsuz yönde etkilemektedirler (37). İskeminin ağırlığı arttıkça, mukozanın büyük bir kısmına ilave olarak submukoza da



kaybedilebilir. İskemik dokuda kan akımının yeniden sağlanması, enerji gereksiniminin restore edilmesi ve toksik metabolitlerin ortadan kaldırılması gibi yararlı etkileri olmaktadır (37,47). Bununla birlikte iskemik bir dokunun yeniden kanlanması metabolik asidoz, hiperkalemi, miyoglobini, nefropatik metabolik sendrom olarak adlandırılan renal yetmezlikle karakterize bir çok sistemik problemle sonuçlanabilir (37)

### **Reperfüzyon Hasarı:**

Reperfüzyon iskemiyeye maruz kalan doku ya da organların yeniden kanlanması ile oluşur ve hücrelere yeniden oksijen girişi sağlanır (21). Reperfüzyon hasarı iskemi epizodunu izleyen, kan akışının yeniden başlaması esnasında bir organda meydana gelen hasar olarak da tanımlanabilir (21).

Oksijen eksikliğine bağlı doku ve hücrelerde yapısal ve biokimyasal hasarlar görülür ve oksijenin doku ve hücrelere girmesi ile birlikte bu hasarın azalması beklenir. Fakat yapılan bir çok çalışma iskemi sonucu oluşan hasarın reperfüzyonun sağlanması ile daha da şiddetlendiğini göstermiştir (48-50). Reperfüzyon iki ucu keskin kılıç gibi tanımlanabilir, doku ya da organ normal metabolik fonksiyonu için oksijene gereksinim duyar, fakat oksijenin iskemik ortama girmesi bir diğer olaylar zincirini tetikler ve sonuçta esas olarak toksik oksijen metabolitlerinin ortaya çıkması ile doku hasarı oluşur (21,51,52). Parks ve Granger çalışmalarında üç saatlik iskemiyi takiben oluşan bir saatlik reperfüzyonun, reperfüzyonsuz dört saatlik iskemiden sonra oluşan hasardan daha büyük hasar oluşturduğunu göstermişlerdir (41).

### **Reperfüzyon Hasar Mekanizmaları:**

#### **Lökosit ( nötrofil, lenfosit, monosit ) aktivasyonu**

Reperfüzyon hasarının önemli bir nedenidir. İskemik bölgeye lökositlerin, öncelikle de polimorfonükleer lökositler (PNL) olan nötrofillerin infiltrasyonudur (24,51,53). Granger iskemi periyodunda mukozadaki myeloperoksidaz (MPO) da beş ile yedi kat artış, reperfüzyon esnasında ise mukozadaki myeloperoksidazda 18 kat artış olduğunu gözlemiştir. Yine Granger iskemi-reperfüzyon (İ/R)' a bağlı doku hasarının granülosit infiltrasyonu ile ilişkisini araştırdığı bir çalışmada, İ/R'ye bağlı mukozada myeloperoksidaz aktivitesinde artış saptamıştır. SOD ya da allopurinol ile tedavinin etkilerini incelediğinde hem SOD, hem

de allopurinolün, reperfüzyon sonrası mukozada artan MPO aktivitesini anlamlı bir şekilde azalttığını gözlemiştir (41,54).

Aktive olmuş nötrofiller, seri reaksiyonlar sonucunda süperoksit anyon radikali,  $H_2O_2$ ,  $OH^-$ , hipoklorik asit (HOCl) ve kloraminleri oluşturarak, ileri doku hasarına neden olurlar (55,56).

### **Ksantin Oksidaz (XO)**

İ/R'ye bağlı oluşan önemli hasar mekanizmalarından birisi de ksantin oksidaza bağlı olarak serbest oksijen radikallerinin oluşmasıdır (55,57). Reperfüzyonda oksijenin ani ve fazla miktarda yeniden dokuya girmesi sonucu ksantin oksidaz reaksiyonu ile ürik asit, yan ürün olarak da süperoksit radikali oluşmaktadır. Oluşan süperoksit radikali  $H_2O_2$  ve  $OH^-$  radikalini oluşturmaktadır (24,54,55).

### **BAKTERİYEL TRANSLOKASYON**

Bozulmamış barsak mukozası nonsteril olan lümen ile steril olan vücut arasında bariyer oluşturarak barsakta kolonize bakterilerin sistemik organ ve dokulara geçmesine engel olmaktadır. Bu engelin kırılıp bakterilerin sistemik dolaşım ve/veya organlara geçmesine bakteriyel translokasyon (BT) denilmektedir (39, 44, 58). Normal fizyolojik koşullarda, barsak florasının kolonizasyonu önleyici etkisi, lokal ve/veya sistemik immün sistem, intestinal mukozanın fiziksel bariyer işlevi uyum içindedir, bu faktörler arasında dengenin birlikte veya bir diğeri aleyhine bozulması lümen içindeki mikroorganizmaların translokasyonuna neden olmaktadır.

İskemi-reperfüzyon hasarında barsak bariyerinin kırılması temel rol oynar. Barsak bariyerinin kırılması barsak motilitesini ve absorpsiyonunu azaltır, mukozanın bütünlüğünün bozulması sonucu bakteriyel translokasyon ile bakteriler portal ve sistemik dolaşıma geçer (10). Bakteriyel translokasyon çalışmaları sonrası bakteriyel translokasyonun en fazla distal ileum ve çekumda gerçekleştiği ortaya konmuştur. Endojen gram(-) enterik basiller en fazla endojen gram(+) bakteriler orta derece, anaeroplara en az transloke olan bakterilerdir.

Bakteriyel translokasyon sırasında özellikle *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Enterobacteriaceae*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Enterococcus*, *Streptococcus*, *Lactobacillus* ve *Staphylococcus*' ların transloke oldukları saptanmıştır (59).

### **Multisistem Organ Yetmezliği ve Sepsis**

Barsak İ/R hasarına neden olan değişik patofizyolojik olayların bakteriyel translokasyona, sepsis ve çoklu organ disfonksiyon sendromu (MODS)'na yol açtığı bildirilmiştir (60). MODS'da pulmoner sistem önemli ölçüde etkilenir. Sendromun oluşması, iskemik olayın başlamasından sonraki 24-72 saat içinde akut respiratuar yetmezlik gelişeceğinin habercisidir (61). Reperfüzyondan sonra serbestleşen SOR, trombosit aktive edici faktör (PAF), lökotrien B4 gibi biyolojik moleküller nötrofil adezyonunun kimyasal mediyatörü olup aktive nötrofillerin akciğerlerde ve diğer organlarda birikimine neden olur. Bu birikim MODS gelişiminde önemli bir basamaktır (37). Pulmoner hasar hızla respiratuar yetmezliğe neden olarak akut solunum sıkıntısı sendromuna yol açar. Respiratuar yetmezliği hepatik, renal, myokardiyal, gastrointestinal sistem ve santral sinir sistemi disfonksiyonu izler (61,62).

### **TEMPOL**

Tempol (4-hidroksi - 2, 2, 6, 6 - tetrametilpiperidin-N- oksil), biyolojik membranları geçen düşük moleküler ağırlıklı (moleküler ağırlığı, 172 Dalton) stabil bir piperidin nitroksid'tir(63). Tempol biyolojik membranları geçip sitozolde birikir (64).

### **Tempol ve SOR**

Tempol ve diğer stabil nitroksidlerin SOD taklitçileri mi olduğu, yoksa süperoksit anyonlarının temizleyicileri olarak mı işlev gördüğü konusunda bazı tartışmalar vardır (65,66). Kesin etki mekanizmasına bakmaksızın, Tempol'ün süperoksit anyonlarının etkilerini *in vitro* azalttığını belgeleyen pek çok çalışma vardır (67-70). Tempol'ün Fenton reaksiyonunda hücre içi ferröz demir seviyelerini düşürerek meydana gelen hidroksil radikallerinin oluşumunu azalttığı da ileri sürülmüştür (14). Tempol'ün yararlı etkilerinin pekçoğunun bu ajanın hidroksil radikallerini temizleyebilmesine bağlı olduğu

hipotezi aşağıdaki bulgularla desteklenir (64). Tempol'ün koruyucu etkilerinin, bu stabil nitroksid radikalın hücre içi süperoksid anyonların özellikle hidroksil radikallerinin temizleyicisi olarak işlev görebilmesine bağı olduğu ileri sürülmüştür (14).

#### **Tempol ve DNA Hasarı**

SOR ve peroksinitrit DNA zincir kırılmalarına sebep olabilir ve bu etki Tempol ile ortadan kaldırılır. Örneğın aktive olmuş mürin nötrofilleri hedef plazmasitom hücrelerinde (RIMPC 2394) DNA zincir kırıklarına neden olur. Bu hedef hücrelerde aktive olmuş nötrofillere bağı DNA hasarı, konsantrasyona bağı bir şekilde Tempol ile azaltılır (71).

