

T.C.
DOKUZ EYLÜL ÜNİVERSİTESİ
TIP FAKÜLTESİ
ANESTEZİYOLOJİ VE REANİMASYON
ANABİLİM DALI

**RATLARDA İNTESTİNAL İSKEMİ REPERFÜZYON
HASARINA LEVOSİMENDANIN ETKİLERİ**

DR. M. OZAN ÖZKAYA

UZMANLIK TEZİ

İZMİR-2010

T.C.
DOKUZ EYLÜL ÜNİVERSİTESİ
TIP FAKÜLTESİ
ANESTEZİYOLOJİ VE REANİMASYON
ANABİLİM DALI

RATLARDA İNTESTİNAL İSKEMİ REPERFÜZYON HASARINA LEVOSİMENDANIN ETKİLERİ

UZMANLIK TEZİ

Dr. M. Ozan ÖZKAYA

TEZ DANIŞMANI

Yrd. Doç. Dr. Yüksel ERKİN

TEŐEKKÜR

Uzmanlık eğitimim boyunca bilgi ve deneyimlerini bizlerle paylaŐan hocalarım Sayın Prof. Dr. Zahide Elar, Sayın Prof. Dr. Emel Sağıroğlu, Sayın Prof. Dr. Ali GÜnerli, Sayın Prof. Dr. Atalay Arkan, Sayın Prof. Dr. Erol Gökeli, Sayın Prof. Dr. Semih Küçükğüçlü ve Sayın Prof. Dr. Ali Necati Gökmen' e;

Tez çalıŐmamın her aŐamasında desteğini ve anlayıŐını esirgemeyen danıŐman hocam Sayın Yrd.Doç.Dr. Yüksel Erkin' e;

Uzmanlık eğitimim boyunca, beraber çalıŐtıđım öğretim üyeleri, uzman ve asistan arkadaşlarıma;

Tezimin hazırlanmasında ki yardımları için Sayın Prof. Dr. Mustafa Olguner, Sayın Doç. Dr. Uğur Koca, Uzm. Dr. UlaŐ Bağatır ve Dr. Sinem Kıstır' a;

Anestezi teknikeri arkadaşlarıma, ameliyathane, yoğun bakım, ağrı ünitesi, gündüz hastanesi hemŐire ve personeline;

Sadece tezimin hazırlanması ve uzmanlık eğitimimde değil tanıdığım andan itibaren hayatımın her anında yanımda olan, sevgisini ve desteğini hiç esirgemeyen hocam Sayın Doç. Dr. Çimen Olguner' e;

Hayatıma anlam katan, sevgi ve anlayıŐlarıyla yanımda olan, eğitimim süresince onlara ayırabildiğim kısıtlı zamana rağmen bana hep destek veren canım aileme;

Anestezinin bana kazandırdığı en büyük değer olan, zor zamanlarımda beni ayakta tutan ve hayatı benimle paylaŐan canım eŐim FÜsun' a;

Sonsuz saygı, sevgi ve teŐekkürler.....

Dr. Ozan Özkaya

İÇİNDEKİLER

	<u>Sayfa No</u>
TABLO LİSTESİ	i
ŞEKİL LİSTESİ	i
GRAFİK LİSTESİ	ii
RESİM LİSTESİ	iii
KISALTMALAR	iv
ÖZET	v
SUMMARY	vi
1. GİRİŞ VE AMAÇ	1
2. GENEL BİLGİLER	2
2.1. İskemi.....	2
2.2. Reperfüzyon	6
2.3. İntestinal İskemi Reperfüzyon Hasarı	9
2.4. İntestinal İskemi Reperfüzyon Hasarının Sistemik Etkileri ..	11
2.5. İntestinal İskemi Reperfüzyon Hasarını Azaltıcı Yöntemler..	12
2.6. Levosimendan	15
3. GEREÇ VE YÖNTEM	19
4. BULGULAR	25
5. TARTIŞMA	30
6. SONUÇ VE ÖNERİLER.....	36
7. KAYNAKLAR.....	37

TABLO LİSTESİ

Sayfa No

Tablo 1. İnce barsağın histopatolojik değerlendirmesi **24**

ŞEKİL LİSTESİ

Sayfa No

Şekil 1. Hücre zedelenmesinde sitoplazmik kalsiyum artışının sebepleri
ve sonuçları **3**

Şekil 2. İskemi sonucu membran hasar mekanizmaları **5**

Şekil 3. İskemide pürin metabolizmasının gelişimi ve ksantin dehidrogenazın
ksantin oksidaza çevrilmesi, reperfüzyonda oksijen radikalinin
oluşumu **7**

Şekil 4. Serbest oksijen radikalinin dokudaki doğrudan ve dolaylı etkileri **8**

Şekil 5. Levosimendanın kimyasal yapısı **16**

GRAFİK LİSTESİ

Sayfa No

Grafik 1. İnce barsak dokusunda TBARS değerleri 25

Grafik 2. İnce barsak dokusunda MPO değerleri 26

Grafik 3. İnce barsak dokusunun histopatolojik değerlendirmesi27

RESİM LİSTESİ

Sayfa No

Resim 1: Süperiyor mezenterik arterin klempenmesi	22
Resim 2: İskemik ince barsak dokusu	22
Resim 3: Reperfüzyon sonrası ince barsak dokusu	22
Resim 4: <i>Sham</i> Grubu: Normal yapıdaki ince barsak dokusu	29
Resim 5: İİR Grubu: Villus dejenerasyonu, konjesyon, hemoraji ve ülserlerin görüldüğü ince barsak dokusu	29
Resim 6: İİR+L Grubu: Hafif kapiller konjesyonla beraber villus uçlarında ayrılmaların bululduğu ince barsak dokusu	29

KISALTMALAR

ATP:	Adenozin trifosfat
PMNL:	Polimorfonükleer lökosit
ADP:	Adenozin difosfat
SOR:	Serbest oksijen radikali
SOD:	Süperoksid dismutaz
H₂O₂:	Hidrojen peroksid
HEM:	Hemoprotein
MPO:	Myeloperoksidaz
DNA:	Deoksiribonükleikasit
LP:	Lipoprotein
MDA:	Malonildialdehit
SMA:	Süperiyor mezenterik arter
İR:	İskemi-reperfüzyon
İİR:	İntestinal iskemi-reperfüzyon
TNF-α:	Tümör nekrozis faktör alfa
IL-6:	İnterlökin – 6
GLP-2:	Glukagon <i>like</i> peptit – 2
İÖK:	İskemik ön koşulama
FÖK:	Farmakolojik ön koşulama
TnC:	Troponin C
ÇOY:	Çoklu organ yetersizliği
TBARS:	<i>Thiobarbituric Acid Reactive Substance</i>
FDE:	Fosfodiesteraz

RATLARDA İNTESTİNAL İSKEMİ REPERFÜZYON HASARINA LEVOSİMANDANIN ETKİLERİ

ÖZET

Amaç: Arteriyel kaynaklı barsak kan akımının kısmen veya tamamen tıkanması sonrası intestinal iskemi; kan akımının yeniden sağlanması ile reperfüzyon ortaya çıkmaktadır. İntestinal iskemi reperfüzyon hasarı çoklu organ yetersizliğine ve ölüme neden olabilir. Bu çalışmanın amacı intestinal iskemi reperfüzyon hasarı üzerine levosimendanin etkisinin araştırılmasıdır.

Gereç ve Yöntem: DEÜTF Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu onayı alındıktan sonra ağırlıkları 250-300 g arasında değişen 21 adet erkek Albino Wistar rat her birinde 7'şer denek olacak şekilde 3 gruba ayrılmıştır. Tüm gruplara laparotomi uygulanmış ve süperiyor mezenter arter (SMA) diseke edilmiş, *Sham* Grubu'na başka bir işlem yapılmamıştır. İntestinal İskemi Reperfüzyon (İİR) Grubu'nda SMA 60 dk klemlenerek iskemi oluşturulmuş ve klemp açılarak 120 dk reperfüzyon için beklenmiştir. İntestinal İskemi Reperfüzyon+Levosimendan (İİR+L) Grubu'nda 12 µg/kg 10 dk levosimendan yüklemesini takiben SMA klemlenmiş, 60 dk iskemi süresince 0,2 µg/kg/dk infüzyon sürdürülmüş, 60 dk sonunda infüzyon durdurulmuş ve 120 dk reperfüzyon için beklenmiştir. 120 dk sonunda denekler sakrifiye edilmiş, biyokimyasal işlemler (doku miyeloperoksidaz (MPO) ve *Thiobarbituric Acid Reactive Substance* (TBARS)) ve histopatolojik değerlendirme (*Chiu* skoru) için ileum doku örnekleri alınmıştır. İstatistiksel değerlendirmede $p < 0,05$ anlamlı kabul edilmiştir.

Bulgular: Doku MPO ve TBARS düzeylerinin İİR Grubu'nda, *Sham* ve İİR+L Gruplarına göre belirgin yüksek olduğu, *Sham* ve İİR+L Grupları arasında fark olmadığı bulunmuştur. *Chiu* skorunun *Sham* Grubu'nda İİR ve İİR+L Gruplarına oranla anlamlı düşük, İİR grubunda ise İİR+L grubuna göre anlamlı yüksek olduğu saptanmıştır.

Tartışma: Çalışmamızda levosimendanın, deneysel intestinal iskemi reperfüzyon modelinde doku hasarını azalttığı saptanmış, bu olumlu etkinin öncelikle deneysel çalışmalar ile ayrıntılandırılması gerektiği sonucuna varılmıştır.

Anahtar Kelimeler: İntestinal iskemi, reperfüzyon hasarı, levosimendan

EFFECTS OF LEVOSIMENDAN ON RATS' INTESTINAL ISCHEMIA REPERFUSION INJURY

SUMMARY

Purpose: Full or semi arterial obstruction of gut' s blood flow produces intestinal ischemia and reperfusion occurs by reinstation of blood flow. Intestinal ischemia reperfusion (IIR) injury can cause multi organ failure and death. The purpose of this study is to search the effects of levosimendan on IIR injury.

Material and Method: After taking ethic committee agreement from D.E.U.T.F. 250-300 g weighted 21 male Albino Wistar rat divided into 3 groups (n=7). Laparotomy was applied to all groups and superior mesenteric artery (SMA) was detected. Nothing else was applied to sham group. In IIR group SMA was clamped for 60 min. and 120 min. reperfusion period was applied. In IIR+Levosimendan (IIR+L) group after 12 µg/kg 10 min. levosimendan loading dose, SMA was clamped for 60 min ischemia time with 0,2 µg/kg/h infusion after than infusion was stopped and for reperfusion 120 min were waited. After 120 min rats were sacrificed and for biochemical (tissue MPO and TBARS) and histopathology researchs ileum tissue samples were taken. $p < 0,05$ was accepted as significant.

Results: Tissue MPO and TBARS levels are higher in IIR group compared with sham and IIR+L group and no difference was found sham and IIR+L groups. In sham group chiu score was lower than IIR and IIR+L group. In IIR group chiu score was significantly higher than IIR+L group.

Discussion: In present study, levosimendan decreased tissue damage in experimental IIR model. The effects of levosimendan need more detailed experimental studies.

Key words: Intestinal ischemia, reperfusion injury, levosimendan.

1. GİRİŞ VE AMAÇ

İntestinal iskemi reperfüzyon (İİR) hasarı akut mezenter iskemisi, abdominal aort anevrizma cerrahisi, strangule herniler, volvulus, neonatal nekrotizan enterokolit, travma, septik şok ve hatta ağır yanıklar gibi pek çok durum için önemli bir sorundur (1). İntestinal İR sonucu oluşan hasar sadece bu bölgede sınırlı kalmayıp, aktive olan birçok mekanizma ve ortaya çıkan toksik ürünler nedeniyle başta akciğer olmak üzere karaciğer, kalp, beyin, böbrekler gibi uzak organlarda hasar oluşturur ve çoklu organ yetersizliğine (ÇOY) neden olabilir (2).

İntestinal İR hasarının oluşmasında iki mekanizma söz konusudur. Bunlardan ilki serbest oksijen radikallerinin açığa çıkması, diğeri ise hidrolitik bir enzim olan fosfolipaz A2' nin iskemik dönemde kalsiyum etkisiyle aktive olarak membranlardaki yağ asitlerini parçalamasıdır (2). İntestinal iskemik hasar, mukozanın villus tabakasından başlar (3). Kapiller geçirgenlik artar ve hasarın şiddetine göre barsak mukozasının tüm katları tutulabilir (4).

Barsaklar sistemik inflamatuvar yanıt sedromunda önemli bir rol oynadığından, splanknik perfüzyon üzerine vazodilatör ajanların etkisi önemlidir (5). Levosimendan yeni bir inodilatör ajandır. Kardiyak troponin C' nin (TnC) sitoplazmik kalsiyuma duyarlılığını artırarak kasılmayı sağlarken, vasküler düz kas hücrelerindeki adenosin trifosfat (ATP) duyarlı potasyum kanallarını açarak arteriyoller ve venöz genişlemeye neden olur. Ayrıca fosfodiesteraz (FDE) III' ü selektif olarak inhibe eder (6).

Bu çalışmanın amacı intestinal iskemi reperfüzyon (İİR) hasarı üzerine yeni bir inotropik ve vazodilatör ilaç olan levosimendanın etkisinin araştırılmasıdır.

2. GENEL BİLGİLER

Günlük uygulama içerisinde tıbbın pek çok dalında iskemi ve reperfüzyonun yer aldığı olgular vardır. Şok, yanık, sepsis, pankreatit gibi olgularda ortaya çıkan hipovolemi ile iskemi ve bu durumların resüsite edilmesi ile de reperfüzyon hasarı ortaya çıkmaktadır. Serebrovasküler olaylarda, miyokard infarktüsünde, mezenterik vasküler olaylarda uygulanan trombolitik tedavi veya revaskülarizasyon ameliyatları da yine reperfüzyon hasarına neden olmaktadır. Travmalarda ve travma cerrahilerinde hipovolemi ya da kanama kontrolü nedeniyle yapılan klemp, tampon uygulamaları iskemiye neden olurken, resüsitasyon sonrası mutlak bir reperfüzyon ile yine iskemi reperfüzyon (İR) hasarı oluşmaktadır. Kardiyovasküler cerrahide aortik ya da periferik arteriyel klemp uygulaması sonrası ortaya çıkan tablo İR hasarı ile karakterizedir. Transplantasyon cerrahisinde de kaçınılmaz olarak transplante edilecek organın iskemi ve reperfüzyonu söz konusu olup oluşan hasar greft fonksiyonlarını etkilemektedir. Özetle bütün cerrahi işlemler sırasında dokuların iskemisi ve sıklıkla bunun takip eden bir reperfüzyon süreci vardır (7).

