

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

**RAT ALT EKSTREMİTE İSKEMİ REPERFÜZYON
MODELİNDE TENOKSİKAMIN ANTİOKSİDAN
ETKİNLİĞİNİN ARAŞTIRILMASI**

DR. YÜCEL MOL

UZMANLIK TEZİ

İZMİR-2008

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

RAT ALT EKSTREMİTE İSKEMİ REPERFÜZYON
MODELİNDE TENOKSİKAMIN ANTİOKSİDAN
ETKİNLİĞİNİN ARAŞTIRILMASI

UZMANLIK TEZİ

DR. YÜCEL MOL

Danışman Öğretim Üyesi: Prof. Dr. Zahide Elar

İÇİNDEKİLER

	<u>Sayfa</u>
TEŞEKKÜR.....	2
TABLO LİSTESİ.....	3
ŞEKİL LİSTESİ	4
RESİM LİSTESİ	5
KISALTMALAR	6
ÖZET	8
SUMMARY.....	9
GİRİŞ	10
AMAÇ.....	11
GENEL BİLGİLER.....	12
GEREÇ VE YÖNTEM	20
İSTATİSTİKSEL ANALİZ.....	24
BULGULAR.....	25
ELEKTRON MİKROSKOPİ RESİMLERİ.....	29
TARTIŞMA.....	33
KAYNAKLAR	39
Ek 1: ETİK KURUL İZİN BELGESİ.....	43

TEŞEKKÜR

Uzmanlık eğitimim süresince bilgi ve deneyimlerinden yararlandığım, hekimlik sanatının ve anesteziyolojinin temel ilkelerini öğrendiğim hocalarım; Sayın Prof. Dr. Zahide Elar'a, Sayın Prof. Dr. Emel Sağıroğlu'na, Sayın Prof. Dr. Ali Günerli'ye, Sayın Prof. Dr. Atalay Arkan'a, Sayın Prof. Dr. Erol Gökel'e,

Tez araştırmamı destekleyen, yapımı ve yazımı sırasında katkı ve yardımlarını esirgemeyen Doç. Dr. Deniz Özzeybek'e, Prof Dr Candan Özođul'a, Prof Dr Hüray İşlekel'e, Uzm. Dr Tuncay Küme'ye, Dr. Burak Küçükebe'ye, Dr. Özgür Özel'e, Dr. Ali İhsan Uysal'a,

Asistanlığım süresince birlikte çalıştığım, eğitimime katkıda bulunan bölümümüz tüm öğretim üyeleri ve uzmanlarına,

Asistanlık döneminin heyecanını, stresini ve güzelliklerini birlikte yaşadığımız tüm asistan arkadaşlarıma,

Anestezi teknikeri arkadaşlarıma, ameliyathane, yoğun bakım, derlenme ünitesi, ağrı ünitesi, gündüz hastanesi hemşire ve personeli ile bölüm sekreterlerine ve tanıma fırsatı bulduğum tüm hastane çalışanlarına,

Hayatım boyunca benden desteğini, sevgisini ve sabrını esirgemeyen aileme,

Ve son olarak gördüğüm günden beri kalbimde olan, eşim Nazlı'ya,

Sonsuz sevgi ve saygılarımı sunar, teşekkür ederim.

Dr. Yücel Mol

TABLO LİSTESİ

	<u>Sayfa</u>
Tablo 1: Graplarda Belirlenen Mitokondriyal Kristalizis Skorları	25
Tablo 2: Graplarda Belirlenen Mitokondri Boyut Farkı Skorları	26
Tablo 3: Graplarda Belirlenen Sarkoplazmik Retikulum Dilatasyonu Skorları.....	26
Tablo 4: Graplarda Belirlenen Kromatin Kaybı Skorları	27
Tablo 5: Graplarda Belirlenen Miyofibriler Dezorganizasyon Skorları	28

ŞEKİL LİSTESİ

	<u>Sayfa</u>
Şekil 1: İskemi Reperfüzyon Kaskadı	14
Şekil 2: Lökositlerin damar endoteli ile etkileşim mekanizması	15
Şekil 3: Serbest radikallerin oluşum süreci ve etkileri	17
Şekil 4: Deneysel İskemi Reperfüzyon Modeli	21

RESİM LİSTESİ

	<u>Sayfa</u>
Resim 1: Ratın sol alt ekstremitesine elastik bandaj uygulanması	22
Resim 2: Ratta alt ekstremitede kan akımı kesilmesinin sintigrafi ile gösterilmesi	23
Resim 3: Grup 1(Kontrol)	29
Resim 4: Grup 1 (Kontrol).....	29
Resim 5: Grup 2 (İ/R, Sham)	30
Resim 6: Grup 2 (İ/R, Sham).....	30
Resim 7: Grup 3 (İ/ R, 2,5 mg/kg tenoksikam)	31
Resim 8: Grup 4 (İ/ R, 10 mg/kg tenoksikam)	32
Resim 9: Grup 4 (İ/ R, 10 mg/kg tenoksikam)	32

KISALTMALAR

I/R.....	İskemi reperfüzyon
NSAİİ.....	Nonsteroid antiinflamatuvar ilaçlar
COX-2.....	Siklooksijenaz- 2
TXA2	Tromboksan A2
PAF.....	“Platelet-activating factor” Trombosit aktive edici faktör
LTB4	Lökotrien B4
TNF- α	Tümör nekrozis faktör
IL-1- β	İnterlökin-1- β
ATP.....	Adenozin tri-fosfat
Ca ⁺⁺	Kalsiyum
Na ⁺	Sodyum
ip.....	İntraperitoneal
NADPH oksidaz.....	Nikotinamid adenin dinükleotid fosfat oksidaz
MPO.....	Myeloperoksidaz
NOS.....	Nitrik oksit sentaz
SOD.....	Süperoksid dismutaz
SOR.....	Serbest oksijen radikalleri
O ₂ ⁻	Süperoksit
H ₂ O ₂	Hidrojen peroksit
OH ⁻	Hidroksi radikali
H ⁺	Hidrojen atomu
HO ₂ ⁻	Hidroperoksil radikali
MDA.....	Malondialdehid
TBARS.....	“Thiobarbituric acid reactive substances” Tiyobarbitürik asid ile reaksiyon veren maddeler
KAT.....	Katalaz
KO.....	Ksantin oksidaz
KD.....	Ksantin dehidrogenaz
EM.....	Elektron mikroskopi
LDH.....	Laktat dehidrogenaz
CK.....	Kreatin kinaz

ER.....Endoplazmik retikulum

ÖZET

RAT ALT EKSTREMİTE İSKEMİ REPERFÜZYON MODELİNDE TENOKSİKAMIN ANTİOKSİDAN ETKİNLİĞİNİN ARAŞTIRILMASI

Dr. Yücel Mol, Dokuz Eylül Üniversitesi Tıp Fakültesi Anesteziyoloji ve Reanimasyon
Anabilim Dalı, İzmir/Türkiye

Amaç: Bu çalışmada alt ekstremitte iskemi-reperfüzyon modelinde bir COX-2 inhibitörü olan tenoksikamın antioksidan etkinliğini araştırmaktır.

Metod: Erkek Wistar ratlarda anestezi verilmesini takiben sol alt ekstremitteye 3 saat iskemi ve 24 saat reperfüzyon uygulandı. Çalışmaya, her birinde 7 denek bulunan 4 grup dahil edildi. Denekler Grup 1 (Kontrol, n=7), Grup 2 (İ/R, Sham, n=7), Grup 3 (İ/R, 2,5 mg/kg Tenoksikam, n=7) ve Grup 4 (İ/R, 10 mg/kg Tenoksikam, n=7) grublarına ayrıldı. Tenoksikam 3 saat'lik iskeminin ardından hemen intraperitoneal olarak uygulandı. Reperfüzyon dönemi bitiminde gastrokinemyus kasından örnekler alınarak, elektron mikroskopunda incelendi.

Bulgular: Elektron mikroskopi ile yapılan çalışmada Grup 2'de (İ/R, Sham, n=7), Grup 1'e (Kontrol, n=7) göre belirgin doku hasarı tespit edildi. Grup 2 'de (İ/R, Sham, n=7) yoğun lökosit, nekroz, ödem, sarkoplazmik retikulum dilatasyonu, mitokondri kristalarında silinme, miyofibril dezorganizasyonu gözlemlendi. Grup 3 (İ/R, 2,5 mg/kg Tenoksikam, n=7) ve Grup 4 'de (İ/R, 10 mg/kg Tenoksikam, n=7), Grup 2'ye (İ/R, Sham, n=7) kıyasla özellikle sarkoplazmik retikulum dilatasyonu, mitokondri kristalarında silinme ve miyofibril dezorganizasyonu anlamlı olarak düşük bulundu. Grup 3 (İ/R, 2,5 mg/kg Tenoksikam, n=7) ve Grup 4 'de (İ/R, 10 mg/kg Tenoksikam, n=7) daha az histopatolojik etkilenme oldu. Tenoksikam, doza bağlı olarak histolojik değişiklikleri önledi.

Sonuç: Alt ekstremitte iskemi-reperfüzyon hasarında belirgin histopatolojik değişiklikler ortaya çıkar. Tenoksikam, kas dokusu iskemi-reperfüzyon hasarının önlenmesinde koruyucu etkiye sahip bir ilaç olarak gözükmektedir.

Anahtar Kelimeler:

İskemi reperfüzyon, tenoksikam, alt ekstremitte, rat, histopatoloji

SUMMARY

THE ANTIOXIDANT EFFECT OF TENOXICAM INVESTIGATED IN RAT MODEL OF LOWER LIMB ISCHEMIA/REPERFUSION

Dr. Yücel Mol, Dokuz Eylül University, Faculty of Medicine, Department of Anesthesiology and Reanimation, İzmir/Türkiye

Background: In this study we investigated the antioxidant effects of Tenoxicam, a type 2 cyclooxygenase (COX-2) inhibitor, on lower limb ischemia-reperfusion model.

Method: Male Wistar rats were anesthetized and submitted to ischemia of left lower limb for 3 h. After 3 h of unilateral lower limb ischemia, tourniquets were released and the extremity reperfused for 24 h. Four groups of rats consisting of 7 subjects were included in the study. Animals were divided into Group 1 (Control, n=7), Group 2 (I/R, sham, n=7), Group 3 (I/R, 2,5 mg/kg Tenoxicam, n=7), Group 4 (I/R, 10 mg/kg Tenoxicam, n=7). Tenoxicam was administered intraperitoneally immediately after the end of 3 h ischemia. Following reperfusion the gastrocnemius muscle was dissected for electron-microscopic examination.

Results: Electron- microscopic investigations showed that the muscle damage in the Group 2 (I/R, Sham) was more than the Group 1 (Control group). After sham-ischemia showed intense leukocyte infiltrate, necrosis, oedema, mitochondria with reduced cristae, disorganized myofibril and dilated sarcoplasmic reticulum. Mitochondria with reduced cristae, disorganized myofibril and dilated sarcoplasmic reticulum levels in Group 3 (I/R, 2,5 mg/kg Tenoxicam, n=7), and Group 4 (I/R, 10 mg/kg Tenoxicam, n=7) were significantly lower than Group 2 (I/R, Sham). Histopathological changes was less in Group 3 (I/R, 2,5 mg/kg Tenoxicam) and Group 4 (I/R, 10 mg/kg Tenoxicam). Tenoxicam, dose-dependently prevented histopathological changes.

Conclusion: In conclusion, we showed that ischemia-reperfusion causes histopathological changes. Tenoxicam, has a protective effect on skeletal muscle tissues ischemia-reperfusion injury.

Key words:

Ischemia-reperfusion, Tenoxicam, lower extremity, rat, histopathology

GİRİŞ

İskemi reperfüzyon (İ/R), doku veya organa giden kan akımında bir süre azalma veya kesilme sonrasında yeniden kanlanma olarak tanımlanır (1). Reperfüzyon dokularda iskeminin oluşturduğu hasardan daha fazla bir yaralanmaya yol açabilmektedir. Buna iskemi reperfüzyon hasarı denir (2–6).

Miyokard infarktüsü, serebral iskemi, inme, hemorajik şok, tromboemboli ve organ nakli gibi cerrahi girişimlere ve trombolitik tedaviye bağlı olarak ortaya çıkan fizyopatolojinin temelinde İ/R hasarı vardır (7–11).

İskelet kasındaki akut ve kronik iskemi, genellikle alt ekstremitede olmak üzere sıklıkla travma, kanama, damar tıkanıklığı ve tromboembolik oluşumlarla beraber görülür (12, 13).

Alt ekstremitede İ/R sık karşılaşılan ve klinik açıdan önem taşıyan bir olaydır. Ekstremitte iskemisini takiben reperfüzyon döneminde paradoksal olarak başta sistemik komplikasyonlar olmak üzere belirgin morbidite ve mortalite artışı olur. Lokal olarak masif ödem, kas nekrozu meydana gelirken, reperfüzyonda ilerleyen saatlerde sistemik inflamatuvar yanıt ve çoklu organ yetmezliği (akciğer, kalp, böbrek, respiratuvar sistem... vb) gibi sorunlar ortaya çıkabilir (5, 14- 23).

Birçok cerrahi dalın başvurduğu bir yöntem olan turnike kullanımı, bir İ/R modelidir. Kansız bir ortam sağlayarak girişimi kolaylaştırması, kan kaybını azaltarak transfüzyon gereksinimini sınırlaması ve operasyon süresini kısaltması turnike kullanımının avantajlarından (3).