#### **Tempol ve Sitokinler**

Endotel hücrelerinin, proinflamatuvar sitokinler gibi pekçok uyarıya yanıt olarak SOR ürettiğı bilinmektedir. Volk ve arkadaşlarının yaptığı çalışmada hücre içi radikal temizleyicisi Tempol, TNF $\alpha$ , IL-1 ve interferon- $\lambda$ 'ya bağı hem SOR oluşumunu hem de monosit kemotaktik protein (MCP)-1 ve IL-6 oluşumunu azalttı. Bu sonuçlar, hayvanlarda inflamasyon ve iskemi-reperfüzyon hasarı modellerinde Tempol'ün bazı yararlı etkilerinin, MCP-1 gibi kemokinlerin veya IL-6 gibi pro-inflamatuvar sitokinlerin oluşumunun önlenmesine ikincil olduğı görüşünü destekler (72).

#### **Tempol ve İntestinal İ/R**

Tempol'un intestinal iskemi-reperfüzyona bağı doku hasarını azalttığı konusunda kanıtlar vardır. Sıçanda süperior mezenterik arterin oklüzyonu ve reperfüzyonu, Tempol ile bariz bir şekilde azaltılan, intestinal permeabilitede büyük bir artışa yol açmıştır. En dikkat çekici olanı, reperfüzyondan hemen önce verildiğinde etkili olmasıdır (73).

Tempol (reperfüzyondan 5 dakika önce 30 mg/kg bolus injeksiyon, ardından 30 mg/kg/saat intravenöz infüzyon), 1-) reperfüze edilen barsağın nötrofillerle infiltrasyonunu, 2-) lipid peroksidasyonunu, 3-) peroksinitrit üretimini, 4-) Splanknik arter oklüzyonu (SAO) şokuna uğramış sıçanlardan alınan doku kesitlerinde P-selectin ve anti-intersellüler adezyon molekülü 1'in boyanma derecesini, 5-) barsak hasarının histolojik bulgularını ve 6-) reperfüzyondan iki saat sonraki mortaliteyi azaltmıştır (16). Birlikte ele alındığında bu sonuçlar açıkca hücre içi radikal temizleyicisi Tempol'ün SAO şokuna tabi tutulan sıçanların barsak hasarını azalttığını gösterir.

## GEREÇ VE YÖNTEM

### HAYVANLAR

Bu çalışmada 250-300 g ağırlıktaki erkek Wistar-Albino ratlar kullanıldı. Çalışma boyunca tüm hayvanlar 12 saatlik zaman dilimlerinde aydınlık-karanlık döngüsünde tutuldu, suya ve yiyeceğe serbestçe ulaşabilmeleri sağlandı. Hayvanlar intestinal floralarının stabilizasyonu için çalışma öncesinde 7 gün boyunca kafeslerinde bekletildi. Çalışma öncesinde Pamukkale Üniversitesi Tıp Fakültesi Deneysel Çalışmalar Etik Komitesi tarafından onay alındı ve tüm operatif işlemler, anestezi kullanımı ve hayvan bakım yöntemleri, laboratuvar hayvanlarının bakım ve kullanımıyla ilgili kabul edilmiş rehberlere (NIH publication No.86-23, revised 1985, Bethesda, MD) uygun olarak gerçekleştirildi.

Çalışmaya alınan ratlar randomize olarak 3 gruba ayrıldı. Herbirinde on erkek rat olacak şekilde oluşturulan gruplar şu şekilde belirlendi:

Grup I: Kontrol Grubu: 10 adet rat

Grup II: İntestinal İskemi/Reperfüzyon Grubu: 10 adet rat (İ/R)

Grup III: İntestinal İ/R + Tempol Grubu: 10 adet rat (İ/R + Tempol )

### İLAÇLAR

*Ketamine*: Ketalar flakon (50 mg/ml, Eczacıbaşı İlaç ve Ticaret A.Ş. İstanbul - Türkiye). 50 mg/kg dozunda intramusküler olarak anestezi sağlamak amacıyla verilmiştir.

*Xylazine*: Rompun flakon (23.32 mg/ml, Bayer Türk Kimya San. Ltd. Şti. İstanbul - Türkiye). 10 mg/kg dozunda intramusküler olarak analjezi ve kas gevşetici amacıyla verilmiştir.

Heparin: Nevparin flakon (25000 IU/5 ml, Mustafa Nevzat İlaç San. A.Ş. Mecidiyeköy, İstanbul - Türkiye)

Tempol: Fluka, 56516 - 5 gr. graniil. (4 - Hydroxy - 2, 2, 6, 6 - tetramethyl - piperidine 1 - oxyl). Tempol, % 0,9 NaCl solüsyonu içersinde çözümlenilüp 30 mg/kg dozunda intravenöz olarak verilmiştir (Sigma-Aldrich, Steinheim, Almanya ve Exper Laboratuarları, İzmir, Türkiye).

## OPERASYON DETAYLARI

Bir gecelik açlığı takiben, 50 mg/kg intramuskuler *ketamine* (Ketalar;Parke-Dawis, Eczacıbaşı, İstanbul, Türkiye) ve 10 mg/kg *xylazine* (Rompun; Bayer AG, Leverkusen, Almanya) kullanılarak ratlara anestezi verildi. Cerrahi sırasında hayvanların spontan olarak solumaları sağlandı. Vücut sıcaklıklarının 37° C derece civarında tutulabilmesi için bir ısıtıcı lamba kullanıldı. Ameliyat sonunda ratların dehidrate olmasının önlenmesi amacıyla subkutan yoldan 10 ml Ringer laktat solusyonu verildi. Karın ve sağ servikal bölge traş edildikten sonra %10 povidon iyodür solusyonuyla iki kez silindi ve asepsi kurallarına uyularak steril aletlerle ameliyata başlandı. Orta hat laparotomisiyle batına girildi ve süperior mezenterik arter (SMA) ortaya konuldu. Ratlar rastgele seçilerek her biri on hayvandan oluşan üç grup oluşturuldu. Grup I'de (kontrol grubu) SMA izole edilerek ortaya konuldu ancak bağlanmadı. Grup II'de (intestinal iskemi/reperfüzyon grubu) ve grup III'te (intestinal İ/R+Tempol grubu) ise, SMA nazıkçe izole edildi ve aortadan çıktığı yerin hemen distalinden 60 dakika boyunca atravmatik mikrovasküler pensler kullanılarak literatürde tarif edildiği üzere klampe edildi (74). Bu işlem sonucunda ince barsaklar, çekum ve sağ kolonda soluklukla ve nabız yokluğu ile doğrulanan iskemi elde edildi. SMA'nın oklüzyonunu takiben, sağ servikal bölgede 1 cm' lik insizyon yapılarak juguler ven bulundu ve içine 24 gauge kateter yerleştirildi. Bu kateter, deney süresince Tempol ve salin infüzyonu için kullanıldı. İskemiye takibeden 60 dakika sonrasında, vasküler pens çıkarıldı ve reperfüzyon periyodu başlatıldı. Grup III ratlarda reperfüzyonun başlatılmasından 5 dk önce 30 mg/kg Tempol (Sigma-Aldrich, Steinheim, Almanya ve Exper Laboratuarları, İzmir, Türkiye) bolus olarak juguler vendeki kateterden enjekte edildi ve reperfüzyonun ilk 60 dakikası boyunca salin solusyonu içinde 30 mg/kg dozunda Tempol infüzyonuna devam edildi (16,73). Grup I ve II'de, içinde Tempol olmaksızın aynı miktarda salin infüzyonu yapıldı. Daha sonra,

batın insizyonları 3/0 poliglaktin sütürlerle (Vicryl, Ethicon, İngiltere) iki kat üzerinden kapatıldı. Postoperatif dönemde hayvanlar standart rat yiyeceği ve suyla beslenmeye devam edildi. Reperfüzyondan 24 saat sonra tüm hayvanlara anestezi verilerek tonazi uygulandı. İskemi/reperfüzyona bağlı intestinal hasarı ve bakteriyel translokasyonu araştırmak üzere doku ve kan örnekleri elde edildi.

### **DOKU ÖRNEKLERİNİN ALINMASI**

Reperfüzyondan 24 saat sonra tüm ratlar sakrifiye edildi. Steril teknik ve aletler kullanılarak orta hattan batına girildi ve karaciğer, dalak, mezenterik lenf nodları ve terminal ileumdan aerobik ve anaerobik mikroorganizmaların kantitatif kültürü için biyopsi örnekleri alındı. Yine aerobik ve anaerobik organizmaların uygun ortamda kültürlerinin yapılması için vena kavadan 1 ml kadar kan rneği alındı. Lipid peroksidasyon, MPO aktivitesi ve doku glutatyon (GSH) tayini için ise ileum segmentleri alınarak -80°C'de saklandı.

### **MİKROBİYOLOJİK İNCELEMELER**

Mikrobiyolojik analiz, daha önce tanımlanan Şekilde yapıldı (75). Kan rnekleri 5 ml beyin-kalp infüzyon ortamında 37 °C'de 7 gün boyunca kültüre edildi. Kültürler günlük olarak incelendi ve kanlı agar ve eozin metilen mavisi agar (EMB) tabaklarında alt kültürlere alındı.