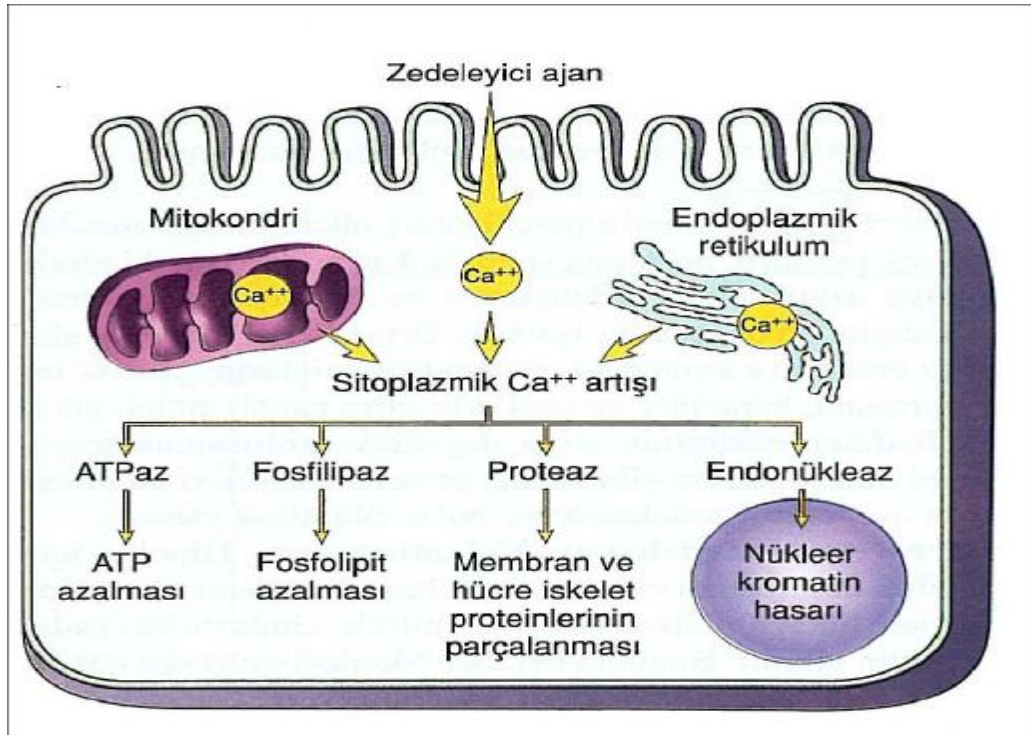
2.1 İskemi

İskemi, organ veya dokuyu perfüze eden kan akımındaki yetersizliğe bağlı olarak gelişen geri dönüşümlü veya dönüşümsüz hücre ve doku hasarıdır (1). Geri dönüşümsüz hücre hasarını önleyebilmek için dokuya yeniden kan akımının sağlanması (reperfüzyon) gerekmektedir. Ancak reperfüzyonun gerçekleşmesi, iskemik dokularda iskeminin dokuda oluşturduğu hasardan daha fazla hasara yol açmaktadır. İskemi ve reperfüzyon periyotlarından oluşan bu zararlı etkilerin tümü İR hasarı olarak adlandırılmaktadır (8).

Oksijen (O₂) hücre fonksiyonu için temel gereksinimdir. İskemi sonucu dokulara yeterli O₂ sağlanamaması hücre disfonksiyonuna ve sonuçta hücre ölümüne neden olan bir dizi kimyasal olayı başlatır. Oluşan bu anaerobik metabolizmayla laktik asit artışının yarattığı asidoz normal enzim kinetiğini değiştirerek yüksek enerjili bağların azalmasına

ve hücre dengesinin korunması için gereken enerjinin yetersiz kalmasına sebep olur (3,9).

İskemi nedeniyle gerekli enerjinin sağlanamaması hücre membranında bulunan adenozin trifosfat (ATP) bağımlı Na^+/K^+ pompasında işlev yetersizliğine yol açar. K^+ hücre dışına çıkarken Na^+ ve Cl^- iyonları hücre içine girerler. İyon dengesizliği hücre içerisinde izoozmotik su birikimine ve akut hücre şişmesine neden olur. Anaerobik glikoliz sonucu oluşan asidoz, karbondioksit (CO_2) birikimiyle oluşan karbonik asit (H_2CO_3) ile daha da derinleşir. ATP bağımlı çalışan diğer bir pompa ise ekstrasellüler ve intrasellüler kalsiyum'u (Ca^{++}) dengelemektedir. İntrasellüler Ca^{++} artışı ile proteolitik enzimler ve fosfolipazlar aktive olurlar. Fosfolipazların aktivasyonu araşidonik asit oluşumu ile sonuçlanır. Araşidonik asit direkt etkiyle mitokondriyal enzimleri inhibe eder ve serbest radikal oluşumunu artırır (10,11)(şekil 1).



Şekil 1: Hücre zedelenmesinde sitoplazmik kalsiyum artışının sebepleri ve sonuçları (11).

Hücre içerisinde oluşan bu sitotoksik olaylar sonucunda ribozomlar granüllü endoplazmik retikulumdan ayrılır. Polizomlar monozomlara parçalanır ve protein sentezi azalır. Bu aşamadan sonra iskemi hala devam ederse geri dönüşümsüz zedelenme ortaya çıkar. Hasara, mitokondrilerde şiddetli vakualizasyon ve matrikste kalsiyumdan zengin şekilsiz yoğunluk birikimi eşlik eder (11).

Membran hasarının potansiyel nedenleri (11)(şekil 2):

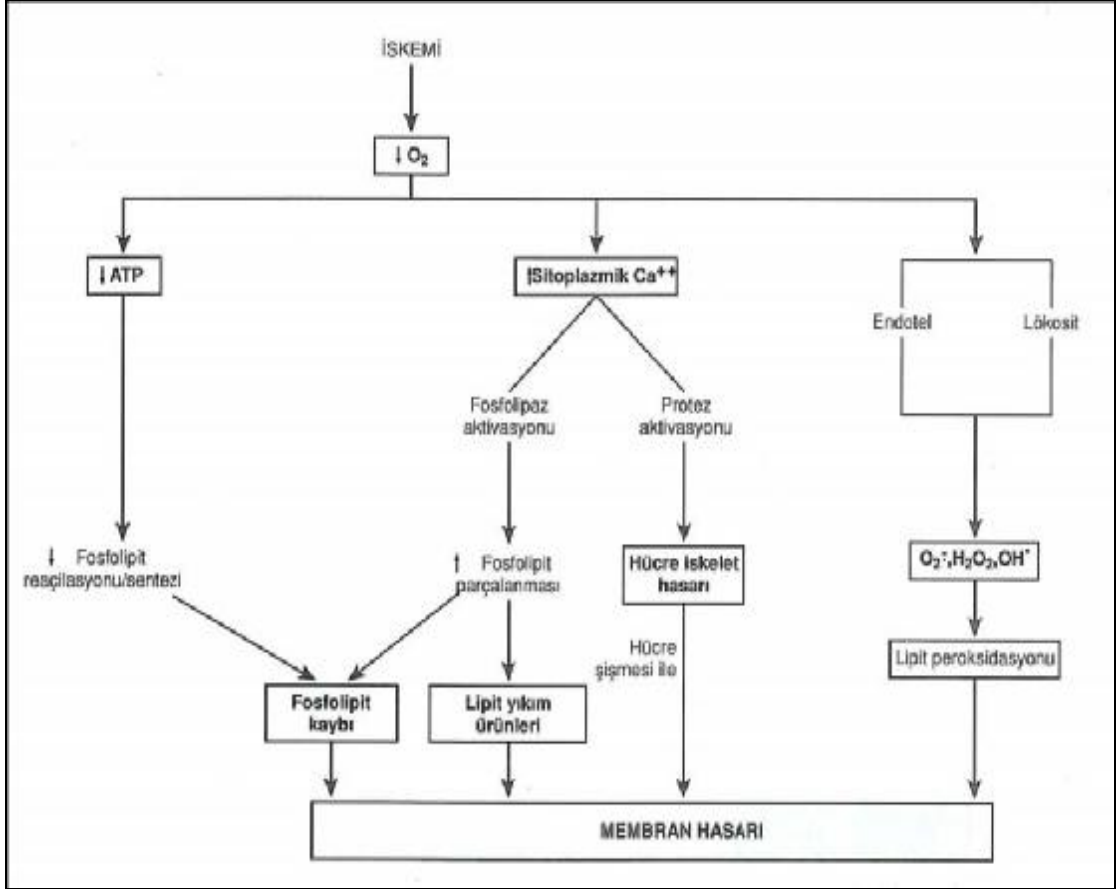
a) *Membran fosfolipitlerinin ilerleyici kaybı*: İskemiye bağlı kalsiyum artışı ile endojen fosfolipazların aktivasyonu yıkımın artmasına yol açabilir.

b) *Hücre iskelet anormallikleri*: Hücre içi Ca^{+2} 'un artması ile aktive olan proteazlar hücre çatısına zarar verebilirler.

c) *Serbest oksijen radikalleri (SOR)*: İndirgenmiş O_2 türevleri hücre membranına ve elemanlarına zarar verirler. SOR iskemik dokularda, özellikle kan akımının düzelmesinden sonra artar ve büyük ölçüde reperfüzyon sırasında zedelenme alanına gelen polimorfonükleer lökositler (PMNL) tarafından oluşturulduğu düşünülmektedir.

d) *Lipid yıkım ürünleri*: Fosfolipidlerin parçalanması sonucu iskemik hücrelerde biriken bu ürünler membranlar üzerinde hasar oluşturur (11).

Membran hasarının mekanizmaları ne olursa olsun sonuç, yukarıda tanımlanan olaylarla Ca^{+2} 'un bol miktarda hücre içine girmesidir(11).



Şekil 2: İskemi sonucu membran hasar mekanizmaları (3).

İskemi süresince ATP üretimi kısıtlıdır. Fakat yaşamsal faaliyetlerin devamı için tüketim sürmektedir. ATP enerji üretmek için ADP' ye daha sonrada adenozine indirgenir. Adenozin, intrasellüler alanda inozine, sonra da hipoksantine dönüşür. Hipoksantin oksijenli ortamda ksantin oksidaza ardından ürik aside dönüştürülerek atılır. Fakat iskemik dokuda yeterli oksijen olmadığından hipoksantin dokuda birikir (12). Michael ve ark. (13) yaptıkları çalışmada iki saat süre ile kısmi iskemi uygulanmış intestinal dokuda, iskemi sonrası ATP konsantrasyonunun iskemi öncesi konsantrasyona göre %40 azaldığını ve hipoksantin miktarının da 7,6 kat arttığını göstermişlerdir.

2.2 Reperfüzyon

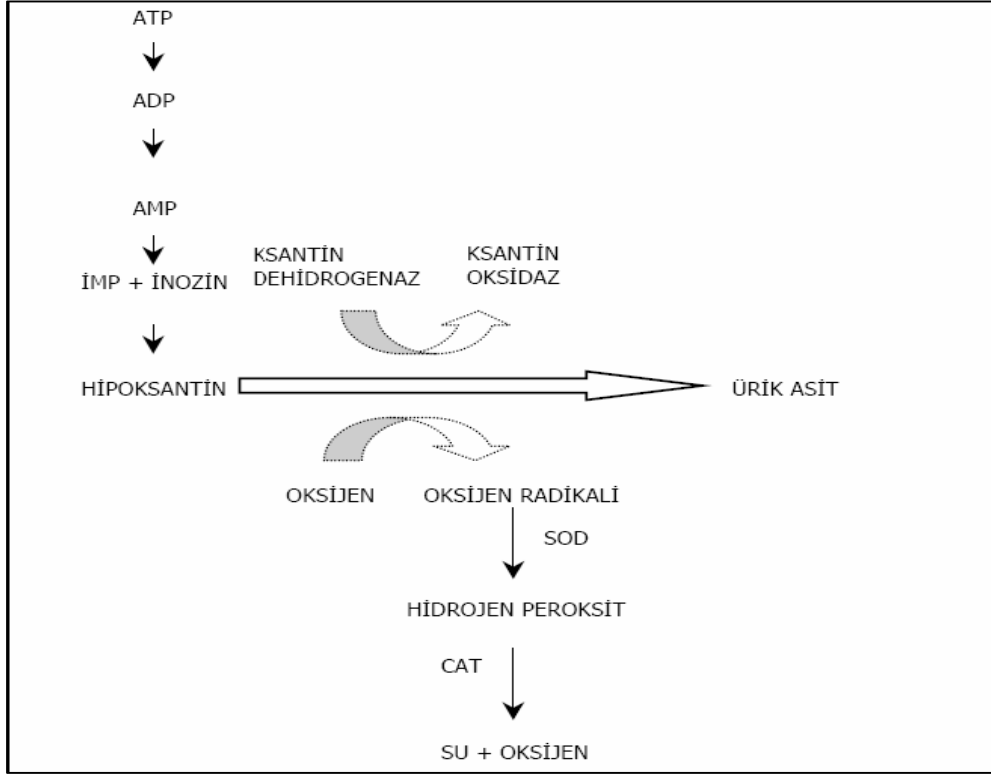
Reperfüzyon hasarı, belirli bir süre iskemiye maruz kalan dokuların tekrar perfüze olması sonucu mikrosirkülasyonda görülen tıkanmalar ve tekrar perfüze olan dokunun nekrozu ile karakterize bir yaralanma olarak tanımlanmıştır (14).

İskemik dokuda kan akımının yeniden sağlanmasının, enerji gereksiniminin yeniden yapılanması ve toksik metabolitlerin ortadan kaldırılması gibi yararlı etkileri olmaktadır (3). Ancak iskemik dokunun reperfüzyonu paradoksik olarak daha fazla hasara yol açmaktadır. Parks ve Granger (15), yaptıkları deneysel çalışmada reperfüzyon ile oluşan hasarın iskemi ile ortaya çıkan hasardan daha fazla olduğunu göstermişlerdir.

Reperfüzyon hasarının oluşmasında iki mekanizma söz konusudur. Bunlardan ilki serbest oksijen radikallerinin açığa çıkması, diğeri ise hidrolitik bir enzim olan fosfolipaz A₂' nin iskemik dönemde Ca⁺² etkisiyle aktive olarak membranlardaki yağ asidlerini parçalamasıdır (16).

