

T1272

T.C
AKDENİZ ÜNİVERSİTESİ
TIP FAKÜLTESİ
FİZYOLOJİ ANABİLİM DALI

İSKEMİ-REPERFÜZYON HASARININ
ERİTROSİT MEKANİĞİNE ETKİSİ

T1272/1-1

UZMANLIK TEZİ
Dr. Ercüment KAYAR

DANIŞMAN ÖĞRETİM ÜYESİ
Prof. Dr. Oğuz K. BAŞKURT

Bu çalışma Akdeniz Üniversitesi Araştırma Fonu tarafından
98 02 0103 03 proje numarası ile desteklenmiştir
Kaynakça gösterilerek tezinden yararlanılabilir

Antalya, 1999

AKDENİZ ÜNİVERSİTESİ
Merkez Kütüphanesi

TEŐEKKÜR

Tezimin hazırlanmasında danıőmanlıđımı yürüten ve yol gösteren değerli hocam Prof Dr. Oğuz Kerim Başkurt'a, hayatta her an yanımda olduğunu hissettiren sevgili eőim Nermin Kayar'a, tezimin deneysel çalıőmaları sırasında gösterdikleri özverili yardımlardan dolayı Cerrahi Araştırma Unitesi'nin teknisyeni Erol Nizamoglu ve tüm araştırma görevlisi arkadaőlarıma teőkkr ederim

İÇİNDEKİLER

Giriş ve Amaç	1 – 3
Genel Bilgiler	4 – 30
Gereç ve Yöntemler	31 – 36
Bulgular	37 – 42
Tartışma	43 – 47
Özet	48
Summary	49
Kaynaklar	50 – 63

GİRİŞ VE AMAÇ

Çok hücreli canlılarda hayatın devamı için zorunlu fonksiyonları bulunan kan dokusu, bu fonksiyonlarını en ideal şekliyle ancak sürekli bir hareket halinde iken gerçekleştirebilir. Bir yandan, hücrelere yaşamlarını sürdürebilmeleri için gerekli organik moleküllerin ve oksijenin sunumu; diğer yandan, bu hücrelerin açığa çıkardıkları metabolik artıkların uzaklaştırılması, bu koşulda mümkündür.

Önceden kan akımının sınırlandığı bir dokuda kan akımının yeniden sağlanması (reperfüzyon) sırasında, moleküler oksijenin sunumu sonucu geri dönüşümsüz bir hücre zedelenmesi meydana gelir (13,39). Bu tablo "iskemi-reperfüzyon hasarı" olarak tanımlanmıştır (36). Bir dokunun gereksinimini karşılayamayacak ölçüde yetersiz kan akımı ile beslenmesi (iskemi) hali, başta miyokard ve beyin dokusunu etkilemek üzere tromboembolik olaylarda, karaciğer, böbrek, barsak, akciğer dokusunda transplantasyon sırasında, şok ve sepsis hallerinde ise birden çok organ ve sistemde karşılaşılan bir durumdur (2,11,30,39,49,84).

İskemi-reperfüzyon tablosunun beyin, kalp, böbrek, mide ve barsak gibi çeşitli dokulardaki etkisi geniş olarak incelenmiş görünmektedir. Özellikle miyokard dokusundaki iskemi-reperfüzyon hasarı ile ilgili önemli bir literatür birikimi bulunmaktadır (87,93). Bunu karşılık, genel olarak iskemiye dirençli olarak kabul

edilen iskelet kasında reperfüzyon hasarının mekanizması açıklık kazanmamıştır (27,42,46,59,100,106). Araştırmacılar akut arteriyel tıkanmayı takip eden yeniden kanlanma sonrasında iskelet kasında ödem, kontraktıl fonksiyon bozukluğu ve metabolik düzensizlik olduğu konusunda bir fikir birliği içindedir (41,53,54,122). Oksijen serbest radikalleri oluşumunu sınırlayan girişimlerin iskelet kası reperfüzyon hasarını azalttığı gösterilmiştir (100) Oksijen serbest radikallerinin parankimal hücrelerde mitokondri ve sarkoplazmik retikulum gibi kaynaklardan, endotel hücrelerinde ksantin oksidaz ve nötrofillerde NADPH oksidaz gibi enzimatik kaynaklardan köken alabileceği bilinmektedir McCord, iskemi sırasında miyosit içinde ksantin dehidrogenaz enziminin ksantin oksidaza dönüşmemesi nedeniyle iskelet kasının reperfüzyon hasarına karşı dirençli olabileceğini savunmuştur (69). Buna karşın Korthuis ve arkadaşları ise, iskemi-reperfüzyonu takiben izlenen artmış vasküler geçirgenliğin Allopurinol, katalaz (CAT) ve süperoksit dismutaz (SOD) ön uygulaması ile anlamlı olarak geriletilebildiğini göstermişler ve ksantin oksidazın oksijen türevi serbest radikaller için primer kaynak olduğunu savunmuşlardır (57).

İskemi-reperfüzyon hasarı gibi dokuda oksidatif strese neden olabilen bir tablo eritrositlerde önemli yapısal ve fonksiyonel değişikliklere yol açabilir (8,12,62,63,68,116) Dolaşım mekanizmasının yapısal ve fonksiyonel özelliği nedeniyle, doku perfüzyonunun herhangi bir nedenle bozulması halinde bir dizi hemoreolojik mekanizma aktive olur ve eritrosit deformabilitesi (şekil değiştirebilme yeteneği) başta olmak üzere kanın çeşitli reolojik özelliklerinde giderek büyüyen anormalliklerin oluşumuyla sonuçlanan bir kısır döngü ortaya çıkar (23)

Oksidatif denatürasyona oldukça yatkın olan doymamış yağ asitlerinden zengin bir lipid kapsamına sahip olmaları, serbest radikal zincir reaksiyonlarını kolaylaştıran transizyonel (geçiş) metalleri (demir gibi) bol miktarda bulundurmaları ve oksijen içeriği yönünden zengin olmaları eritrositlerin oksidan hasara yatkın olmalarını sağlar. Oksidatif hasar eritrositlerde hemoglobin oksidasyonu, lipid peroksidasyonu artışı, membran proteinlerinde denatürasyon, katyon permeabilitesinde ve mekanik özelliklerde değişikliklerle kendisini gösterir (4,5,6,7,8,43,56,116)

Eritrositlerin yapısal ve fonksiyonel özelliklerindeki değişiklikler, kan dokusunun akışkanlığını, özellikle de kanın mikrodolaşımdaki davranışını yakından ilgilendirdiğinden organizmadaki bütün dokuların perfüzyonu açısından önem taşır. Bu açıdan, belirli bir dokuda ortaya çıkan iskemi-reperfüzyon tablosunun, o doku dışındaki etkilerinden eritrositlerin reolojik ve diğer fonksiyonel özelliklerindeki değişikliklerin de sorumlu olabileceği düşünülebilir. Bu tablo içinde kan dokusunun, özellikle de eritrositlerin ne şekilde etkilendiği sorusu, literatür bilgileriyle cevaplandırılabilir durumda değildir. Bu çalışma ile, sıçan arka bacağına akut iskemi-reperfüzyon modeli kullanılarak, iskemi-reperfüzyon-hemoreoloji ilişkisinin ayrıntılarına ışık tutmak üzere eritrositlerdeki yapısal ve fonksiyonel değişikliklerin incelenmesi amaçlanmıştır.

GENEL BİLGİLER

Doku düzeyinde oksijen eksikliği (hipoksi) durumu genel olarak dört kategoride incelenir: 1) Hipoksik hipoksi: Arteriyel kandaki parsiyel oksijen basıncı (PO_2)'nin azaldığı durumdur 2) Anemik hipoksi: Arteriyel kan PO_2 düzeyi normaldir, fakat oksijen taşıyacak hemoglobin düzeyi azalmıştır. 3) Stagnant (durgun) veya iskemik hipoksi: Normal düzeyde bir PO_2 ve hemoglobin yoğunluğu bulunmasına karşılık dokuya ulaşan kan akımı çok düşük olduğundan yeterli oksijen sunumu yoktur 4) Histotoksik hipoksi: Dokuya taşınan oksijen miktarı yeterlidir, ancak toksik bir ajanın etkisi nedeniyle doku hücreleri kendilerine ulaşan oksijenden yararlanamazlar (32)

Nedene bağlı bu sınıflandırma içinde iskemik hipoksinin ayrı bir özelliği vardır Çünkü bu tip hipoksinin etkileri, etkilenen dokuya bağlıdır Bir başka deyişle; arteriyel kan akımının kesintiye uğraması (iskemi)'nin boyut ve süresine bağlı olarak organizmadaki organ veya sistemlerde farklı derecelerde doku tahribatı gelişimi söz konusudur Bir takım organlar iskemiye diğer bazılarına nazaran daha iyi dayanıklılık sergilerler (85,89,100) Dolaşım yavaşlamasına bağlı hipoksi, şok sırasında kalp ve böbrek gibi organlarda bir sorun oluşturur Konjestif kalp yetmezliğinde karaciğer ve muhtemelen beyin iskemik hipoksi nedeniyle olumsuz

yönde etkilenir. Akciğerlere olan kan akımı ise normalde çok büyüktür ve önemli harabiyet oluşması için uzun süreli hipotansiyon gerekir (32)

İskemi sırasında, hücreler iyonik gradiyentlerini ve homeostazı korumak için ihtiyaçları olan enerjiden yoksun kalırlar İlk bakışta iskemik bir dokunun yeniden kanlanması (reperfüzyonun) bu dokunun hayatiyetini sürdürmesi için gerekli olduğu düşünülebilir. Ancak, ilk olarak tanımlandığı yıllardan bu yana yapılan çalışmalarla, reperfüzyonun tek başına iskeminin neden olduğundan daha fazla bir doku yıkımına yol açtığı açık olarak gösterilmiştir (3) Granger ve arkadaşları, dört saat süren barsak iskemisinin üç saatlik bir iskeminin ardından bir saat süreyle uygulanan reperfüzyondan daha az bir hasar oluşturduğunu göstermişlerdir (39) Diğer taraftan bu hasarın sadece lokal etkiyle sonuçlanmadığı, bazı durumlarda birden çok organ yetmezliğine uzanabilen sistemik etkilere (uzak organ hasarına) de yol açtığı bildirilmiştir (39)