Nonsteroid antiinflamatuvar ilaçlar (NSAİİ), tüm dünyada analjezik, antipiretik ve antiinflamatuvar etkilerinden dolayı çok sık kullanılan ilaçlardır. Tenoksikam, *oxicam* grubundan tiyonyazin türevi bir NSAİİ'dir (21, 24, 25).

Tenoksikamın serebral iskemi modelinde hasarlanmayı doza bağlı olarak azalttığıının gösterilmiş olmasına karşın (25); yapılan literatür araştırmalarında tenoksikamın alt ekstremitte İ/R modelinde antioksidan etkinliğinin araştırıldığı bir çalışmaya rastlanmamıştır.

Bu çalışma, tenoksikamın serebral iskemi modelinde oluşturduğu belirlenen bu etkiyi alt ekstremitte İ/R modelinde de sergileyebileceği varsayımından yola çıkılarak planlanmıştır.

AMAÇ

Ratlarda alt ekstremiteye turnike uygulayarak oluşturulan İ/R modelinde, intraperitoneal (ip) yolla 2,5 ve 10 mg/kg dozlarında verilen tenoksikamın İ/R hasarını önleme ya da azaltmaya yönelik etkisinin olup olmadığını değerlendirmektir.

GENEL BİLGİLER

İ/R hasarı yetersiz oksijen sunumu ile başlayan, nötrofil ve serbest oksijen radikallerinin rol aldığı sekonder inflamatuvar yanıtla genişleyen karmaşık patolojik bir süreçtir (1–9).

Dokuya giden kan akımı kesildiği zaman hücrel disfonksiyona yol açan ardışık kimyasal olaylar tetiklenir. Oksijen hücre fonksiyonlarının idamesi için temel yakıttır. Aerobik metabolizma normal hücre fonksiyonlarının idamesi için normal şartlarda kullanılan yoldur. Oksijen yokluğu ise aneorobik metabolizma ile sonuçlanır ve laktik asidin birikimi artar. Asidoz sonucunda hücrede normal enzim kinetikleri değişir, yüksek enerji bağları parçalanır ve hücre, yaşamsal dengesini sürdürmek için gerekli olan enerjiyi kaybeder (9, 26-28).

Organizmanın iskemiye verdiği yanıt, hücre ve doku tipi ile süreye bağlı olarak değişir. Örneğin insan kas dokusunda normal sıcaklıkta histolojik değişikliklerin başladığı iskemi süresi 2 saatten fazla iken, jejunumda bu değişiklikler yaklaşık 30 dakikalık iskeminin ardından başlar (9).

İskemik hasarın derecesini belirleyen iki önemli faktör iskeminin genişliği ve süresidir. Fizyolojik ve anatomik çalışmalarda kas dokusunda 3 saatlik iskemi sonrası geri dönüşümsüz hücrel hasarın başladığı ve 6. saatte neredeyse tamamlandığı görülmüştür (28).

İskemik dokuya kan akımının yeniden sağlanması ile enerji temin edilir, hasarlı hücre onarılır ve toksik metabolitler ortamdaki temizlenir. Reperfüzyon, iskemik hasarın geri dönebilmesi için gerekli olmakla birlikte, tehlikeli metabolik sonuçlara yol açabilir. Daha şiddetli bölgesel doku hasarını başlatabilir ve toksik metabolitler sistemik dolaşıma geçerek sistemik hasara yol açabilir. İ/R'un neden olduğu doku hasarının büyük ölçüde reperfüzyon aşamasında gerçekleştiği birçok çalışma ile kanıtlanmıştır (9–12). Hasarlanmaya neden olan doku perfüzyonundaki bozulma, damar permeabilitesinin artışı ve buna sekonder gelişen doku ödemiyle ilişkilidir. Damar endotelini koruyan ve endotel fonksiyonlarını bozacak patolojik süreçleri hafifleten ajanlar ve yaklaşımlar hasarlanmaya karşı profilaktik etkinlik göstermişlerdir (17, 26–28).

Parks ve Granger (11), intestinal iskemi modelinde yaptıkları bir çalışmada, 3 saatlik iskemi ve 1 saat'lik reperfüzyon ile meydana gelen mukoza hasarının, 4 saatlik iskemi sonucu oluşan hasardan daha fazla olduğunu saptamışlar ve doku hasarında reperfüzyon döneminin daha önemli olduğu sonucuna varmışlardır.

Haimovici H (18), akut arter tıkanmasının sonuçlarını incelediği bir çalışmada, reperfüzyonun başlaması ile metabolik asidoz, hiperkalemi, miyoglobinüri ve böbrek yetersizliğinin geliştiği “ miyonefropatik metabolik sendrom “ oluştuğunu belirlemiştir.

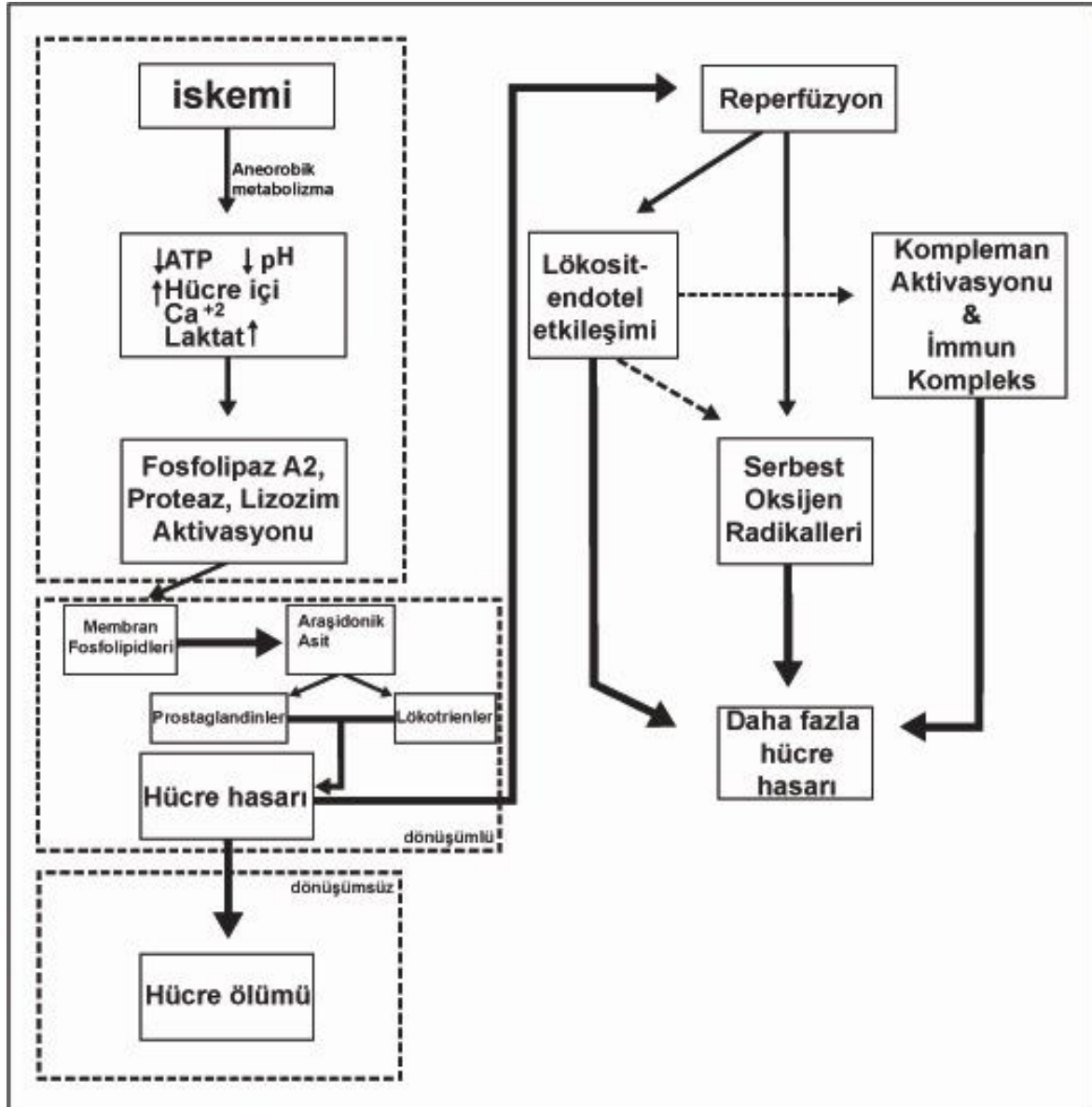
Magdi M ve ark (15), ratların alt ekstremitelerinde uygulanan bir İ/R çalışmasında ortaya çıkan tümör nekrozis faktör- α (TNF- α), interlökin-1- β (IL-1- β), IL-6, IL-8 ve trombosit aktive edici faktör (PAF) gibi mediyatörlerin serbest oksijen radikali ve lökositler aracılığı ile, hem lokal dokuda hem de uzak organlarda hasara neden olduğunu saptamışlardır.

Zimon IN ve ark (19) akut alt ekstremitte iskemisi gelişen ve cerrahi tedavi uygulanan 70 hastada, erken postoperatif dönemde %64 oranında pulmoner komplikasyon geliştiğini bildirmişler ve preoperatif iskemi süresi ile oluşan akciğer hasarının şiddeti arasında belirgin bir korelasyon bulunduğunu göstermişlerdir.

İskeminin erken fazında hücre içinde anaerobik metabolizma başlar, hızla birçok kimyasal mediyatör ve hücre hasarını içeren patofizyolojik olaylar kaskadı ortaya çıkar (Şekil 1) (9). Kısa sürede glikojen depoları boşalır, adenzin trifosfat (ATP) tüketimi artar, laktat ve diğer toksik metabolitler birikmeye başlar. Hücre membran potansiyeli değişir, hücre içi kalsiyum/ sodyum (Ca^{++}/Na^{+}) oranı artar ve hücre organizasyonu bozularak şişmeye başlar. Hücre içinde hipoksantin ve Ca^{++} seviyesi artarken ATP, fosfokreatin ve glutatyon seviyesi hızla düşer. Bu durum fosfolipaz A2, proteazlar, serbest yağ asitleri, lizozimleri de içeren kimyasal mediyatörlerin ve enzimlerin oluşmasını tetikler. Hücre içi Ca^{++} artışı ile aktive olan fosfolipaz A2, membran fosfolipitlerini lökotrien ve prostaglandin gibi inflamatuvar mediatörlerin prekürsörü olan araşidonik asite dönüştürür (1, 21, 22, 26–28).

Araşidonik asitten lipoksijenaz yollarıyla oluşan metabolitlerden özellikle lökotrienler, lökositlerin vasküler endotele yapışmasını hızlandırır ve reperfüzyon hasarının derecesini belirleyen postkapiller permeabiliteyi artırır. İskemi devam ederse lizozimler aracılığı ile hücre nekrozu ortaya çıkar (9).

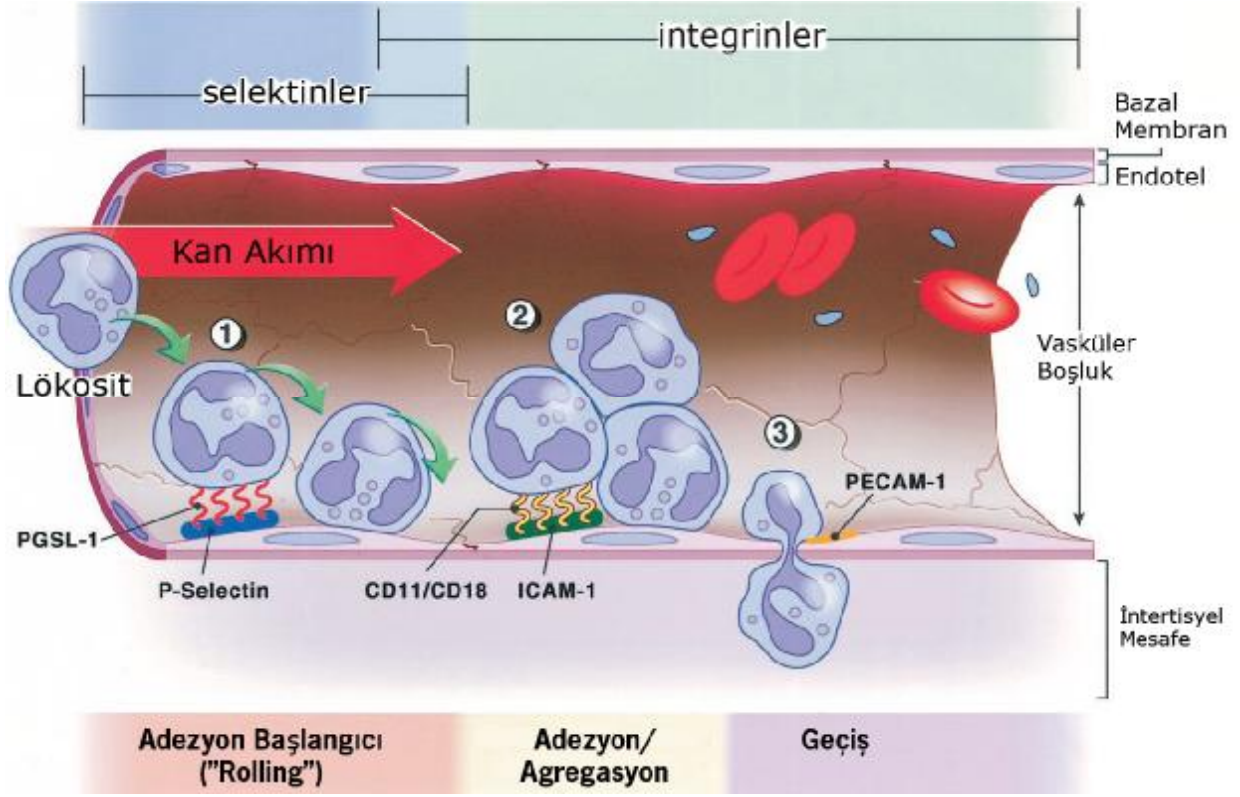
Eğer iskemiye takiben reperfüzyon olursa lökosit-endotel etkileşimi, kompleman aktivasyonu, immünkompleks aracılığı ile serbest oksijen radikali üretimi daha fazla artar. Tüm bu sürecin sonucunda hücre hasarlanması artar ve dolaşımdaki lökositlerin etkisi ile oluşan mikrovasküler tıkaçlar, doku perfüzyonunu azaltır (9, 10).