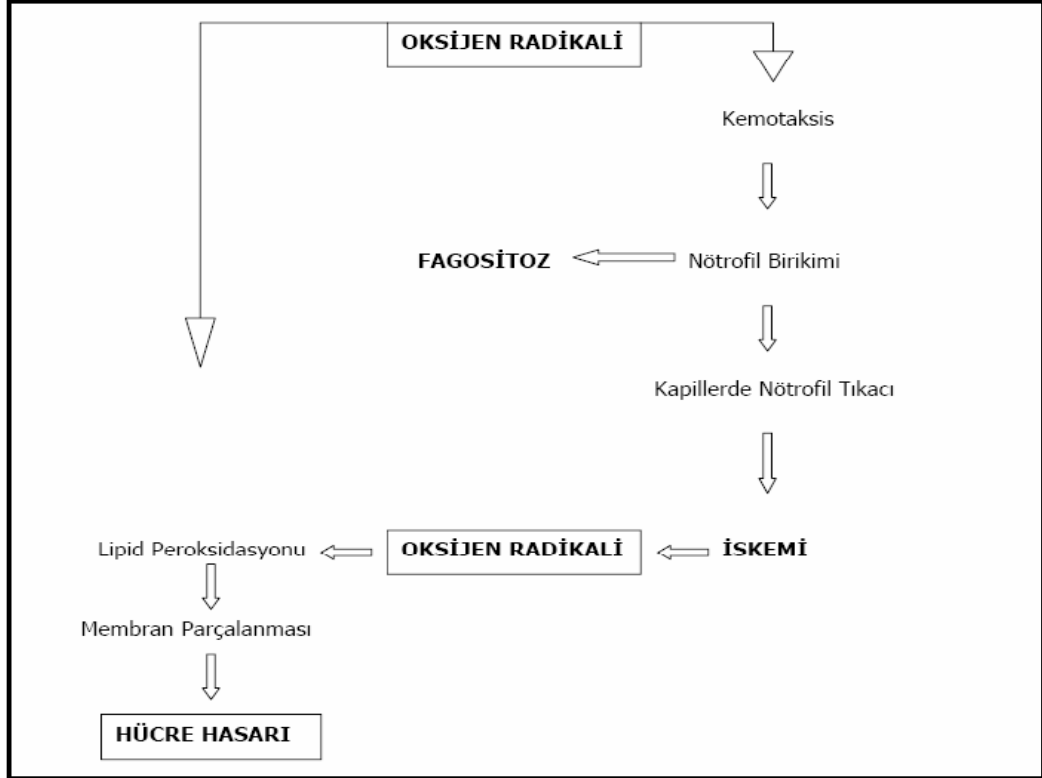
2.2.1 Serbest Oksijen Radikalleri

Reperfüzyonun sağlanması ile birlikte sitotoksik olaylar serisi başlar. Bu olayları başlatan faktörlerin en önemlisi SOR' dir (17). Reperfüzyon sonucu dokuya kan ve O₂ sağlanır. Dokuda iskemi süresince biriken hipoksantin atılmaya çalışılır. Oksijen varlığında ksantin oksidaz enzimi aktive olarak serbest oksijen radikallerini oluşturur (18). Serbest oksijen radikali, süperoksit dismutaz (SOD) enzimi ile hidrojen peroksit ve O₂' ye dönüşür. Hidrojen peroksit ise katalaz enziminin etkisiyle su ve O₂' ye çevrilir (19)(şekil 3). Artan SOR' un başlattığı lipid peroksidasyonu ve protein hasarı sonucu hücre fonksiyonları bozularak doku nekrozu ortaya çıkar (17).



Şekil 3: İskemide pürin metabolizmasının gelişimi ve ksantin dehidrogenazın ksantin oksidaza çevrilmesi, reperfüzyonda oksijen radikalinin oluşumu (13).

Serbest oksijen radikalleri hem dokuya doğrudan zarar vermekte hem de PMNL'lerin hasarlı dokuda birikmesine yol açar. Nötrofil ve monositler primer lizozomal granüllerinde bir hemoprotein (HEM) enzimi olan miyeloperoksidaz (MPO) içerirler. Nötrofiller dolaşımda bulunan PMNL'lerin % 90'ından fazlasını oluştururlar. Dokuya gelen aktive PMNL'ler MPO, elastaz, proteaz, kollajenaz, laktoferrin ve katyonik proteinler gibi enzimleri açığa çıkarırlar. Bu enzimler dokudaki hasarı arttırırken daha fazla radikal oluşmasına neden olurlar (19)(şekil 4).



Şekil 4: Serbest oksijen radikalinin dokudaki doğrudan ve dolaylı etkileri (13).

Serbest oksijen radikalleri dokuda deoksiribonükleikasit (DNA), protein ve en çok da lipidlerle reaksiyona girerek yapılarını bozarlar. Lipid peroksidasyonu (LP) başladığında yeni serbest radikaller oluşturarak kısır döngüyü tetikler ve reperfüzyon hasarının diğer mediyatörü fosfolipaz A₂' yi aktive eder. Fosfolipaz A₂' tarafından aktif hale getirilen lisofosfolipaz, trombosit aktive edici faktör ve araşidonik asit ile lipid peroksidasyonu devam eder. LP sonucunda hidrokarbonlar, pentan ve lipid peroksidasyon belirleyicisi olarak da kullanılan son ürün *Thiobarbituric Acid Reactive Substance* (TBARS) veya malonildialdehit (MDA) açığa çıkar (12).

2.2.2 Fosfolipaz A₂

Diğer bir mekanizma ise hidrolitik bir enzim olan fosfolipaz A₂' nin iskemik dönemde kalsiyum etkisiyle aktive olarak hücre membranındaki yağ asidlerini parçalamasıdır (16). Fosfolipaz A₂' nin etkisiyle lesitinden lizolesitin, sefalinden lizosefalin, fosfatidilkolinden lizofosfatidilkolin meydana gelir. Fosfolipaz A₂ ayrıca araşidonik asit mekanizmasını aktive ederek prostaglandinlerin ve lökotrienlerin üretimini de uyandır. Lizolesitin, çok sitotoksik bir maddedir. Lizofosfatidilkolin normalde iskemiden sonra görülen intestinal geçirgenliği artırır (19).

2.3 İntestinal iskemi-reperfüzyon hasarı

Barsak kan akımının genellikle arteriyel kaynaklı parsiyel veya tam obstrüksiyonu sonrası intestinal iskemi ortaya çıkar. Mezenter iskemilerinin çoğunda neden, aortadaki aterom plaklarından kaynaklanan süperiyor mezenterik arter (SMA) embolisidir (20). Bunun dışında miyokard infarktüsü, dissekan anevrizma, aortik rekonstrüktif cerrahiler, hiperkoagulabilite, sepsis, invaziv neoplazmlar, abdominal travma, şok, dehidratasyon, barsak rezeksiyonu, volvulus gibi birçok durum da mezenter iskemisine yol açmaktadır (11).

İntestinal iskemik hasar barsak mukozasının villus tabakasında başlar (3). Kan akımında kısa süreli azalmalarda bile villus uçlarında ağır hipoksi oluşarak iskemik doku hasarı oluşabilir. Önce kapiller ardından mukozal permeabilite artar. Yüzeysel mukozada oluşan hasarı transmukozal ve transmural hasar takip eder. Kritik ve septik hastalarda görülen intestinal iskemi, yüzeysel mukozal hasara sebep olurken strangülasyon, mezenterik vasküler oklüzyon, non-oklüziv obstrüksiyon olarak bilinen durumlar ise daha derin doku hasarına neden olurlar (4). Geçici iskemiden kaynaklanan değişiklikler yüzeysel ve lokalize olabileceği gibi transmural infarktüs veya gangren ile birlikte yaygın olabilir. Oluşan patolojik görünüm iskeminin şiddeti, süresi, olayın hızı ve kollateral dolaşımın bulunup bulunmaması gibi etkenlere bağlıdır (21).

İntestinal iskemi sırasında artan kapiller permeabiliteye birçok mekanizma katkıda bulunabilir. Mukozal kapillerlerin 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. Mukozanın iskemik hasarı sonucunda lümenin daha fazla miktarda proteolitik enzim, bakteri ve endotoksin dolaşıma girmektedir. Bunun sonucunda kardiyodepresan faktörlerin de salınımıyla kardiyak ve respiratuvar sistemler bozulur, intestinal iskemi daha da artar (22).

İskemi reperfüzyon hasarının gerek başlatıcı gerekse ilerletici nedenlerinin başında gelen serbest oksijen radikalleri, normal metabolizma sırasındaki oksidasyon redüksiyon reaksiyonları sırasında da oluşan bir üründür. Ancak inflamasyon, iskemi, radyasyon, antibiyotik ve antineoplastik ilaçların klinik uygulamalarında oksijen metabolizmasının artması sonucu artan serbest oksijen radikalleri hücresel membranlar, enzimler, polisakkaritler ve nükleik asitler üzerinde toksik etki oluşturarak doku hasarına yol açar (22,23).

İntestinal İR hasarı sonucu SOR oluşturan en önemli mekanizma, hipoksantin-ksantin oksidaz yoludur. Hipoksantin, dokunun oksijenizasyonu ile ksantin dehidrogenaz aracılığıyla ürik aside dönüşür. Hipoksi halinde ise ksantin dehidrogenaz ksantin oksidaza çevrilir. Bu enzimlerin en yüksek konsantrasyonu villus uçlarında saptanmıştır (24).

Serbest oksijen radikalleri intestinal sistemde doğrudan çevredeki molekülleri etkileyerek hücre membranının yapı ve bütünlüğünü bozarlar. Serbest oksijen radikalleri ve lipid peroksidlerinin dolaylı etkisiyle fosfolipaz A₂ ve araziidonik asit metabolizması aktive olur. Reaksiyon sonucu oluşan prostaglandin, tromboksan ve lökotrienler, permeabilite değişikliklerine, mikro ve makro sirkülasyonda bozukluklara aracılık ederler. İskemik dokudan açığa çıkan bazı maddeler ve nötrofiller SOR etkisiyle kapiller damar duvarına yapışarak doku içine göç ederler (25).

İntestinal mukoza villus kapillerlerinde İR sonrası görülen diğer bir olay mikrovasküler vazodilatasyona eşlik eden kapiller permeabilite artışıdır. İnterstisyel alana, barsak lümenine sıvı ve eritrositler kaçarak kapiller tıkaçlar ortaya çıkar. Sonuç olarak reperfüzyon başladıktan kısa bir süre sonra, nötrofil ve eritrosit tıkaçları doku kanlanması tekrar azalmasına yol açar ki bu olaya “*no-reflow fenomeni*” denir (25).

2.4 İntestinal iskemi-reperfüzyon hasarının sistemik etkileri

İntestinal İR hasarı sonrasında başta akciğerler olmak üzere uzak organlarda oluşan hasar çoklu organ yetersizliğine (ÇOY) ve ölüme neden olabilir (26). Akciğerlerde ödem, hemoraji ve PMNL infiltrasyonu ile karakterli bir durum ortaya çıkar (27). Bu hasarı tanımlayan pek çok mekanizma olmakla birlikte, %80’ inde PMNL’ lerin sorumlu olduğu bildirilmiştir (26,28).

İntestinal İR hasarı, barsak mukoza engelini bozarak bakteriyel translokasyona neden olur (28,29). Endotoksin, farklı dokularda monosit ve makrofajları uyarak inflamatuvar sitokinlerin sentez ve salınımını uyarak sistemik inflamatuvar yanıt sendromunu başlatan primer mediyatördür (27,30). Makrofajlar açısından zengin olan akciğer ve karaciğer transloke olan endotoksinin ilk geçtiği organlardır (28). İntestinal İR hasarını takiben vena porta yoluyla karaciğere ve akciğere ulaşan endotoksinler, önce Kupffer hücrelerini ve sonra alveolar makrofajları aktive ederek tümör nekrosis faktör alfa (TNF- α) ve interlökin-6 (IL-6) gibi sitokinlerin üretimini arttırırlar (28,30).

TNF- α 17kDa molekül ağırlığında bir sitokindir. Aktive monosit, makrofaj, mast, endotel, T, B ve Kupffer hücrelerinde üretilir. İntestinal İR sonrası oluşan akut akciğer hasarından sorumlu tutulan en önemli sitokin olduğu öne sürülmektedir (26).

İntestinal İR hasarının böbrekler üzerinde de olumsuz etkileri bulunmaktadır. SMA’ nın bir saatlik iskemi ve bir saatlik reperfüzyonu ile böbrek kan akımında, sodyum ve inülin klirensinde belirgin düşme kaydedilmiş (31). Bir diğer araştırmada ise oluşturulan

İİR hasarının hepatik kan akımı, safra üretimi ve ATP düzeylerini belirgin düşürerek, karaciğer perfüzyonu ve fonksiyonlarını azalttığı gösterilmiştir (32).

2.5 İntestinal iskemi reperfüzyon hasarını azaltıcı yöntemler

İskemi reperfüzyon hasarı sonucu oluşan oksidatif stresi azaltmak için antioksidan mekanizmalar ve farklı ekzojen yöntemler bulunmaktadır (3).

2.5.1 Doğal (endojen) Antioksidanlar

2.5.1.1 Enzimler

Mitokondrial sitokrom oksidaz sistemi

Solumun zincirinin son enzimi sitokrom oksidaz süperoksidi detoksifiye eder. Bu işlem oksidasyon reaksiyonu ile olur ve sonuçta enerji üretimi sağlanır. Ancak süperoksid üretimi çoğu zaman bu enzimin kapasitesini aşar bu durumda diğer antioksidanlar devreye girer(33).

Süperoksid Dismutaz

Serbest radikallere karşı organizmada ilk savunma SOD enzimi ile gerçekleşir. SOD, Süperoksit radikalini metabolize eder ve daha zararlı olan hidroksil radikalinin oluşumunu engeller. Süperoksit radikalini hidrojen perokside (H_2O_2) ve moleküler O_2 ' ye dönüştürür. Tepkime ürünü olan H_2O_2 tarafından inhibisyona uğrar (34).

Katalaz

Katalaz, konsantrasyonu değişmekle birlikte tüm hücrelerde bulunan yapısında bir hemoprotein içeren enzimdir. Sitoplazmada %20, peroksizomlarda %80 oranında bulunur. H_2O_2 'nin oluşum hızının yüksek olduğu durumlarda katalitik reaksiyonla iki molekül H_2O_2 ' yi suya dönüştürerek ortamdaki uzaklaştırır (35).

Glutasyon Peroksidaz (GPx)

Glutasyon sistemi, oksidatif hasarın azaltılmasında rol oynayan serbest radikallerin hücre içinde detoksifikasyonuna neden olan ve lipid peroksidasyonunu önleyen en önemli endojen mekanizmalardandır. İntrasellüler glutasyon olarak bulunan en güçlü *thiol* bileşimidir. GPx enzimi, glutatyondan ayırarak H₂O₂' yi suya dönüştürür, selenyuma bağlı sitoplazmik bir enzimdir, H₂O₂' yi detoksifiye ederek su ve okside glutatyona dönüştürür (36).

Glutasyon-S-Transferaz

Özellikle araşidonik asit ve linoleat hidroperoksitleri olmak üzere lipid peroksitlerine karşı Glutasyon-S-Transferazlar selenyum bağımsız Glutasyon Peroksidaz aktivitesi göstererek bir savunma mekanizması oluştururlar (36).

Hidroperoksidaz

2.5.1.2 Enzim Olmayanlar

Lipid fazda bulunanlar

α - tokoferol ve β -karoten

Sıvı fazda bulunanlar (hücre sitozolünde veya kan plazmasında)

Askorbik asit, melatonin, ürat, sistein, seruloplazmin, transferin, laktoferrin, myoglobin, hemoglobin, ferritin, metiyonin, albümin, bilirubin, glutasyon.