Vasküler endotelial hücreler, hasarın mekanizmasında anahtar rolü oynayan metabolik işlevlere sahip, çok aktif yapılardır (80) Hasarlanan vasküler endotelium bir yandan reaktif oksijen metabolitleri üretebilirken, diğer yandan fonksiyonu kapsamındaki bir çok ajanın salgılanması etki altında kalabilir Nitrik oksit (NO), endotelin (ET), aktive olan kompleman ürünleri, sitokinler ve adezyon molekülleri gibi faktörlerin hemen hemen tümü iskemi reperfüzyon hasarının oluşumunda rol oynayabilirler (21,78,82)

Nötrofillerin iskemi-reperfüzyon sürecindeki gerek lokal gerek sistemik hasardan sorumlu olduklarına inanılmaktadır. Bu hücrelerin dolaşımında azaltılmalarının permeabilite değişimini ve ödem oluşumunu etkin biçimde önlediği gösterilmiştir (20,37,44,51,83,85)

Reperfüzyon hasarının modelleri ve mekanizmaları

Reperfüzyon hasarında rol oynayan hücresel olayları açıklayan en önemli iki mekanizma aşırı kalsiyum yüklenmesi ve serbest radikal hasarıdır (114). Reperfüzyonun hücrenin kalsiyum içeriği üzerindeki etkilerine ilişkin ilk çalışmalar Jennings ve Shen tarafından yapılmıştır (50). Bu çalışmalardan birinde koroner arterin reperfüzyonu sırasında dokulardaki katyon değişikliklerinin koroner oklüzyonun sürdürüldüğü durumdakine göre çok daha belirgin olduğu saptanmıştır. Reperfüzyonun, olasılıkla kalsiyum fosfatın depolandığı intramitokondriyal yoğun cisimciklerin oluşumu ile hücre içine kalsiyum girişinde on katlık bir artmaya neden olduğunu belirtmişlerdir (50). Bu fenomenin çarpıcı bir biçimde kalsiyum paradoksuna benzediğini ve reperfüzyonun sitozole aşırı kalsiyum alımı ile mitokondrilerde kalsiyum yüklenmesine ve ATP oluşturma yeteneklerinin bozulmasına neden olduğunu bildirmişlerdir.

İzole organ modelleri kullanılan, reperfüzyonun reoksijenasyondan ayrıldığı deneylerde hasarın büyük bir kısmının akımın yeniden sağlanmasına bağlı olmayıp, dokuya yeniden oksijenin ulaşması ile ilgili olduğu saptanmıştır (30,36,39,57). Bu nedenle "reperfüzyon hasarı" terimi tam olarak doğru değildir ve miyokard

üzerindeki bu etkiyi tanımlamak için “oksijen paradoksu” terimini kullanılmıştır. Oksijen paradoksu, kalsiyum paradoksuna çok benzer morfolojik özellikleri olan ve onunla çok yakından ilgili bir fenomendir. Aniden reoksijene olan mitokondriler tarafından hızlı ve aşırı kalsiyum alımı enerji kaybına, sitozolik kalsiyum kontrolünün bozulmasına, sarkolemmal zedelenmeye ve intrasellüler enzimlerin salıverilmesine neden olur (39). Günümüzde, ani reoksijenasyonun serbest oksijen radikalleri oluşumunu artırarak doku hasarına neden olduğu kabul edilmektedir (2,69,81,86).

Substratın olmadığı hipoksi sırasında elektron transport zincirinin sitokrom C₁'e yakın ögelerinde azalma, mitokondriler tarafından süperoksit radikallerinin oluşumuna olanak sağlar. Ayrıca dokularda serbest radikallerin etkilerine karşı koruyucu antioksidan sistemin parçaları olan indirgenmiş glutatyon, glutatyon peroksidaz ve süperoksid dismutazın sitoplazmik düzeylerinde kayıplar mevcuttur (100,106). Bu koşullarda hidrojen peroksit (H₂O₂) ve hidroksil radikalının (OH[·]) oluşumu için uygun ortam hazırlanır.

İskemi-reperfüzyon hasarında reaktif oksijen metabolitlerinin oluşumu

Stabil moleküllerin çoğunun dış yörüngesinde biri diğerine zıt yönde dönen elektron çiftleri vardır. Bu elektron çiftleri molekülün kararlı kalmasını sağlar. Dış yörüngelerinde en az bir adet eşleşmemiş elektron içeren atom veya moleküle serbest radikal denir (86). Serbest radikaller oldukça reaktiftirler ve elektronu çiftlemek için

diğer moleküllerle reaksiyon yapma eğilimindedirler Anyonik, katyonik veya nötral karakterde olabilirler

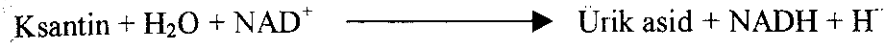
Moleküler oksijenin bütün canlılar için toksik etkisi olup, atmosferdeki değerinin % 20 artması ile toksisite kendini gösterir. Oksijenin tam olmayan indirgenmesi ile oluşan toksik ürünlere karşı canlılar korunma mekanizmasına sahip olmakla birlikte, bu korunma pek çok koşulda aşılabilmekte ve yetersiz kalabilmektedir. Çoğu hücrede aerobik metabolizma ile pekçok oksijen metaboliti oluşur. Bu oluşum iskemi-reperfüzyon hasarı gibi patolojik durumlarda artar. Antioksidan savunmanın yetersiz kaldığı durumlarda doku harabiyeti oluşur (19,106,107)

Reaktif oksijen metabolitlerinin açığa çıkması çeşitli yollarla olur. Bunlar;

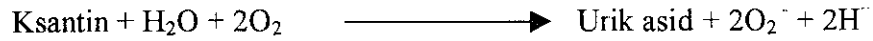
a Oksidatif fosforilasyon: Mitokondride oksidatif fosforilasyonla ATP oluşurken, moleküler oksijenin tetravalen (dört değerli) reaksiyonu ile su oluşur. Ancak, oksijenin yaklaşık % 1-5'lik kısmı sitokromlarla katalizlenen bu yoldan dışarı sızarak suya indirgenir ve nonkatalitik univalan indirgenmeye uğrar. Ara ürün olarak süperoksid radikali, hidrojen peroksit ve hidroksil radikali salınır (92)

b Purinlerin iki basamaklı reaksiyonu: Postiskemik dokularda süperoksid radikalının ana kaynağı ksantin oksidaz enziminin katalizlediği reaksiyondur. Bu enzim, süperoksid radikalının ilk bildirilen biyolojik kaynağıdır. Özellikle barsak, akciğer, karaciğer, böbrek gibi dokularda bulunur ve ksantin dehidrogenaz (Tip D)

olarak sentezlenir. Enzimin bu tipi sağlıklı bir dokuda total aktivitenin % 90'ını oluşturur. Dehidrogenaz, süperoksit oluşturmak üzere elektronları moleküler oksijene transfer edemez. Fakat nikotinamid adenin dinükleotidi (NAD⁺) aşağıdaki şekilde indirger (48,70):



Oksidaz ise, NAD⁺ yerine moleküler oksijeni kullanır ve aşağıdaki şekilde süperoksit oluşturur:



Dokularda kan akımının, ATP oluşumu için gerekli oksijeni sağlayamayacak kadar azalması, Tip D aktivitesinin, Tip O aktivitesine dönüşümüne yol açar. Hücrelerin enerji kaynağı azaldığında, membranın her iki yanındaki iyon gradiyenti sağlanamaz. Bunun sonucu, sitozolik kalsiyum konsantrasyonunun artışı, enzimin dehidrogenaz formunu oksidaz formuna çevirecek bir proteazı (kalpain) aktive eder (39). Hücre ATP düzeylerinin azalması, AMP konsantrasyonunun artmasına neden olur. AMP ise sırasıyla adenosin, inozin ve hipoksantine katabolize olur. Hipoksantinden, ksantin yolu ile ürat oluşurken, dehidrogenaz enziminin O-formu olan oksidaz kullanıldığında süperoksit radikali oluşur (57). Sonuç olarak, iskemi sırasında, dokularda iki önemli değişiklik olur: Birincisi, yeni bir enzim aktivitesi belirir. İkincisi, bu enzimin iki substratından biri ortamda hazır hale gelir. Tip O aktivitesi için gerekli ikinci substrat olan moleküler oksijen, dokunun reperfüzyonu

sırasında temin edilir. Bu olaylar sonucunda süperoksit radikali oluşumunda bir artış olur (Şekil 1). Sıçan ileumunda Tip D aktivitesinin Tip O'ya çevrilişi 10 saniyede oluşur. Diğer dokularda da aynı şekilde, fakat yavaş bir seyirde gelişir. Kalpte, oksidaz içeriği, iskeminin sekizinci dakikasında iki katına çıkar. Karaciğer, dalak, akciğer ve böbrekte ise aynı artışlar 30 dakikayı gerektirir (69,87). Bir grup araştırmacıya göre bütün dokular içinde sadece iskelet kası dokusunda iskemi, ksantin dehidrogenazın ksantin oksidaza çevrilmesine neden olamaz. İskelet kası dokusunun, diğer dokulara göre iskemik hasara dirençli olmasının nedeni buna bağlanmaktadır (86).

Reperfüzyon hasarına reaktif oksijen metabolitleri dışında, endotel ve nötrofillerin etkileşimleri de aracılık eder (98,112). Ancak nötrofiller bazı sistemlerde oksijen serbest radikallerinin oluşumunda önemli olabilirlerse de, iskemi-reperfüzyon sırasında serbest radikallerin oluşumu için her zaman gerekli değildir. Nötrofillerin bulunmadığı solüsyonlarla perfüze edilen izole kalplerin kullanıldığı in vitro modellerde de oksijen serbest radikalleri saptanmıştır (30,64,123). Ayrıca, in vivo çalışmalarda doku nekrozunun ve nötrofil hücumunun olmadığı 15 dakikalık kısa bir iskemi ve reperfüzyon döneminden sonra serbest radikaller belirlenmiştir. Dolayısıyla bu sonuçlar, uzun süreli iskemi ve reperfüzyon dönemleri sonrasında granulositlerin, vasküler tıkanma ve geri dönüşümlü doku hasarının başlıca kaynağı olmalarına karşın, kısa süreli iskemi sonrası fonksiyon bozuklukları oluşumunda büyük bir rol oynamadıklarını ortaya koymuştur (39,44,61).