Şekil 1: İskemi Reperfüzyon Kaskadı (9)

İskemi-reperfüzyon sonucunda lipooksijenaz ve siklooksijenaz yollarında lökositlerin uyarılması için kimyasal ve kemotaktik mediyatörler (TNF- α , IL-2, IL-6 v e IL-8) serbestleşir. Özellikle lökotrienler aracılığı ile lökositlerin damar endoteline yönelimi olur ve post kapiller venüllerdeki geçirgenlik artar. Bu iki olay reperfüzyon hasarındaki en önemli basamaklardır. Kimyasal ve kemotaktik mediyatörler ile aktiflenen lökositler hasarlı bölgeye göç eder (1, 9, 26, 27).

Lökositlerin damar endoteli ile etkileşim mekanizması Şekil 2’de sunulmuştur (26).



Şekil 2: Lökositlerin damar endoteli ile etkileşim mekanizması (26)

(PGSL-1: P-selektin glikoprotein 1 ; CD11b/ CD18 : Lökosit fonksiyon antijeni 1 ; ICAM-1: “*Endothelial intercellular adhesion molecule 1*” Endotelyal hücre içi adezyon molekülü-1 ; PECAM: “*Platelet-endothelial cell adhesion molecule 1*” Trombosit-endotel adezyon molekülü-1

Hücreler arası boşlukta aktive olmuş lökositler, reaktif oksijen radikalleri, proteazlar ve elastazların ortaya çıkmasını sağlayarak mikrovasküler geçirkenliği, ödemi, trombozu ve parankimal hücre ölümünü artırır (9, 26).

Aktive lökositler, membranlarına bağlı nikotinamid adenin dinükleotid fosfat (NADPH) oksidaz enzimi içerirler. Bu enzim, sitoplazmik NADPH’ı nikotinamid adenin dinükleotide (NADP) okside eder ve moleküler oksijeni süperokside indirger, süperoksit her an spontan olarak hidrojen perokside dönüşebilir. Aktive nötrofillerin oksijen metabolizmasındaki bu uyarılmış artış ‘respiratuvar *burst*’ olarak adlandırılır (1).

Dokudaki nötrofil birikimi, dokunun myeloperoksidaz (MPO) aktivitesi ölçülerek saptanabilmektedir. MPO enzimi, nötrofillerin sitozolik granüllerinden salınmaktadır ve

indirekt olarak nötrofil birikimini yansıtmaktadır (5).

Lin B ve ark (23), rat beyinde yapmış oldukları bir İ/R çalışmasında iskemik dokuda MPO birikiminin en yüksek seviyesine 24. saatte ulaştığını ve bu yüksek seviyenin 3. güne kadar sürdüğünü göstermişlerdir.

Klinik çalışmalarda vasküler kan akımının yeniden sağlanmasından sonra, iskemik organa kan akımının tam olarak geri dönmediği gösterilmiştir. Fakat bu perfüzyon sorununun altında yatan mekanizmalar tam olarak aydınlatılamamıştır. Bu duruma, damar lümeninde trombosit-lökosit birikimi, intertisyel sıvı birikimi (ödem), endotel vazorelaksanların (nitrik oksit, prostasiklinler) azalması ve sonuçta mekanik olarak kan akımı azalmasının neden olduğu ileri sürülmektedir. Klinik olarak infarkt sahasında artma, transplant greftinin reddi, postoperatif dönemde organ yetersizliğinde artmayla karşımıza çıkar. Söz konusu bu olay “ *no-reflow fenomeni* ” olarak adlandırılır. Bu fenomene neden olarak, sıklıkla lökosit adezyonu üzerinde durulmaktadır. Örneğin iskemi sonrası dokuda yeniden akım oluşmayan kapillerlerin sayısı ile burayı infiltrate eden lökosit sayısı arasında güçlü bir korelasyon vardır. Yapılan çalışmalarda nötrofillerin baskılanması ile miyokard, beyin ve iskelet kasında bu oluşumun azaltılabildiği gösterilmiştir. Ayrıca serbest oksijen radikalleri (SOR) oluşumu önlendiğinde, kapiller akımın onarıldığı ve lökosit/endotel hücre adezyonunun engellendiği de çalışmalarla ortaya konmuştur (1, 26, 29).

İskemik dokunun reperfüzyonu ile ortaya çıkan reoksijenasyon, bir yandan doku canlılığının sürmesini sağlarken, diğer yandan SOR oluşumuna yol açan sayısız enzimatik oksidasyon reaksiyonu için gerekli olan oksijeni ortama getirir (9).

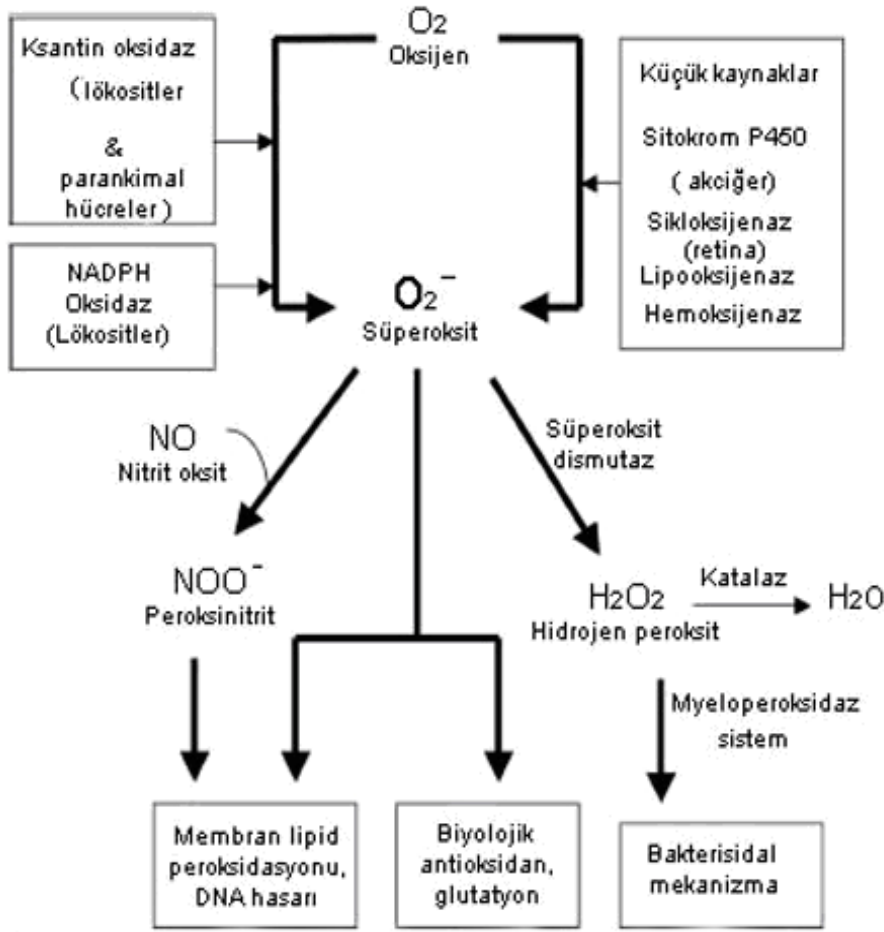
Serbest oksijen radikallerinin potansiyel biyolojik kaynakları çok çeşitlidir. Bunlar arasında ksantin oksidaz (KO) enzimi, aktive lökositler, mitokondriyal elektron transport zinciri, araşidonik asit metabolizması ve katekolamin otooksidasyonu yer alır. Bu yollardan iskelet kası İ/R hasarı için en çok KO ve nötrofil NADPH oksidaz üzerinde yoğunlaşmaktadır (1).

Serbest oksijen radikalleri tek elektron içeren, yüksek oranda düzensiz oksijen molekülleridir. Organizmada her dokunun farklı bir radikal üretme mekanizması vardır. Örneğin lökositlerde en önemli kaynak NADPH oksidaz enzimi, akciğerde sorumlu sitokrom p450, beyinde ise endotel ve gliyal nitrik oksit sentaz (NOS) enzim sistemidir (9).

Serbest oksijen radikalleri, moleküler oksijenin indirgenmesi ile oluşurlar. Mitokondriyal, endoplazmik retiküler ve nükleer membranın elektron transport olaylarında, oksidatif fosforilasyon sırasında, normal hücre metabolizmasında meydana gelirler. İ/R ‘da

SOR kaynağının reperfüze dokuya migrasyon yapan lökositler, endotel ve lokal doku olduğu kabul edilmektedir. Moleküler oksijene 1 elektron eklenmesi ile süperoksit (O_2^-), 2 elektron eklenmesi ile hidrojen peroksit (H_2O_2), 3 elektron eklenmesi ile hidroksi radikali (OH^-), 4 elektron eklenmesi ile su (H_2O) ve süperoksit radikaline bir hidrojen atomu (H^+) eklenmesi ile hidroperoksil radikali (HO_2^-) oluşmaktadır (1, 27, 30).

Nöronal endotelial ve gliyal hücrelerde nitrik oksit (NO^-) ile O_2^- in reaksiyona girmesi sonucu peroksinitrit ürünleri ortaya çıkmaktadır. Serbest radikallerin oluşum süreci ve etkileri Şekil 3 'de sunulmuştur (9, 10, 22, 27, 31).



Şekil 3: Serbest radikallerin oluşum süreci ve etkileri (9)

Hidroksi radikalleri son derece aktif oksidanlardır. Hücrede lipid peroksidasyonunu, protein oksidasyonunu ve DNA hasarını başlatırlar. Lipit peroksidasyonu sırasında, karbon bağlarının kopması ile aldehit yapısında yıkılım ürünleri ortaya çıkmaktadır. Malondialdehit

sınıfından olan tiyobarbitürik asid ile reaksiyon veren maddeler (TBARS), İ/R olayında lipid peroksidasyonunun en duyarlı göstergelerindedir (1, 9, 10, 22).

Süperoksit radikali (O_2^-), SOD enzimi tarafından katalizlenir; memeli hücrelerinde katalaz (KAT), H_2O_2 radikalini moleküler oksijen ve suya parçalar. Yapılan bir çalışmada, iskelet kası nekrozunun reperfüzyon sırasında aşamalı olarak verilen moleküler oksijen ile birlikte KAT, SOD ve mannitol birleşimi verilmesiyle anlamlı olarak azaldığı belirlenmiştir. Dimetil sulfoksit, dimetiltiyüüre ve mannitol gibi enzimatik olmayan OH^- radikal temizleyicileri de iskemi sonrası iskelet kasında reperfüzyon hasarına karşı koruyucu olduğu gösterilmiştir (1, 18, 26, 27, 32–35).

Ksantin oksidaz (KO), iskelet kasında reperfüzyon sırasındaki hasarın oluşumunda büyük bir role sahip olup, SOR' in ana kaynaklarından biridir. Normal sağlıklı hücrelerde enzim, ksantin dehidrogenaz (KD) formunda bulunur. KD, hipoksantinün ürik aside metabolizmasını katalizler. KD (tip D), iskemik koşullarda hücre içi Ca^{++} 'nin artması ile KO (tip O) formuna dönüşür. D-O dönüşümü bağırsaklarda dakikalar içinde oluşurken, iskelet kasında bunun olması için en az 1 saatlik süre gereklidir. Bu dönüşümün derecesi, iskemi süresi ile doğru orantılıdır. Örneğin kas dokusunda 2 saatlik iskemi, KO aktivitesinde belirgin artışla karakterlidir (1, 32).

Farklı dokularda varyasyonlar gösteren KO enzimi normal şartlarda sağlam endotel hücreleri ve kanda bulunan inflamatuvar hücrelerde mevcuttur. Histokimyasal lokalizasyon çalışmalarına göre KO, aerobik kas liflerinde sarkolemma ve mitokondride yerleşmiştir. Fakat en fazla bulunduğu bölge vasküler endotel hücreleridir. Kapiller endotel hücreler aynı dokudaki hücelere göre 100 kat daha fazla KO aktivitesine sahiptir (1, 30).

İskemik faz sırasında, ATP' nin azalması ile, KO için adenin nükleotit, adenzin, inozin, hipoksantin ve ksantin gibi substrat oluşum süreci başlar. Reperfüzyon fazında histamin serbestleşmesiyle beraber KO sentezi ve katalitik aktivitesi artar. KO, İ/R 'da oksijen molekülünden O_2^- oluşumunu sağlar ve en önemli serbest radikal kaynağıdır (1, 27, 30, 34, 36,).

TENOKSİKAM

NSAİİ, tüm dünyada analjezik, antipiretik ve antiinflamatuvar etkilerinden dolayı çok sık kullanılan ilaçlardandır (21, 37–39). Klinik olarak iskelet-kas sisteminin inflamatuvar, dejeneratif ve mekanik hastalıklarında, postoperatif ağrılı durumlarda, ağrı ve inflamasyonla seyreden respiratuvar, jinekolojik ve ürolojik hastalıklarda da kullanılmaktadır (40).