2.5.1.3 Diğer Antioksidanlar

Karotenoidler, melatonin, glutasyon, ürat, sistein, albümin, serüloplazmin (37).

2.5.2 Ekzojen Antioksidanlar ve diğ er yöntemler

Vitamin E, vitamin C gibi vitaminler süperoksit, hidroksil ve lipid peroksit radikallerini tutma özelliğine sahiptirler. Süperoksit dismutaz, katalaz, glutatyon peroksidaz gibi enzimler, allopürinol gibi metal bağlayan proteinler, dimetil sülfoksit, desferroksamin gibi birçok ajan oksijen radikallerinin oluşumunu azaltarak, radikallerin yükseltgen olmalarını engeller ya da DNA onarım mekanizmalarını arttırarak antioksidan etki gösterirler (3).

Topaloğ lu ve ark (38), iskemiye maruz kalan intestinal dokuda artış gösteren prostaglandin E₂' nin (PGE₂), rat intestinal İR hasarı üzerine etkilerini araştırdıkları çalışmalarında, PGE₂' nin barsaktaki iskemik hasarı anlamlı olarak azalttığını, iskemik hasarın geri dönüşümsüz safhaya gelmesini önlediğini bildirmişler. Zhang ve ark (39) barsak epitelinin endokrin hücrelerinden salınan ve mukozal DNA tamirini arttıran glukagon-like peptit 2' nin (GLP-2) rat intestinal İR hasarı üzerine koruyucu etkilerini araştırmışlar, GLP-2' nin bakteriyel translokasyonu, SOR' un oluşumunu, endotoksin 1 salınımını ve proinflamatuvar sitokinlerin üretimini azaltarak intestinal İR hasarına karşı koruyucu olduğunu göstermişlerdir.

Oxymatrine, "sofora flavences ait" isimli geleneksel Çin bitkisinden elde edilen ve kronik hepatit tedavisinde kullanılan bir ilaçtır. Farmakolojik etkileri arasında immun sistemin düzenlenmesi, antiinflamatuvar ve histamin salınımının engellenmesi bulunmaktadır. Zhao ve ark (2), rat intestinal İR hasarına *oxymatrine*' nin etkisini araştırdıkları çalışmalarında bu ajanın lipid peroksidasyonunu, apoptozisi ve histolojik hasarı azalttığını bildirmişlerdir.

Uzun bir iskemi döneminde olusan hücre hasarını azaltmak amacıyla iskemi öncesinde uygulanan kısa iskemi reperfüzyon periyodları iskemik önkosullama (İÖK) olarak tanımlanır (40). Davis ve ark (41), rat ince barsağında, İÖK' nın lökositlerin inflamasyon alanına yönelmesinde etkili olan P-selektinin artışı ve böylece nötrofil adezyonunu önlediği bulmuşlar. İÖK, uzak organlardaki hasarı TNF- α aracılı P-selektin

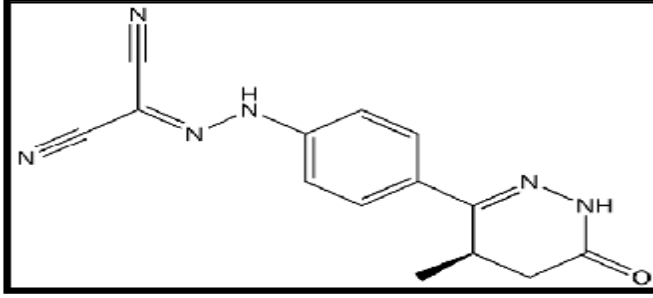
artışı (42) ve lipid peroksidasyonunu azaltarak iyileştirmektedir (43). Tam olarak netleşmemekle birlikte İÖK' nın etki mekanizmasında en çok nitrik oksit (NO), adenozin, protein kinaz C (PKC) ve ısı şok proteinleri üzerinde durulmaktadır (44).

İskemi reperfüzyon hasarının önlenmesi için İÖK yanında farmakolojik önkoşullama da (FÖK) uygulanabilmektedir. Bu amaçla antioksidanlar, nitrik oksit, glutamin, glisin, enteral beslenme tedavileri gibi birçok madde deneysel olarak uzun süredir uygulanmaktadır (45).

Alfa-calcitonin gene-related peptide (α -CGRP), İÖK' nın koruyucu etki mekanizmasında NO ile birlikte rol alan, gastrointestinal sistemde yaygın olarak bulunan kapsain duyarlı bir transmitterdir (46). Li ve ark (46), rat intestinal İR hasarı üzerine nitrogliserin ile oluşturulan FÖK' nın etkilerini araştırdıkları çalışmalarında nitrogliserin verilen grupta İR grubuna göre serum α -CGRP ve NO seviyelerinin yüksek histopatolojik skorun (*Chiu* skoru) düşük olduğunu bulmuşlardır.

2.6 Levosimendan

Levosimendan, troponin C' ye (TnC) yüksek bağlanma afinitesi olan, (R)-[[4-(1,4,5,6- tetrahidro-4-metil-6-okso-3-piridazinil)-fenil]hidrazono]propandinitril yapısında, kapalı formülü $C_{14}H_{12}N_6O$ olan piridazinon-dinitril türevi kardiyovasküler bir ajandır (Sekil 5). Moleküler ağırlığı 280.3 g/mol' dür. Orta derecede lipofilik özelliktedir. Zayıf asittir (pKa=6.3). Distile su ve fosfat tamponlarında çözünürlüğü azdır. Etanoldeki çözünürlüğü yüksek olduğundan ticari infüzyon preparatlarında çözücü olarak etanol kullanılmıştır (47).



Şekil 5: Levosimendanın kimyasal yapısı (47)

Levosimendan kalp yetersizliğinin akut alevlenmesinin kısa dönem tedavisi için geliştirilmiş, miyokardın Ca^{+2} 'a duyarlılığını arttıran ve vazodilatör etkiye sahip yeni bir inotropik ajandır. Teorik olarak bu ajan, hücre içi Ca^{+2} ve cAMP düzeylerini arttırmaksızın, troponin C' ye bağlanarak kontraktıl proteinlerin Ca^{+2} 'a duyarlılığını arttırarak kardiyak performansı iyileştirirler (48). Ayrıca, levosimendan fosfodiesterazı (FDE) selektif olarak inhibe eder. Diğer Ca^{+2} duyarlılaştırıcıların FDE inhibisyonu terapötik dozlarda izlenirken, levosimendanın bu etkisi yalnızca terapötik düzeyin üzerindeki dozlarda izlenmektedir (49). Levosimendanın miyosit ve damar duvarlarındaki ATP bağımlı K^+ kanallarını açarak, sistemik vasküler yatakta vazodilatasyona, miyokardiyal önyük ve artyükte azalmaya neden olmaktadır (48). Levosimendanın K-ATP kanal açıcı etkisi ilacın iskemiye karşı koruyucu etkileri olmasını da sağlamaktadır (50).

Sürekli sabit dozda infüzyon yapıldığında kararlı duruma 4. saatte ulaşır; ancak, daha hızlı etki istendiğinde yükleme dozu infüzyonu ile plazma doruk konsantrasyonuna 12 dk sonra ulaşılır. Levosimendan, %95-98 oranında plazma proteinlerine bağlanır. Karaciğerde konjugasyonla metabolize olur, 1/3' ü idrarla, 1/3' ü feçesle atılır. Ancak, barsaktaki bakteriler feçesteki metabolitlerin bir kısmını redüksiyonla aromatik bir amin olan aktif OR-1855 metabolitine dönüştürürler. OR-1855' de reabsorpsiyon ile karaciğerde asetillenerek daha aktif metabolit olan OR-1896' ya dönüşür. Sağlıklı

gönüllülerde OR-1896' nın yarılanma ömrü 60 saattir (51). Seyreltme işlemi %5 glukoz çözeltisi ve %0.9 NaCl ile yapılır, intravenöz infüzyon ile uygulanır. Önerilen tedavi dozu 10 dakikada 6-24 µg/kg yüklemeyi takiben 24 saat boyunca 0.05-0.2 µg/kg/dk sürekli infüzyon şeklindedir (52).

Levosimendan in vitro ve in vivo olarak vazodilatasyon oluşturabilmektedir. Levosimendanın insan koroner arteri (53), insan portal veni (54) ve sıçan mezenterik arterinde (55) gevşeme oluşturduğu ve sıçan arteriyal myositlerinde K-ATP kanallarını aktive ettiği (56) gösterilmiştir.

Barsak kan akımının azalması veya kesilmesi lokal, bölgesel, sistemik anormalliklerle sonuçlanıp çoklu organ yetersizliğine (ÇOY) yol açabilir (27). Barsakların ÇOY' ndeki rolü nedeniyle birçok araştırmada vazoaaktif ajanların etkisi araştırılmıştır. İnotropik ve vazopresörler kalp hızını, kan basıncını arttırırken bölgesel kan akımı ve oksijen tüketimi üzerine yararlı veya zararlı etkiler gösterebilirler (57).

Koyunlarda intravenöz (İV) *Escherichia coli* (E. Coli) verilerek oluşturulan hiperdinamik sepsis modelinde norepinefrinin (NE) ortalama arter basıncını (OAB) arttırdığı fakat mezenterik kan akımı üzerine etki oluşturmadığı gösterilmiş (58). Septik hastalarda yapılan bir araştırmada NE ve dopamin uygulamasının hepatosplanknik kan akımını arttırdığı, hepatik enerji balansı üzerine farklı etkiler gösterdiği saptanmıştır. Dopamin negatif hepatik enerji balansı oluşturmuştur (59). Domuzlarda fekal peritonit yöntemiyle oluşturulan sepsis modelinde dopamin mezenterik kan akımını dobutamin ve doksaminine göre daha fazla arttırmıştır (60).

Levosimendan verilen sağlıklı köpeklerde selektif olarak duodenal kan akımında artış ve splanknik vasküler dirençte azalma oluşmuştur (61). Endotoksik şok oluşturulan domuzlarda levosimendan ön tedavisi portal ven kan akımını ve barsağa O₂ sunumunu arttırmış, ileal mukozal asidozun azalmasına katkı sağlamamıştır (5).

Sağlıklı köpeklerde yapılan bir çalışmada levosimendan, dobutamin ve milrinonun mide mukozal hemoglobin oksijenizasyonu, O₂ transportu ve tüketimi üzerine etkileri karşılaştırılmıştır. Levosimendan verilen köpeklerde mide mukozal hemoglobin oksijenasyonu anlamlı olarak artmış, sistemik oksijen transportu hafif düzeyde artmış ve stabil oksijen tüketimi sağlanmıştır. Milrinon verilen grupta benzer O₂ transportu ve tüketimi olmuş fakat mide mukozal hemoglobin oksijenizasyonunda artış olmamış. Dobutamin grubunda tüm analizlerde artış olmuştur. Bu sonuçlarla levosimendanın sistemik etkilerinden bağımsız olarak gastrik mukoza üzerine yararlı etkilere sahip olduğu belirtilmiştir (62).

Kalp dışında, diğer organların İR hasarlarında levosimendanla yapılmış sınırlı sayıda çalışma bulunmaktadır. Aortik klemp sonrası spinal İR hasarına levosimendanın etkisinin araştırıldığı bir çalışmada, levosimendanın nörolojik, histopatolojik ve biyokimyasal parametreleri düzelttiği bulunmuştur (63). Renal İR hasarına levosimendanın etkisinin araştırıldığı çalışmada ise levosimendanın renal tübüler nekroz ve atrofiyi azalttığı, kontrol grubuna göre TBARS değerlerinin daha düşük olduğu belirtilmiştir (64).

3. GEREÇ VE YÖNTEM

Çalışma, DEÜTF Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu onayı alındıktan sonra Multidisipliner Deney Hayvanları Laboratuvarı'nın olanakları kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Ağırlıkları 250-300 g arasında değişen 21 adet *Wistar Albino* tipi erişkin erkek rat, standart rat yemi ve su ile beslenmiş, oda ısısında 12 saat aydınlık/karanlık siklusunda tel kafeslerde yaşatılmıştır. Cerrahiden önceki 12 saat sadece su içmelerine izin verilmiştir. Deney süresince hayvanların vücut sıcaklığı ısıtıcı bir lamba ile korunmuştur.

3.1 Anestezi uygulaması

Anestezi, intraperitoneal 50 mg/kg ketamin (*Ketalar*®, Pfizer Pharma GMBH, Germany) ve 10 mg/kg *xylazine hydrochloride* (Alfazyne®, %2, Alfasan International, 3440 AB, Woerden, Holland) uygulanarak sağlanmış, gerektiğinde doz tekrarı yapılmıştır. Sıvı ve ilaç uygulamaları için anestezi altındaki ratların kuyruk venine 24 gauge kanül (Bıçakçılar, İstanbul, Türkiye) yerleştirilmiştir.

3.2 Deney Grupları ve Protokol

Üç grup oluşturulmuştur.

Sham Grubu (n=7): Laparotomi sonrası süperiyor mezenterik arter (SMA) yalnızca diseke edilmiştir.

İntestinal İskemi Reperfüzyon Grubu (İİR, n=7): Laparotomi sonrası SMA diseke edilerek klemlenmiş, 60. dk' da klemp açılmış ve 120 dk boyunca reperfüzyon için beklenmiştir.

İntestinal İskemi Reperfüzyon + Levosimendan Grubu (İİR+L, n=7): Laparotomi sonrası SMA disseke edilmiş, 12 µg/kg levosimendan (Simdax konsantre infüzyon ®, Abbott, 2,5 mg/5 mL, flakon, ABD) infüzyonu başlatılmış, 10. dk sonunda SMA klempenmiş, levosimendan infüzyonu 60 dakika boyunca 0.2 µg/kg/dk dozda sürdürülmüştür (63). Klemp açıldığı anda infüzyon sonlandırılmış ve 120 dk reperfüzyon için beklenmiştir.

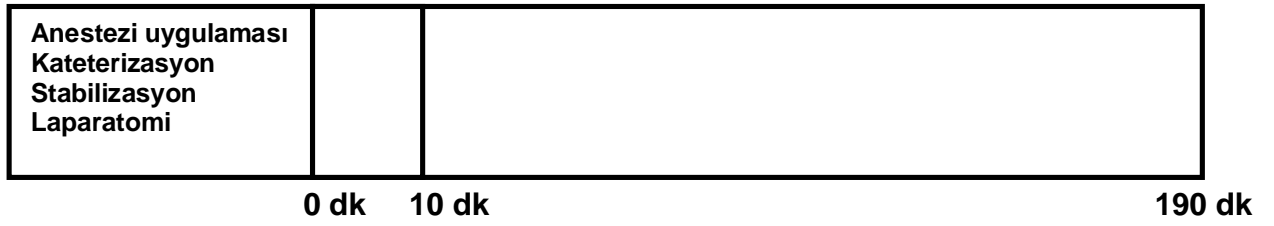
Total çalışma süresi gruplarda aynı tutulmuş, çalışma sonunda doku örnekleri alınmıştır. Levosimendan solüsyonu %0.9 NaCl ile 1 µg/mL olacak şekilde hazırlanmıştır.