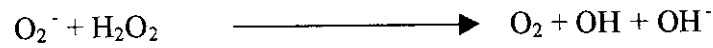
Stimüle edilmemiş nötrofiller ile endotel hücrelerinin teması, genellikle 2:1 olan ksantin dehidrogenazın, ksantin oksidaza oranını değiştirmez. Bununla birlikte, endotel hücreleri N-formil Methionine-Leucine-Phenylalanine (fMLP) gibi forbol esterleri ile temas ettiğinde bu oran 1:2'ye döner. Bu dönüşüm geri çevrilemez ve SOD ile CAT varlığında bloke edilmez. Son yıllarda yapılan çalışmalar, dönüştürücü faktörün lökositik elastaz olduğunu ortaya koymaktadır (51,85,124). Çünkü elastaz inhibitörleri, nötrofillerce ksantin dehidrogenazın ksantin oksidaza dönüşümünü bloke etmektedir.

Endotel hücrelerinde ksantin dehidrogenazın ksantin oksidaza dönüşümü tümör nekrozis faktör-alfa (TNF- α), C5_a veya kemotaktik oligopeptit fMLP'nin hücre ile teması sonucu da gerçekleşir (99).

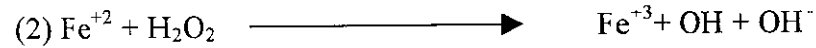
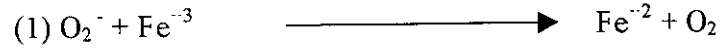
c. Araşidonik asit yolu: Hücre membranında bulunan birçok potansiyel oksijen radikali kaynağından biri araşidonik asitlerdir. Bu yolda ara peroksi bileşikleri ve hidroksil radikalleri meydana gelir. Bu, lipid peroksidasyonunun ilk ürünleri olan hidro ve endo peroksitler, daha sonra yeni zincirleme reaksiyonları başlatabilecek radikal ürünleri meydana getirebilir (11,46,47,86,94).

d. Demir ile katalizlenen reaksiyonlar: Süperoksid anyonu ve hidroksil radikali diğer moleküllerden elektron çekebildikleri için oksidleyici ajanlar olarak kabul edilirler. Süperoksid anyonu aynı zamanda bir indirgeyici ajan olarak da etki gösterebilir. Süperoksid anyonunun bir diğer özelliği sulu (aköz) ortamda fazla reaktif olmamasıdır. Bu nedenle intakt hücre membranlarından kolayca geçebilir.

Olasılıkla iyon kanalları aracılığı ile intrasellüler kaynağından dışarıya diffüze olabilir. Hidroksil radikali ise aşırı reaktif ve kısa ömürlü (yarı ömrü; 6-10 saniye) olup, ekstrasellüler alana geçemez. Bu radikal, serbest demir iyonunun yardımıyla hidrojen peroksid ve süperoksid anyonunun birbirleri ile reaksiyona girmeleri (Haber-Weiss reaksiyonu) sonucu oluşurlar (40):



Bununla birlikte fizyolojik pH'da bu reaksiyonun hız sabiti, demir tarafından katalizlenen aşağıdaki iki basamaklı reaksiyon ile karşılaştırıldığında çok yavaştır.



Ferrik Fe (Fe^{+3}) önce süperoksid anyonu ile reaksiyona girerek ferröz demire (Fe^{+2}) indirgenmekte ve ferröz demir ardından hidroksil radikali oluşturmak için yeniden H_2O_2 ile oksidlenmektedir. Bu iki basamaklı reaksiyon "Fenton reaksiyonu" olarak adlandırılır. Hemoglobinin in vitro olarak oksidan strese maruz kaldığında katalitik demiri salıvererek bir biyolojik fenton reaktifi olarak etki gösterebileceği bilinmektedir (63).

Otuz yılı aşkın bir süre önce doku perfüzyon yetersizliği ile plazmada artmış demir düzeylerinin ortaya çıkışı arasında ilişki olduğu anlaşılmıştır. Bunun üzerine

iskemi-reperfüzyon sonrası doku hasarının patogeneğinde demirin rolü, desferoksamin ve diğer demir bağlayıcı ajanların doku hasarını gerilettiğinin gösterilmesi ile açıklık kazanmıştır (27) Smith ve arkadaşları da desferoksamin ve apotransferrin adındaki demir bağlayıcı bileşiklerin, sıçan iskelet kası iskemi-reperfüzyon modelinde mikrovasküler permeabiledaki artışı ve lipid peroksidasyonunu zayıflattığını göstermişlerdir (107,108)

e Solunumsal patlama (respiratory burst): Nötrofiller, monositler, makrofajlar ve eozinofiller, çeşitli uyarılar ile sensitize olarak süperoksid radikali, hidrojen peroksit, hidroksil radikali ve hipokloroz asit (HOCl) salınımına neden olurlar Nötrofillerin hücre membranındaki NADPH bağımlı oksidaz sistemi, süperoksid radikali oluşturan önemli bir kaynaktır Normalde inaktif formda olan bu enzim, bakteri, mitojen ajan, sitokinler, opsonize partiküller, immün kompleksler, C5_a, formillenmiş peptitler, lektinler, araşidonik asit metabolizma ürünleri (ekosanoidler) gibi etkenlerle aktive olur; oksijeni hidrojen peroksit ve süperoksid radikale katalizler Bu fenomene solunumsal patlama (respiratory burst) denir (92)

Nötrofillerde, primer granüllerde bol bulunan miyeloperoksidaz (MPO) enzimi ile hidrojen peroksit ve klor iyonlarından hipokloroz asit oluşumu katalizlenir Hipokloroz asidin kendisi ve bu asidin endojen aminlerle olan reaksiyon ürünleri kuvvetli oksidan ajanlar olup nötrofil toksisitesinin büyük bölümünden sorumludur Bu reaksiyonlar hücre membranında gerçekleşir (11,38).



Hipokloroz asit ve bu ajanın endojen aminlerle olan reaksiyon ürünleri doğrudan hücreleri zedeleyebilmeleri yanında nötrofillerde elastaz, jelatinaz ve kollejenaz gibi proteazları aktive etmek suretiyle dolaylı olarak doku hasarı oluşturabilirler (85,124) (Şekil 1)

Oksijen serbest radikallerinin yaratacağı hasarlar

Kaynağı ne olursa olsun oluşan oksijen serbest radikalleri ve diğer toksik metabolitler; özellikle sülfhidril içeren aminoasit ve doymamış yağ asitleri ile etkileşerek proteinlerin denatürasyonuna, membran fosfolipidlerinin peroksidasyonuna, kemotaktik faktörlerin oluşumuna, kollojen sentezinin bozulmasına, polisakkaritlerin depolimerizasyonuna, deoksirubonükleotidlerin yıkımına, yapısal hücre proteinlerinin sülfhidril gruplarının oksidlenmesine ve çapraz köprülerin kurulmasına, proteolitik enzimlerin aktivasyonuna, proteoglikan ve glikozaminoglikan moleküllerinin oksidatif hasarına yol açarlar (19)

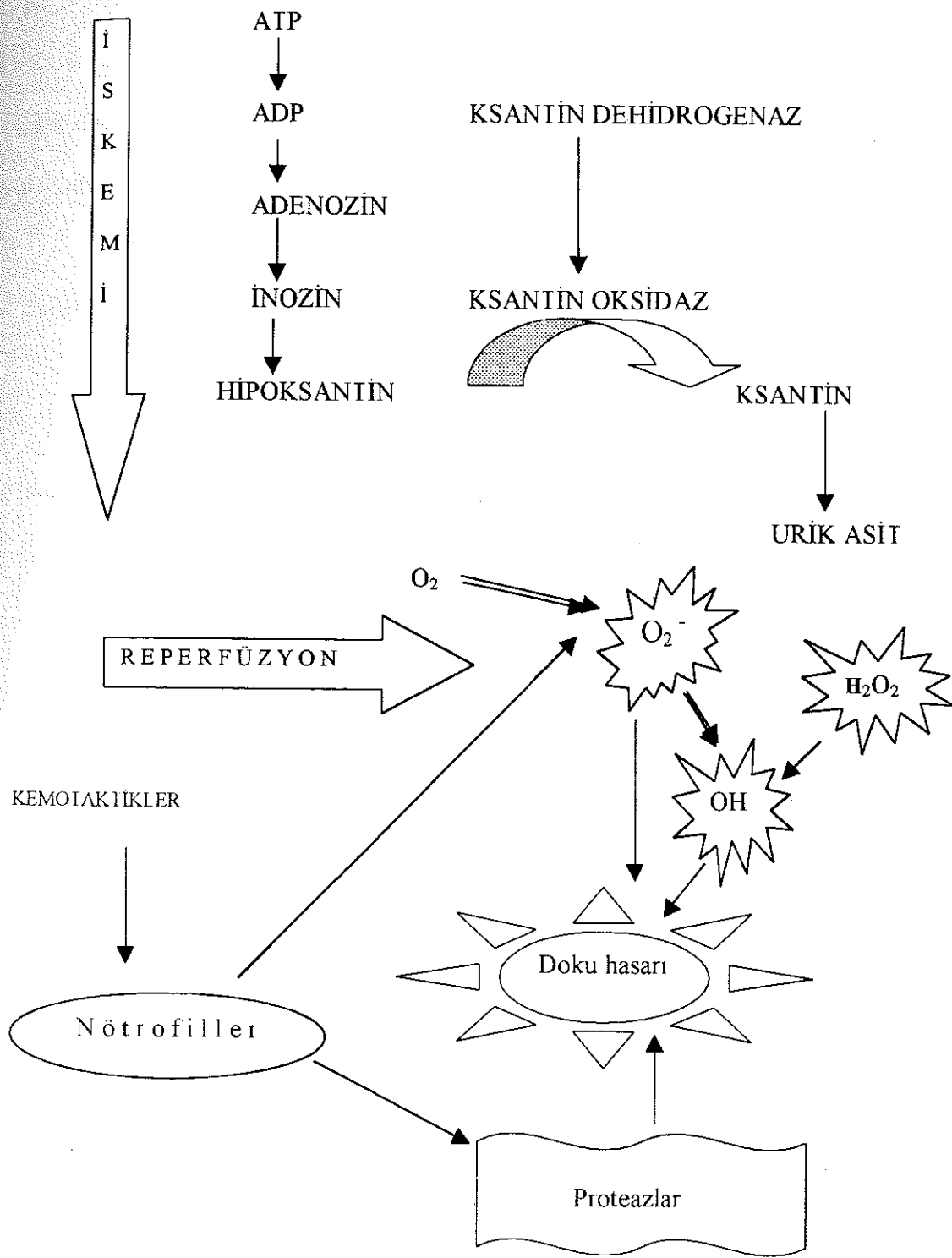
Bu genel etkilerin yanısıra, süperoksid anyonu güçlü bir trombosit adezyon inhibitörü olan nitrik oksiti tahrip eder. Bu indirekt etkisi yanında, trombositleri aktive edici direkt etkisi de mevcuttur. Trombositlerin süperoksid anyonu ile inkübasyonu, serotonin sekresyonunu ve trombin ile oluşan aktivasyonunu artırmıştır. Serbest radikaller, iskemi sırasında ATP'nin yıkım ürünü olan vasodilatasyon, nötrofillerin adezyonu ile aktivasyonunda inhibisyon ve adrenerjik uyarının baskılanması gibi etkilere sahip, sonuçta hasara karşı doğal bir savunma rolü bulunan adenzinin üretimini inhibe ederler. Diğer yandan inozine olan