Tenoksikam, *oxicam* grubundan tionetiyazin türevi bir NSAİİ'dir. Eliminasyonu karaciğer yolu ile olur. Eliminasyon yarı ömrü 72 saattir. Yıkım ürünleri olan 5'-hidroksil ve 6-0-glukuronidatın, 2/3 'ü safra ve 1/3 'ü üriner yol ile atılır (39).

Diğer NSAİİ'lar gibi siklooksijenazı inhibe ederek prostaglandinlerin sentezini baskılar. Nonselektif COX₂ inhibitörüdür. COX₂, inflamasyon olan bölgede indüklenir; mitojenler, sitokinler ve endotoksinlerce stimüle edilir, inflamasyonu artırır.

Tenoksikam ile yapılan çalışmalar genel olarak ağrı ve inflamasyon başlıklarını içeren çalışmalardır (24, 25, 40, 41).

Paino M ve ark (41), ratlarda diklofenak, indometazin, naproksen, piroksikam ve tenoksikamın SOR oluşumu üzerine etkilerini karşılaştırmışlardır. Çalışmada ilaçların bu etkilerini MPO, hipoklorür (HOCl), H₂O₂ aktivitesi ve Laktat dehidrogenaz (LDH) düzeyi ile değerlendiren araştırmacılar, çalışmada kullanılan tüm NSAİİ'in terapötik dozlarda lökosit aktivitesini baskıladığı sonucuna varmışlardır.

GEREÇ VE YÖNTEM

Çalışma; DEÜTF Deney Hayvanı Araştırmaları Etik Kurulu izni alındıktan sonra, 28 adet erişkin erkek Wistar rat (200–250 gr) kullanılarak DEÜ Multidisipliner Deney Hayvanları Laboratuvarı'nda gerçekleştirildi. Deney hayvanları, çalışma başlangıcına kadar adaptasyonlarının sağlanması için 12 saat aydınlık–12 saat karanlık ortamda tutuldu, standart yiyecek ve suyla beslendi.

Çalışmada tenoksikam içeren Oksamen-L (Liyofilize enjektabl toz, Mustafa Nevzat İlaç Sanayi, Türkiye) kullanıldı. Bir flakon Oksamen, 57.33 mg mannitol, 3.28 mg sodyum hidroksit, 3 mg trametamol, 2 mg sodyum metabisülfid, 0,2 mg sodyum EDTA içinde etken madde olarak 20 mg tenoksikam içermektedir.

Deneklerin cerrahi işlemden 12 saat önce sadece su içmelerine izin verildi. Ratlarda anestezi, ip 50 mg/kg ketamin (Pfizer Pharma GMBH, Germany) ve 10 mg/kg'dan *xylazine hydrochloride* (Alfazyne, %2, Ege Vet) ile sağlandı, gerektiğinde dozlar tekrarlandı. Denekler histolojik doku örneği ve yeterli kan örneği alındıktan sonra 100 mg/kg tiyopental sodyum (Pental Na, İ.E.Ulugay İlaç Sanayi), i.p uygulanarak sakrifiye edildi. Tüm gruplarda toplam çalışma süreleri eşit tutuldu.

Deney Grupları ve Protokol

Dört grup oluşturuldu.

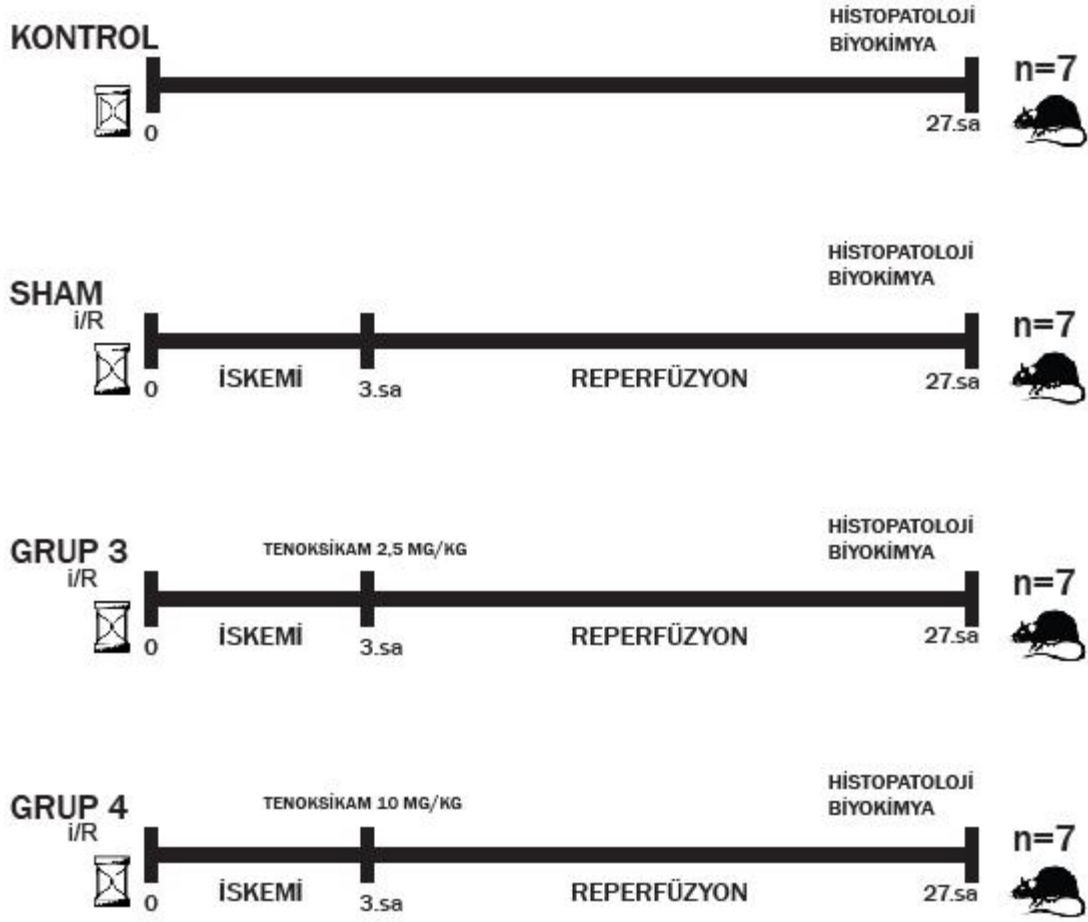
Grup 1 (Kontrol, n=7): Çalışma boyunca anestezi uygulaması dışında hiç bir işlem gerçekleştirilmedi. Reperfüzyon süresinin bitimine uyan saatte doku ve kan örneği alındı.

Grup 2 (Sham, İ/R, n=7): Anestezi sonrası sol alt ekstremiteye turnike ile 3 saat iskemi ve 24 saat reperfüzyon uygulandı, ilaç verilmedi. Reperfüzyon süresinin bitimine uyan saatte doku ve kan örneği alındı.

Grup 3 (İ/R, 2,5 mg/kg Tenoksikam, n=7): Anestezi sonrası sol alt ekstremiteye turnike ile 3 saat iskemi ve 24 saat reperfüzyon uygulandı, turnike açıldıktan hemen sonra 2,5 mg/kg tenoksikam, ip olarak verildi. Reperfüzyon süresinin bitimine uyan saatte doku ve kan örneği alındı.

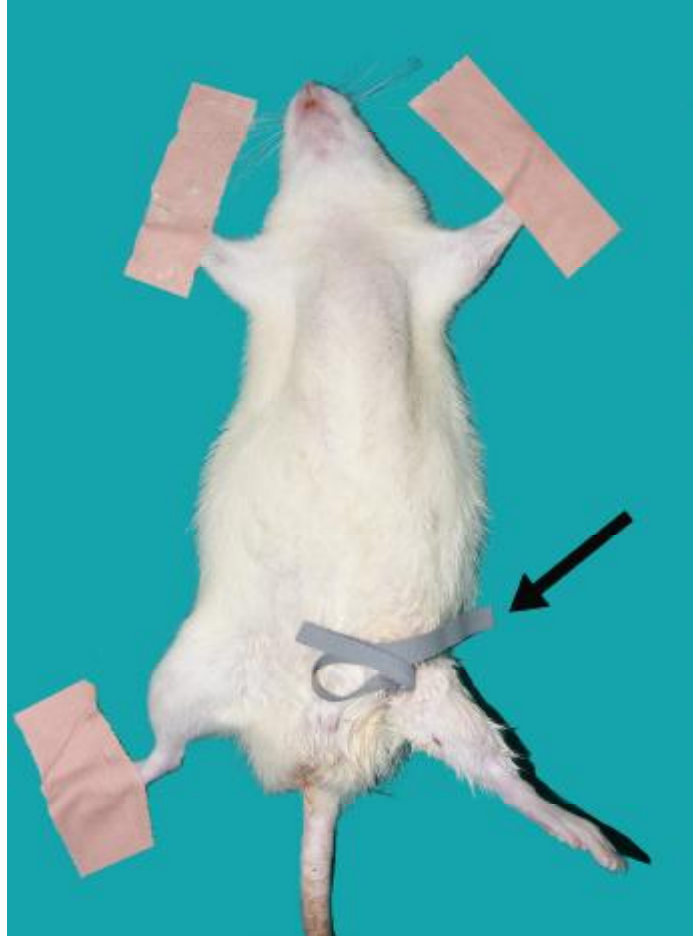
Grup 4 (İ/R, 10 mg/kg Tenoksikam, n=7): Anestezi sonrası sol alt ekstremiteye turnike ile 3 saat iskemi ve 24 saat reperfüzyon uygulandı, turnike açıldıktan hemen sonra 10 mg/kg tenoksikam, ip olarak verildi. Reperfüzyon süresinin bitimine uyan saatte doku ve kan örneği alındı.

Deney Protokol Şeması



Şekil 4: Deneysel İskemi Reperfüzyon Modeli

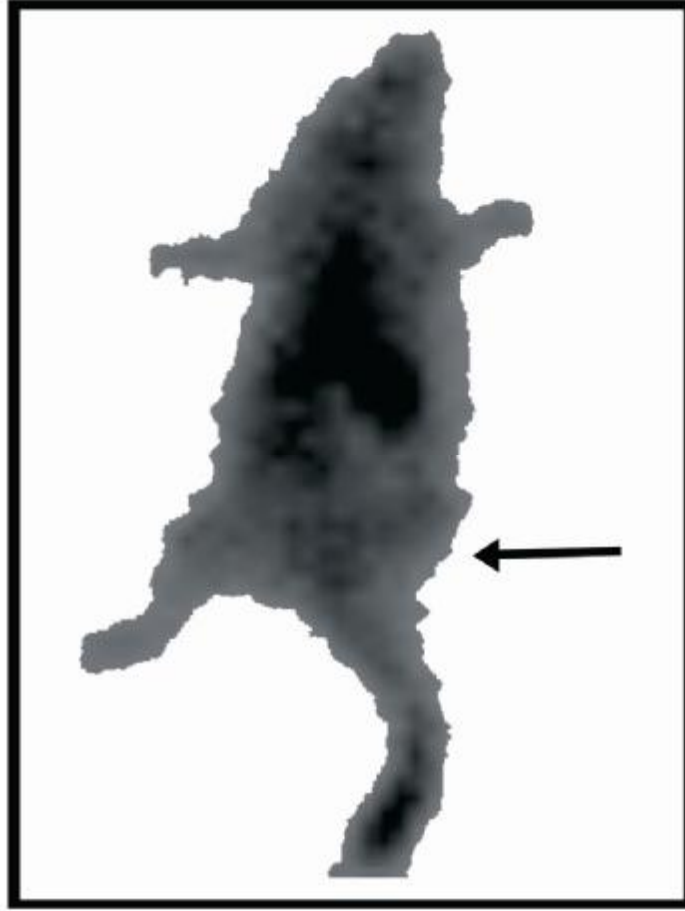
Alt ekstremite iskemisi için deneklerin sol arka bacak kasık bölgesinden elastik bandaj (1cm eninde ve 30cm boyunda) ile çepeçevre basınç uygulandı (5) (Resim 1).



Resim 1: Ratın sol alt ekstremitesine elastik bandaj uygulanması

Kan akımının kesilmesi Tc 99-m perteknetat sintigrafi ile doğrulandı (5). Resim 2’de ratta alt ekstremitede kan akımının kesilmesinin sintigrafi ile doğrulanması görülmektedir.

Sintigrafi çalışması tek bir rat bir rat üzerinde yapıldı. Sol alt ekstremiteye turnike uygulamasını takiben tek doz 200 Ci Tc 99-m perteknetat bir tüberkulin enjektörü (0,4 ml) ile rat kuyruk veninden enjekte edildi. Gama kamera (Philips Forte, USA) ile düşük enerjili ve yüksek çözünürlüklü yönlendirici altında 5 dakika süreyle görüntüler alındı.



Resim 2: Ratta alt ekstremitede kan akımı kesilmesinin sintigrafi ile gösterilmesi

Deneklerin vücut sıcaklıklarını 36,8–37,5 C° arasında tutmak amacıyla çalışma süresince operasyon masası ısıtıldı, ortam sıcaklığı sabit tutuldu.