3.3 Deneysel Çalışma Protokolü

Anestezi ve kuyruk venine kanülasyon uygulanıp 10 dk stabilizasyon sağlandıktan sonra abdomen orta hat insizyonu ile açılmıştır. Barsaklar vücut yüzeyine doğru çıkarılmış, SMA disseke edilmiş ve atravmatik mikrovasküler klemple sıkıştırılarak 60 dk iskemi oluşturulmuştur (Resim 1). Klemp uygulamasından önce intravasküler koagülasyonu engellemek amacıyla 50 IU/kg heparin intravenöz uygulanmıştır. Yeterli oklüzyon, mezenterik damarlarda pulsasyon olmaması ve solukluk oluşması ile doğrulanmıştır (Resim 2). Daha sonra klemp kaldırılmış ve 120 dk reperfüzyon için beklenmiştir (Resim 3)(39).

Çalışma gruplarının şematik görünümü

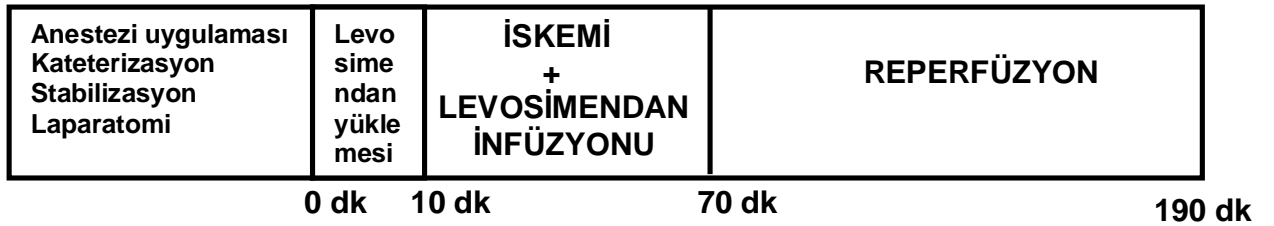
Grup 1 (Sham)

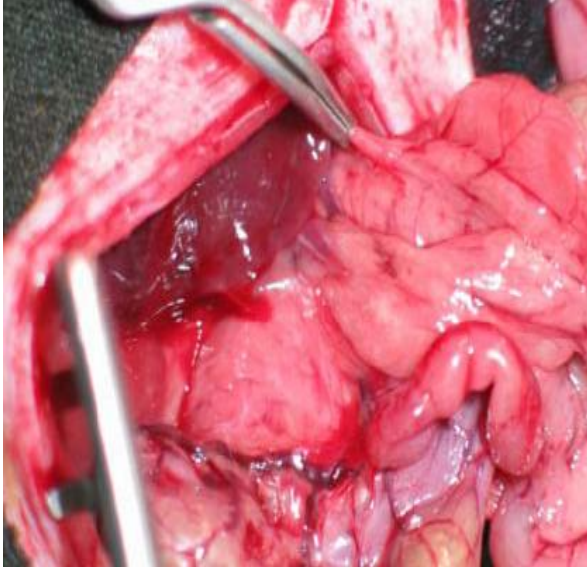


Grup 2 (IIR)



Grup 3 (IIR+L)

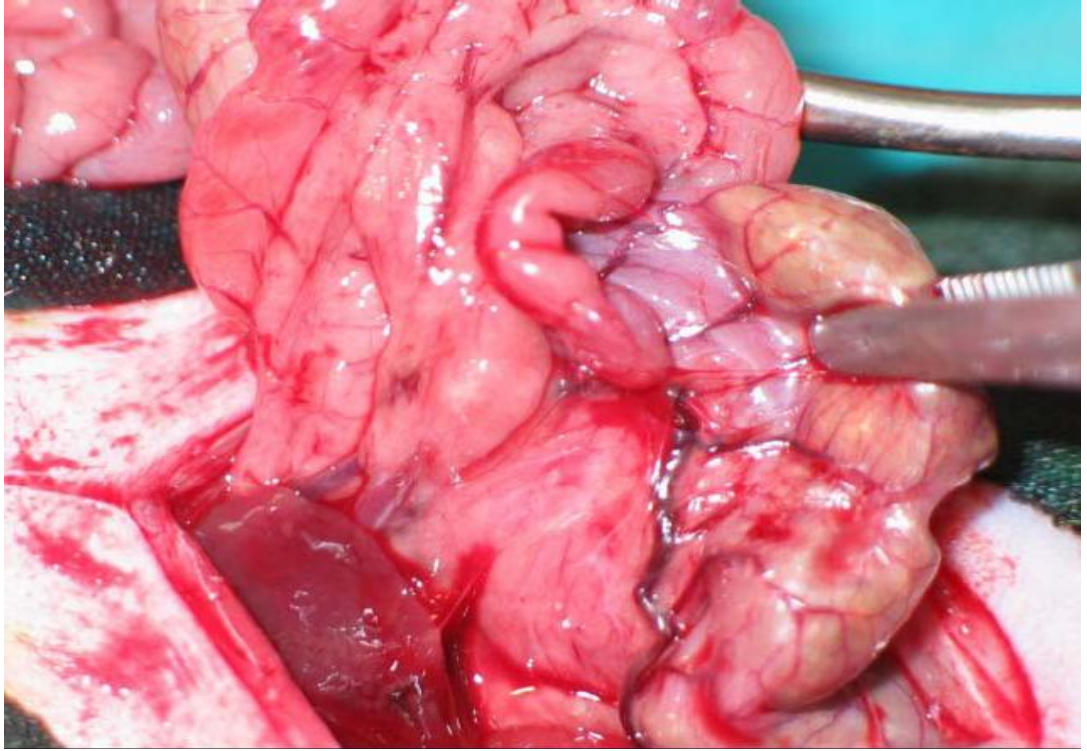




Resim 1:Süperiyor mezenter arterin klemplenmesi



Resim 2: İskemik ince barsak dokusu



Resim 3: Reperfüzyon sonrası ince barsak dokusu

Çalışma boyunca deneklerin sıcaklığı ısıtıcı bir lamba ile korunmuştur. Sham ve İİR grubuna, İİR+L grubuna verilen süre ve miktarda intravenöz SF uygulanmıştır (10 dk' da 12 mL/kg, 1 saat süresince 0,2 mL/kg/dk). Bekleme süreleri boyunca batin ıslak steril tamponlar ile kapatılmıştır.

Reperfüzyonun tamamlanmasından sonra anestezi altındaki ratlar kansızlaştırma yöntemiyle sakrifiye edilmiştir. Sakrifikasyonun hemen sonrasında terminal ileumun proksimalinden 4 cm ileum çıkarılmış, çıkarılan barsak lümeni soğuk %0,9 NaCl ile yıkanmıştır. Çıkarılan ileum dokusunun 2 cm' lik parçası histopatolojik inceleme için %10 formaldehit içerisinde saklanmıştır. Kalan ileum dokusu cerrahi tampon ile kurulandıktan sonra biyokimyasal işlemler için (doku MPO-TBARS ölçümleri) iki eşit parçaya bölünüp mikrosantrifüj (*ependorf*) tüplerine yerleştirilmiştir. Ölçüm yapılacağı güne kadar -80°C' de derin dondurucu içinde korunmuştur.

3.4 İnce barsak dokusunda MPO ve TBARS ölçümü

Doku MPO düzeyleri Krawisz ve ark.'ın (65) yöntemiyle gerçekleştirildi. MPO sonuçları ünite/gram yaş doku olarak değerlendirildi. (Ü/g doku).

Doku TBARS düzeyleri Ohkawa ve ark. (66) belirttiği yöntem (tiyobarbitürik asit türevleri; *tissue thiobarbituric acid reactive substance /TBARS*) ile nmol/g yaş doku olarak ölçüldü.

3.5 Histopatolojik incelemeler

Tüm histopatolojik değerlendirmeler, grupları bilmeyen bir histolog tarafından gerçekleştirilmiştir. İleum dokuları %10 formaldehit içinde fikse edilmiş, 2 gün bekletilmiş, rutin histolojik takip işlemlerinin ardından parafine gömülmüştür. Mikrotom ile 5 µm kalınlığında alınan doku kesitleri lizinli lamlara yerleştirilmiş, örnekler 24 saat 60°C

etüvde bekletildikten sonra hematoksilen-eosin ile boyanmıştır. Barsak dokusundan elde edilen kesitlerin histopatolojik değerlendirmeleri, *Chui* ve ark. (38) tanımladığı barsak skorlamasına göre yapılmış, lezyonlar 0 ile 5 arasında derecelendirilmiştir.

Tablo 1: İnce barsağın histopatolojik değerlendirilmesi, *Chiu* skoru (38)

SKOR	BULGU
0	Normal mukozal villus
1	Kapiller konjesyonla birlikte villus üst ucunda subepitelial ayrılmalar
2	Subepitelial ayrılmaların mukoza epitelini yukarı doğru ittiği orta yoğunluktaki görünüm
3	Subepitelial ayrılmaların büyük oranda gözlenmesi, villus boyunca mukozal epitelin yoğun olarak yukarı doğru itildiği villus uçlarında deformasyonlar
4	Dilate kapillerlerle birlikte lamina propriaya dek ulaşan villus deformasyonu
5	Lamina proprianın ülserasyonu, bütünlüğünün bozulması ve hemoraji

3.6 İstatistiksel değerlendirme

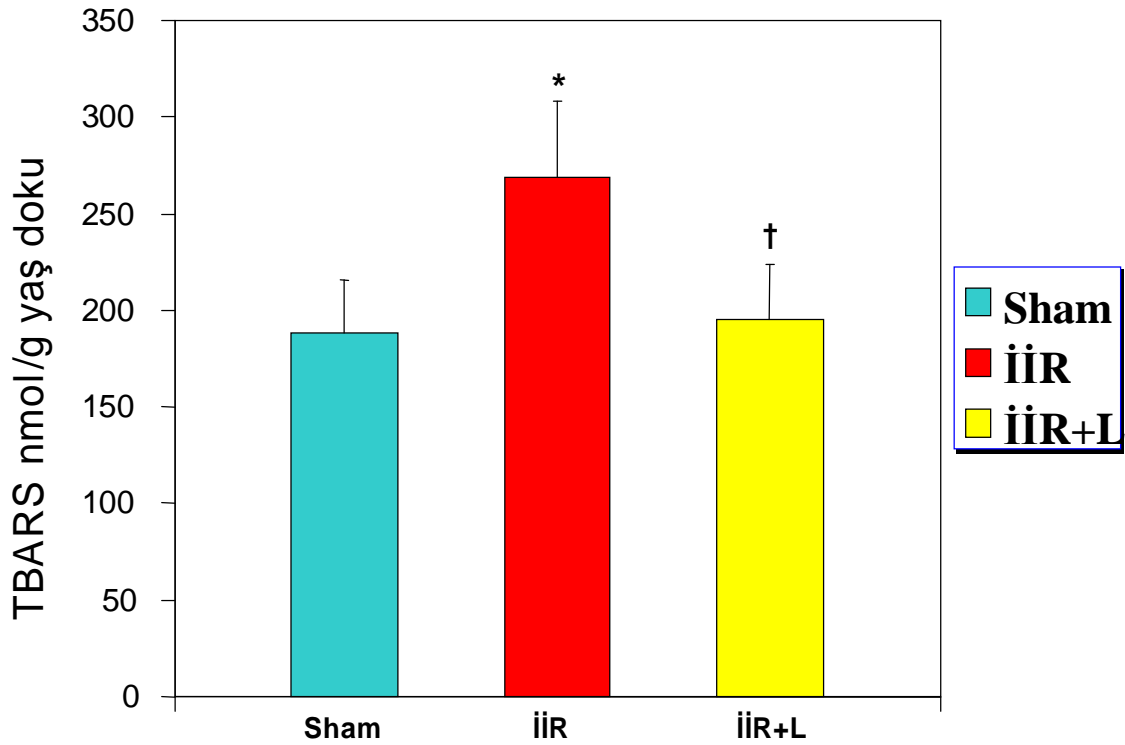
İstatistiksel değerlendirme için *Statistical Package of Social Sciences 15 (SPSS 15,0, Chicago, IL, USA)* programı kullanıldı. Verilerin analizinde *Kruskal-Wallis* varyans analizi uygulandı. Grupların ikili karşılaştırmaları için *Mann-Witney U* testi ile kullanıldı. Tüm değerler ortalama \pm standart sapma (ort \pm ss) olarak gösterildi. İstatistiksel olarak $p < 0,05$ değeri anlamlı kabul edildi.

4. BULGULAR

DEÜTF Deneş Hayvanları Laboratuvarı' nda gerçekleştirilen çalışmaya toplam 21 rat dahil edilmiş, tüm denekler çalışmayı tamamlamıştır. Doku TBARS ve MPO değerleri ortalama \pm standart sapma olarak gösterilmiştir.

4.1 *Tissue thiobarbituric acid reactive substance* /TBARS (nmol/g, yaş doku)

Sham ($188 \pm 27,32$), İİR ($268 \pm 39,55$) ve İİR+L ($195 \pm 28,51$) grupları karşılaştırıldığında, İİR grubunun TBARS düzeylerinde *sham* ve İİR+L grubuna göre anlamlı artış görülürken, (sırasıyla $p=0,004$, $p=0,004$), *sham* ve İİR+L grupları arasında fark saptanmamıştır ($p=0,668$).