Mezenterik lenf nodu, karaciğer, dalak ve ileal içerikler tartıldıktan sonra karıştırıcı tüpe alındı. Dokular kantitatif kültür için 1 ml salin içinde homojenize edildi. Hazırlanan bu homojenizat, kanlı agar ve eosin metilen mavisi agar' a konularak ortam havasında 24-48 saat boyunca inkübe edildi. Bakteriyel türlerin tanımlanması standart mikrobiyolojik yöntemlere göre yapıldı. Kolonizasyon ise doku homojenizatının her bir gramındaki (CFU/g) koloni oluşturan bakteri nitelerinin (CFU) sayısı ile belirlendi.

## **BİYOKİMYASAL İNCELEMELER**

### **1-Nötrofil Birikiminin Hesaplanması**

Nötrofil birikiminin gösterilmesi için ileum segmentlerindeki myeloperoksidaz aktivitesi ölçüldü. Doku örnekleri, proteaz inhibitörü, 0.2 µM fenilmetasulfonyl florür (PMSF) ve 1 mM etilendiamin tetra asetik asit (EDTA) içeren 50 mM fosfat tamponunda (pH 7.4) (1/10, w/v) bir homojenizatör (Potter S, B. Braun, Almanya) kullanılarak 4°C'de 30 sn homojenize edildi. Daha sonra MPO tayini için uygun homojenizat miktarı kullanıldı.

Suzuki ve ark.larının yöntemi hafifçe modifiye edilerek kullanıldı (76). Bu yöntem, sentetik bir madde olan 3,3',5,5'-tetrametil benzidinin (TMB) MPO ile oksidasyonuna dayanır. Standart reaksiyon karışımında 500 µl deterjan içeren tampon (160 mM potasyum fosfat tamponu, pH 5.4, 1% heksadesiltrimetilamonyum bromür), 100 µl TMB (16 mM, dimetilformamid çözeltisinde), 50 µl homojenizat ve 300 µl su bulunur. Reaksiyon 37 °C'de 50 µl H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (%0.003) eklenmesiyle başlatılır. TMB nin MPO tarafından katalize edilme hızı 655 nm'de absorbans artışı ile kaydedilir. Reaksiyonun başlangıç ve lineer hızı gözönüne alınarak dakikada absorbans değişikliği ölçümlendi ve bir enzim ünitesi çalışma şartlarında dakikada bir absorbans değişikliği yapan enzim miktarı olarak tanımlandı. Enzim aktivitesi ise her bir gram yağ dokudaki enzim ünitesi olarak hesaplandı.

### **2-Lipid Peroksidasyon Ölçümü**

İleal doku örneklerinde ölçülen malondialdehid (MDA) düzeyleri lipid peroksidasyonunun bir indikatörü olarak ölçümlendi. Dokulardaki MDA üretimi ve böylece lipid peroksidasyon tayini Ohkawa'nın yöntemine göre yapıldı. MDA, TBA varlığında 532 nm'de absorbans ile ölçülen renkli bir kompleks yapar. Bu absorbans Shimadzu UV-160 spektrofotometre ile ölçüldü. Standart olarak 1,1',3,3' -Tetraetoksipropan kullanıldı ve sonuçlar dokuda µmol/g protein cinsinden verildi (77).



### **3-Glutasyon Ölçümü**

Doku örneklerinde GSH konsantrasyonu Ellman'ın yöntemiyle ölçüldü (78). Bir ml doku homojenizati 2ml %5 TCA ile çöktürüldü ve buna 0.5 ml Ellman solusyonu (%1 sodyum sitrat içinde %0.0198 DTNB) ile 3 ml fosfat tamponu (pH 8.0) eklendi. Ortaya çıkan renk 412 nm dalga boyunda okundu. Sonuçlar doku örneklerindeki konsantrasyonun mg/g protein cinsinden hesaplanmasıyla verildi.

### **İSTATİSTİKSEL METOD**

Sonuçlar ortalama±SEM olarak çıkarıldı. Pozitif kültürlerdeki oransal karşılaştırmalar Ki-kare (Fisher's Exact test) analizi ile hesaplandı. Kantitatif kültürlerin ve ileal MDA, MPO ve GSH düzeylerinin istatistikleri ise Kruskal-Wallis testi ile, gruplar arasındaki çoklu karşılaştırmalar ise Mann Whitney-U testi ile yapıldı. Hesaplanan sonuçlar arasındaki farkların  $p<0.05$  olduğu durumlar istatistiksel bakımdan anlamlı olarak değerlendirildi. İstatistiksel verilerin hesaplanmasında bir bilgisayar yazılım programı kullanıldı (SPSS for Windows 11.5; SPSS, Chicago, Illinois, A.B.D).

## BULGULAR

### MİKROBİYOLOJİK İNCELEMELER

#### 1-Bakteriyel Translokasyon

Tüm hayvanlar deney protokolünü canlı olarak tamamladı. Mezenterik lenf nodları (MLN) ( $X^2=15.600$ ,  $df=2$ ,  $p<0.05$ ), karaciğer ( $X^2=11.553$ ,  $df=2$ ,  $p<0.05$ ) ve dalaktaki ( $X^2=6.667$ ,  $df=2$ ,  $p<0.05$ ) bakteriyel translokasyon oranları İ/R grubundaki (grup II) ratlarda kontrol grubu ve Tempol grubundaki (grup I ve III) ratlara göre anlamlı olarak daha yüksek bulundu (Tablo I). Dahası, Tempol ile tedavi görmüş ratlardaki bakteriyel translokasyonun insidansı ile kontrol grubundakilerin BT insidansı arasında istatistiksel olarak anlamlı fark bulunmadı ( $p>0.05$ ). Kan dolaşımına bakteriyel translokasyon grup II'de yer alan sadece tek bir hayvanda görüldü ( $X^2=2.000$ ,  $df=2$ ,  $p>0.05$ ). En sık olarak translokasyonu olan mikroorganizmalar *Escherichia coli*, *klebsiella* ve *enterobacteriaceae* suşları oldu.

Tablo I: Doku Örneklerinde Bakteriyel Translokasyon Sayıları ve İnsidans

Gruplar (n=10)	Mezenterik Lenf Nodları		Karaciğer		Dalak	
	insidans	CFU±SEM	insidans	CFU±SEM	insidans	CFU±SEM
<b>Kontrol</b>	0/10	-	0/10	-	0/10	-
<b>İ/R</b>	8/10	54050±15315,65	6/10	1075,5±623,24	3/10	80±46,66
<b>İ/R+Tempol</b>	2/10	1430±961,71	1/10	1±3,1	0/10	-

#### 2-İleum Bakteri Sayımları

İleum bakteri sayımları kontrol grubunda İ/R ve İ/R+Tempol gruplarına göre anlamlı olarak daha düşüktü ( $X^2=18.06$ ,  $df=2$ ,  $p<0.05$ ). Tempol tedavisi grup III'te ileum bakteri sayımında anlamlı bir düşüş yapmakla beraber, bu durum istatistiksel olarak grup II'deki sayımlardan farklı değildi ( $p>0.05$ ) (Tablo II).

Tablo II: İleum Bakteri Sayımları

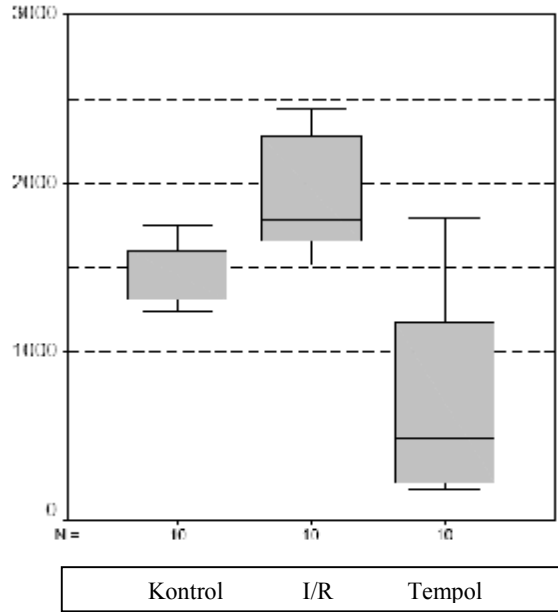
Gruplar	Bakteri sayımı (g/CFU±SEM)
Kontrol	60200±13573,50*
İ/R	419500±49857,85
İ/R + Tempol	286080±41234,15

(\*p < 0.05 )

## BİYOKİMYASAL İNCELEMELER

### 1-Tempol'un Dokuda Nötrofil Birikimi Üzerine Etkileri

Kontrol grubu ve Tempol grubuyla karşılaştırıldığında, grup II'deki ratların ileumunda doku MPO düzeylerinde anlamlı artış olduğu bulundu ( $X^2=18010$ ,  $df=2$ ,  $p<0.05$ , Şekil 1). Grup III'teki ratların Tempol verilerek tedavi edilmesi bu hayvanların ileum dokularındaki MPO düzeylerinde anlamlı bir azalmaya neden oldu ( $p<0.05$ , grup III'e karşı grup II).