Kas Dokusunun Histopatolojik Değerlendirilmesi

Gastroknemiyus kasından alınan biyopsi örnekleri %2,5'lük gluteraldehide alınarak +4°C' de bekletildi. Sorenson fosfat buffer ile 3–4 kez değiştirilerek 15–20 dakika yıkandı. 1 kısım *fosfat buffer saline* (PBS) + 1 kısım osmium tetraksit solüsyonu karışımında 1 saat bekletildi. PBS ile 15–20 dakika yıkanarak bir gece bekletildi. Dehidratasyon işlemi %70 alkol, %100 (Absolu) alkol ve propilen oksit kullanılarak yapıldı. İnfiltrasyon işleminde dokudaki propilen oksiti; dokuları kurutmayacak şekilde 1: 1 oranındaki propylen oksit+araldit karışımına alınarak, oda sıcaklığında 1 saat bekletildi. Daha sonra dokular araldit karışımında bekletildi. Son olarak dokular *Dimetyaminomethy fenol* (DMP) 30'lu ya da *benzil dimetil aminli* (BDMA) saf araldit içine gömülerek, 60°C' lik etüvde 48 saat polimerize edildi.

Histopatolojik değerlendirmeler her gruptan randomize olarak seçilen 5 denek üzerinde uygulandı. Kas dokusundaki değişimler nekroz, sarkoplazmik retikulum (SR) dilatasyonu, mitokondri boyut farkı, mitokondriyal kristalizis (kristaların azalması), nötrofil hücre yoğunluğu, kromatin kaybı düzeyi ve miyofibriler dezorganizasyon gibi değişimler yönünden, bir histolog tarafından elekton mikroskopu (EM) altında kör olarak değerlendirildi. Deęerlendirmede “*doku hasar skoru*” kullanıldı. Skorlama 0; hasar yok ya da minimal hasar, 1; hafif hasar, 2; orta hasar, 3; şiddetli hasar şeklinde derecelendirildi (25). Kalpten alınan kan örneklerinde LDH ve kreatin kinaz (CK) değerleri incelendi.

İSTATİSTİKSEL ANALİZ

Deneyde elde edilen veriler Windows için SPSS 11,0 programı kullanılarak analiz edildi. Çoklu analizler için Kruskal Wallis Testi, ikili karşılaştırmalar için Mann Whitney *U* Testi kullanıldı ve $p < 0,05$ olan değerler istatistiksel olarak anlamlı kabul edildi.

BULGULAR

Bu çalışma 7'şer rattan oluşan 4 gruptaki toplam 28 ratta gerçekleştirildi. Deneklerin tümü, protokolü tamamladı.

Histopatolojik değerlendirmeler her gruptan seçilen 5'er denek, toplam 20 denek üzerinde randomize olarak yapıldı.

EM ile gerçekleştirilen histopatolojik değerlendirmeler sonucunda elde edilen skorlar istatistiksel olarak kıyaslandı. Tüm gruplara ait EM örnekleri Resim 3–9 'da sunulmuştur.

I- Mitokondriyal kristalizis yönünden değerlendirilen gruplardan elde edilen skorlar Tablo 1' de sunulmuştur.

Tablo 1: Gruplarda Belirlenen Mitokondriyal Kristalizis Skorları

SKOR	Grup 1 (Kontrol) (n=5)	Grup 2 (İ/R, Sham) (n=5)	Grup 3 (İ/R, 2.5 mg/kg) (n=5)	Grup 4 (İ/R, 10 mg/kg) (n=5)
0	5	1	4	5
1	–	4	1	–
2	–	–	–	–
3	–	–	–	–

Mitokondriyal kristalizis skorları kıyaslandığında, sham grubunda oluşan ve İ/R hasarının önemli bir belirteci olarak ortaya çıkan mitokondriyal kristalizisin Grup 1 ($p=0,014$) ve Grup 4 'e ($p=0,014$) kıyasla anlamlı derecede fazla olduğu saptandı. Grup 3'de sayısal farklılık olmasına karşın Grup 2 ile karşılaştırıldığında, farkın istatistiksel olarak anlamsız olduğu gözlemlendi ($p= 0,072$).

II- Mitokondriyal boyut farkı yönünden değerlendirilen gruplardan elde edilen skorlar

Tablo 2’de sunulmuştur.

Tablo 2: Gruplarda Belirlenen Mitokondri Boyut Farkı Skorları

SKOR	Grup 1 (Kontrol) (n=5)	Grup 2 (İ/R, Sham) (n=5)	Grup 3 (İ/R 2.5 mg/kg) (n=5)	Grup 4 (İ/R,10 mg/kg) (n=5)
0	3	3	5	4
1	2	2	–	1
2	–	–	–	–
3	–	–	–	–

Tüm gruplar karşılaştırıldığında mitokondriyal boyut farkı yönünden gruplar arasında istatistiksel anlamlı bir fark gözlenmedi ($p>0,05$).

III- Sarkoplazmik retikulum (SR) dilatasyonu yönünden değerlendirilen gruplardan elde edilen skorlar Tablo 3’de sunulmuştur.

Tablo 3: Gruplarda Belirlenen Sarkoplazmik Retikulum Dilatasyonu Skorları

SKOR	Grup 1 (Kontrol) (n=5)	Grup 2 (İ/R, Sham) (n=5)	Grup 3 (İ/R 2.5 mg/kg) (n=5)	Grup 4 (İ/R,10 mg/kg) (n=5)
0	5	–	–	5
1	–	1	4	–
2	–	2	1	–
3	–	2	–	–

İ/R hasarının önemli göstergelerinden biri olan SR dilatasyonu yönünden karşılaştırılan gruplarda SR dilatasyonunun Grup 2' de gerek Grup 1 ($p=0,005$), gerekse Grup 3'e ($p=0,004$) kıyasla anlamlı derecede fazla olduğu belirlendi. Kristalizis skorlarındakine benzer şekilde, SR dilatasyonunun Grup 3'de Grup 2'ye kıyasla sayısal farklılık sergilemesine karşın, bu fark istatistiksel olarak anlamlı bulunmadı ($p= 0,054$). SR dilatasyonundaki azalma yönünden Grup 3 ve Grup 4 arasındaki farkın istatistiksel olarak anlamlı olduğu belirlendi ($p=0,004$).

IV-Kromatin kaybı yönünden değerlendirilen gruplardan elde edilen skorlar Tablo 4'de sunulmuştur.

Tablo 4: Gruplarda Belirlenen Kromatin Kaybı Skorları

SKOR	Grup 1 (Kontrol) (n=5)	Grup 2 (İ/R, Sham) (n=5)	Grup 3 (İ/R 2.5 mg/kg) (n=5)	Grup 4 (İ/R,10 mg/kg) (n=5)
0	4	2	3	4
1	1	1	2	1
2	–	2	–	–
3	–	–	–	–

Tüm gruplar karşılaştırıldığında, gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark gözlenmedi ($p>0,05$).

V- Miyofibriler dezorganizasyon yönünden değerlendirilen gruplardan elde edilen skorlar Tablo 5’ de sunulmuştur.

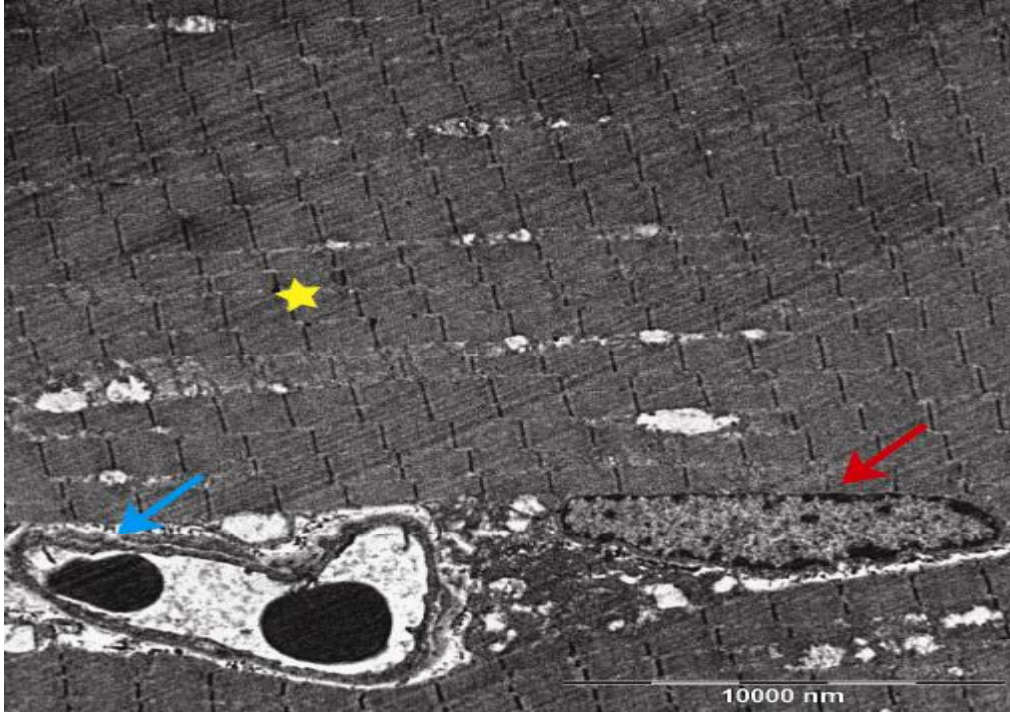
Tablo 5: Gruplarda Belirlenen Miyofibriler Dezorganizasyon Skorları

SKOR	Grup 1 (Kontrol) (n=5)	Grup 2 (İ/R, Sham) (n=5)	Grup 3 (İ/R 2.5 mg/kg) (n=5)	Grup 4 (İ/R,10 mg/kg) (n=5)
0	5	–	3	4
1	–	–	2	1
2	–	3	–	–
3	–	2	–	–

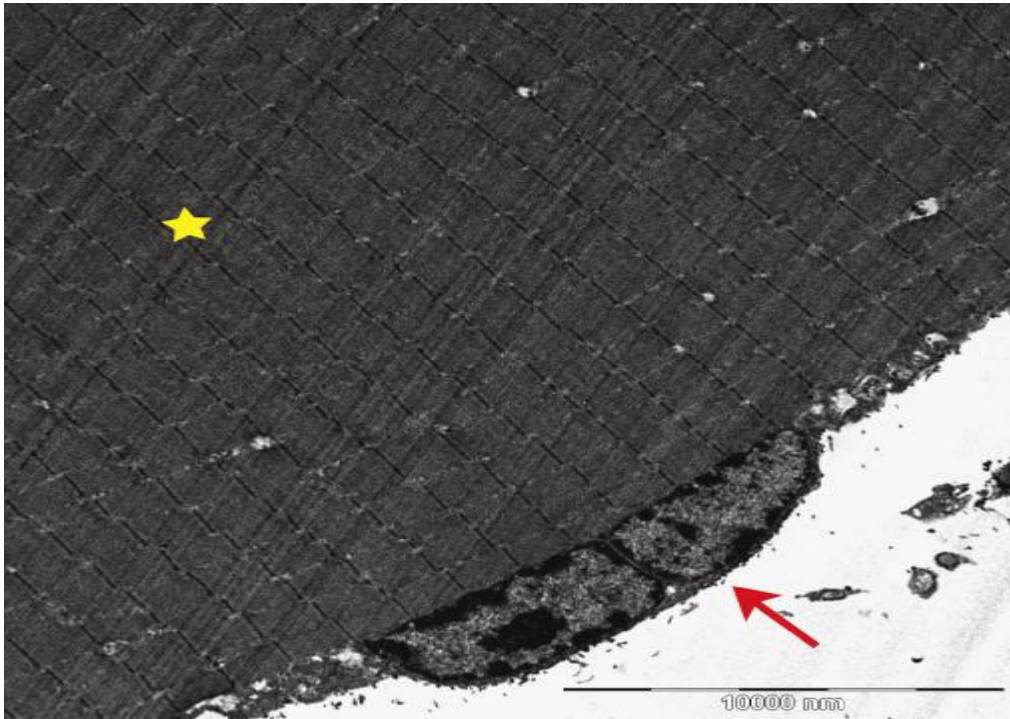
İ/R hasarının önemli bir belirti olan miyofibriler dezorganizasyonun, Grup 2’de Grup 1’e ($p=0,005$), Grup 3’e ($p=0,007$) ve Grup 4’e ($p=0,006$) kıyasla anlamlı derecede fazla olduğu saptandı. 2,5 ve 10 mg’lık gruplardaki fark istatistiksel olarak anlamlı fark bulunmadı ($p>0,05$).

EM’ de bu verilere ek olarak ödem, nötrofil birikimi, nekroz ve lizozom oluşumu açısından da değerlendirmeler elde edildi. Bu veriler skorlama sistemi ile karşılaştırılmaya dahil edilmedi. Fakat Grup 2’de yoğun olarak gözlenen nötrofil birikimi, nekroz, ödem ve lizozom oluşumu Grup 3 ve Grup 4’de doza bağlı olarak azaldı ve 10 mg’lık grupta belirgin iyileşme gözlemlendi.