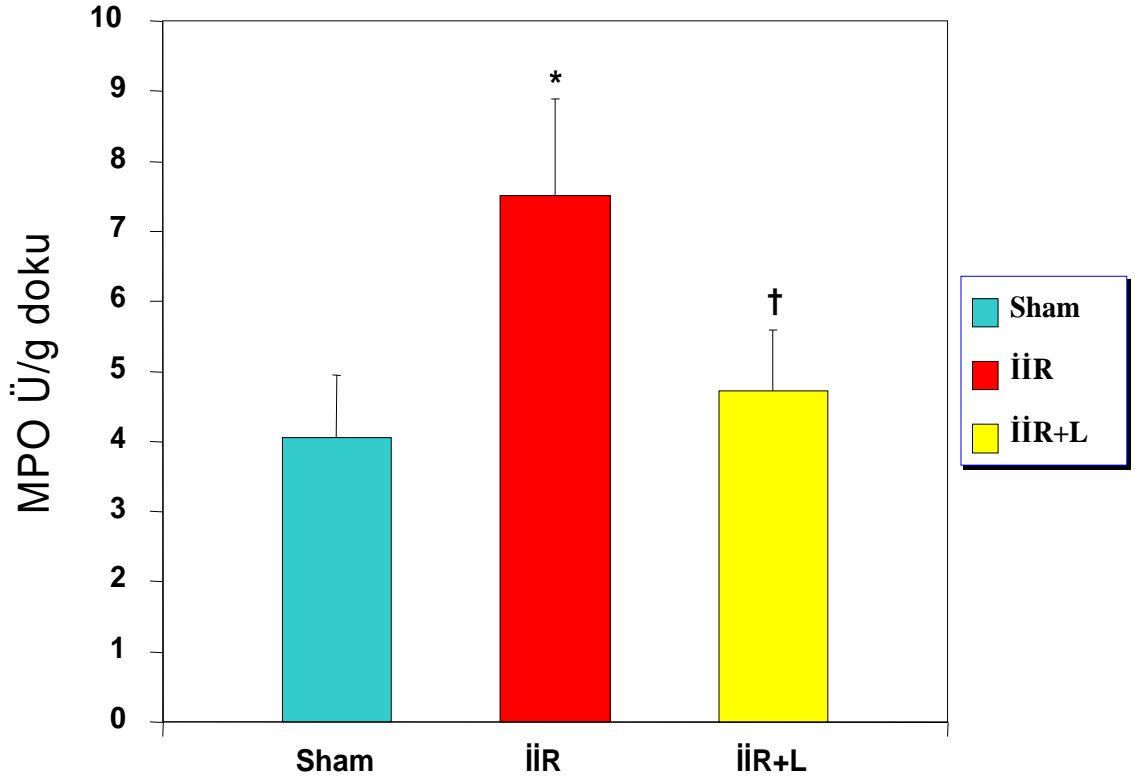
Grafik 1: İnce barsak dokusunda TBARS değerleri.

* İİR grubu ile *Sham* grubu karşılaştırıldığında ($p=0,004$)

† İİR+L grubu ile İİR grubu karşılaştırıldığında ($p=0,004$)

4.2 Miyeloperoksidaz (MPO)(Ü/g doku)

Sham ($4,06 \pm 0,89$), İİR ($7,50 \pm 1,38$) ve İİR+L ($4,72 \pm 0,88$) grupları karşılaştırıldığında, İİR grubunun MPO düzeylerinde *sham* ve İİR+L grubuna göre anlamlı artış görülürken, (sırasıyla $p=0,003$, $p=0,004$), *sham* ve İİR+L grupları arasında fark saptanmamıştır ($p=0,110$).



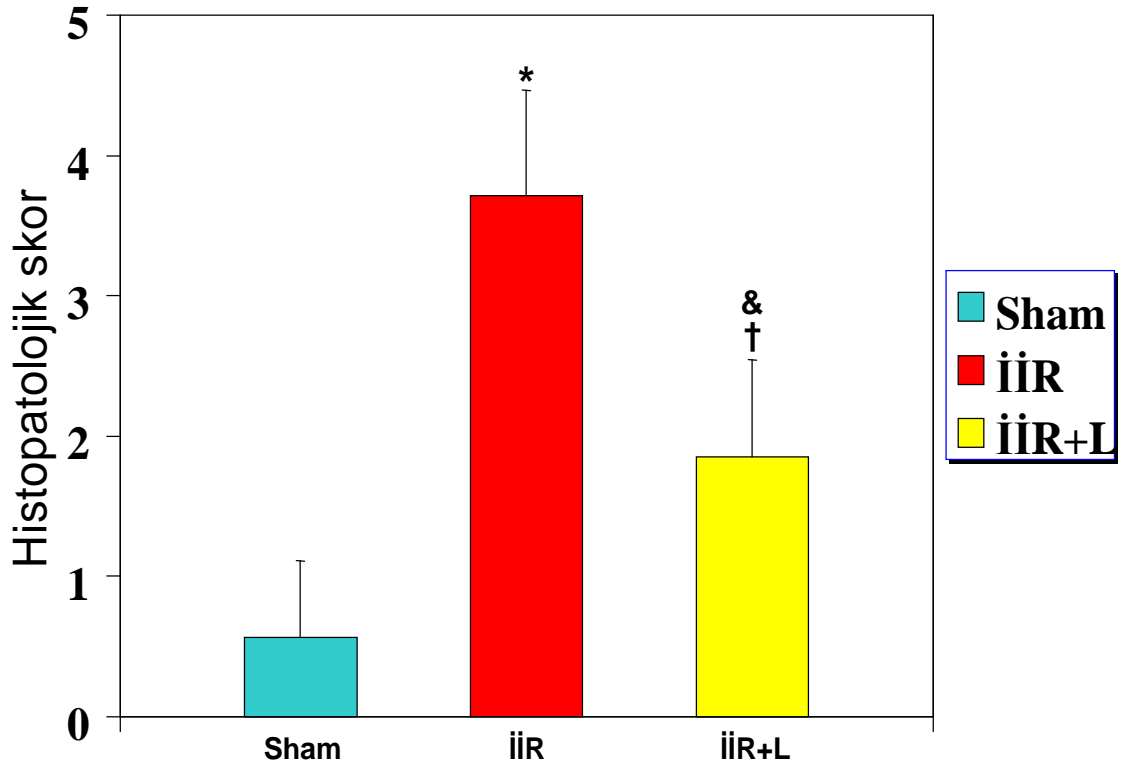
Grafik 2: İnce barsak dokusunda MPO değerleri.

* İİR grubu ile *Sham* grubu karşılaştırıldığında ($p=0,003$)

† İİR+L grubu ile İİR grubu karşılaştırıldığında ($p=0,004$)

4.3 İncebarsak histopatolojik hasar skoru (*Chiu* skoru)

Sham ($0,57 \pm 0,53$), İİR ($3,71 \pm 0,75$) ve İİR+L ($1,85 \pm 0,69$) gruplarının histopatolojik incelemesinde *sham* grubu *Chiu* skorlarının İİR ve İİR+L gruplarından anlamlı düşük (sırasıyla $p= 0,001$ ve $p= 0,006$), İİR grubu *Chiu* skorlarının ise İİR+L grubuna oranla belirgin yüksek olduğu saptanmıştır ($p=0,003$).



Grafik 3: İnce barsak dokusunun histopatolojik değerlendirilmesi

* İİR grubu ile *Sham* grubu karşılaştırıldığında ($p=0,001$)

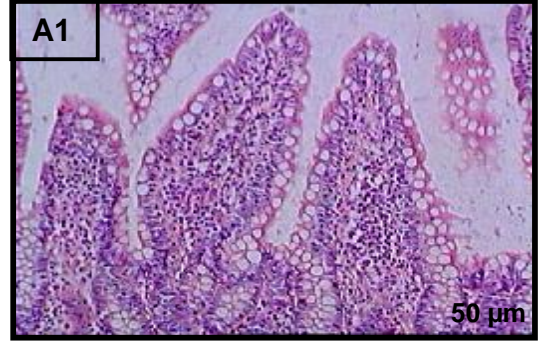
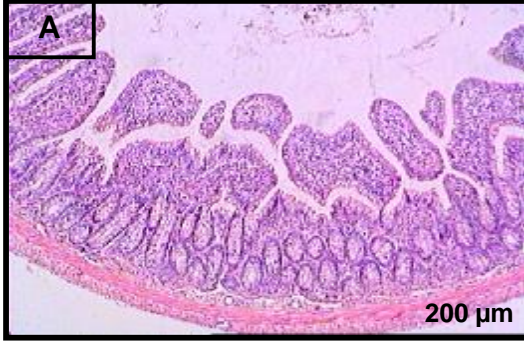
† İİR+L grubu ile İİR grubu karşılaştırıldığında ($p=0,003$)

& İİR+L grubu ile *Sham* grubu karşılaştırıldığında ($p=0,006$)

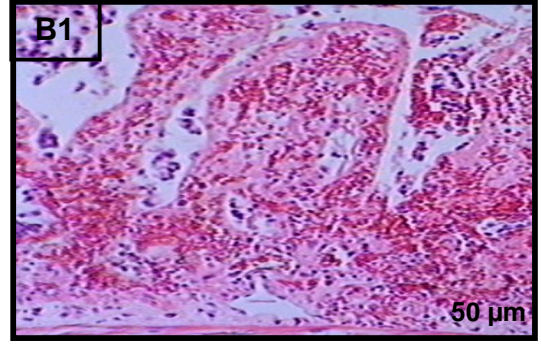
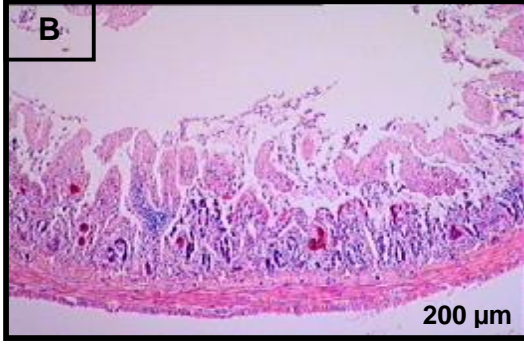
Sham grubunun barsak kesitlerinin incelenmesinde dokunun normal yapıya sahip olduğu, villusların bütünlüğünün korunduğu, lamina propriyada herhangi bir patolojiye ve ülserasyona rastlanmadığı, mononükleer hücre infiltrasyonu ve kapiller permeabilitede artış bulunmadığı ve hemorajinin olmadığı gözlenmiştir (Resim 4).

İntestinal iskemi reperfüzyon (İİR) grubunda villus yapılarının bütünlüğünün bozulduğu, villuslarda kısalma, küntleşme ve birleşmeler olduğu saptanmıştır. Villus epitel hücrelerinin dökülmüş, yer yer tamamen kaybolduğu izlenmiş, kripta sayısı ile birlikte bez hücre sayılarında azalma, lamina propriyada ülserasyonlar, mononükleer hücre infiltrasyonu, kapiller permeabilitede artış ve hemoraji gözlenmiştir (Resim 5).

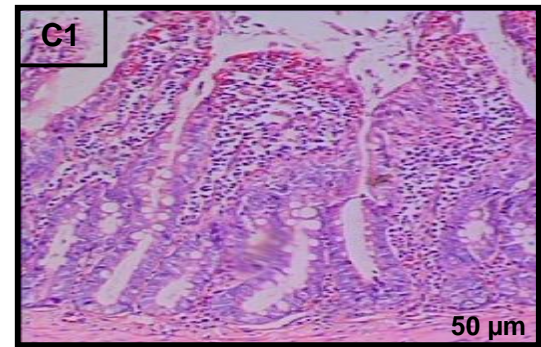
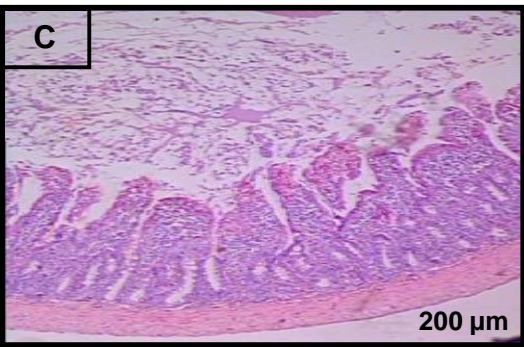
İntestinal İR+L grubunda bulguların İİR grubuna göre daha iyi olduğu, villus yapılarının korunduğu, az miktarda mononükleer hücre infiltrasyonu olduğu, lamina propriyada ülserlerin bulunmadığı, kapiller permeabilitede az miktarda artış olduğu ve hemorajiye rastlanmadığı gözlenmiştir (Resim 6).



Resim 4: Sham Grubu: Normal yapıdaki ince barsak dokusu (*Chiu* Skoru: 0)(H&E)
(x4, x20)



Resim 5: İİR Grubu: Villus dejenerasyonu, konjesyon, hemoraji ve ülserlerin görüldüğü
ince barsak dokusu (*Chiu* skoru: 5) (H&E) (x4, x20)



Resim 6: İİR+L Grubu: Hafif kapiller konjesyonla beraber villus uçlarında ayrılmaların
bulunduğu ince barsak dokusu (*Chiu* skoru:1)(H&E) (x4, x20)

5. TARTIŞMA

Barsak kan akımının azalması veya kesilmesiyle oluşan iskemi, kan akımının yeniden sağlanmasıyla meydana gelen reperfüzyon, inflamatuvar sitokinler ve serbest oksijen radikallerinin (SOR) oluşumuna yol açmaktadır (22). Sitotoksik olaylar serisi barsağın bariyer fonksiyonunu bozarak toksik ürünlerin sistemik dolaşıma geçmesine ve uzak organlarda hasar oluşmasına neden olabilmektedir. Hem bölgesel hem de akciğer başta olmak üzere böbrek, karaciğer, kalp gibi organların tutulumu ÇOY' a yol açmaktadır (26).

Çoklu organ yetersizliğinde, etkilenmiş organ sayısı ile mortalite arasında yakın ilişki vardır. Dört veya daha fazla organ yetersizliği durumunda, yapılan tedavinin türüne ve yoğunluğuna bakılmaksızın mortalite %90' ın üzerine çıkmaktadır. Çoklu organ yetersizliğinde oluşan oksijen açığı ile sağ kalım doğrudan ilişkili olup dokuya oksijen sunumunu arttıran her türlü girişimin sağ kalımı olumlu yönde etkilediği bilinmektedir (67).

İntestinal İR hasarı barsak mukozasının villus tabakasından başlayarak tüm mukoza katlarını tutarak ödem ve hemorajiye neden olabilir (3). Hasarlı barsak bölgesinden açığa çıkan toksik ürünler akciğer ve karaciğerdeki makrofajlar üzerinden TNF- α ' yı aktive ederek akut akciğer hasarı ve karaciğerde fonksiyon kaybına yol açmakta (28), kardiyodepresan faktörleri de aktive ederek bu organların perfüzyonlarını bozmaktadırlar. İntestinal İR hasarı ile ortaya çıkan bu değişiklikler bölgesel kan akımını azaltıp ince barsak perfüzyonunu bozmakta ve hasar daha da artmaktadır (30).

Levosimendan splanknik ve mezenterik kan akımını olumlu etkileyerek intestinal perfüzyon ve oksijenizasyonu artırmaktadır (48,61,68). Dopamin de levosimendan gibi mezenterik kan akımını artırmakta ancak bu etkiyi oluşturan dozlarda negatif hepatik enerji balansı ortaya çıkmaktadır. Vazopressin ve epinefrin ise splanknik kan akımını azaltmaktadır (57).

Levosimendan, pimobendan ve milrinonun kalp debisinin bölgesel dağılımına etkileri deneysel olarak araştırılmış, ilaçların hemodinamik etkileri benzer bulunmakla birlikte, levosimendanın ince barsak ve karaciğer kan akımını arttırırken splanknik damarlarda direnci düşürdüğü belirlenmiştir (61).