dönüşümünü artırabilirler Bunu doğrulayan sonuçlar kalpte adenozin monofosfatı (AMP) adenoze dönüştüren 5' nükleotidaz enzim aktivitesinin azaldığı ve adenozi inozine dönüştüren adenozin deaminaz enzim aktivitesinin arttığı çalışmalardan elde edilmiştir (105)

İskemi-reperfüzyon hasarı ve lökositler

Geçici de olsa hafif derecede bir iskemi nötrofil aktivasyonuna yol açar İskemi periyodunu takip eden reperfüzyondan önce, lökositlerin dolaşımdan çeşitli yöntemlerle uzaklaştırılması (hidroksiüre gibi sistemik nötrofil azaltan ajan uygulanması) veya lökosit yüzeyindeki β_2 integrin gibi adezyon reseptörlerinin spesifik monoklonal antikorlarla blokajı doku hasarını sınırlandırabilir (49,64)

İskeminin ardından gelişen reperfüzyon sırasında bazı kemotaktik peptit ve kemoaktivatör faktörlerin (Araşidonik asit metabolitleri olan lökotrienler ve özellikle de içlerinde en potent kemotaktik olan LTB₄, PAF, C_{5a}, C_{3a}, ve oksijen serbest radikalleri tarafından aktive edilen diğer maddeler) dolaşımdaki düzeyleri artar (52,55,58) (Şekil 2) Tıpkı inflamatuvar bir hadisedeki gibi bu faktörler reperfüze olan dokuya polimorfonükleer lökositlerin toplanmasına ve aktivasyonuna yol açarlar Aktive olan lökositler özellikle postkapiller venüllerde birikerek fonksiyonel ve morfolojik açıdan bozulmuş endotelden göçe zorlanır (29,37,41,42,88) Diğer yandan ilk olarak Ames ve arkadaşları tarafından, değişen vizköelastik özellikleri nedeniyle aktive lökositlerin kapillere ait lümeni tıkamak suretiyle, kan akımının yeniden gerçekleşmesiyle mikrodolaşım perfüzyonunu bozduğu öne sürülmüştür (3,73,74)



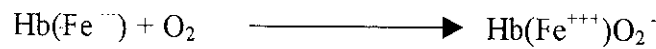
Şekil 1 İskemi-reperfüzyonda oluşan metabolitler ve doku hasarı

Aktive lökositlerin hasar oluşturmaya yönelik etkileri başlıca; membrana bağlı NADPH oksidaz yolu ile üretilen serbest oksijen radikallerine, başta LTB₄ olmak üzere araşidonik asit metabolitlerine ve lizozomal granüllerden saldıkları proteolitik enzimlere (elastaz, β glukronidaz, N-asetil-β glukoz aminidaz gibi) bağlıdır (105).

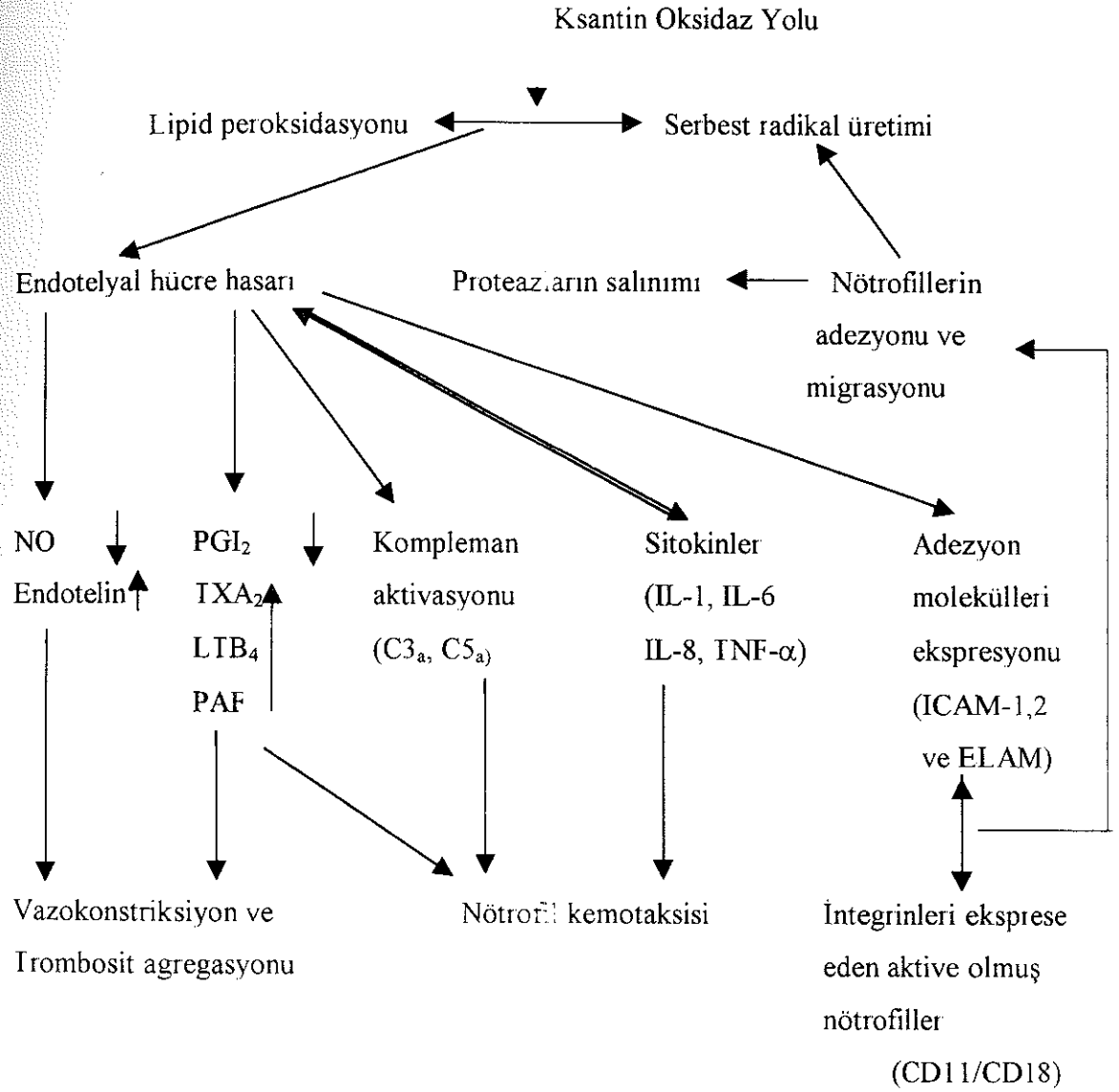
Eritrositlerde oksidatif stres

Eritrositler içinde buldukları ortam dolayısıyla oksidatif hasara açık hücrelerdir. Eritrosit membranının poliansatüre yağ asidi içeriği yüksektir. Eritrositler sürekli olarak yüksek yoğunluklarda oksijene maruz kalırlar. Hücre içindeki hemoglobin, demir içeriği sayesinde oksidatif reaksiyonlarda katalizör görevi yapar. Substrat ve katalizörlerin bu denli yoğun olarak bir arada bulunmaları, serbest oksijen radikallerinin oluşmasına uygun bir ortam hazırlar. Oluşan radikallerin eritrositlerde ortaya çıkardığı hasarın hücrelerin yaşlanması ve dolaşımdan uzaklaştırılmasından sorumlu olduğu bilinmektedir (4).

-Hemoglobinin oksidasyonu: Deoksi formunda, hem demiri dış kabuğunda dördü çiftleşmemiş elektronlardan altısına sahip olarak ferröz (Fe⁺⁺) şeklindedir. Molekül oksijeni bağlayınca, çiftleşmemiş elektronlardan biri demiri ferrik formda (Fe⁺⁺⁺) bırakarak kısmi olarak oksijen molekülüne transfer olur. Oksijeni kendisine bağlı bir süperoksid anyon haline çevirir (4).