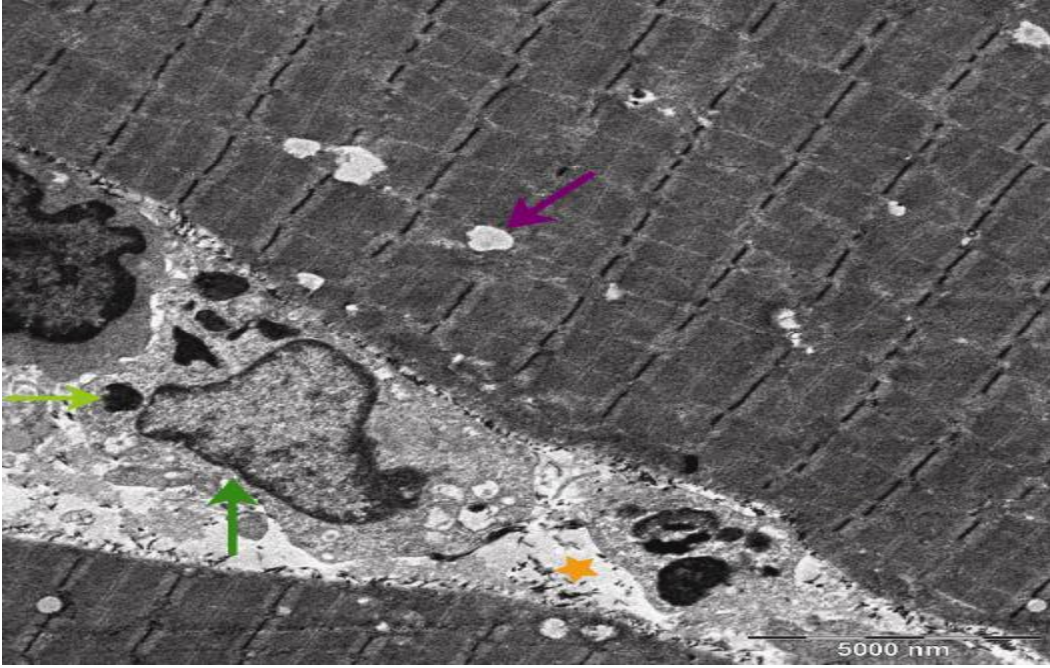
Tüm gruplara ait EM örnekleri Resim 3–9 ‘da sunulmuştur.



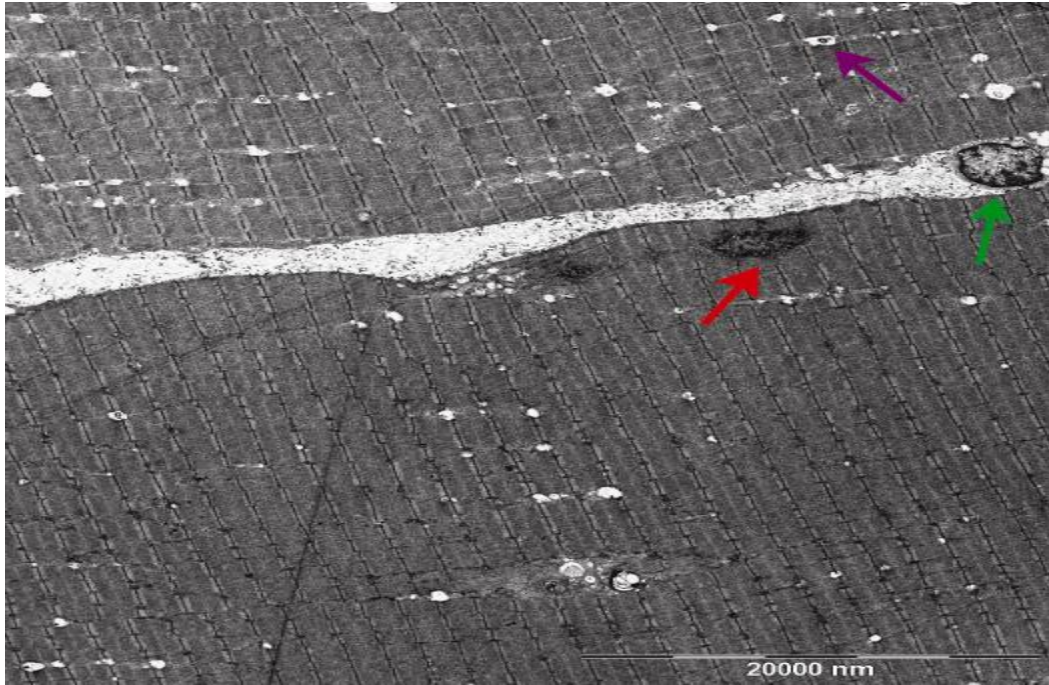
Resim 3: Grup 1 (kontrol) [Çekirdek kromatini (kırmızı ok), damar yapısı (mavi ok) ve miyofibriler yapı (sarı yıldız) normal görünümdeydi.]



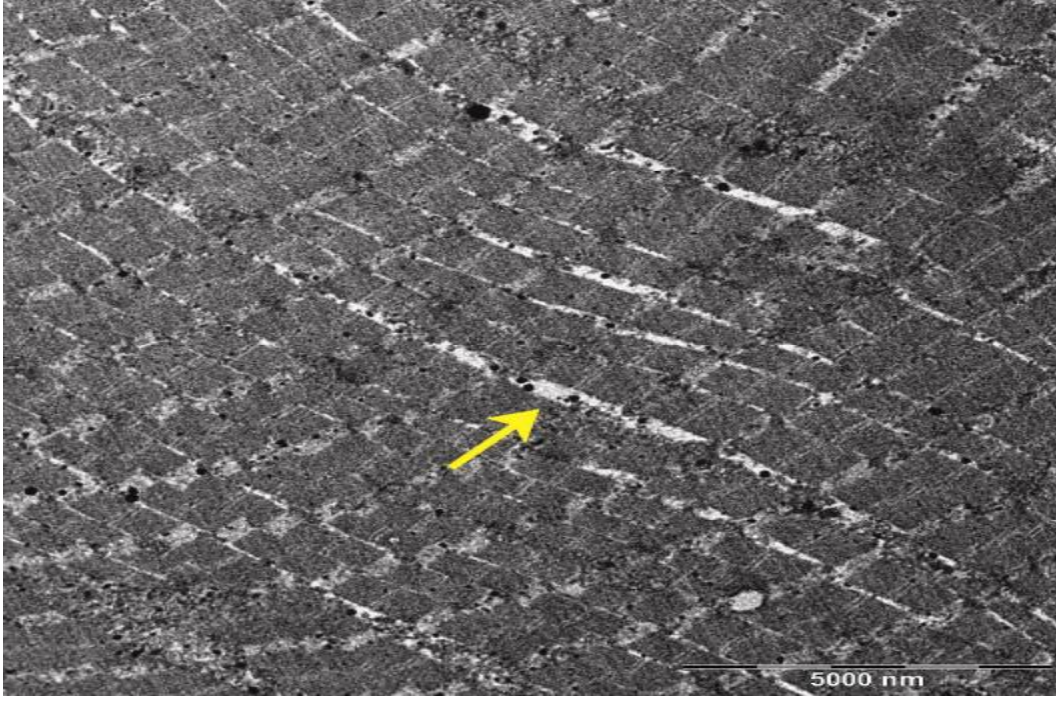
Resim 4: Grup 1 (kontrol) [Çekirdek kromatini (kırmızı ok) ve miyofibriler yapı (sarı yıldız) normal görünümdeydi.]



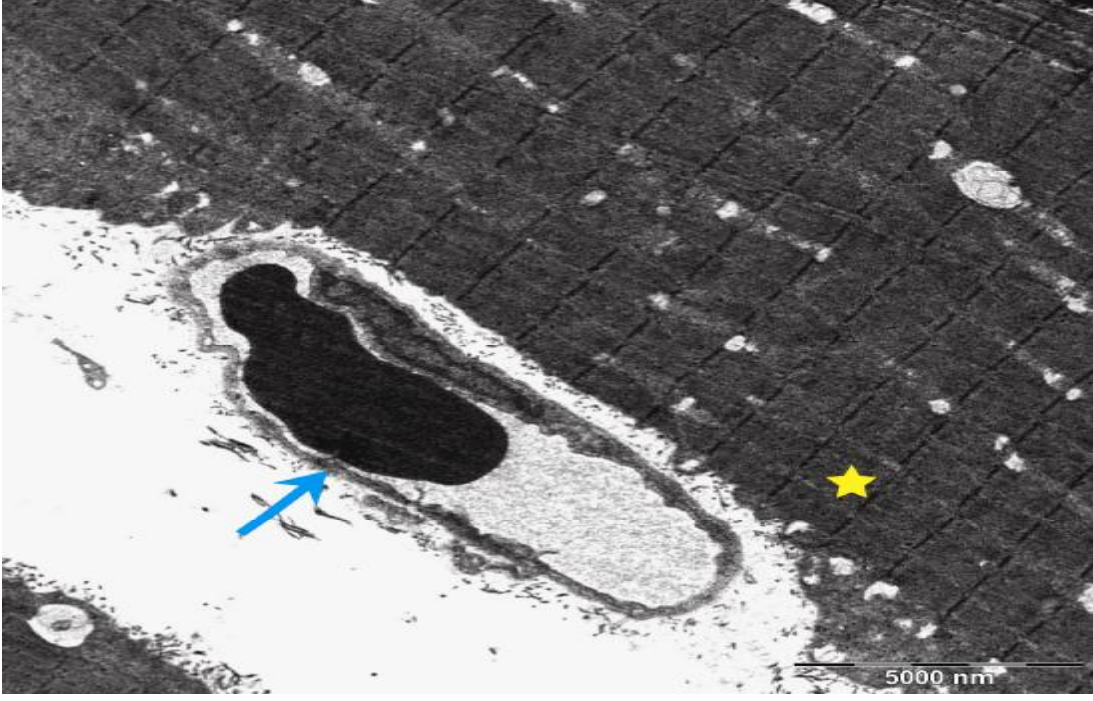
Resim 5: Grup 2 (İ/R, Sham) [Yaygın sarkoplazmik dilatasyon (mor ok), nötrofil infiltrasyonu (yeşil ok), lizozom aktivitesi (açık yeşil ok) ve yaygın ödem oluşumu (turuncu yıldız) görüldü.]



Resim 6: Grup 2 (İ/R, Sham) [Nekroza uğramış bir çekirdek (kırmızı ok), yaygın sarkoplazmik dilatasyon (mor ok) ve nötrofil infiltrasyonu (yeşil ok) görüldü.]



Resim 7: Grup 3 (I/R, 2,5 mg/kg Tenoksikam) [Miyofibriler düzensizlik (sarı ok) görüldü.]



Resim 8: Grup 4 (İ/R, 10 mg/kg Tenoksikam) [Normal myofibriler yapı (sarı yıldız) ve normal görünümde vasküler yapı (mavi ok) görülüyor.]



Resim 9: Grup 4 (İ/R, 10 mg/kg Tenoksikam)

TARTIŞMA

Turnike kullanımı, bir İ/R modelidir. Turnikeye bağlı İ/R hasarında vasküler yatakta ve kas dokusunda fonksiyonel ve metabolik değişiklikler ortaya çıkar. Kapiller hasara bağlı fonksiyon bozukluğu ile beraber vasküler geçirgenlik artar, proteinler damar dışına kaçar ve bu olayların devamında kas dokusunda ödem oluşumu gözlenir. Turnike kullanımı sonrası ortaya çıkan lokal ve sistemik etkilerin derecesi ile inflasyon süresi arasında paralellik vardır. Morfolojik ve histokimyasal açıdan hasarın derecesi, turnike süresine bağlı olarak değişir (12, 43- 46).

Kas hücresinde İ/R hasarlanması sonucu önce geri dönüşümlü, iskeminin ilerleyen dönemlerinde hücre ölümünün gözlemlendiği geri dönüşümsüz zedelenme ortaya çıkar. Hücrede geri dönüşümlü zedelenmede akut hücresel şişme, nükleer kromatin kümeleşmesi, mikrovillusların kaybı, endoplazmik retikulum (ER) ve mitokondri şişmesi (dilatasyon) gibi değişiklikler ortaya çıkar. ER’ de şişme sonucu protein sentezi bozulur. Hipoksi düzelmez ise mitokondri fonksiyonlarının daha da kötüleşmesi ve membran permeabilitesinin artması daha fazla morfolojik bozulmaya neden olur. Geri dönüşümsüz zedelenmeye, mitokondrielerin daha şiddetli şişmesi ve mitokondri matriksinde şekilsiz, kalsiyumdan zengin yoğunlukların birikimi eşlik eder. Lizozomal membranların zedelenmesi, enzimlerin sitoplazma içine sızmasına yol açar. ER’de lizis, fosfolipitlerin kaybı, hücre iskelet değişiklikleri, SOR oluşumu, lipidlerin yıkımı, protein sindirimi, kreatin kinaz (CK) ve LDH gibi enzimlerin ortaya çıkışı gözlenir. Çekirdekte ise kromatin bazofilisinde azalma (karyolizis), nükleer büzülme (piknoz) ve piknotik çekirdeğin parçalanması (karyorheksis) gözlenir. İ/R’nun ilerleyen döneminde hücre ölümü “nekroz” ortaya çıkar (9, 47, 48).

Kas dokusu, diğer dokular (örneğin kalp ve beyin dokusu) ile karşılaştırıldığında iskemiye daha dirençlidir. Çünkü 5–7 saat süre ile metabolik kapasitesini kullanabilir. Belirgin morfolojik değişimlerin 2 saatlik iskemi süresi ardından başladığı gözlemlenmiştir (9). Bununla beraber cerrahi işlem bitiminde alınan biyopsi örneklerinde yalnızca 15–90 dakikalık iskemi sonrası kas dokusu yapısında özellikle hücre organelli düzeyinde mitokondri ve endoplazmik retikulum hasarı, kontraktıl materyal yoğunlaşması, lizozom artışı gibi patolojik değişimler saptanmıştır (29).

İskemik hasarlanma ile iskeminin süresi arasında önemli bir bağlantı vardır. Petrasek ve ark (49), alt ekstremitte İ/R çalışmasında ölçüm yaparak iskeminin 4. saatinde kas

dokusundaki nekroz oranını %21, 5. saatte %61 ve 5. saatten sonra ise %92 olarak tespit etmişlerdir. Skjeldal ve ark (50), iskeminin 4. saatinde nekrozu %46 saptarken, 4,5 saat sonra % 70 olarak gözlemiştir. Bu iki çalışma bize iskemi süresi ile nekroz oranı arasında doğru orantı olduğunu telkin etmektedir. Nekroz, hücrede geri dönüşümsüz hasarın göstergesidir (47). Çalışmamızda sham grubunda çekirdekte belirgin nekroz alanları gözlenmiştir. Sham Grubu'nda belirgin olarak gözlenen nekroz, 2,5 ve 10 mg'lık gruplarda doza bağlı olarak azalmıştır.