Şekil 1. Doku MPO düzeyleri (U/gr yaş ağırlık)

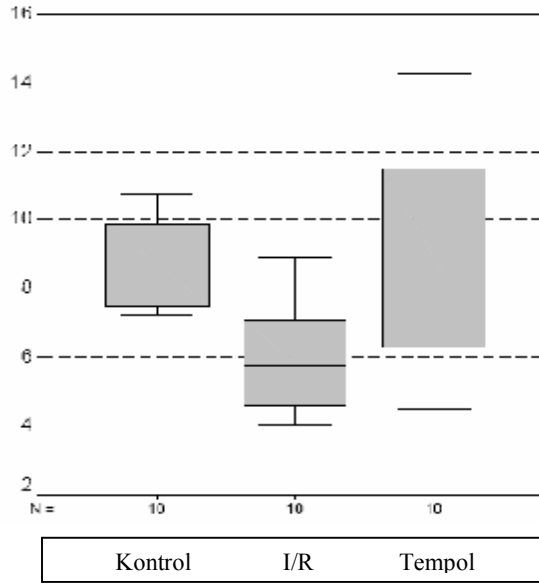
Tablo III: İleum glutatyon ve malondialdehit düzeylerinin gruplar arasında karşılaştırılması

Gruplar	GSH (mg/g protein)	MDA ( $\mu$ mol/g protein)
Kontrol	9.1 $\pm$ 0.2	1.8 $\pm$ 0.1
İ/R	6 $\pm$ 0.5*	5.3 $\pm$ 0.4*
İ/R + Tempol	8.9 $\pm$ 0.4	2.4 $\pm$ 0.4

Veriler: ortalama  $\pm$  SEM, GSH: Glutatyon, MDA: Malondialdehit (\*p < 0.05)

## 2-GSH Düzeyleri

Grup I (Kontrol) ve grup III (İ/R + Tempol grubu) ile karşılaştırıldığında, intestinal dokularda ölçülen GSH miktarının, sadece İ/R hasarına maruz bırakılan ratlarda (grup II) anlamlı olarak azalmış olduğu bulundu ( $X^2=10098$ ,  $df=2$ ,  $p<0.05$ , Şekil 2). Tempol uygulanması, azalmış olan GSH düzeylerinin anlamlı olarak artmasını sağladı ( $p<0.05$  grup III'e karşı grup II). Ayrıca, grup III' te (Tempol grubunda) ölçülen GSH düzeyleri, kontrol grubunda ölçülen GSH düzeylerinden anlamlı olarak farklı değildi ( $p>0.05$ ).

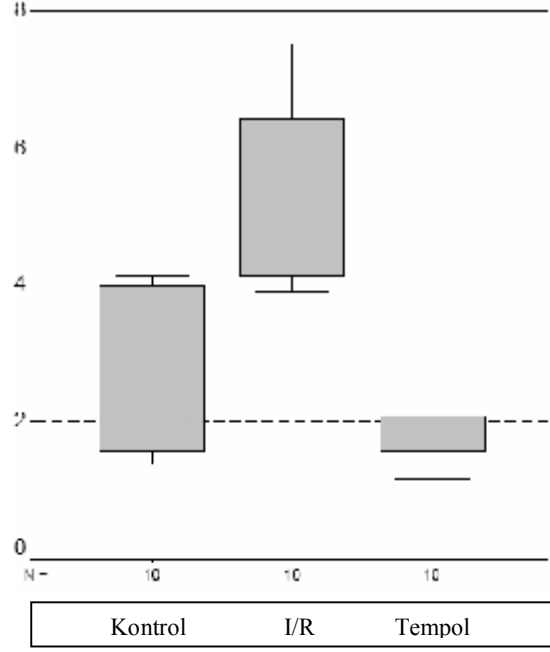


Şekil 2. Doku GSH düzeyleri (mg/gr protein)

## 3-MDA Düzeyleri

İleum dokularında ölçülen ortalama MDA düzeyleri gruplar arasında anlamlı olarak farklı idi ( $X^2=17081$ ,  $df=2$ ,  $p<0.05$ , Şekil 3). Grup II'deki ortalama intestinal doku MDA konsantrasyonu deney sonunda diğer iki gruptan anlamlı olarak daha yüksek

bulundu. Grup III'teki (I/R + Tempol grubu) MDA miktarı kontrol grubunda ölçülenden istatistiksel açıdan anlamlı olarak farklı değildi ( $p>0.05$ ).



Şekil 3. Doku MDA düzeyleri (mikromol/gr protein)

## TARTIŞMA

Barsakları besleyen arterlerin emboli, tromboz veya ateroskleroza bağlı tıkanıklıkları ile volvulus, intestinal strangüstasyon, invajinasyon gibi mekanik vasküler nedenler veya barsağın venöz dönüşünde obstrüksiyon gibi çok çeşitli nedenlerle barsaklarda iskemik hasar görülür (19,79). İntestinal kan akımında az miktarda kısa süreli azalmalarda dahi dolaşım devam etse de iskemik lezyonlar oluşabilir (9).

İntestinal iskemide oksijen ve doku kanlanması azalır ve doku hasarı oluşur; intestinal reperfüzyon ile doku hasarı daha da şiddetlenir (19,49). İskemik mukoza hasarında ilk olarak kapiller geçirgenlik, daha sonra mukoza geçirgenliği artar, mukoza yüzeyindeki hasarı transmukozal ve transmural hasar takip eder (39,41,42). Barsak mukoza engelinin bozulmasına değişik patolojik mekanizmalar neden olmaktadır. Bunlar içinde en önemli mekanizmanın İ/R hasarı olduğu yönünde görüş birliği vardır (38,80). İ/R hasarını açıklayan kesin bir mekanizma bulunmamakla birlikte, hasardan sorumlu birkaç mekanizmadan sözedilebilir. Sitokinler, nötrofil aktivasyonu, endotel adezyonu ve bunun sonucunda üretilen toksik metabolitler, PAF, fosfolipaz A2'nin aktivasyonu, ksantin oksidaz enzim sistemi ve serbest oksijen radikalleri en önemli hasar mekanizmalarıdır. İskemik barsak sistemik ve portal dolaşıma hidrojen peroksit, süperoksit radikalleri, sitokinler, araşidonik asit metabolitleri gibi inflamatuvar metabolitler salgılar. Yapılan çalışmalar reperfüzyon sonrası moleküler oksijene bağlı olarak oluşan hasarın iskemiye bağlı intestinal mukoza hasarından daha şiddetli olduğunu göstermektedir (48-50). İskemik dokunun kurtarılması için kan dolaşımının yeniden sağlanması gerekliliği inkar edilemez, ancak iskemik dokunun reperfüzyonu paradoksal olarak doku yaralanmasına neden olan olaylar zincirinin başlamasına neden olur (38)

İnsan vücudunda bulunan bakterilerin büyük çoğunluğu, gastrointestinal sistemde bulunur. Normal barsak florasının kolonizasyonu önleyici etkisi, immün savunma mekanizmaları, intestinal mukozanın fiziksel bariyel işlevi gibi normalde bulunan bazı

faktörler bakterilerin gastrointestinal sistem dışına çıkmasını ve vücut için bir tehdit oluşturmasını engellerler. Flora içindeki bakteri dengesinin patojen bakteriler lehine değişmesi, intestinal mukozanın harabiyeti, immün savunma mekanizmalarının bozulması gibi durumlarda bakteriler transmukozal yolla veya intersellüler aralıktan geçerek gastrointestinal sistem dışına çıkabilirler. İlk olarak mezenter lenf noduna ulaşan bakteriler burada fagosite edilemezlerse, karaciğer, dalak ve akciğer gibi sistemik organlara yayılabilir. Bu durum bakteriyel translokasyon olarak bilinir (81). Barsağın bariyer fonksiyonunu bozup bakteriyel translokasyona neden olan en önemli etkenlerden birisi İ/R hasarıdır.

İntestinal iskemi/reperfüzyon (İ/R) serbest oksijen radikallerini ortaya çıkararak doku hasarına neden olması yanında mukozal bütünlüğü bozacak şekilde endotel ve epitel hücrelerinde yıkıma neden olarak intestinal geçirgenlikte artmaya ve intestinal bariyer fonksiyonun iflasına yol açar (82). Sonuç olarak, endojen enterik bakterilerin mezenterik lenf nodları, karaciğer, dalak ve kan dolaşımı gibi ekstraintestinal bölgelere translokasyonu oluşur ve sepsis ve çoklu organ yetmezlikleri ortaya çıkabilir (82). Yapılan çalışmalarda sepsis ve MODS nedeni ile ölen birçok hastanın klinik bulgularında veya otopsilerinde septik bir odak bulunamadığı halde bu hastalarda enterik kaynaklı bakteriyemi olduğu bildirilmiştir (81).

Bakteriyel translokasyon ile ilgili çalışmalar 1960'lı yıllarda başlamıştır. İlk kez Fine sepsis ve ölüme yol açan sistemik bakteriyel infeksiyon kaynağının intestinal sistem olabileceğini düşünmüş ve hemorojik şok oluşturulan deneklerde, intestinal sistemden çıkan bakteri ve endotoksinlerin şok sonrasında sepsise neden olduğunu göstermiştir. Bu çalışmadan sonra, bakteriyel translokasyonla ilgili klinik ve deneysel araştırmalar giderek yoğunlaşmıştır (58,83).