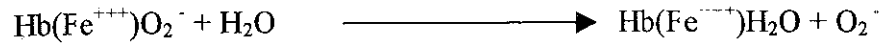


İskemi-Reperfüzyon



Şekil 2 İskemi-reperfüzyon hasarı NO nitrik oksit, PGI₂: prostasiklin, TXA₂: tromboksan A₂, LTB₄: Lökotrien B₄, PAF: trombosit aktive edici faktör, IL: interleükin, TNF: tümör nekrosis faktör, ICAM: interseleüler adezyon molekülü, ELAM: endotelial lökosit adezyon molekülü

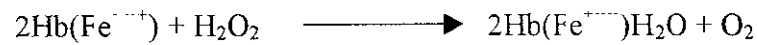
Oksijen hemoglobinden ayrılırken, paylaşılan elektron genelde hem demirinde kalır ve onu ferröz forma tekrar dönüştürür. Ancak, elektronun oksijene bağlı olarak kalması da mümkündür. Bu kez serbest bir süperoksit anyon radikali ve ferrik demirli bir hem açığa çıkar (15)



Bu hemoglobin ürünü methemoglobin olarak adlandırılır. Bu tipte hemoglobin oluşumu, eritrosit intraselüler mesafesi içinde serbest radikalleri ortaya çıkardığından hücresel oksidan denge için önemlidir. Bunun dışında methemoglobin, süperoksit anyonunun oksihemoglobin üzerine olan etkisiyle;



Diğer yandan hidrojen peroksidin deoksihemoglobin üzerine olan etkisiyle de oluşabilir;



SOD enzimi etkisiz kalırken hidrojen peroksidi parçalayan CAT enziminin hem hemoglobin oksidasyonunu hem de lipid peroksidasyonunu azaltması, hidrojen peroksidin bu reaksiyonlarda rolü bulunduğunu düşündürmüştür (1,121)

-Lipid peroksidasyonu: Eritrosit sitoplazmasının major bileşeni olan hemoglobin, lipid peroksidasyonunun başlaması ve yayılımı için güçlü bir katalizör görevi görür Lipid peroksidasyonu, karbon atomunda çiftleşmemiş bir elektronu bırakarak, genellikle çifte bir bağa bağlanmış bir metilen grubundan bir hidrojen atomu çıkaran serbest radikal ile başlatılır Moleküler bir düzenlemeden sonra bir oksijen molekülü bu karbon radikale eklenir ve bir peroksil radikali oluşur Bu radikal hidrojen atomlarını çıkararak diğer lipid radikalleri ile hidroperoksitleri oluşturur (39,46). Lipid hidroperoksitleri geçiş metalleri ile ilişkiye girmedikçe stabildir. Geçiş metalleri varlığında ise, hemolitik yıkımla daha çok radikal üretir

Eritrosit membranı eritrosit membran iskeleti olarak adlandırılan özel bir protein ağ ile desteklenmiş çift katmanlı bir lipid tabakadan oluşan özel bir yapıya sahiptir (14,26) Bu protein ağı membranın yapısal bütünlüğü kadar bikonkav diskoid şeklinin korunmasından sorumludur (45,75,76,101,103). Buna ilave olarak, eritrosit membran iskeletinin, hücreye ait reolojik özelliklerin düzenlenmesinde büyük bir rol oynadığı da bilinmektedir (75,101).

Membran iskeletinin ana komponenti olan Spektrin, α ve β alt birimlerden oluşmuş ve çift katmanlı lipid tabakanın stoplazmik yüzünde bir ağ şeklini almıştır Bu ana ağ yapı içine kenetlenip birleşen diğer birkaç protein; aktin, tropomyozin, band 4 proteinleri ve ankirin (band 2 1)'dir (14,65,103) Bu ağ, membran integral proteinlerine belli etkileşimler vasıtasıyla bağlantı sağlar Spektrin baş kısmından ankirine bağlanır Ankirin aynı zamanda spektrini band 3 (anyon-Cl⁻/HCO₃⁻-exchanger) proteinine bağlar Kuyruk kısmında ise spektrin, F-aktin moleküllerine

bağlanır. Bu bağlantıya protein 4.1'in de katılması bu bölgedeki bağları güçlendirir (14,76)

Oksidatif hasar genelde fosfolipidlerde başlar, fakat kolaylıkla membran iskeletini kapsayan proteinlere yayılabilir. Spekrinin sülfhidril grupları aminofosfolipidlerin poliansatüre yağ asitlerine çok yakın yerleşmiş durumdadır ve onları özellikle oksidan hasara yatkın kılacak şekildedir (4,35). Örneğin, fosfatidilserin membranda protein 4.1'in tutunduğu bölgelerden biridir (101). Oksidan hasar spekrin birimlerini disülfid bağları ile çapraz bağlı hale getirebilir. Spekrin molekülünün dışı açık sülfhidril gruplarının, aminofosfolipidlerin içindeki poliansatüre yağ asitlerine çok yakın olarak yerleşmiş olması, neden spekrinin oksidan hasara en açık iskelet proteini olduğunu ortaya koyar (4).

Malonildialdehit gibi lipid peroksidasyon ürünleri de amino grupları içeren membran komponentlerine çapraz bağlanabilir. Böyle bir çapraz bağlantı membran yapıları ile sınırlı kalmaz. Stoplazmik protein olan hemoglobin de spekrine çapraz bağlantı yapabilir. Ancak hemoglobin-spekrin komplekslerinin oluşması lipid peroksidasyonundan bağımsız olarak görülmektedir. Hemoglobin oksidasyonu sırasında spekrin-hemoglobin komplekslerinin meydana gelmesi eritrosit deformabilitesini azaltır (8,68,103,113).

Oksidan stres altında izlenen ve lipid peroksidasyonu ile direkt olarak ilişkili olmayan bir diğer değişim de artmış katyon geçirgenliğidir. Artmış pasif katyon (özellikle K^+) geçirgenliğine membran sülfhidril (SH) gruplarının oksidasyonun yol

açması olasıdır (110,113,116) Diğer yandan lipid peroksidasyonu, hemoglobine bile geçirgen olabilen porların oluşumuna neden olan membran hasarı meydana getirebilir (92) Bu biyokimyasal ve yapısal değişimlerin önemli fonksiyonel sonuçları vardır Eritrositin fizyolojik açıdan bağımlı olduğu protein olan hemoglobin, oksidan hasar ile nonfonksiyonel hale gelebilir (117)

Eritrosit mekaniği ve akışkanlık

Fiziksel olarak hücresel elemanların plazma içindeki süspansiyonundan ibaret olan kan dokusunun akışkanlığı, öncelikli olarak eritrosit kitlesi ile plazmanın özelliklerine ve bu iki fazın birbirine oranına bağlıdır (67). Ancak kanın gerek mikroeolojik gerekse makroeolojik davranışı üzerinde eritrositlerin reolojik özellikleri belirleyici bir rol oynar Zira normal eritrositlerden oluşan süspansiyonlar eritrositlerle aynı boyutlara sahip rijid parçacıklar içeren süspansiyonlardan iki kat fazla yoğunlukta bir hacimde bulunmaları halinde dahi akışkanlıklarını koruyabilmektedirler (118,119). Eritrosit süspansiyonlarının bu farklı davranışı, bu hücrelerin şekil değiştirebilme yetenekleriyle açıklanabilir Ayrıca çeşitli yöntemlerle bu yetenekleri değiştirilen eritrositlerden oluşan süspansiyonların reolojik özelliklerinin, normal eritrosit süspansiyonlarından önemli ölçüde farklı olduğu bildirilmiştir (104). Bu nedenle gerek büyük damarlardaki kitle halinde kan akımı için gerekse kapiller damar yatağındaki dolaşım için son derece önemli olan eritrosit deformabilitesi, bütün olarak dolaşım sisteminin reolojik özellikleri üzerinde belirleyici bir rol oynar Bir başka deyişle, eritrositlerin şekil değiştirme yeteneğinin

normal sınırlar içinde korunması dolaşım fonksiyonunun yerine getirilmesi yönünden büyük bir öneme sahiptir (17,101).

Eritrosit deformabilitesi

Eritrositlerin şekil değiştirebilmeleri sahip oldukları özel yapısal organizasyonla yakından ilişkilidir. Solunum gazlarının taşınması için gerekli fonksiyonel yapılarla bu yapıların en uygun şekilde işlev görmelerini sağlayan sistemlerden oluşmuş sade organizasyon, eritrositlerin benzersiz reolojik davranışının temelini oluşturmaktadır (75,76,77).

Hiçbir dış kuvvetin etkisi yokken, bikonkav disk şeklinde olan eritrositlerin bu geometrik yapısı en yüksek yüzey alanı-hacim oranını sağlayarak hem solunum gazlarının değişimi için önemli bir avantaj oluşturur hem de şekil değiştirmelerini kolaylaştırır (75,101). Eritrositlerin şekil değiştirebilme yeteneğinin, küresel bir yapıya döndükçe azaldığı bildirilmiştir (76).

Diğer yandan, eritrosit membranı elastik yapısı sayesinde eritrositlerin etkisi altında kaldığı kuvvetleri hücrenin bütün bölümlerine dağıtarak, hemen sadece bir hemoglobin süspansiyonundan oluşmuş eritrosit sitoplazmasının akışkanlığının ön plana çıkmasını sağlar (45). Bu yüzden eritrosit sitoplazmasının akışkanlığı da eritrositlerin reolojik davranışını etkiler. Sitoplazmanın akışkanlığını ise, kapsamının büyük bir bölümünü oluşturan hemoglobin konsantrasyonu belirler (75,76,77). Normal bireylerde eritrositlerin hemoglobin konsantrasyonları hücrenin yaşına bağlı

olarak değişmek üzere 27-37 g/dL arasındadır. Bu aralıkta sitoplazmik viskozite ise 5-15 centipoise kadardır (67) Bu sınırlarda hemoglobın konsantrasyonu ile sitoplazmik viskozitenin eritrosit deformabilitesine olan etkisi ihmal edilebilirken, bu konsantrasyonların üzerinde sitoplazmik viskozitede büyük artışlara neden olur Ayrıca olgun eritrositlerde hemoglobın sentezi ve yıkımı olmadığından, konsantrasyon değişimleri hemen daima hücrelerin su kapsamındaki değişimlere bağlıdır