Blaisdell F ve ark (12), 3 saatlik alt ekstremite iskemi dönemi ardından kas dokusunda geri dönüşümsüz histolojik hasarlanmanın başladığını ve yaklaşık 6. saatte tamamlandığını göstermiştir. Sirsjö ve ark (51), 3 saatlik iskemi dönemi ardından laser doppler ile kas kan akımının belirgin olarak azaldığını saptamışlardır. Duru ve ark (5), ratlarda 3 saatlik iskemi süresi sonunda kas dokusunda yaygın nötrofil birikimi oluştuğunu belirlemişlerdir. Bu bilgiler ışığında çalışmamızda iskemi süresi olarak geri dönüşümsüz hasarın başladığı 3 saat seçilmiştir. Çalışmamızda Sham Grubu'nda ortaya çıkan veriler, 3 saatlik iskemi süresi uygulanan diğer alt ekstremite İ/R çalışmalarındaki EM verilerine benzer bulunmuştur.

Kas dokusunda İ/R hasarının derecesinin, uygulanan reperfüzyon süresi ile paralellik gösterdiği kanıtlanmıştır (9, 26, 52, 53). Edna M ve ark (54), İ/R hasarının alt ekstremitede kas dokusunda meydana getirdiği morfolojik ve histokimyasal değişiklikleri belirlemek için bir deneysel çalışma yapmışlardır. Çalışmada 4 saat iskemi (İ/R), 4 saat iskemi-1 saat reperfüzyon (İ/R-1 sa), 4 saat iskemi 24 saat reperfüzyon (İ/R-24 sa), 4 saat iskemi 72 saat reperfüzyon (İ/R-72 sa) grupları oluşturulmuş. Çalışma sonunda

- 1) İR grubunda, kas dokusunda normal myofibriller yapı yanında mitokondriya kristalarında kümelenme ve kristaların azalması (Kristalizis) ile birlikte ödem,
- 2) İR-1 sa reperfüzyon grubunda, kas dokusunda ödem, miyofibriler yapıda yoğunlukta artma ve nekroz,
- 3) İR-24 sa grubunda kas dokusunda farklı morfolojik görünümler, ödemli doku, endomisyum ve perimisyumda yoğun nötrofil birikimi, sitoplazmada nekroz,
- 4) İR-72 sa grubunda kas dokusunda nekroz, bağ dokusunda nötrofil birikimi gözlenmiştir. Soleus kasından örneklerde lezyonların reperfüzyon süresi ile orantılı olarak ilerleyici artış gösterdiği belirlenmiştir.

Çalışmamızda daha önceki çalışmaların sonuçlarına bakılarak 3 saatlik iskemi süresinin ardından 24 saatlik reperfüzyon süresi (21, 25, 54) öngörülmüştür. Reperfüzyon süresinin sonunda Sham Grubu'nda yaygın SR dilatasyonu, miyofibriler dezorganizasyon ve

mitokondriyal kristalizis gözlenmiştir. Sham grubundan elde edilen bu histopatolojik bulgular aynı süreyi kullanan diğer İ/R çalışmalarında (5, 12) elde edilenlerle benzer bulunmuştur.

Ödem oluşumu İ/R' a bağlı inflamasyonda ilk ortaya çıkan belirtilerden biridir. Ödemin nedeni histamin, bradikinin, lökotrienler, kompleman komponentleri, substant P ve PAF etkisi ile proteinden zengin sıvının intravasküler yataktan intertisyuma transvasküler geçişidir (1). Duarte ve ark (53) farelerde alt ekstremitede 60, 90 ve 120 dakikalık iskemiye izleyen 60 dakikalık reperfüzyon sonrası ıslak kas dokusu ağırlığında (ödem) %90, doku protein içeriğinde ise %40 artış saptamışlardır. Appell H ve ark (48), hastalarda turnike kullanımı sonrası vastus lateralis kasından biyopsi örnekleri alarak patolojik değişimleri elektron mikroskopu ile incelemişler, 90 dakikalık iskemi süresi sonunda lifler arası ödem, lizozom birikimi, hücreler arası ödem, nekroz, endotelyumda balonlaşma, bazal membranda kalınlaşma saptamışlardır. Çalışmamızda sham grubunda ekstravasküler ve myofibriller arasında yaygın ödem oluşumu gözlenmiştir. 2,5 ve 10 mg'lık gruplarda ödem doza bağlı olarak azalmıştır. Çalışmalarda tenoksikamın dolaylı yoldan nötrofil aktivitesini, SOR, kemokinler, PAF ve lizozomal enzim oluşumunu azalttığı gösterilmiştir (25, 41, 42, 55, 56). Ödem oluşumunun azalması bu dolaylı etkiyi destekler niteliktedir.

İskemi reperfüzyonda tüm mekanizmalarda COX enziminin rol oynadığı çalışmalarla gösterilmiştir (21, 25, 55). Dupouy V ve ark (21), ratlarda alt ekstremitede yaptıkları İ/R çalışmasında, 2 saatlik iskemi süresinin ardından COX-2 protein sentezinin 10. saatte, COX-1 sentezinin 72. saatte belirgin olarak yükseldiğini bildirmişlerdir. Yine aynı çalışmada kas hasarının belirtisi olan CK, reperfüzyonun 24. saatinde ve ödem oluşumu ise 10. saatte en yüksek değerlerine ulaşmıştır.

Patel N ve ark (55), rodentlerde böbrek İ/R çalışmasında selektif COX-2 inhibitörü olan parekoksib ile böbrek hasarının belirtileri olan tubuler, glomerüler yetmezliğin azaldığını saptamışlardır. COX-2 'nin böbreklerde İ/R hasarının oluşumunda önemli bir konuma sahip olduğunu belirtmişlerdir.

Tenoksikamın anti-inflamatuvar etkinliği ile ilgili çalışmalar sınırlı sayıdadır. Tenoksikam direkt olarak COX enzim aktivitesini inhibe eder ve arşidonik asit metabolitlerinin oluşumunu engeller (25). Ichihara S ve ark (42), tenoksikamın nötrofillerde peroksidaz aktivitesinin azalmasında kofaktör rolü oynayarak antiinflamatuvar etki gösterdiği sonucuna varmışlardır. Paino M ve ark (41), ratlarda NSAİİ ajanlardan diklofenak, indometazin, naproksen, piroksikam ve tenoksikam ile aktive olmuş nötrofiller üzerinde yapmış oldukları çalışmada, tenoksikamın lökositlerde peroksidasyon aktivitesini ve hipoklorik asit üretimini %90, SOR oluşumunu %45 oranında azalttığını göstermişlerdir.

Ezberci F ve ark (56), ratlarda peritonit modelinde yapmış oldukları çalışmada, tenoksikamın KAT seviyesini artırıp, MDA ve SOR seviyesini azaltarak abdominal adezyon oluşumunu önlediğini göstermişlerdir. Yine Çelebioğlu ve ark (57), fareler üzerinde yapmış oldukları çalışmada, i.p uygulanan tenoksikamın PGE2 seviyesini düşürdüğü ve abdominal adezyon oluşumunu azalttığını göstermişlerdir. Tüm bu çalışmalar tenoksikamın antiinflamatuvar etkinliğini hem lokal olarak dokuda hem de nötrofiller üzerinden gösterdiğini kanıtlar niteliktedir.

Yapılan literatür araştırmalarında Galvao R ve ark'nın (25) çalışması dışında tenoksikamın İ/R modelinde antioksidan etkinliğinin araştırıldığı bir çalışmaya rastlanmamıştır. Galvao R ve ark (25), ratlarda oluşturulan serebral iskemi modelinde tenoksikamın antioksidan etkinliğini incelemişlerdir. Çalışmada, her iki karotid artere çift taraflı klemp konularak 45 dakika iskemi uygulanmış; iskemiden hemen sonra 2,5 mg/kg ve 10 mg/kg dozlarda tenoksikam ip verilmiş; 45 dakikalık iskeminin ardından 24 saat reperfüzyon uygulanmıştır. Glutamat ve aspartat seviyelerinde gruplar arasında belirgin bir değişiklik gözlenmemesine karşın, 24 saatlik reperfüzyonun ardından MPO düzeyleri belirgin olarak artmış; bu artışın tenoksikam verilen gruplarda kontrol grubuna kıyasla kısmen gerilediği saptanmıştır. Histolojik analizlerde tenoksikam verilen gruplarda, kontrol grubuna göre striatal ve hippokampal lezyonların (vakuolizasyon, nötrofil birikimi, piknozis) belirgin şekilde azaldığı görülmüştür. İskemi grubunda “ 3 ” olarak değerlendirilen lezyon skoru, 10 mg tenoksikam grubunda “ 1 ” olarak gözlenmiştir. İskemi grubunda histolojik olarak gözlenen yoğun vakualizasyon (SR dilatasyonu) , nötrofil birikimi ve piknozis (çekirdek hasarı) 10 mg tenoksikam grubunda belirgin azalma göstermiştir. MPO aktivitesi ve nitrik oksit (NO) üretiminin göstergesi olan nitrit yoğunluğu tenoksikam verilen grupta düşüş göstermiştir. Çalışmacılar, elde ettikleri verilere dayanarak, tenoksikamın hasarlanmayı doza bağlı olarak azalttığı ve serebral iskeminin önlenmesinde nöroprotektif etki gösterdiği sonucuna varmışlardır. Çalışmamızda özellikle Galvao R ve ark'nın (25) yapmış olduğu çalışmayı göz önüne alarak tenoksikamın alt ekstremite İ/R hasarlanmasını önleyebileceğini öngördük.

Galvao R ve ark'ı (25) çalışmalarında Sham Grubu'nda striatal ve hippokampal lezyonlar gözlemişler. Tenoksikam verilen gruplarda doza bağlı olarak bu lezyonlar azalmış, özellikle 10 mg/kg tenoksikam verilen grupta iskemiye bağlı histolojik doku değişiklikleri belirgin azalma göstermiştir. Bizim çalışmamızda da benzer bir sonuç elde edilmiştir. İskemi sonrası sham grubunda yoğun olarak gözlenen nötrofil birikimi, piknoza gidişi işaret eden

kromatin kümeleşmesi, SR dilatasyonu, mitokondriyal kristalizis, miyofibriler dezorganizasyon bulguları doza bağlı olarak azaldı. Bu üç parametrede 10 mg'lık grupta ortaya çıkan sonuçlar ile kontrol grubu arasındaki sonuçlar anlamlı derecede benzerlik göstermiştir. EM'de gözlenen SR dilatasyonu, mitokondriyal kristalizis, miyofibriler dezorganizasyon bulguları İ/R' da geri dönüşümsüz hücre hasarına gidişi gösterir (47).

Edna M ve ark (54), 4 saat iskemi ve 24 saat reperfüzyon dönemi uyguladıkları çalışmada kas dokusunda yaygın nötrofil infiltrasyonu, ödem ve nekrotik fibriller saptamışlar. Ayrıca 4 saat iskemi/ 1 saat reperfüzyon grubunda dilate SR, mitokondriyal düzensizlik gözlenmişler. Bizim çalışmamızda Sham Grubu'yla karşılaştırıldığında 2,5 ve 10 mg'lık gruplarda nötrofil infiltrasyonu yoktu ve mitokondriyal kristalizis oluşumu gözlenmemiştir. 2,5 mg'lık grupta azalan SR dilatasyon oranı, 10 mg'lık grupta tamamen kayboldu. Yine Edna M ve ark'ı (54) çalışmalarında 1, 24, 72 saatlik reperfüzyon dönemi ardından yaygın miyofibriler düzensizlik gözlenmişlerdir. Çalışmamızda 2,5 ve 10 mg'lık gruplarda miyofibriler düzensizlik doza bağlı olarak azalmış; özellikle 10 mg'lık grupta belirgin olarak düşük derecede saptanmıştır.

Lizozom oluşumu nekrotik hücrelerin ortadan kaldırılmasını sağlar ve nötrofil aktivitesinin bir belirtisidir. Appell H ve ark (52)'nin yapmış oldukları çalışmada 2 saat iskemi, 1 saat reperfüzyon süresi ardından gözlenen lizozom oluşumu ve perivasküler ödem çalışmamızda yalnızca sham grubunda görülmüştür. 2,5 ve 10 mg'lık gruplarda lizozom oluşumu ve perivasküler ödem gözlenmemiştir. Bu sonuç, tenoksikam ile nötrofil aktivitesinin baskılandığı fikrini destekler niteliktedir.

Sonuç olarak bu çalışma ile tek taraflı alt ekstremite İ/R'sinde kullanılan tenoksikamın doza bağlı olarak hasarlanmayı belirgin derecede azalttığı kanısına varılmıştır. Bu sonuç İR patogenezinde araşidonik asit yolağının çok önemli olduğu savını destekler niteliktedir.

Çalışmanın sınırlamaları alınan kan örneklerinde gözlenen hemoliz nedeniyle LDH ve CK enzimlerinin, teknik yetersizlikler nedeniyle MPO, MDA, nitrit, glutatyon değişimlerinin değerlendirilememesidir.

SONUÇ VE ÖNERİLER

Sham grubundaki histolojik değişimler göz önüne alındığında, tenoksikamın kas dokusu hasarlanmasını belirgin olarak azalttığı gözlenmiştir.