Garcia-Septiem ve ark (68) domuzlarda İV E.Coli ile oluşturulan septik şok modelinde levosimendan ön tedavisinin portal kan akımını, barsak mukoza oksijenasyonunu ve pulmoner fonksiyonları iyileştirdiğini göstermişlerdir. Ulaşabildiğimiz kaynaklara göre çalışmamız intestinal İR de öntedavi olarak levosimendani irdeleyen ilk araştırmadır. İnce barsak dokusunda TBARS, MPO düzeyleri ve Chiu skoru, levosimendan uygulanan grupta İİR grubuna oranla belirgin düşük saptanmıştır. Bu sonucun başlıca nedeninin bölgesel kan akımı artışı, splanknik direnç azalması, mukozal oksijenasyonun yükselmesi olabileceği düşünülmüştür. Benzer şekilde Schwartze ve ark (62), herhangi bir işlem yapılmamış köpeklerde levosimendan, dobutamin ve milrinonun mide mukozal Hb oksijenasyonu, oksijen transportu ve oksijen tüketimi üzerine etkilerini karşılaştırmışlar; dobutaminin oksijen tüketiminde artışa neden olurken, milrinonun mukoza oksijenasyonunu artırmadığı, levosimendanın ise mide mukoza oksijenasyonu ve sistemik oksijen transportunu yükseltirken oksijen tüketimini stabil tuttuğunu belirlemişlerdir. Gastrik mukozal oksijenizasyonu arttırmada levosimendanın milrinon ve dobutaminden üstün olduğunu vurgulayan çalışmacılar, levosimendanın splanknik iskemi riski olan hastalarda alternatif olarak kullanılmasını önermişlerdir.

Birçok çalışmada, deneysel İİR hasar modelini oluşturmak için farklı iskemi ve reperfüzyon süreleri uygulanmıştır. Mallick ve ark. (69) deneysel modellerini 30 dk iskemi, 120 dk reperfüzyon yaparak oluşturmuşlardır. Arruda ve ark. (70) İİR hasarının bronş hiperaktivitesi ve serum TNF- α düzeyleri üzerine olan etkilerini araştırdıkları çalışmalarında hasar modelini 45 dk iskemi, 120 dk reperfüzyon şeklinde belirlemişlerdir. Bu çalışmada, levosimendanın etkisini izleyebilmek amacıyla daha uzun iskemi süreci

öngören Zhang ve ark.larının (39) 60 dk iskemi, 120 dk reperfüzyon yönteminin uygulaması tercih edilmiştir.

Levosimendanın intestinal İR modelinde oluşan bölgesel hasarlanma üzerine etkilerini araştıran bir çalışmaya rastlanmamıştır. Literatürde, kalp dışında diğer organ İR modelleri üzerine levosimendanın etkisinin araştırıldığı iki çalışmaya ulaşılmıştır. Katırcioğlu ve ark (63) tavşan spinal İR modelinde, iskemi öncesi 12 µg/kg 10 dk levosimendan yüklemesini takiben 30 dk iskemi süresince 0.2 µg/kg/dk infüzyon uygulayıp 24 saat reperfüzyon sağladıkları çalışmalarında, *Tarlov* skoru, TBARS ve MPO değerlerini kontrol grubuna göre anlamlı düzeyde düşük bulmuşlardır. Levosimendanın önerilen klinik dozu 6-24 µg/kg yükleme dozu sonrası 0,05-0,2 µg/kg/dk infüzyon olarak bildirilmiştir (71). Bu nedenle çalışmamızda kalp dışında yapılmış iki İR çalışmasında biri olan ve klinik terapötik doz aralığında bulunan Katırcioğlu ve ark (63) kullandığı levosimendan dozunu kullandık.

İskemi reperfüzyon hasarını azaltmak ve ÇOY gelişmesini engellemek için temel tedavi yöntemleri bulunmaktadır. Bunlar yeterli volüm replasmanının sağlanması, hücresel fonksiyonların korunması, mediyatör sistemlerinin aktivasyonunun engellenmesi, mikrosirkülatuar dolaşımın düzenlenmesi ve açığa çıkan SOR' un toksik etkilerinin azaltılmasıdır (72). Bu amaçla İÖK, antioksidan ajanlarla tedavi, NO uygulamaları, antikompleman terapi ve çeşitli ajanlarla oluşturulan FÖK kullanılmıştır (73).

Farmakolojik ön koşullama, ince barsağı İR hasarına karşı koruma yöntemlerinin en önemlilerinden biridir. Oluşturulan modellerde farklı mekanizmalar üzerine etkili birçok ajan kullanılmıştır. Serbest oksijen radikalleri İR hasarından sorumlu tutulan başlıca faktörler olup, endojen ve ekzojen antioksidanlar sağaltımda ön plana çıkmaktadır. Bu amaçla allopürinol, SOD, desferroksamin, N-Asetil Sistein (NAS), etanol, askorbik asit, tokoferol gibi pek çok antioksidan kullanılmıştır (73). Mollen ve ark (74) hemorajik şok modelinde NAS' in reaktif oksijen türevlerini azalttığını ve hepatositlerde oksidatif stres

yükünün azaldığını ileri sürmüşlerdir. Antioksidanlar dışında pentoksifilin, kaptopril, verapamil ve nitrogliserin gibi pek çok ilaç İİR hasarında FÖK amacıyla araştırılmış ve etkili oldukları bildirilmiştir (39,46,73).

Hidrojen peroksid, SOR' un süperoksid dismutaz (SOD) tarafından yıkılması sonucu oksijenle birlikte oluşan bir ara üründür (19). İntestinal İR hasarı sonucu artan SOR ve hidrojen peroksidin, lipid peroksidasyonu ve protein hasarını başlatarak hücre apoptozisi ve doku nekrozuna yol açtığı bildirilmiştir (17). Oluşan lipid peroksidasyonu sonucu TBARS açığa çıkmaktadır. Çalışmamızda doku TBARS düzeyleri İİR grubunda *sham* ve İİR+L gruplarına göre anlamlı yüksek bulunmuştur. Bu sonuç levosimendanın barsak iskemi reperfüzyonu sonrasında ortaya çıkan lipid peroksidasyonunu azalttığını göstermektedir. Miyozit kültüründe levosimendanın oksidatif strese etkisini araştıran Maytin ve ark (75), ilacın klinik terapötik doz aralığında K-ATP kanallarını açtığını, hidrojen peroksidin oluşturduğu apoptozisten hücreyi koruduğunu bulmuşlardır. Bu nedenle çalışmamızda levosimendanın bir diğer etkisinin direkt antioksidan özellik göstermesi yanı sıra FÖK olabileceği düşünülmüştür. Benzer şekilde deneysel İİR de *oxymatine* (2) ön tedavisinin lipid peroksidaz üretimi ve apoptotik indeksi azalttığı, GLP-2 (39) ve N-metil D-aspartat antagonisti (76) ön tedavilerinin de lipid peroksidasyonunu engellediği ifade edilmiştir.

İskemik ön koşullamanın deneysel intestinal İR hasarında nötrofil adezyonunu ve TNF- α aracılı P-selektin artışını bloke ederek koruyucu olduğu gösterilmiştir (42). Bu etki ilk defa 1996 yılında Hotter tarafından tanımlanmıştır (77). Moore-Olufemi ve ark (78) İİR sonrası barsak disfonksiyonu ve mukoza hasarı üzerine İÖK' nın koruyucu etkisini incelediklerinde 3 döngülük İÖK nın *Chiu* skoru ile MPO aktivitesini düşürdüğünü ve barsak geçirgenliğini azalttığını belirlemişlerdir. Domuz kalbinde yapılan bir çalışmada İR hasarına karşı levosimendanın K-ATP kanallarını açarak oluşturduğu ön koşullamanın İÖK kadar etkili olduğu bulunmuştur (48).

Çalışmamızda İİR hasarı sonucu dokuya gelen nötrofil ve monositlerin açığa çıkardığı MPO enzimi İİR grubunda *sham* ve İİR+L grubuna göre anlamlı yüksek saptanmıştır. Bu, İÖK' nın koruyucu mekanizmalarından olan nötrofil adezyonunu engelleyici etkisi ile benzeşmektedir. İİR grubunda ortama daha çok nötrofil göçü olduğunu ve levosimendanın reperfüzyona bağlı nötrofil akümülesyonunu azalttığını bulduk. Parissis ve ark. (79) levosimendanın proinflamatuvar sitokinler (TNF- α , IL-6) ve apoptoz mediatörlerinin (Fas-Fas ligand) salınımını azaltarak antiinflamatuvar ve antiapoptotik etki gösterdiğini yayımlamışlardır. Bu araştırmada inflamatuvar sitokinler ve adezyon molekülleri çalışılmamıştır. İİR+L grubunda MPO aktivitesinin İİR grubuna oranla belirgin düşük çıkması, yoğun antiinflamasyonu işaret etmektedir. *Leflunomide* ön tedavi uygulamasında da benzer şekilde MPO aktivitesinin azaldığı belirtilmiştir (80). Ek olarak levosimendanın FDE III inhibisyonu yaptığı (81), FDE III enzim inhibitörlerinin inflamatuvar sitokinlerin baskılanma yol açtığı bildirilmiştir (82). Katırcıoğlu ve ark. (63) levosimendanın spinal İİR hasarına karşı koruyucu olduğunu ve bu koruyucu etkinin K-ATP kanallarını açmasının yanı sıra FDE III enzimini inhibe etmesine bağlı olabileceğini belirtmişlerdir.

Yakut ve ark (64) renal İİR da levosimendanın histolojik skor (tübüler nekroz, atrofi, hidropik dejenerasyon) ve lipid peroksidasyonunu azalttığını, proinflamatuvar sitokinler ve apoptotik mediyatörleri düşürerek antiinflamatuvar - antiapoptotik özellik gösterebildiği belirtilmişlerdir.

İntestinal İİR hasarının histopatolojik sınıflandırmasında değişik skorlar kullanılmaktadır. *Chiu* ve ark (38), *Park* ve ark (83), *Hierholzer* ve ark (84) farklı skorlamalar yapmışlardır. *Chiu* ve ark tarafından tanımlanan histopatolojik sınıflamayı basit, kullanılabilir olması, ince barsak doku hasarını iyi göstermesi ve literatürde deneysel İİR hasar modellerinde en çok kullanılan skor olması nedeniyle tercih ettik. Çalışmamızda İİR grubunda ince barsaklarda villus yapısının ileri derecede bozulduğu, lamina propriyada ülserasyonlar ve mononükleer hücre infiltrasyonun belirgin olarak arttığı, dolayısıyla *Chiu* skorunun *sham* ve İİR+L grubundan anlamlı yüksek olduğu

saptanmıştır. İİR+L grubunda *sham* grubuna göre *Chiu* skorunda fark olmakla birlikte ışık mikroskopik görüntüleme hemoraji, ülserasyonlar ve mononükleer hücrelerin *sham* grubuna çok benzediği bildirilmiştir. Benzer histopatolojik bulgulara Mallick ve ark' nın (69) *pyrolidine dithiocarbamate*, Topaloğlu ve ark' nın PGE2 (38), Zhang ve ark' nın (39) GLP-2 ön tedavileri uygulayıp İİR hasarı oluşturdukları çalışmalarında da rastlanmaktadır.

Bu çalışma deneysel intestinal iskemi-reperfüzyonda levosimendanın ön tedavi olarak uygulanmasının etkisini sorgulayan ilk araştırmadır. İskemi öncesinde başlatılan levosimendan infüzyonu; barsaklarda nötrofil birikimini, lipid peroksidasyonunu ve histolojik hasar skorunu azaltmıştır. Hastada iskeminin başlangıç zamanını bilmek çok zor olabilir. Araştırma sonuçlarının klinikte destek bulabilmesi için uygulamanın başlatılma zamanı ve süresini irdeleyen deneysel çalışmalara gereksinim olduğu kanaatine varılmıştır.

6. SONUÇ VE ÖNERİLER

Bu deneysel çalışmada rat intestinal iskemi reperfüzyon modelinde, ön tedavi olarak verilen levosimendanın ince barsak hasarı üzerine etkileri, doku TBARS-MPO düzeyi ve histopatolojik olarak değerlendirilmiştir.

Levosimendan, intestinal iskemi reperfüzyon hasarını azaltmıştır.

Bu araştırmada inflamatuvar sitokinler, adezyon molekülleri çalışılmamıştır.

İntestinal iskeminin klinik tedavisinde rutin olarak yer almayan levosimendanın erken dönem uygulaması barsak hasarını azaltabilir. Bu sonucun öncelikle deneysel araştırmalar ile ayrıntılanması uygun olacaktır.

7. KAYNAKLAR

1. Tullis MJ, Brown S, Gewertz BL. Hepatic influence on pulmonary neutrophil sequestration following intestinal ischemia-reperfusion. J Surg Res 1996;66:143-146
2. Zhao J, Yu S, Tong L, Zhang F ve ark. Oxymatrine attenuates intestinal ischemia/reperfusion injury in rats. Surg today 2008;38:931-937
3. Grace PA. Ischemia-reperfusion injury. Br J Surg 1994;81:637-647
4. Haglund U. Gut ischemia. Gut 1994;1;73-76
5. Oldner A, Konrad D, Weitzberg E, Rudehill A ve ark. Effects of levosimendan, a novel inotropic calcium-sensitizing drug, in experimental septic shock. Crit Care Med 2001;29:2185-2193
6. De Witt BJ, Ibrahim IN, Bayer E, Fields AM ve ark. An analysis of responses to levosimendan in the pulmonary vascular bed of the cat. Anesth Analg 2002;94:1427-1433
7. Kumbul K. Deneysel intestinal iskemi ve reperfüzyon modelinde caffeic acid phenethyl ester' in akciğer hasarını önlemedeki etkinliği. S.D.Ü.T.F. Genel Cerrahi A.D. uzmanlık tezi 2007
8. Collard CD, Gelman S. Pathophysiology, clinical manifestations and preventations of ischemia-reperfusion injury. Anesthesiology 2001;94:1133-1138
9. Rhodes RS, DePalma RG. Mitochondrial dysfunction of the liver and hypoglycemia in hemorrhagic shock. Surg Gynecol Obstet 1980;150;347-352
10. Best B. Ischemia and reperfusion injury in cryonics. www.benbest.com/cryonics/ischemia.html
11. Kumar V, Cotran R, Robbins SL. Basic Pathology. 6th edition 2000: P:6-10,30-36
12. Michalik L, Wahli W. Involvement of PPAR nuclear receptors in tissue injury and wound repair. J Clin Invest. 2006;116(3):598-606
13. Schoenberg MH, Beger HG. Reperfusion injury after intestinal ischemia. Crit Care Med 1993;21(9):1376-1386