Membran viskoelastisitesinin etkisi

Eritrositlerin şekil değiştirmesine neden olan kuvvetlerle akım sırasında doğrudan karşı karşıya kalan bölümü membrandır Membranın esnek yapısı sayesinde hücre dışarıdan etki eden kuvvetleri sitoplazmaya aktararak, adeta sitoplazmanın akıma katılmasını sağlar (28,96,97) Eritrositlerin gösterdikleri şekil değiştirme yeteneği yanında, buna neden olan kuvvetin ortadan kalkması ile kısa sürede normal bikonkav diskoid şeklini kazanmasını sağlayan bir başka fizyolojik özelliği de membranın elastik yapısıdır Bu özelliğin büyük ölçüde membran iskeletine bağlı olduğuna inanılmaktadır (26,75) İleri derecede akışkan bir yapıya sahip iki katmanlı lipid tabakanın bu özelliğinin lipid kompozisyonuna bağlı olarak değişebildiği bilinmekle birlikte, bu değişkenliğin membranın bütün olarak viskoelastik davranışı üzerinde önemli bir etkisi gözlenmemiştir (17) Dolayısıyla membranın viskoelastik karakterinin birinci planda eritrosit membran iskeletiyle ilgili olduğuna anlaşılmıştır (14.103)

Eritrositlerin şekil değiştirme yeteneklerinin tek başına bu hücreleri oluşturan materyalin fiziko-kimyasal özelliklerinden kaynaklanmayıp, membranda yer alan enzimlerin rol oynadığı aktif mekanizmalar tarafından da kontrol edildiği bildirilmiştir (77)

Oksidanların deformabiliteye etkisi

Eritrosit deformabilitesi oksidan stres tarafından etkilenen duyarlı bir parametredir. Şekil değiştirme yeteneği üzerinde oksidan saldırının sonuçları literatürde geniş ölçüde tartişılmıştır (71,113,115,116). Ksantin oksidaz-hipoksantin sistemi tarafından ekzojen olarak üretilen süperoksit anyonlarının ve hidrojen peroksidin in vitro koşulda eritrosit membran rijiditesini artırabileceği gözlenmiştir (4,8,71). Bunun temelinde, membran iskelet proteinlerinin yapısında veya bunların birbiriyle ilişkilerinde ortaya çıkan değişimlerin eritrosit deformabilitesini etkilediği fikri yatmaktadır (75,76,103). Açığa çıkan sonuçların iskelet proteinleri arasında, iskelet proteinleri ile hemoglobin arasında veya membran lipidleri ile protein yapılar arasında oluşan çapraz bağlarla, ayrıca lipid peroksidasyonu artışı ve hemoglobin oksidasyonu gibi biyokimyasal değişimlerle ilgili olduğu bildirilmiştir (22,34,110,116). Bu konuda ortaya konan bir diğer sonuç oksidanların etkisi altında eritrosit deformabilitesinde izlenen bu bozulmanın doz bağımlı olduğudur (60,115).

Eritrosit agregasyonu

Akımı sağlayan kuvvetler azaldıkça eritrositler geniş diskoid yzeylerinden birbirlerine yaklaşarak kümelenirler ve üç boyutlu agregatlar meydana getirirler (66,90). Yeterli kayma kuvveti varlığında, eritrositlerin plazma içinde bir sıvı damlası gibi davranmalarına karşılık, akım hızının yavaşlaması halinde böyle agregatlar oluşması kan akımı içinde sıvı tabakaları arasındaki sürtünme kuvvetini artırır ve kanı daha viskz nitelikli bir hale dönüştürür (111) Eritrosit agregasyonunun kan akımını yavaşlatmasına paralel olarak agregasyon daha da hızlanır Bu yüzden bazı koşullarda bir kısır döngü meydana gelir (23,24,111)

Agregasyona etkili faktörler

Eritrosit agregasyonu gerek plazmanın gerekse eritrositerin çeşitli özelliklerindeki değişimlerden etkilenir. Plazma fibrinojen konsantrasyonu eritrosit agregasyonu üzerinde çok önemli bir rol oynar (90,120) Plazma globulin fraksiyonlarındaki değişimler, osmolarite ve pH değişiklikleri gibi faktörler de eritrosit agregasyonunu etkiler (7,66,101) Hematokrit değerindeki artış, eritrosit membranının fiziko-kimyasal özelliklerindeki (membran yüzeyinin konformasyonu ve yüzey yükü) değişimler, hücre şekli, eritrosit içi kalsiyum konsantrasyonu ve eritrositin şekil değiştirme yeteneği de eritrosit agregasyonunu etkileyen hücrenel faktörler arasında sayılabilir (23,31,72,91,101,104)

Oksidanların agregasyona etkisi

Bu konuda yapılan in vitro çalışmalar oksijen serbest radikallerinin etkisiyle eritrositlerin yüzey özelliklerinin değişebildiğini ortaya koymuştur (6,8,113) Bununla birlikte bu çalışmalarda oksidatif hasarın, ekinositik şekil değişikliğine, dolayısıyla eritrosit agregasyonunun inhibisyonuna yol açabileceği bildirilmiştir (113)

Reaktif oksijen metabolitlerinin eritrosit agregasyonu üzerindeki etkisinin, bu oksidanların hücre içinden veya dışından kaynak almasına bağımlı olarak değiştiği gösterilmiştir (8). Hücre içinde sitoplazmik hidrojen donörlerini kullanarak süperoksit üreten bir madde olan phenazine methosulfate (PMS) ile hücre dışında süperoksit üreten ksantin oksidaz-hipoksantin sistemini kullandıkları bir çalışmada Başkurt ve arkadaşları, PMS ile inkübe edilen eritrositlerde agregasyon ve agregatları birarada tutan kuvvetin derecesini yansıtan kayma hızı düzeylerinde bir değişiklik izlemezken, ksantin oksidaz-hipoksantin içeren süspansiyonda inkübe edilen eritrositlerin agregasyon indekslerini anlamlı şekilde azalmış, agregatların sağlamlığını yansıtan kayma hızı değerini ise 2-3 kat artmış olarak bulmuşlardır. Bu çalışmalarında ortaya koydukları bir diğer bulgu ise, agregasyon yeteneğinin tersine, eritrosit deformabilitesi üzerinde PMS'in etkilerinin ksantin oksidaz-hipoksantininkinden daha baskın olmasıdır (8)

Agregasyon ve deformabilitenin kan akımına olan etkileri

Kan reolojik özellikleri yönünden non-Newtonian davranış gösteren bir sıvı sistemidir (66) Bu nedenle kayma hızı ile kayma gerilimi arasında doğrusal bir ilişki yoktur. Kayma hızı arttıkça kanın viskozitesi azalır (shear thinning) (23,66) Kanın bu şekilde bir akım özelliği sergilemesinde etken rol oynayan iki önemli faktör eritrositlerin agregasyon ve şekil değiştirme yetenekleridir (101) Zira düşük akım hızlarında meydana gelen agregasyon kan viskozitesini artırırken, yüksek akım hızlarında eritrositlerin şekil değiştirme yetenekleri sayesinde kan viskozitesi azalır (23) Bir başka ifade ile, düşük akım hızlarında kanın akışkanlığını belirleyen faktör eritrosit agregasyonu iken, yüksek akım hızlarında eritrositlerin deformabilitesi belirleyici rol oynamaktadır Bununla birlikte agregat oluşumu sırasında eritrositler birbirine paralel yüzeyler oluşturmak üzere şekil değişimine uğradıklarından, eritrosit deformabilitesinin azalması agregasyonu da azaltır Sonuçta, eritrosit deformabilitesinin azalması yüksek kayma hızlarında gözlenen etkinin tersine, düşük kayma hızlarında kan viskozitesinin düşmesine neden olur (118)

Büyük damarlarda sıvı akışı, Newton'un tanımladığı gibi sonsuz sayıdaki sıvı tabakalarının birbiri üzerinde kayması olarak kabul edilirse (laminer akım), bir sıvı tabakasının diğeri üzerinde kaymasını sağlayan kuvvet, sıvının iç direncini yani viskozitesini yansıtır (66) Laminer akım sırasında sıvı tabakaları süspansiyon içindeki parçacıkların çevresinde yoğunlaşır Bunun sonucu sıvı tabakaları arasındaki sürtünme artarak viskozite yükselir Eritrosit gibi şekil değiştirme yeteneği olan parçacıklar söz konusu olunca, hücre bütün kapsamıyla sıvı tabakalarının hareketine

katıldığından bu iç direnç artışı en az oranda gerçekleşir (28,96,119) Bu durum, eritrositlerin sahip oldukları esnek yapı nedeniyle kendilerini akım çizgilerine oriente etmeleri şeklinde de değerlendirilebilir. Ancak agregat oluşumunun artması partikül çapını büyütür ve laminer akım çizgilerini distorsiyona uğratar ve tabakalar arasındaki sürtünmenin artmasına neden olur.

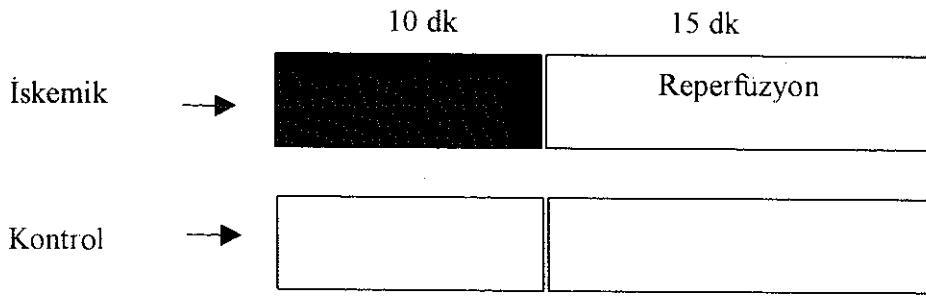
Eritrositlerin reolojik özellikleri mikrodolaşımda da önemli rol oynar. Çünkü kanın küçük çaplı damarlarda, daha büyük çapa sahip damarlara oranla daha iyi aktığının ortaya konmuştur. Bunun nedeni kan akımı içinde eritrositlerin akım hızının en yüksek olduğu merkezde toplanma eğilimlerinin olması ve sonuç olarak çepere yakın kısımda hücre konsantrasyonunda azalma ile kapiller yatağa giden kanın hemodilüsyona uğramasıdır (66) Diğer taraftan, akımın gerçekleştiği damarın boyutları kanın şekilli elemanlarının boyutlarına yaklaşınca, bu elemanların laminer akım çizgilerini distorsiyona uğratmaları nedeniyle ortaya çıkan, sıvı tabakaları arasındaki direnci artırıcı etki en aza inmiş olur (23,67)