Akut mezenterik iskemi tedavisinde farklı ajanlar çalışılmış; son yıllarda vitamin E, vitamin C, selenyum, mannitol, allopurinol gibi bazı antioksidan bileşiklerin iskemi-reperfüzyon hasarını azalttığı tespit edilmiştir (18). Biz de çalışmamızda Tempolün iskemi-reperfüzyon hasarına ve bakteriyel translokasyona etkisini inceledik



Bu çalışmanın sonuçlarına göre, membran geçirgen bir radikal tutucusu olan Tempol, mezenterik iskemi-reperfüzyon ve sonrasında görülen intestinal bakteri translokasyonunu önlemektedir. Tempol'un bu yararlı etkisi, bu ajanın lipid peroksidasyon ve nötrofil birikimini azaltmasıyla ve ileum dokusunda GSH'yı arttırmasıyla gösterildiği gibi, intrasellüler bir serbest oksijen radikali tutucusu olmasına bağlıdır.

Tempol (4 - hidroksi - 2, 2, 6, 6 - tetrametilpiperidin - N - oksil), elektron spin rezonans spektroskopide geniş çapta kullanılan spin label Tempo'nun suda çözünen bir analogudur. Tempol, biyolojik membranları geçen stabil, düşük moleküler ağırlıklı (moleküler ağırlığı, 172 Dalton) bir piperidin nitroksid'tir (63). Tempol'un süperoksit anyonlarının etkilerini *in vitro* azalttığını belgeleyen pek çok çalışma vardır. Tempol'un hücre içinde H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>' e bağlı mitokondriyal solunumda bozulmayı konsantrasyon bağımlı bir şekilde azalttığı gösterilmiştir (14). Bu nedenle Tempol'un koruyucu etkilerinin, bu stabil nitroksid radikalın hücre içi süperoksit anyonlarının özellikle hidroksil radikallerinin temizleyicisi olarak işlev görebilmesine bağlı olduğu ileri sürülmüştür (14). Tempol verilmesi biyolojik sıvılarda tempol birikimine yol açar ve DNA zincir kırıklarını önler (71).

Tempol'un intestinal iskemi-reperfüzyona bağlı doku hasarını azalttığı konusunda kanıtlar vardır. Sıçanlarda SMA oklüzyonu ve reperfüzyonu, distal ileumda ağır bir hasar meydana getirir. Distal ileumda meydana gelen bu hasarın Tempol ile belirgin bir şekilde azaltıldığı Thiemermann ve arkadaşları tarafından gösterilmiştir (63).

Biz çalışmamızda, bir deneysel akut mezenterik İ/R modelinde reperfüzyon öncesinde Tempol ile tedavi gören deney grubunda bakteriyel translokasyonun anlamlı olarak azaldığını gözlemledik. Daha da ötesi, Tempol tedavisi istatistiksel olarak anlamlı rakamlara ulaşmamakla birlikte ileumda bakteri üreme hızında bir azalma sağladı. Daha önce de gösterildiği gibi, mezenterik İ/R barsaklarda sadece mukoza hasarı oluşturmakla kalmamakta, aynı zamanda intestinal motor aktivitede değişiklikler başlatarak gastrointestinal transit zamanında yavaşlamaya neden olmaktadır (84-86). Enterik sinir sisteminde oluşan bu yapısal ve nöronal değişiklikler ve transit zamanındaki yavaşlama bakteri temizliğinde yetersizliğe yol açarak aşırı üremeye ve sonuçta translokasyon ile sonuçlanabilir (84,87,88).

Deneyimizde Tempol ile tedavi edilen gruptaki ratların ileum dokularında anlamlı olarak düşük bulunan MPO aktivitesi ile gösterilen nötrofil birikimindeki azalmanın da oksidatif hasarın engellenmesine sekonder olduğu görülmektedir. Nötrofiller İ/R hasarının gidişinde önemli bir rol oynarlar. Reperfüzyon sonrasında nötrofillerin sistemik aktivasyonu sitokinler gibi medyatörler ve serbest oksijen radikalleri aracılığıyla olmaktadır (89). Aktive olan bu nötrofiller inflamasyona ve oksidatif hasara yol açarlar. İ/R hasarı, endotelyal yıkım ve nötrofil infiltrasyonu arasındaki bu kısır döngünün artan şekilde ek serbest radikal birikimine neden olduğu bildirilmiştir (90). Bu bulgular Aydın ve ark.larının yakın zamanda yaptığı bir çalışmanın sonuçlarıyla birlikte ele alındığında, Tempol tedavisinin etkin bir şekilde İ/R ile ilişkili intestinal hasarı bu kısır döngüyü kırarak engellediği görülmektedir (91).

İntestinal İ/R hasarının başlamasında ve gelişiminde pek çok mekanizma rol oynar. Bunlardan başlıcaları serbest oksijen radikallerinin aşırı üretimi, lökositlerin artan ekspresyonu ve üretimi ile sitokinler gibi inflamatuvar medyatörlerin üretimidir (10). Katalitik bir reaksiyon aracılığıyla hidroksil radikal oluşumunu zayıflatmasının yanısıra hidrojen peroksitin neden olduğu hasara da engel olur (64,68). Biyolojik membranları geçemeyen rekombinant süperoksit dismutazdan farklı olarak, Tempol bu membranlardan geçer ve hücre içindeki süperoksit anyonları tutarak hidroksil radikallerinin ve diğer serbest radikallerin oluşmasını önler (63,92). Bu serbest oksijen radikallerinin özellikle hücresel membran lipidlerinin peroksidasyonunu da içeren farklı mekanizmalarla hücre hasarına ve sonuçta nekroza neden olduğuna inanılmaktadır (10). Lipid radikalleri pek çok radikal reaksiyon ile oluşabilir. Lipid radikali, memeli hücre membranlarında bol miktarda doymamış yağ asitlerinin peroksidasyonuna sebep olarak hücre hasarına neden olmaktadır. Lipid radikali oksijen ile reaksiyona girer ve lipid peroksid radikalini yapar. Tüm biyolojik membranlar lipid peroksidasyonuna duyarlıdır. Geçirgenlik değişkenliklerinden başlayarak membranda yapısal ve fonksiyonel bozukluklar oluşabilir. Membran bütünlüğü bozulabilir. Lipid peroksid radikali diğer lipid hidroperoksidlerini oluşturur. Hidroperoksidler yüksek derecede toksik ürünlere dönüşür. En toksik ürünler "aldehid"lerdir (93). Serbest oksijen radikalleri çok kısa

ömürlü olduğundan dolayı direkt yöntemlerle ölçümleri zor olmakta, bu yüzden indirekt yöntemler tercih edilmekte ve genellikle lipid peroksidasyon ürünü olan MDA düzeyine bakılmaktadır (77). Otamiri ve arkadaşlarının intestinal İ/R çalışmalarında, İ/R grubunda MDA seviyelerinde anlamlı bir artış olduğu gösterilmiştir (57). Mevcut deneysel modelimizde, superior mezenterik arterin okluzyonunu takiben oluşan reperfüzyon ileum dokularında malondealdehid düzeylerinde anlamlı bir ciddi artışa neden olmuş ve Tempol tedavisi yapılan grupta MDA düzeylerinde azalmayla gösterildiği şekilde lipid peroksidasyonu engellenmiştir.

GSH tüm hücrelerde doğal olarak bulunan endojen bir antioksidandır. Redükte glutatyon, DNA sentezi, protein sentez regülasyonu ve detoksifikasyon gibi olaylarda önemli rol oynar. Hüresel GSH eksikliği, mitokondriyal ve sitozolik redükte glutatyon havuzunu etkiler. Mitokondriyal redükte glutatyon, solunum zincirinde meydana gelen serbest oksijen radikallerinin detoksifikasyonu, tiol grubu içeren protein yapılarının korunması ve mitokondriyal membran potansiyelinin düzenlenmesinde önemli rol oynar (94,95). GSH'nın İ/R hasarına sekonder ortaya çıkan serbest radikallerle reaksiyona girme potansiyeli vardır ve bu maddenin prekursorleri değişik tiplerdeki serbest radikallerin aracılık ettiği hüresel hasara karşı koruyucudur (96). Oksidanlar GSH sentezinde hız kısıtlayıcı bir enzim olan gama glutamil sentetaz geninin transkripsiyonunu hızlandırabilmektedir (97). Yakın zamanda yapılan bir çalışmada kolonik anastomozların iyileşmesinde İ/R hasarının uzak etkileri araştırılmış ve Tempol'un GSH'nın tüketilmesini iyileştirdiği bildirilmiştir (91). Tempol aynı zamanda bir deneysel polimikrobial sepsis modelinde perianastomotik dokulardaki GSH düzeylerini normalleştirmiştir (98). Sola ve arkadaşları, İ/R periyodu boyunca hücre içi redükte glutatyonun tükendiğini ve bunun serbest oksijen radikallerine bağlı oksidatif stresin bir göstergesi olarak kullanılabileceğini göstermiştir (99). Wu ve arkadaşları, rat ince bağırsağında iskemik ön koşullama konusunda yaptıkları bir çalışmada, intestinal İ/R sonrası reaktif oksijen türevlerinin anlamlı derecede mitokondriyal okside glutatyon (GSSG) seviyelerini artırdığını, mitokondriyal redükte glutatyon seviyelerini ve GSH/GSSG oranını azalttığını ve mitokondriyal lipid peroksidasyonunu artırdığını göstermiştir (100). Zhao ve arkadaşları, redükte glutatyonun serbest oksijen radikalleri

ile tepkimeye girerek doğal oksijen, OH<sup>-</sup> ve süperoksit radikalinden korunma sağlayabileceğini göstermiştir (101). Glutamin, glutatyonun prekürsörüdür. Glutamin, glutatyonun aksine hücre içine girebilir. Salehi ve arkadaşları, intestinal İ/R hasarını azaltmak üzere lüminal olarak glutamin içeren aminoasit bazlı solüsyon kullanmışlar ve intestinal dokuda redükte glutatyon seviyelerinin yaklaşık iki misli arttığını tespit etmişlerdir (102). Bizim çalışmamızda, ileum doku örneklerinde GSH düzeylerindeki azalmanın oksidatif hasara bağlı olduğu ve Tempol ile tedavi edilen gruptaki ileum doku GSH düzeylerindeki düzelmelerin Tempol'un antioksidan özelliklerine bağlı olduğu görülmektedir (63,96).