Çalışma grupları sham grubu ile karşılaştırıldığında SR dilatasyonu, myofibriler dezorganizasyon ve mitokondriyal kristalis parametreleri üzerinden, tenoksikam hasarlanmayı doza bağlı olarak azaltmıştır.

Tenoksikamın, major ekstremitte ameliyatlarında, travmaya bağlı hasarlanmada ve akut ekstremitte embolizasyonu gibi klinik durumlarda uygulanabilir bir ajan olabileceği düşünülmektedir. Fakat ilacın yüksek dozları ile çalışıldığı ve bazı parametrelerin değerlendirilemediği düşünüldüğünde, daha ileri deneysel ve klinik çalışmalara gereksinim olduğu sonucuna varılmıştır.

KAYNAKLAR

- 1) Gute DC, Ishida T, Yarimizu K, Korthuis RJ. Inflammatory responses to ischemia and reperfusion in skeletal muscle. *Mol Cell Biochem* 1998; 179:169–87.
- 2) Köksal C, Bozkurt A, Gökçe Şirin. Aprotinin ameliorates ischemia/reperfusion injury in rat hind limb model. *Vascul Pharmacol* 2004; 41:125–9.
- 3) Dammers R, Wehrens T, Slaf D.W. Microcirculatory effects of experimental acute limb ischaemia-reperfusion. *Br J Surg* 2001; 88: 816–824.
- 4) Leena S, Korvenoja M, Markku A. Glucose, lactate and pyruvate response in an experimental model of microvascular flap ischemia and reperfusion: A Microdialysis Study. *Microsurgery* 2004; 24: 223–231.
- 5) Duru S, Koca U, Öztekin S, Olguner Ç, Elar Z. Antithrombin III pretreatment reduces neutrophil recruitment into the lung and skeletal muscle tissues in the rat model of bilateral lower limb and reperfusion: A pilot study. *Acta Anaesthesiol Scand* 2005; 49: 1142–1148.
- 6) Cerra FB, Lajos TZ, Montes M. Hemorrhagic infarction: A reperfusion injury following prolonged myocardial ischemic anoxia. *Surgery* 1975;78: 95–104.
- 7) Hobson RW, Neville R, Watanabe B. Role of heparin in reducing muscle infarction in ischemia-reperfusion. *Ann Acad Med Stetin* 1989; 35:131–143.
- 8) Tokito A, Silva J. Ischemia and reperfusion syndrome of hind limbs functional and histological renal changes in rats. *Medicine Riberio Preto* 2005; 38: 294–300.
- 9) Alizan A, Khalil C, Farah A, John C. Reperfusion injury. *Plast. Reconstr Surg* 2006;117: 1024–1033.
- 10) Schlag M, Haris K. Role of leukocyte accumulation and oxygen radicals in ischemia-reperfusion-induced injury in skeletal muscle. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2001; 280: 1716–1721.
- 11) Parks D and Granger D. Contributions of ischemia and reperfusion to mucosal lesion formation. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 1986; 250: 749–753
- 12) Blaisdell F W. The pathophysiology of skeletal muscle ischemia and the reperfusion syndrome: a review. *Cardiovasc Surg* 2002; 10: 620–630
- 13) Schlag M G, Harris K A and Potter R F. Role of leukocyte accumulation and oxygen radicals in ischemia-reperfusion-induced injury in skeletal muscle. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2001; 280:1716–21

- 14) Turchanyi B, Toth B, Racz I. Ischemia reperfusion Injury of skeletal muscle after selective deafferentation. *Physiol Res* 2005; 54: 25–31.
- 15) Magdi M, Yasin I, Denis W. Harkin. Lower limb ischemia-reperfusion injury triggers a systemic inflammatory response and multiple organ dysfunction. *World J Surg* 2002; 26: 11–121.
- 16) Sirsio A, Gidlof A, Nilsson G. Skeletal muscle blood flow after prolonged tourniquet ischaemia and reperfusion with and without intervening reoxygenation: an experimental study in rats using laser doppler perfusion imaging. *Scand J Plast Reconstr Surg Hand Surg* 1999; 33: 281–5.
- 17) Rupinski S. Effect of tourniquet ischemia of the arm on changes in selected parameters of muscle metabolism. *Ann Acad Med Stetin* 1989;35: 131–143.
- 18) Haimovici H. Muscular, renal and metabolic complications of acute arterial occlusions. *Surgery* 1979; 85: 461–8.
- 19) Zimon IN, Mavlianova NA. Respiratory disorders in patients with acute arterial occlusion of legs and ischemic syndrome. *Khirurgiia* 1997; : 16–8
- 20) Punch J, Reer R. Acute lung injury following reperfusion after ischemia in the hind limbs of rats. *J Trauma* 1991;31: 760–7
- 21) Dupouy V, Fere P, Uro-coste E. Time course Of cox–1 and cox–2 expression during ischemia-reperfusion in rat skeletal muscle. *J Appl Physiol* 2006: 233–239.
- 22) İşlekel H, İşlekel S, Güner G. Biochemical mechanism and tissue injury of cerebral ischemia and reperfusion. *Nörol Bil D* 2000; 17/2.
- 23) Lin B, Ginsberg M, Busto R, Li L. Hyperglycemia triggers massive neutrophil deposition in brain following transient ischemia in rats. *Neurosci Lett* 2000; 278: 1–4.
- 24) Ferreira H, Lucio M. Effect of anti-inflammatory drugs on splenocyte membrane fluidity. *Analytical biochemistry* 2005;339: 144–149.
- 25) Galvao R, Diogenes J, Maia G. Tenoxicam exerts a neuroprotective action after cerebral ischemia in rats. *Neurochem Res* 2005;30:39–46.
- 26) Collard CD, Gelman S. Pathophysiology, Clinical Manifestations, and Prevention of Ischemia–Reperfusion Injury. *Anesthesiology* 2001; 94: 1133–8.
- 27) Schoenberg M H, Beger H G. Reperfusion injury after intestinal ischemia. *Crit Care Med* 1993; 21: 1376–1387.
- 28) Arasa O, Dilsizian V. Targeting ischemic memory. *Curr Opin in Biotechnol* 2007; 18: 46–51.

- 29) Korthuis R J, Grisham M B. Leukocyte depletion attenuates vascular injury in posts ischemic skeletal muscle. *Am J Physiol*, 1988; 254:823–827.
- 30) Friedl H P, Smith D J, Till G O. Ischemia-Reperfusion in Humans Appearance of Xanthine Oxidase Activity. *Am J Pathol* 1990;136:491–5.
- 31) David J, Rosario S, Barry C. Peroxynitrite Inhibits Leukocyte–Endothelial Cell Interactions and Protects Against Ischemia-Reperfusion Injury in Rats *J Clin Invest* 1997; 99: 684–691.
- 32) Carden D and Granger D. Pathophysiology of ischemia-reperfusion injury. *J Pathol* 2000; 190:255–266.
- 33) Salvatore C, Emanuela M. Beneficial effects of n-acetylcysteine on ischemic brain injury. *Br J Pharmacol* 2000; 130: 1219–1226.
- 34) Ambrosio A, Pinsky D J, and Connolly E S. The Role of the Complement Cascade in Ischemia/Reperfusion Injury: Implications for Neuroprotection. *Mol Med* 2001; 7: 367–382
- 35) Bosco G, Yang Z, Nandi J. Effects of hyperbaric oxygen on glucose, laktate, glycerol and anti-oxidant enzymes in the skeletal muscle of rats during ischemia and reperfusion. *Clin Exp Pharmacol Physiol* 2007; 34:70–6.
- 36) Linas S L, Whittenburg D. Role of xanthine oxidase in ischemia/reperfusion injury. *Am J Physiol* 1990; 27: 711- 716.
- 37) Hankey G J, Eikelboom J W. Cyclooxygenase–2 inhibitors are they really atherothrombotic, and If not, why not? *Stroke* 2003;34: 2736–2740.
- 38) Scaglione F, Demartini G, Dugnani S, Frascini F, Triscari FA. Pharmacokinetics of tenoxicam at different dosage regimes. *Farmaco* 1993; 48(9):1321–5.
- 39) Nilsen OG. Clinical pharmacokinetics of tenoxicam. *Clin Pharmacokinet*. 1994;26:16–43.
- 40) Deirdre M, Sallyann T, Padraic W. Regional anesthesia and pain timing of pre-emptive tenoxicam is important for postoperative analgesia. *Can J Anaesth* 2001; 48: 162–166.
- 41) Paino M, Ximenes V, Fonseca L. Effect Of therapeutic plasma concentrations of non-steroidal anti-inflammatory drugs on the production of reactive oxygen species by activated rat neutrophils. *Braz J Med O Bio Res* 2005; 38: 543–551.
- 42) Ichihara S, Tomisawa H, Fukazawa H, Tateishi M, Joly R, Heintz R Oxidation of tenoxicam by leukocyte peroxidases and H₂O₂ produces novel products. *Drug Metab Dispos*. 1989 ;17:463-8
- 43) Wakai A, Wang J, Winter D. Tourniquet-induced systemic inflammatory response in extremity surgery. *J Trauma* 2001; 51: 922–926.

- 44) Sezgin S, Tolgay Ş. Turnikeye bağlı nöromuskuler hasarın patofizyolojisi. *Joint Dis Rel Surg* 2003; 14:235–240.
- 45) Fried H P, Till G O. Role of oxygen radicals in tourniquet-related ischemia-reperfusion injury of human patients. *Klin Wochenschr* 1991; 69: 1109–1112.
- 46) Girardis M, Milesi S. The hemodynamic and metabolic effects of tourniquet application during knee surgery. *Anesth Analg* 2000;91: 727–31.
- 47) Kumar V, Cotran R, Rabbits S. *Temel Patoloji*, 6. baskı. Çeviri: Kemal Kutlu, Nobel Yayınları, İstanbul 2000. s. 4–24.
- 48) Appell H J, Glöser S, Duarte JA, Zellner A, Soares JM. Skeletal muscle damage during tourniquet-induced ischaemia. The initial step towards atrophy after orthopaedic surgery? *Eur J Appl Physiol Occup Physiol* 1993;67:342–7
- 49) Petrasek PF, Homer-Vanniasinkam S, Walker PM. Determinants of ischemic injury to skeletal muscle. *J Vasc Surg* 1994 ;19:623–31.
- 50) Skjeldal S, Torvik A, Grøgaard B, Nordsletten L, Lyberg T. Histological studies on postischemic rat skeletal muscles. With emphasis on the time of leukocyte invasion. *Eur Surg Res* 1993;25:348–57.
- 51) Sirsjö A, Gidlöf A, Nilsson G, Povlsen B. Skeletal muscle blood flow after prolonged tourniquet ischaemia and reperfusion with and without intervening reoxygenation: an experimental study in rats using laser Doppler perfusion imaging. *Scand J Plast Reconstr Surg Hand Surg* 1999 Sep;33: 281–5.
- 52) Appell H J, Glöser S, Soares J, Duarte J A. Structural Alterations of Skeletal Muscle Induced by Ischemia and Reperfusion. *Basic Appl Myol* 1999; 9 : 263–268.
- 53) Duarte JA, Glöser S, Remião F, Carvalho F, Bastos ML, Soares JM, Appell HJ. Administration of tourniquet. I. Are edema and oxidative stress related to each other and to the duration of ischemia in reperfused skeletal muscle? *Arch Orthop Trauma Surg* 1997;116: 97–100.
- 54) Edna M, Maeli D, Vitalino D. Ischaemia and reperfusion effects on skeletal muscle tissue: Morphological and histochemical studies. *Int J Exp Path* 2007; 88: 147–154
- 55) Patel N, Cuzzocrea S, Collino M. The role of cyclooxygenase–2 in the rodent kidney following ischaemia/reperfusion injury in vivo. *Eur J Pharmacol* 2007; 562:148–54.
- 56) Ezberci F, Bulbuloglu E, Ciragil P. Intraperitoneal Tenoxicam to Prevent Abdominal Adhesion Formation in a Rat Peritonitis Model. *Surg Today* 2006; 36:361–366.
- 57) Celebioglu B, Eslamboul N, Olcay E. The Effect of Tenoxicam on Intraperitoneal Adhesions and Prostaglandin E2 Levels in Mice. *Anesth Analg* 1999;88. 939–42.



DOKUZ EYLÜL ÜNİVERSİTESİ TIP FAKÜLTESİ DENEY HAYVANI ARAŞTIRMALARI ETİK KURULU

35340 İnciraltı, İzmir-232 277777-2254
<http://tic.deu.edu.tr/etik/deneysel/>


Sayı : 95
Tarih : 05/10/2007
Toplantı No : 05/20/2007
Toplantı Tarihi : 05/10/2007

DOKUZ EYLÜL ÜNİVERSİTESİ TIP FAKÜLTESİ DEKANLIĞINA,

89/2007 Protokol No'lu; Anesteziyoloji ve Reanimasyon Anabilim Dalı Araştırma Görevlilerinden Dr.Yücel MOL'un sorumlusu olduğu, "Rat alt ekstremite iskemik reperfüzyon modelinde tenoksikamın antioksidan etkinliğinin araştırılması" isimli projede; dokudaki MPO, MDA, nitrit ve glutarilyon düzeylerinin ölçüm yöntemlerinin belirtilmesi, sakrifikasyon için 100/mg/kg tiyopental yeterli olduğu tespit edilmiştir.

Projenin uygulanmasında etik açıdan sakınca yoktur.

Bilgilerinizi ve gereğini arz ederim.


Prof. Dr. Mustafa OLGUNER
Deney Hayvanı Araştırmaları
Etik Kurulu Başkanı