Eritrositler agregatlarını dağıtan kayma hızı değerinde artış bir risk faktörü teşkil ederek, özellikle venöz sistem gibi dolaşım sisteminin düşük kayma hızına sahip kısımlarında eritrosit agregatlarının oluşmasına olan eğilimi daha da büyütür. Venöz sistemde artmış agregasyon sırasıyla kan viskozitesini ve akım direncini artırarak kan akımında bölgesel bir azalmaya neden olur (16,95,111) Bu nedenle iskemi-reperfüzyon fenomeninde olduğu gibi dokuda açığa çıkan oksidanlara eritrositlerin maruz kalması, eritrosit agregatlarının oluşumunu artırarak doku perfüzyonunun daha da olumsuz yönde etkilenmesine neden olabilir (118) Ancak,

iskemi-reperfüzyon hasarında açığa çıkan oksijen serbest radikallerinin eritrosit reolojik özelliklerini ne şekilde etkilediği ve dolayısıyla doku perfüzyonundaki bozulmaya olan katkısı literatürde henüz açıklık kazanmamış bir konudur. Bu bilgiye ulaşmayı sınırlayan engellerin başında iskemi-reperfüzyon, oksidan hasar ve eritrosit reolojik özelliklerindeki değişiklikler arasındaki ilişkinin mekanizmasını *in vivo* koşullarda belirlemenin zorluğu gelmektedir.

GEREÇ VE YÖNTEMLER

Akdeniz Üniversitesi Tıp Fakültesi Fizyoloji Anabilim Dalı Laboratuvarlarında gerçekleştirilen bu çalışmada ağırlıkları 250-350 g arasında değişen 34 adet dişi albino sıçan kullanılmıştır. Deneyler iki aşamalı olarak yürütülmüştür. Aşağıdaki şekilde gösterilen deney protokolu ile on'ar adetten oluşan iki grup hayvan ilk kısım deneyler için kullanılmıştır. Bu deneyde iskemi-reperfüzyon hasarının eritrosit reolojik özelliklerini ne şekilde değiştirdiği araştırılmıştır. 14 sıçanın kullanıldığı ikinci kısım deneylerde ise bu değişikliklerin eritrosit metabolizması ile olan ilişkisi incelenmiştir.



Şekil 3 Deney protokolu

Hayvanların hazırlanması

İntraperitoneal üretan (1 g/kg) anestezisi altında sağ karotid artere yerleştirilen polietilen katater (24 gauge) bir basınç transdüserine (MAY TCI-201) bağlanmıştır. Deney süresince sistolik, diastolik ve ortalama arteriyel kan basınçları fizyolojik bir kayıt sistemi (BIOPAC; Model MP 100) kullanılarak kaydedilmiştir.

Deneye başlamadan önce 20 dakika süreyle hayvanın bu konumda stabilizasyonu sağlanmıştır

İskemi-reperfüzyon modeli oluşturulması ve kan örneklemeleri

Stabilizasyonu takiben hayvanların her iki arka bacağı uyluk iç yüzünden femoral arter ve venlerine ulaşılmıştır. Arter ve ven arasındaki bağ dokuları dikkatli bir şekilde diseke edildikten sonra karotid arterden 24 gauge iğne ile 0.5 ml'lik başlangıç kan örneği (B) alınmıştır. Birinci grup hayvanda sağ bacak, inguinal ligamentin altından geçtiği kısma yakın bir noktadan femoral arteri hemostatik bir klamp (Dieffenbach, Dimeda) yardımıyla sıkıştırmak suretiyle iskemik duruma getirilmiştir. Sol bacak ise kontrol olarak kullanılmış ve herhangi bir işlem uygulanmamıştır. 10 dakika sürdürülen iskemi sonrasında klamp gevşetilerek her iki bacak femoral venlerine 24 gauge iğnelerle eş zamanlı olarak girilip ikinci kan örneklemeleri (İskemik-postiskemi:İPİ ve Noniskemik-postiskemi:NİPİ) yapılmış ve deney sonlandırılmıştır. İkinci grupta hayvanlar iskemi sonlandırıldıktan sonra kan örnekleme yapılmadan 15 dakika süreyle reperfüzyon dönemi için bekletilmiş ve kan örneklemeleri bu sürenin sonunda yapılarak (İskemik-reperfüzyon:İR ve Noniskemik-reperfüzyon:NİR) deney sonlandırılmıştır.

İkinci aşama deney için kullanılan hayvanların femoral venlerine biri kranial diğeri kaudal yön doğrultusunda polietilen kanüller (22 gauge) takılmıştır. Bu iki kanül arasına "y" şeklinde konnektör kısmı bulunan bir set (Venisystem, Abbott) içi heparinize serum fizyolojik ile (150 U/ml) doldurularak yerleştirilmiştir. Basınç takibi yapılarak stabilizasyonun sağlanmasının ardından karotid arterden 1 ml'lik

başlangıç kan örneği alınmıştır. Bir başka hayvandan alınan aynı miktarda kan yavaş bir infüzyon hızında geri verilmiştir. Bu kez gerek iskeminin hemen ardından reperfüzyon başlatıldıktan sonraki, gerekse reperfüzyon döneminin sonundaki kan örneklemeleri (toplam 4 ml) aynı hayvandan gerçekleştirilmiştir. Bu örneklemeleri takiben yine her seferinde alınan hacim kadar kan yerine konmuştur. Gerek donör gerekse deney hayvanlarından kan örnekleri ethylene diamine tetra acetic acid (EDTA) (1.5 mg/ml) kullanılarak alınmıştır.

Hematolojik parametreler

Tüm kan örneklerinde elektronik hematoloji analizörü (Cell-Dyn 3500R, Abbott) kullanılarak hematokrit (HCT), ortalama eritrosit hacmi (MCV), ve ortalama eritrosit hemoglobin konsantrasyonu (MCHC) tayin edilmiştir.

Eritrosit mekaniği

-Eritrosit agregasyonunun değerlendirilmesi

1.5 mg/ml EDTA içerecek şekilde alınan kan örneklerinin hematokrit değerleri saptanmış, daha sonra otolog plazma ilave edilerek veya çıkarılarak 0.4 L/L'ye ayarlanmıştır. Bu numunelerden eritrosit agregasyonunu gösteren indeks (MI) oda ısısında (20 ± 2 °C) dijital bilgisayar kontrollü bir fotometrik agregometre cihazı kullanılarak tayin edilmiştir (9). Agregometrenin kayma kuvveti uygulayan parçası, aralarında 300 µm'lik bir açıklık bulunan birbirine paralel iki cam düzlemden oluşmuştur. Bilgisayar tarafından kontrol edilen bir stepper motor bu cam düzlemlerden birini döndürmek suretiyle belli bir kayma hızı oluşturur. İnfrared ışık

gönderen bir diot ile bir fototransistör, amplifikatör ve A/D çevirici yardımıyla kan örneğinin ışık geçirgenliği zamana karşı kaydedilmiştir. Bunun için kan örneği cam düzlemler arası boşluğa konmuş ve öncelikle eritrosit agregatlarını dağıtmak için 10 saniye süreyle 500 s^{-1} lik bir kayma hızı uygulanmıştır. Ardından motorun aniden durması ile örneğin infrared ışığı geçirgenliği 10 saniyelik sürede ölçülmüştür. Özel geliştirilmiş bir yazılım sayesinde monitörde geçirgenliği yansıtan bir grafik elde edilmiştir ve bu grafiğin altında kalan alan bilgisayar tarafından hesaplanarak eritrosit agregasyonunun ölçüsü olan M indeksi (MI) şeklinde tanımlanmıştır (9). Her örnek üç kez çalışılmış ve bu üç ölçümün ortalaması değerlendirilmeye alınmıştır.

-Eritrosit deformabilitesinin değerlendirilmesi

Bu amaçla eritrositlerin $5 \mu\text{m}$ çapta ve $15 \mu\text{m}$ uzunlukta porlara sahip bir filtreden geçiş süreleri (TT) Cell Transit Analyzer cihazı kullanılarak tayin edilmiştir (10). Bu cihaz iki rezervuar arasına yerleştirilmiş 30 kadar silindirik por içeren filtre ile bir AC iletkenlikölçerden oluşmuştur. İletkenlikölçer 100 KHz 'lik bir akım kullanarak rezervuarlara yerleştirilmiş elektrodlar arasındaki elektriksel direnci ölçmektedir. Rezervuarlardaki sıvı düzeyleri ayarlanarak, dilüe eritrosit süspansiyonunu (% 0.04, pH:7.4 izotonik fosfat tamponu içinde) filtredeki porlardan akmaya zorlayacak şekilde $3 \text{ cm H}_2\text{O}$ düzeyinde bir basınç gradyenti oluşturulmuştur. Bir eritrositin pordan geçişi iki rezervuar arasında bir direnç değişikliği ile sonuçlanır. Böylece iletkenlikölçer devresinin çıkışında o eritrositin pordan geçişi hakkında bilgi veren bir puls oluşturulur. Bu sinyal daha sonra dijital bir bilgisayar yardımı ile analiz edilir ve eritrositin pordan geçiş süresi (TT, msn)'ne karşılık gelen bu pulsun genişliği belirlenir. Her numune için 1000 eritrositin geçiş

süreleri ölçülmüş ve bunların ortalaması eritrosit deformabilitesini temsilen kullanılmıştır. Bu teknikte artmış bir geçiş süresi eritrosit deformabilitesinde azalmayı işaret eder. Tüm ölçümler oda ısısında (20 ± 2)°C'de yapılmıştır.