Sonuç olarak, bu çalışmada Tempol'un superior mezenterik arter oklüzyonu yapılan ratlarda intestinal iskemi/reperfüzyon hasarının zararlı etkilerini anlamlı olarak engellediği görülmüştür. Tempol'un bu yararlı etkilerinin esas olarak bu ajanın antioksidan özelliklerine bağlı olduğu düşünülebilir. Azalmış nötrofil birikimi ve bakteriyel translokasyonda iyileşme olması gibi diğer bulguların da bu antioksidatif etkilere sekonder olarak geliştiği görülmektedir. Bu bilgiler ışığında iskemi/reperfüzyon hasarının önlenmesinde umut veren bir molekül olan Tempol'un, terapötik ajan olarak kullanılabilmesi için etkinliğinin ortaya konulabileceği klinik çalışmalara gereksinim vardır.

## SONUÇLAR

Bu çalışmada Tempol'ün mezenterik iskemi-reperfüzyon ve sonrasında görülen bakteriyel translokasyona etkisi incelenmiş ve şu sonuçlar elde edilmiştir:

1-İntestinal İ/R'a bağlı olarak ortaya çıkan bakteriyel translokasyon Tempol ile tedavi gören deney grubunda (Grup III), sadece İ/R uygulanan gruba göre (Grup II) istatistiksel olarak anlamlı derecede düşük bulundu ( $p<0,05$ ). Tempol tedavisi grup III'te ileum bakteri sayımında anlamlı bir düşüş yapmakla birlikte, istatistiksel olarak grup II'deki sayımdan farklı değildi ( $p>0,05$ ).

2-İntestinal İ/R sonrası Tempol uygulanan grupta (Grup III), ileum doku MPO düzeyleri sadece İ/R uygulanan gruba göre (Grup II) istatistiksel olarak anlamlı derecede düşük bulundu ( $p<0,05$ ).

3- İntestinal İ/R'a bağlı olarak ortaya çıkan hasarda, ileum dokusundaki GSH seviyeleri, Tempol uygulanan grupta (Grup III), sadece İ/R uygulanan gruba göre (Grup II) istatistiksel olarak anlamlı derecede yüksek bulundu ( $p<0,05$ ).

4- İntestinal İ/R'a bağlı olarak ortaya çıkan hasarda, ileum dokusunda lipid peroksidasyonunun göstergesi olarak kullanılan MDA düzeyleri, Tempol ile tedavi gören deney grubunda (Grup III), sadece İ/R uygulanan gruba göre (Grup II) istatistiksel olarak anlamlı derecede düşük bulundu ( $p<0,05$ ).

## ÖZET

Akut mezenterik iskemi; iskemi-reperfüzyon hasarına bağı olarak dokularda harabiyetle sonuçlanan, hayatı tehdit edici vasküler bir acildir. Suda çözünen antioksidan bir ajan olan Tempol, nitroksidlerin bir üyesi olup, süperoksit ve diğer toksik radikalleri detoksifiye eder. Bu çalışmada ratların intestinal dokularında, süperior mezenterik arter iskemi reperfüzyonunun zarar verici etkilerinin Tempol tarafından önlenip önlenemeyeceğini araştırmayı amaçladık.

Bu çalışmada ratlar randomize olarak her grubta on hayvan olacak şekilde üç gruba ayrıldı. Grup I' de SMA izole edildi oklüze edilmedi. Grup II ve Grup III'de SMA 60 dk. süresince aortadan çıktığı yerin hemen distalinden oklüze edildi, daha sonra klemp açılarak reperfüzyon periyodu başlatıldı. Grup III'de reperfüzyon başlamasından 5 dk önce 30 mg /kg Tempol bolus i.v verildi. Reperfüzyonun ilk 60 dk 'sında 30 mg / kg olarak devam edildi. Grup I ve Grup II' de aynı hacimde salin çözeltisi tempol olmadan uygulandı. Reperfüzyonun başlamasından 24 saat sonra tüm ratlar sakrifiye edildi. İ/R'nin indüklediği intestinal zedelenmeyi ve bakteriyel translokasyonu araştırmak üzere doku örnekleri alındı.

Grup II'de MPO aktivitesi, MDA düzeyleri ve bakteriyel translokasyon insidansında anlamlı derecede yükseklik saptanırken, glutatyon düzeylerinde azalma saptandı. Tempol verilen ratlarda (Grup III) araştırılan bu parametrelerin tamamı normal bulundu.

Sonuç olarak Tempol, ratlarda oluşturulan SMA oklüzyon modelinde iskemi-reperfüzyon hasarının zararlı etkilerini ve bakteriyel translokasyonu önlemektedir

## SUMMARY

Acute mesenteric ischemia is a life-threatening vascular emergency resulting in tissue destruction due to ischemia-reperfusion (I/R) injury. Tempol (4-hydroxy-2,2,6,6-tetramethylpiperidine-N-oxy) is a water-soluble antioxidative agent. It is a member of nitroxides, which detoxifies superoxide and possibly other toxic radicals in vivo. In this study, we aimed to investigate whether Tempol prevents harmful effects of superior mesenteric ischemia-reperfusion on intestinal tissues in rats.

Rats were randomly divided into three groups, each having ten animals. In group I, the superior mesenteric artery (SMA) was isolated but not occluded. In group II and group III, the SMA was occluded immediately after branching from the aorta for 60 minutes. After that, the clamp was removed and the reperfusion period began. In group III, 5 minutes before the start of reperfusion, a bolus of 30 mg/kg Tempol was administered intravenously and continued in a dose of 30 mg/kg for the first 60 minutes of reperfusion period. In group I and group II, same volume of saline solution was given without Tempol. All animals were killed 24 hours after reperfusion. Tissue samples were collected to evaluate the I/R-induced intestinal injury and bacterial translocation.

There was a statistically significant increase in myeloperoxidase activity, malondialdehyde levels and in the incidence of bacterial translocation in group II, along with a decrease in glutathione levels. These investigated parameters were found to be normalized in Tempol treated animals (group III).

We conclude that Tempol prevents bacterial translocation while precluding the harmful effects of ischemia/reperfusion injury on intestinal tissues in a rat model of superior mesenteric artery occlusion.

## **KAYNAKLAR**

- 1-Bradbury AW, Brittenden J, McBride K, Ruckley CV: Mesenteric ischaemia: a multidisciplinary approach. *Br J Surg* 1995;82:1446-1459.
- 2-Heys SD, Brittenden J, Crofts TJ: Acute mesenteric ischaemia: the continuing difficulty in early diagnosis. *Postgrad Med J* 1993;69:48-51.
- 3-Lock G: Acute intestinal ischaemia. *Best Pract Res Clin Gastroenterol* 2001;15:83-98.
- 4-Sitges-Serra A, Mas X, Roqueta F, Figueras J, Sanz F: Mesenteric infarction: an analysis of 83 patients with prognostic studies in 44 cases undergoing a massive small-bowel resection. *Br J Surg* 1988;75:544-548.
- 5-Stoney RJ, Cunningham CG: Acute mesenteric ischemia. *Surgery* 1993;114:489-490.
- 6-Oldenburg WA, Lau LL, Rodenberg TJ, Edmonds HJ, Burger CD: Acute mesenteric ischemia: a clinical review. *Arch Intern Med* 2004;164:1054-1062.
- 7-Wilcox MG, Howard TJ, Plaskon LA, Unthank JL, Madura JA: Current theories of pathogenesis and treatment of nonocclusive mesenteric ischemia. *Dig Dis Sci* 1995;40:709-716.
- 8-Burns BJ, Brandt LJ: Intestinal ischemia. *Gastroenterol Clin North Am* 2003;32:1127-1143.
- 9-Schoenberg MH, Beger HG: Reperfusion injury after intestinal ischemia. *Crit Care Med* 1993;21:1376-1386.