14. Tosa Y, Lee WP, Kollias N, Randolph MA ve ark. Monoclonal antibody to interselluler adhesion molecule 1 protects skin flaps against ischemia-reperfusion injury: an experimental study in rats. *Plast Reconstr Surg* 1998;101(6):1586-1594
15. Parks DA, Granger DN. Contributions of ischemia and reperfusion to mucosal lesion formation. *Am J Physiol* 1986;250:749-753
16. Udassin R., Vromen A., Haskel Y. The time sequence of injury and recovery following transient reversible intestinal ischemia. *J Surg Res* 1994;56(3):221-225
17. Özçelik N, Dursun V, Pekmezci S. Mezenter iskemi reperfüzyon hasarının önlenmesinde Allopurinol, Süperoksit Dismutaz ve Dimetil sülfoksitin etkisi. *Kolon rektum dergisi* 1993;3:10-12
18. Lewis MS, Whatley RE, Cain P, McIntyre TM ve ark. Hydrogen peroxide stimulates the synthesis of platelet activating factor by endothelium and induces endothelial cell-dependent neutrophil adhesion. *J. Clin. Invest.* 1988;82:2045-2055
19. Otamiri T. Oxygen radicals, lipid peroxidasyon, and neutrophil infiltration after smallintestinal ischemia and reperfusion. *Surgery* 1989;105:593-597
20. Kuzu MA, Tarık A, Kale T, Aşlar AK ve ark. Effects of ischemia reperfusion as a systemic phenomenon on anastomotic healing in the left colon. *World J Surg.* 2000;24 (8):990-994
21. Mitsudo S, Brandt LJ. Pathology of intestinal ischemia. *Surg. Clin. North Am* 1992;72:43-63
22. Clark ET, Gewertz BL. Intermitant ischemia potentiates intestinal reperfusion injury. *J Vasc Surg.* 1991;13(5):601-606
23. Erden M. Serbest radikaller. *T Klin Tıp Bilimleri* 1992;12;201-207
24. McCord JM, Roy RS. The pathophysiology of superoxide: roles in inflammation and ischemia. *Can J Physiol Pharmacol* 1982;60(11):1346-1352
25. Akgür FM, Olguner M, Yenici O, Gökden M, ve ark. The effect of allopurinol pretreatment on intestinal hypoperfusion encountered after correction of intestinal volvulus. *J Pediatr Surg* 1996;31:1205-1207
26. Köksoy C, Kuzu MA, Kuzu I, Ergün H ve ark. Role of tumour necrosis factor in lung injury caused by intestinal ischaemia-reperfusion. *Br J Surg* 2001;88:464-468

27. Jun-Lin Z, Guo-Hua J, Yi-Ling Y, Jun-Lan Z ve ark. Role of nitric oxide and peroxynitrite anion in lung injury induced by intestinal ischemia-reperfusion in rats. *World J Gastroenterol* 2003;9(6):1318-1322
28. Simpson R, Alon R, Kobzik L, Valeri R ve ark. Neutrophil and nonneutrophil-mediated injury in intestinal ischemia reperfusion. *Ann Surg* 1993;218:444-454
29. Borjesson A, Norlin A, Wang X, Andersson R ve ark. TNF- α stimulates alveolar liquid clearance during intestinal ischemiareperfusion in rats. *Am J Physiol* 2000;278:3-12
30. Towfigh S, Heisler T, Rigberg DA, Hines OJ. Intestinal ischemia and the gut-liver axis: An in vitro model. *J Surg Res* 2000;88:160-164
31. Avlan D, Tamer L, Ayaz L, Polat A ve ark. Effects of trapidil on renal İschemia reperfusion injury. *J Pediatr Surg.* 2006;41:1686-1693
32. Turnage RH, Kadesky KM, Myers SI, Guice KS ve ark. Hepatic hypoperfusion after intestinal reperfusion. *Surgery* 1996;119:151-160
33. Gilgun-Sherki Y, Rosenbaum Z, Melamed E, Offen D. Antioxidant therapy in acute central nervous system injury: current state. *Pharmacol Rev* 2002;54(2):271-284
34. Cuzzocrea S, Reiter RJ. Pharmacological action of melatonin in shock, inflammation and ischemia/reperfusion injury. *Eur J Pharmacol* 2001;426(1-2):1-10
35. Shah PC, Brolin RE, Amenta PS, Deshmukh DR. Effect of aging on intestinal ischemia and reperfusion injury. *Mech Ageing Dev* 1999;107(1):37-50
36. Oral T. İnsan biyokimyası. Ankara: Palme Yayıncılık, 2002:665-674
37. Yalçın SA. Antioksidanlar. *Klinik Gelişim* 1998;2:342-347
38. Topaloğlu Ü, Güran M, Odabaşı M, Karadağ N ve ark. İnce barsaklarda mezenter arter iskemisine bağlı iskemi-reperfüzyon hasarı üzerine PGE2' nin etkisi. *Ulusal travma ve acil cerrahi dergisi* 1997;3(4):258-264
39. Zhang W, Zhu W, Zhang J, Li N ve ark. Protective effects of glucagon-like peptide 2 on intestinal ischemia-reperfusion rats. *Microsurgery*, 2008;(4):285-290
40. Birincioğlu M. İskemi-reperfüzyon tekniklerine genel giriş. www.tfd.org.tr/gaziantep.html

41. Davis JM, Gute DC, Jones S, Krsmanovic A ve ark. Ischemic preconditioning prevents postischemic P-selectin expression in the rat small intestine. *Am J Physiol* 1999;277:2476–2481
42. Peralta C, Fern´andez L, Pan´es J, Prats N ve ark. Preconditioning protects against systemic disorders associated with hepatic ischemia-reperfusion through blockade of tumor necrosis factor–induced P-selectin up-regulation in the rat. *Hepatology* 2001;33:100-113
43. Olguner Ç, Koca U, Kar A, Karcı A ve ark. Ischemic preconditioning attenuates the lipid peroxidation and remote lung injury in the rat model of unilateral lower limb ischemia reperfusion. *Acta Anaesthesiol Scand* 2006;50:150-155
44. Koti RS, Seifalian AM, Davidson BR. Protection of the liver by ischemic preconditioning: a review of mechanisms and clinical applications. *Dig Surg* 2003;20:383-396
45. Gao C, Chai W, Xu L, Zhang G ve ark. Protective Effects of Hyperoxygenated Solution Preconditioning on Intestinal Ischemia–Reperfusion Injury in Rabbits *J Surg Res* 2006;135(2):268–274
46. Li J, Zhang M, Yang C. Nitroglycerin protects small intestine from ischemia-reperfusion injury via NO-cGMP pathway and upregulation of α -CGRP. *J Gastrointest Surg* 2009;13:478-485
47. Kivikko M, Lehtonen L. Levosimendan: a new inodilatory drug for the treatment of decompensated heart failure. *Curr Pharm Des* 2005;11:435-455
48. Pollesello P, Papp Z. The cardioprotective effects of levosimendan: Preclinical and Clinical evidence. *J Cardiovasc Pharmacol* 2007;50:257-263
49. Kivikko M, Lehtonen L, Colucci WS. Sustained hemodynamic effects of intravenous levosimendan. *Circulation* 2003;107:81-86
50. Du Toit EF, Muller CA, McCarthy J, Opie LH. Levosimendan: effects of a calcium sensitizer on function and arrhythmias and cyclic nucleotide levels during ischemia/reperfusion in the Langendorff-perfused guinea pig heart. *J Pharmacol Exp Ther* 1999;290(2):505-514

51. Harjola VP, Oikarinen L, Toivonen L, Jurkko R ve ark. The hemodynamic and pharmacokinetic interactions between chronic use of oral levosimendan and digoxin in patients with NYHA Classes II-III heart failure. *Int J Clin Pharmacol Ther* 2008;46(8):389-399
52. Nieminen MS, Bohm M, Cowie MR, Drexler H ve ark. Executive summary of the guidelines on the diagnosis and treatment of acute heart failure: the Task Force on Acute Heart Failure of the European Society of Cardiology. *Eur Heart J* 2005;26:384-416
53. Krasso I, Pataricza J, Kun A Papp JG. Calcium-dependent vasorelaxant capacity of levosimendan in porcine and human epicardial coronary artery preparations. *Cardiovasc Drugs Ther* 2000;14:691-693
54. Pataricza J, Hohn J, Petri A, Balogh A ve ark. Comparison of the vasorelaxing effect of cromakalim and the new inodilator, levosimendan, in human isolated portal vein. *J Pharm Pharmacol* 2000;52:213-217
55. Ozdem SS, Yalcin O, Meiselman HJ, Baskurt OK ve ark. The role of potassium channels in relaxant effect of levosimendan in rat small mesenteric arteries. *Cardiovasc Drugs Ther* 2006;20:123-127
56. Yokoshiki H, Katsube Y, Sunagawa M, Sperelakis N . Levosimendan, a novel Ca^{+2} sensitizer, activates the glibenclamide-sensitive K^{+} channel in rat arterial myocytes. *Eur J Pharmacol* 1997;333:249-259
57. Woolsey CA, Coopersmith CM. Vasoactive drugs and gut: is there anything new? *Curr Opin Crit Care* 2006;12:155-159
58. Di Giandomasso D, May CN. Norepinephrine and vital organ blood flow. *Intensive Care Med* 2002;28:1804-1809
59. Guerin JP, Levraut J Samat-Long C, Laverse X ve ark. Effects of dopamine and norepinephrine on systemic and hepatosplanchnic hemodynamics, oxygen exchange and energy balance in vasoplegic septic patients. *Shock* 2005;23:18-24
60. Hildebrand LB, Krejci V, Sigurdsson GH. Effects of dopamine, dobutamine and dopexamine on microcirculatory blood flow in the gastrointestinal tract during sepsis and anesthesia. *Anesthesiology* 2004;100:1188-1197

61. Pagel PS, Hettrick DA, Wartier DC. Influence of levosimendan, pimobendan and milrinone on the regional distribution of cardiac output in anaesthetized dogs. *Br J Pharmacol* 1996;119:609-615
62. Schwartze LA, Picker O, Bornstein SR, Fournell A ve ark. Levosimendan is superior to milrinone and dobutamin in selectively increasing microvascular gastric mucosal oxygenation in dogs. *Crit Care Med* 2005;33:135-142
63. Katircioğlu F, Seren M, Parlar AI, Turan NN ve ark. Levosimendan effect on spinal cord ischemia-reperfusion injury following aortic clamping. *J Card Surg* 2008;23:44-48
64. Yakut N, Yasa H, Lafcı BB, Ortac R ve ark. The influence of levosimendan and iloprost on renal ischemia-reperfusion: an experimental study. *Interact Cardiovasc Thorac Surg* 2008;7(2):235-239
65. Krawisz JE, Sharon P, Stenson WF. Quantitative assay of acute intestinal inflammation based on myeloperoxidase activity. Assessment of inflammation in rat and hamster models. *Gastroenterology* 1984; 87: 1344-1350
66. Ohkawa H, Ohishi N, Yagi K. Assay for lipid peroxidase in animal tissues by thiobarbituric acid reaction. *Anal Biochem* 1979;95:351-358
67. Reinhart K, Bloos F, Brunkhorst: Pathophysiology of sepsis and MOF in *Textbook of Crit Care* 5th Ed. 2005
68. Garcia-Septiem J, Lorante JA, Delgado MA, de Paula M ve ark. Levosimendan increases portal blood flow and attenuates intestinal intramucosal acidosis in experimental septic shock. *Shock* 2009 Dec 7
69. Mallick IH, Yang WX, Winslet MC, Seifalian AM. Pyrolidine dithiocarbamate reduces ischemia-reperfusion injury of the small intestine. *World J Gastroenterol* 2005;11:7308-7313
70. de Arruda MJ, Poggetti RS, Fontes B, Younes RN ve ark. Intestinal ischemia/reperfusion induces bronchial hyperreactivity and increases serum TNF- α in rats. *Clinics* 2006;61(1):21-28

71. Antoniadou C, Tousoulis D, Koumalos M, Marinou K ve ark. Levosimendan: Beyond its simple inotropic effects in heart failure. *Pharmacology & Therapeutics* 114 2007;184-197
72. Eriş O, Çankayalı İ, Sezer E. Ratlarda oluşturulan hemorajik şok modelinde N-Asetilsistein' in oksidatif stres üzerine olan etkisi. *J Turk Anaesth Int Care* 2009;37(4):208-216
73. Mallick IH, Yang W, Winslet MC, Seifalian AM ve ark. Ischemia-reperfusion injury of the intestine and protective strategies against injury. *Dig Dis Sci.* 2004;49:1359-1377
74. Mollen KP, McCloskey CA, Tanaka H, Pirince JM ve ark. Hypoxia activates c-Jun N-terminal kinase via rac1- dependent reactive oxygen species production in hepatocytes. *Shock* 2007;28(3):270-277
75. Maytin M, Colucci WS. Cardioprotection: a new paradigm in the management of acute heart failure syndromes. *Am J Cardiol.* 2005;96:26-31
76. Cámara-Lemarroy CR, Guzmán-de la Garza FJ, Alarcon-Galvan G, Cordero-Perez P ve ark. The effects of NMDA receptor antagonists over intestinal ischemia/reperfusion injury in rats. *Eur J Pharmacol* 2009 25;621(1-3):78-85
77. Hotter G, Closa D, Prados M, Fernandez-Cruz L ve ark. Intestinal preconditioning is mediated by a transient increase in nitric oxide. *Biochem Biophys Res Commun* 1996;222:27- 32
78. Moore-Olufemi SD, Kozar RA, Moore FA, Sato N ve ark. Ischemic preconditioning protects against gut dysfunction and mucosal injury after ischemia/reperfusion injury. *Shock* 2005;23(3):258-263
79. Parissis JT, Adamopoulos S, Antoniadou C, Kostakis G ve ark. Effects of levosimendan on circulating proinflammatory cytokines and soluble apoptosis mediators in patients with decompensated advanced heart failure. *Am J Cardiol* 2004;93:1309-1312
80. Yıldız Y, Köse H, Cecen S, Ergin K ve ark. Protective effects of leflunomide on intestinal ischemia-reperfusion injury. *Dig Dis Sci* 2010;55(2):245-252

- 81.**Lepran I, Pollesello P, Vajda S, Varro A ve ark. Preconditioning effects of levosimendan in a rabbit cardiac ischemia-reperfusion model. *J Cardiovasc Pharmacol* 2006;48:148-152
- 82.**Koike T, Nadeen Qutab M, Tsuchida M, Takekubo M ve ark. Pretreatment with olprinone hydrochloride, a phosphodiesterase III inhibitor, attenuates lipopolysaccharide-induced lung injury via an anti-inflammatory effect. *Pulmonary Pharmacology & Therapeutics* 2008;21(1):166-171
- 83.**Stallion A, Kou TD, Latifi SQ, Miller KA ve ark. Ischemia/reperfusion: a clinically relevant model of intestinal injury yielding systemic inflammation. *J Pediatr Surg* 2005;40(3):470-477
- 84.**Hierholzer C, Kalff JC, Audolfsson G, Billiar TR ve ark. Molecular and functional contractile sequelae of rat intestinal ischemia/reperfusion injury. *Transplantation*.1999;15;68(9):1244-1254