- 10-Kong SE, Blennerhassett LR, Heel KA, McCauley RD, Hall JC: Ischaemia-reperfusion injury to the intestine. *Aust N Z J Surg* 1998;68:554-561.
- 11-Yasuhara H: Acute mesenteric ischemia: the challenge of gastroenterology. *Surg Today* 2005;35:185-195.
- 12-Bulger EM, Maier RV: Antioxidants in critical illness. *Arch Surg* 2001;136:1201-1207.
- 13-Chatterjee PK, Cuzzocrea S, Brown PA, Zacharowski K, Stewart KN, Mota-Filipe H, Thiernemann C: Tempol, a membrane-permeable radical scavenger, reduces oxidant stress-mediated renal dysfunction and injury in the rat. *Kidney Int* 2000;58:658-673.
- 14-McDonald MC, Zacharowski K, Bowes J, Cuzzocrea S, Thiernemann C: Tempol reduces infarct size in rodent models of regional myocardial ischemia and reperfusion. *Free Radic Biol Med* 1999;27:493-503.
- 15-Rak R, Chao DL, Pluta RM, Mitchell JB, Oldfield EH, Watson JC: Neuroprotection by the stable nitroxide Tempol during reperfusion in a rat model of transient focal ischemia. *J Neurosurg* 2000;92:646-651.
- 16-Cuzzocrea S, McDonald MC, Mazzon E, Filipe HM, Costantino G, Caputi AP, Thiernemann C: Beneficial effects of tempol, a membrane-permeable radical scavenger, in a rodent model of splanchnic artery occlusion and reperfusion. *Shock* 2000;14:150-156.
- 17-Ozturk C, Avlan D, Cinel I, Cinel L, Unlu A, Camdeviren H, Atik U, Oral U: Selenium pretreatment prevents bacterial translocation in rat intestinal ischemia/reperfusion model. *Pharmacol Res* 2002;46:171-175.

- 18-Sileri P, Sica GS, Gentileschi P, Venza M, Benavoli D, Jarzembowski T, Manzelli A, Gaspari AL: Melatonin reduces bacterial translocation after intestinal ischemia-reperfusion injury. *Transplant Proc* 2004;36:2944-2946.
- 19-Talbot W.: Ischaemia and infarction. *Genel Pathology Seventh Edition*; Pearson Professional Limited 1996; 709-722.
- 20-Kumar Cotran Robbins, Çeviri Editörü: Uğur Çevikbaş. *Temel Patoloji Altıncı Edisyon*; Nobel Tıp Kitabevi 2000; 4-16.
- 21- Damjanov İ. , Linder J.: Cell injury and cellular adaptations. *Anderson's Pathology Tenth Edition*; Volum 1; 357-365.
- 22-Cotran RS, Kumar V, Robbins SL (1995). *Robbins pathologic basis of disease. 4 th ed.* Philadelphia: W.B. Saunders Company, 3-12.
- 23-Ramzi S. Cotran, Ischemia-reperfusion damage. In: Robbins Stanley L, Kumar V, eds. *Basic Pathology, Sixth Edition*, Philadelphia: Saunders Company, 2000: 1-9.
- 24-Reilly PM., Schiller HJ., Bulkley GB.: Pharmacologic approach to tissue injury mediated by free radicals and other reactive oxygen metabolites. *Am J Surg.* 1991 Apr;161(4):488-503.
- 25-Athar M.,Abdulla M., Sultana.: Free radicals and trace elements. *The Journal of Trace Elements in Experimental Medicine* 1993; 6: 65-73.
- 26-Cross C.E., Halliwell B , Allen A Antioxidant protection: A function of tracheobronhial and gastrointestinal mucus. *Lancet.* 1984 Jun 16;1(8390):1328-30.
- 27-Akkuş, İ.:Serbest radikaller ve fizyopatolojik etkileri. *Konya, MimozaYayınları*,: 1-80,1995.

28-Mc Cord, J.M.: Oxygen-derived free radicals in postischemic tissue injury. *N Engl J Med.* 1985 Jan 17 ; 312(3): 159-163.

29-Weiss SJ, Lobuglio AF: Phagocyte-generated oxygen metabolites and cellular injury. *Lab Invest.* 1982 Jul; 47(1):5-18.

30-Wink DA, Mitchell JB. Chemical biology of nitric oxide: Insights into regulatory, cytotoxic, and cytoprotective mechanisms of nitric oxide. *Free Radic Biol Med* 1998; 25: 434-456.

31-Miller RA., Britigan BE.: Role of oxidants in microbial pathophysiology. *Clin Microbiol Rev.* 1997 Jan; 10(1):1-18.

32-Girotti AW. Mechanisms of lipid peroxidation. *Free Radical Biol Med* 1985;1: 87-95.

33-Gutteridge JMC, Halliwell B. The measurement and mechanism of lipid peroxidation in biological systems. *Trends Biochem Sci* 1990; 15: 129-135.

34-Saltman P. Oxidative Stress: A radical view. *Semin Hematol* 1989; 26: 249-256.

35-Freeman, B.A., Crapo, J.D.: Free radicals and tissue injury. *Lab Invest.* 1982 Nov; 47(5):412-26.

36-Halliwell, B.: Free radicals, antioxidants, and human disease: curiosity, cause, or consequence? *Lancet.* 1994 Sep 10; 344(8924):721-724.

37-Grace PA. Ischaemia-reperfusion injury. *Br J Surg* 1994; 81: 634-647.

38-Zimmerman BJ, Granger DN. Reperfusion injury. *Surg Clin North Am* 1992; 72: 65-83.

39-Haglund U. Gut ischaemia. Gut 1994; 1: 73-76.

40-Mitsudo S, Brandt LJ. Pathology of intestinal ischemia. Surg Clin North Am 1992; 72: 43-63.

41-Parks DA, Granger DN. Contributions of ischemia and reperfusion to mucosal lesion formation. Am J Physiol 1986; 250: 749-753.

42-Parks DA, Bulkley GB, Granger DN. Role of oxygen derived free radicals in digestive tract diseases. Surgery 1983; 94: 415-421.

43-Park DA, Bulkley GB, Granger DN, Hamilton SR, et al. Ischemic injury in the cat small intestine: Role of superoxide radicals. Gastroenterology 1982; 82: 9-15.

44-Benjamin E, Oropello JM, Iberti TJ. Acute mezenteric ischemia: pathophysiology, diagnosis, and treatment. Disease-a-Month 1993; 39: 129-212.

45-Wang ZQ. The effects of adenosine on the energy metabolism of the reperfused intestine in rats. Surg Today-Jpn J Surg 1998; 28: 178-83.

46-Granger DN, Rutuli G, Cord JM. Superoxide radicals in feline intestinal ischemia. Gastroenterology 1981; 81: 22-29.

47-Özçelik MF, Durgun V, Pekmezci S ve ark. Mezenter iskemi-reperfüzyon hasarının önlenmesinde Allopurinol, Süperoksid Dismütaz ve Dimetil sülfoksit' in etkileri. Kolon Rektum Hastahklan Dergisi 1993; 3: 10-12.

48-Günel E., Çağlayan F., Çağlayan O.: Treatment of intestinal reperfusion injury using antioxidative agents. Journal of Pediatric Surgery. 1998 Oct; 33(10): 1536-1539.

49-Kazez A., Demirbağ M., Üstündağ B.: The role of melatonin in prevention of intestinal ischemia-reperfusion injury in rats. *Journal of Pediatric Surgery*. 2000 Oct; 35(10): 1444-1448.

50-Şener G., Akgün U., Şatıroğlu H.: The effect of pentoxifylline on intestinal ischemia/reperfusion injury. *Blackwell Science Fundamental & Clinical Pharmacology* 2001; 15; 19-22.

51-Li C, Jackson RM.: Reactive species mechanisms of cellular hypoxia-reoxygenation injury. *Am J Physiol Cell Physiol*. 2002 Feb; 282(2): C227-41.

52-Bulkley GB: Reactive oxygen metabolites and reperfusion injury: aberrant triggering of reticuloendothelial function. *Lancet*. 1994 Oct 1; 344(8927): 934-936.

53-Terada LS., Dormish JJ., Shanley PF.: Circulating xanthine oxidase mediates lung neutrophil sequestration after intestinal ischemia-reperfusion. *The American Physiological Society* 1992; L394-L401.

54-Granger DN: Role of xanthine oxidase and granulocytes in ischemia-reperfusion injury. *American Physiological Society* 1988; H1269-1275.

55-Grisham MB., Hernandez LA., Granger GB.: Xanthine oxidase and neutrophil infiltration in intestinal ischemia. *Am. J. Physiol.* 251 Gastrointest. Liver Physiol.; 14 1986; G567-G574.

56-Zimmerman BJ., Granger DN.: Role of hydrogen peroxide, iron and hydroxyl radicals in ischemia/reperfusion-induced neutrophil infiltration. *Physiologist* 31; A229; 1988.

57-Otamiri T: Oxygen radicals, lipid peroxidation, and neutrophil infiltration after small-intestinal ischemia and reperfusion. *Surgery* 1989; May; 593-597.

58-Dietch EA, Berg R, Robert S. Endotoxin promotes the translocation of bacteria from the gut. *Arch Surg* 1987; 122: 185-190.

59-Steffen EK , Berg RD, Deitch EA. Comparison of translocation rates of various indigenous bacteria from the gastrointestinal tract to the mesenteric lymph node. *J Infect Dis.* 1988 May; 157(5): 1032-1038.

60-Barry MC, Grace PA; Ischemia reperfusion injury. *Surgery* 1997; 15: 68-72.

61-Neary P,Redmond HP:ischemia-reperfusion injury and systemic inflammatory response syndrome ischemia-reperfusion injury.Blackwell Science 1999;123-36.

62-Collard CD,Lekowski R,Jordan JE,Agah A,Stahl GL:Complement activation Following Oxidative stres.*Mol immunol* 1999;36;941-8.

63-Thiemermann C. Membrane-permeable radical scavengers (tempol) for shock, ischemia-reperfusion injury, and inflammation. *Crit Care Med* 2003; 31: No. 1 (Suppl.) 76-84.

64-Monti E, Cova D, Guido E. Protective effect of the nitroxide tempol against the cardiotoxicity of Adriamycin. *Free Radic Biol Med* 1996; 121: 463-470.

65-Weiss RH, Flickinger AG, Rivers WJ. Evaluation of activity of putative superoxide dismutase mimics: Direct analysis by stopped-flow kinetics. *J Biol Chem* 1993; 268: 23049-23054.

66-Krishna MC, Russo A, Mitchell JB, et al: Do nitroxide antioxidants act as scavengers of superoxide anions or as SOD mimetics? *J Biol Chem* 1996; 271:26026-26031.

67-Samuni A, Winkelsberg D, Pinson A: Nitroxide stable radicals protect beating cardiomyocytes against oxidative damage. *J Clin Invest* 1991; 87: 1526-1530.

68-Reddan J, Sevilla M, Giblin F, et al: Tempol and deferoxamine protect cultured rabbit lens epithelial cells from H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> insult: Insight into the mechanism of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-induced injury. *Lens Eye Tox Res* 1992; 9: 385-393.

69-Laight DW, Andrews TJ, Haj-Yehia AI, et al: Microassay.

70-Laight DW, Kaw AV, Carrier MJ, et al: Interaction between superoxide anion and nitric oxide in the regulation of vascular endothelial function. *Br J Pharmacol* 1998; 124: 238-244.

71-Sasaki H, Lin LR, Yokohama T. Tempol protects against lens DNA strand breaks and cataract in the x-rayed rabbit. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 1998; 39: 544-552.

72-Volk T, Hensel M, Schuster H. Secretion of MCP-1 and IL-6 by cytokine stimulated production of reactive oxygen species in endothelial cells. *Mol Cell Biochem* 2000; 206:105-112.

73-Udassin R, Haskel Y, Samuni A. Nitroxide radical attenuates ischemia/reperfusion injury to the rat small intestine. *Gut* 1998; 42: 623-627.

74-Kuzu MA, Tanik A, Kale IT, Aslar AK, Koksoy C, Terzi C: Effect of ischemia/reperfusion as a systemic phenomenon on anastomotic healing in the left colon. *World J Surg* 2000;24:990-994.

75-Isenberg H: *Clinical microbiology procedures handbook*. ed 1, Washington DC, ASM, 1992.

76-Dogan AL, Dogan A, Canpinar H, Duzguncinar O, Demirpence E: Effect of

fludarabine on leukocyte functions. *Chemotherapy* 2004;50:283-288.

77-Okhawa H, Ohishi N, Yag K. Assay for lipid peroxidation in animal tissues by the reaction. *Anal Biochem* 1979; 95: 351-358.

78-Ellman GL: Tissue sulfhydryl groups. *Arch Biochem Biophys* 1959;82:70-77.

79-Brand JL., Boley JS.: ischemic and vascular lesions of the bowel. *Gastrointestinal Diseases* 1993; Vol: 2; Chapter: 97; 1927-1931.

80-Hebra A, Hong J, McGowan KL, et al. Bacterial translocation in mesenteric ischemia-reperfusion injury: Is dysfunctional motility the link ? *J Pediatr Surg* 1994; 29: 280-287.

81-Saadia R, Schein M, MacFarlane C, et al.: Gut barrier function and the surgeon. *Br J Surg* 77:487-492, 1990.

82-Berg RD: Bacterial translocation from the gastrointestinal tract. *Adv Exp Med Biol* 1999;473:11-30.

83-Baker JW, Deitch EA, LiM, et al.: Hemorrhagic shock induces bacterial translocation from the gut. *J Trauma* 28: 896-906, 1988.

84-Cattaruzza F, Cenac N, Barocelli E, Impicciatore M, Hyun E, Vergnolle N, Sternini C: Protective effect of proteinase-activated receptor 2 activation on motility impairment and tissue damage induced by intestinal ischemia/reperfusion in rodents. *Am J Pathol* 2006;169:177-188.

85-Hebra A, Brown MF, McGeehin K, Broussard D, Ross AJ, 3rd: The effects of ischemia and reperfusion on intestinal motility. *J Pediatr Surg* 1993;28:362-365; discussion 365-366.



86-Udassin R, Eimerl D, Schiffman J, Haskel Y: Postischemic intestinal motility in rat is inversely correlated to length of ischemia. An in vivo animal model. *Dig Dis Sci* 1995;40:1035-1038.

87-Calcina F, Barocelli E, Bertoni S, Furukawa O, Kaunitz J, Impicciatore M, Sternini C: Effect of N-methyl-d-aspartate receptor blockade on neuronal plasticity and gastrointestinal transit delay induced by ischemia/reperfusion in rats. *Neuroscience* 2005;134:39-49.

88-Lindestrom LM, Ekblad E: Structural and neuronal changes in rat ileum after ischemia with reperfusion. *Dig Dis Sci* 2004;49:1212-1222.

89-Essani NA, Fisher MA, Farhood A, Manning AM, Smith CW, Jaeschke H: Cytokine-induced upregulation of hepatic intercellular adhesion molecule-1 messenger RNA expression and its role in the pathophysiology of murine endotoxin shock and acute liver failure. *Hepatology* 1995;21:1632-1639.

90-Cuzzocrea S, McDonald MC, Mazzon E, Siriwardena D, Costantino G, Fulia F, Cucinotta G, Gitto E, Cordaro S, Barberi I, De Sarro A, Caputi AP, Thiemermann C: Effects of tempol, a membrane-permeable radical scavenger, in a gerbil model of brain injury. *Brain Res* 2000;875:96-106.

91-Aydin C, Teke Z, Aytakin F, Yenisey C, Kabay B, Simsek NG, Tekin K: Tempol prevents harmful effects of remote ischemia reperfusion injury on healing of experimental colonic anastomoses. *Int J Colorectal Dis* 2007;22:325-331.

92-Almeida LE, Borissevitch IE, Yushmanov VE, Tabak M: Different Micellar Packing and Hydrophobicity of the Membrane Probes TEMPO and TEMPOL Influence Their Partition Between Aqueous and Micellar Phases Rather than Location in the Micelle Interior. *J Colloid Interface Sci* 1998;203:456-463.

93-Cini M, Moretti A. Studies on lipid peroxidation and protein oxidation in the aging brain. *Neurobiol Aging* 1995; 16 : 53-57.

94-Kroemer G, Dallaporta B, and Resche-Rigon M. The mitochondrial death/life regulator in apoptosis and necrosis. *Annu Rev Physiol* 1998; 60: 619-642.

95-Vercesi AE, Kowaltowski AJ, Grijalba MT, Meinicke AR, and Castilho RF. The role of reactive oxygen species in mitochondrial permeability transition. *Biosci Rep* 1997; 17: 43-52.

96-Jefferies H, Coster J, Khalil A, Bot J, McCauley RD, Hall JC: Glutathione. *ANZ J Surg* 2003;73:517-522.

97-Nakamura S, Sugiyama S, Fujioka D, Kawabata K, Ogawa H, Kugiyama K: Polymorphism in glutamate-cysteine ligase modifier subunit gene is associated with impairment of nitric oxide-mediated coronary vasomotor function. *Circulation* 2003;108:1425-1427.

98-Aytekin FO, Teke Z, Aydin C, Kabay B, Yenisey C, Sacar S, Demir EM, Tekin K: Effects of a membrane-permeable radical scavenger, Tempol, on healing of colonic anastomoses in the cecal ligation and puncture model of polymicrobial sepsis in rats. *Am J Surg* 2007;193:723-729.

99-Sola A, De Oca J, Gonzalez R. Protective effect of ischemic preconditioning on cold preservation and reperfusion injury associated with rat intestinal transplantation. *Ann Surg* 2001; 234: 98.

100-Wu B, Ootani A, Iwakiri R, Fujise T, Tsunada S, Toda S, Fujimoto K. Ischemic preconditioning attenuates ischemia-reperfusion-induced mucosal apoptosis by inhibiting the mitochondria-dependent pathway in rat small intestine. *Am J Physiol*

Gastrointest Liver Physiol 2004; 286: 580-587.

101-Zhao X, Alexander JS, Zhang S, Zhu Y, Sieber NJ, Aw TY, Carden DL. Redox regulation of endothelial barrier integrity. American Journal of Physiology: Lung Cellular and Molecular Physiology 2001; 281: 879-886.

102-Salehi P, Madsen K, Zhu J, Castillo E, Avila J, Lakey JRT, Churchill TA. Alleviating Ischemia-Reperfusion Injury in Small Bowel. American Journal of Transplantation 2004; 4: 728-737.