Biyokimyasal parametreler

-Eritrosit sitozolik serbest kalsiyum konsantrasyonu ölçümü

Hücre içi kalsiyum konsantrasyonları yıkanmış intakt eritrositlerde Fura2-AM floresan probu kullanılarak David-Duflho ve arkadaşlarının bildirdiği modifiye bir metoda göre ölçülmüşlerdir (25). Eritrositler bir dansite gradienti kullanılarak (Histopaque-1071, Sigma Chemical Co, St. Louis, MO) lökositlerden arındırılmış ve iki kez izotonik fosfat tamponu ile bir kez de HEPES tamponu (123 mM NaCl, 5 mM KCl, 1 mM $MgCl_2 \cdot 6H_2O$, 1.3 mM $CaCl_2$, 10 mM Glukoz, 25 mM HEPES, pH:7.4) ile yıkanmışlardır. Daha sonra eritrositler HEPES tamponu ile hematokriti %1 olacak şekilde dilüe edilmiş ve bu eritrosit süspansiyonu 10 nM konsantrasyonda Fura 2-AM (Sigma Chemical Co.) varlığında 37°C'de 25 dk süreyle inkübe edilmiştir. Ekstraselüler Fura 2-AM'yi elimine etmek için süspansiyon 5 dk süreyle 350 X g de santrifüj edilmiş ve eritrositlerden tekrar izotonik fosfat tamponu solüsyonunda 10^8 hücre/ml konsantrasyonda süspansiyonu hazırlanmıştır. Bir spektrofloreometre cihazı (Shimadzu RF-5000, Tokyo, Japan) kullanılarak 335-385 nm eksitasyon aralığında, 510 nm'lik bir emisyon dalga boyunda floresans ölçülmüştür. Bu şekilde Fura 2- Ca^{++} kompleksi ve şelat oluşturmamış Fura 2'nin floresans yoğunlukları arasındaki oran (F335/F385) sitozolik kalsiyum konsantrasyonlarını yansıtmaktadır.

-Lipid peroksidasyonu tayini

Eritrosit membranındaki lipid peroksidasyonunun göstergesi olarak tiobarbituric acid reactive substance (TBARS) düzeyleri, Stocks ve Dormandy' nin yöntemine göre tiobarbitürik asit reaksiyonunun spektrofotometrik yöntemle belirlenmesiyle saptanmıştır (110) Eritrositler (0.6 ml) üç kez izotonik fosfat tamponu (0.15 M NaCl, 0.5 M KH₂PO₄, 0.5 M K₂HPO₄) ile yıkandıktan sonra üzerine 2.4 ml bu tampondan ilave edilerek sulandırılmıştır. Üzerine 1.5 ml %30'luk triklorasetikasit ilave edilerek karıştırılmış ve 2000 rpm'de 10 dakika santrifüj edilmiştir. Süpernatant başka bir tüpe alınarak üzerine 0.75 ml %1'lik tiobarbitürikasit eklenmiş ve 15 dakika sıcak su banyosunda kaynatılmıştır. Tüpler soğutulurken, 532 nm dalga boyunda absorbans değerleri spektrofotometrik olarak ölçülmüştür. Drabkin çözeltisi ile Hb değerleri ölçüldükten sonra kan TBARS düzeyleri nmol/gHb cinsinden hesaplanmıştır.

Sonuçların değerlendirilmesi

Elde edilen sonuçları değerlendirmek amacıyla gruplara ait verilerin istatistiksel karşılaştırılması 'eşli t-test' kullanılarak yapılmıştır. Değerler ortalama ± standart hata şeklinde gösterilmiştir.

BULGULAR

Kan Basıncı Değerleri

Tablo 1'de deney süresince farklı dönemlerde ölçülen sistolik, diastolik ve ortalama arteriyel kan basıncı değerleri gösterilmiştir. Değerler arasında istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık saptanmamıştır (n=7)

	Sistolik basınç	Diastolik basınç	Ortalama basınç
Başlangıç	109.11 ± 8.04	81.86 ± 9.23	88.31 ± 7.08
İskemi sonu	102.12 ± 3.26	74.59 ± 3.28	83.99 ± 5.54
Reperfüzyon sonu	105.79 ± 7.20	73.22 ± 5.21	85.34 ± 6.24

Tablo 1. Farklı dönemlere ait sistolik, diastolik ve ortalama arteriyel kan basıncı değerleri (mmHg)

Hematolojik Parametreler

Tablo 2'de her iki bacadan çeşitli dönemlerde olmak üzere alınan kan örneklerine ait hematolojik parametreler gösterilmiştir. Reperfüzyon dönemi sonunda her iki bacadan alınan kanlarda hematokrit değerleri başlangıç değerine göre anlamlı olarak düşük bulunmuştur ($p < 0.05$). Ortalama eritrosit hacmi, iskemi uygulanan bacadaki reperfüzyon dönemi sonunda iskemi uygulanmayan bacadaki reperfüzyon sonu değerine göre anlamlı bir şekilde düşük bulunurken; ortalama eritrosit hemoglobin konsantrasyonu, iskemi uygulanan bacadaki reperfüzyon dönemi sonunda

iskemi uygulanmayan bacadaki reperfüzyon sonu değerine göre anlamlı bir şekilde yüksek bulunmuştur (p<0 05)

	B	IPI	IR	NIPI	NIR
HCT (L/L)	0 42 ± 0 018	0 39 ± 0 016	0 37 ± 0 015*	0 39 ± 0 014	0 37 ± 0 018*
MCV (fL)	49 87 ± 1 76	51 21 ± 1 44	48 92 ± 1 95†	50 11 ± 1 23	51 59 ± 0 89
MCHC (gm/L)	327 4 ± 7 58	321 3 ± 4 83	328 1 ± 4 67†	324 6 ± 3 92	319 4 ± 2 94

Tablo 2. Farklı dönemlere ait hematolojik parametreler (n=7)

B: Başlangıç, IPI: İskemik-postiskemik, IR: İskemik-reperfüzyon,

NIPI: Non-iskemik-postiskemik, NIR: Non-iskemik-reperfüzyon

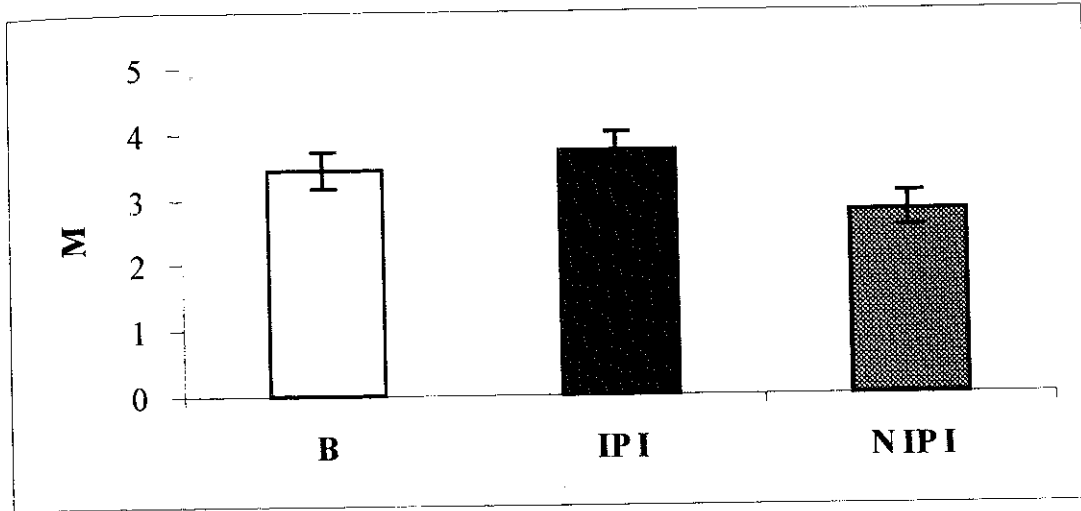
* Başlangıç değerinden fark; p<0 05 † Kontrol bacadan fark; p<0 05

Eritrosit mekaniği

-Eritrosit agregasyonu (MI)

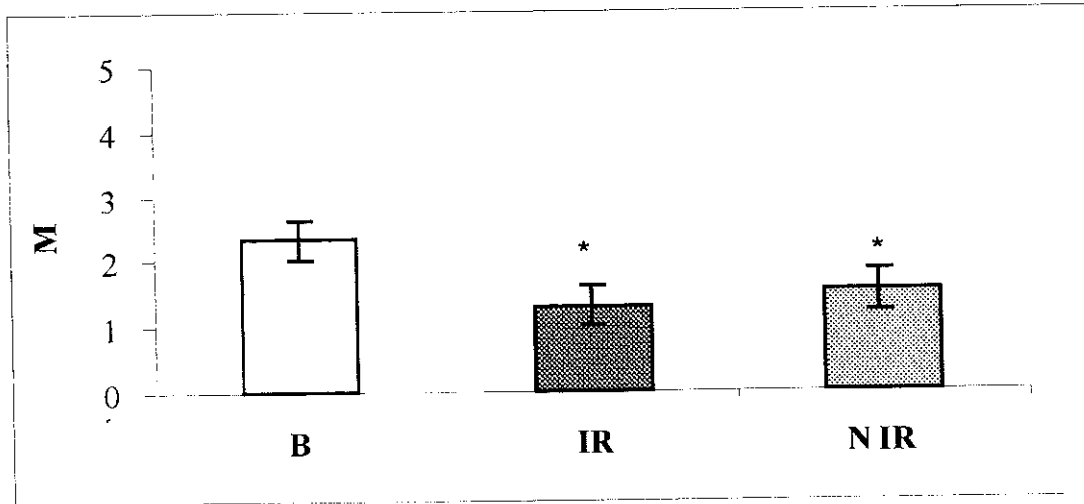
Eritrosit agregasyonu iskemi uygulanmasının hemen ardından (3 72±1 00 / 2 80±0 49) başlangıç değerlerine göre (3 42±0 74 / 2 32±0 61) her iki bacadaki da

istatistiksel olarak önemli ölçüde farklı bulunmazken (Şekil 4), reperfüzyon dönemi sonunda gerek iskemi uygulanan bacakta (1.30 ± 0.40) gerekse iskemi uygulanmayan bacakta (1.53 ± 0.48) başlangıç değerlerine göre istatistiksel olarak önemli ölçüde azalmış olarak bulunmuştur ($p < 0.01$, Şekil 5).



Şekil 4 İskemi sonrasında eritrosit agregasyonu (n=10)

B: Başlangıç, IPI: İskemik-postiskemik, NIPI: Non-iskemik-postiskemik



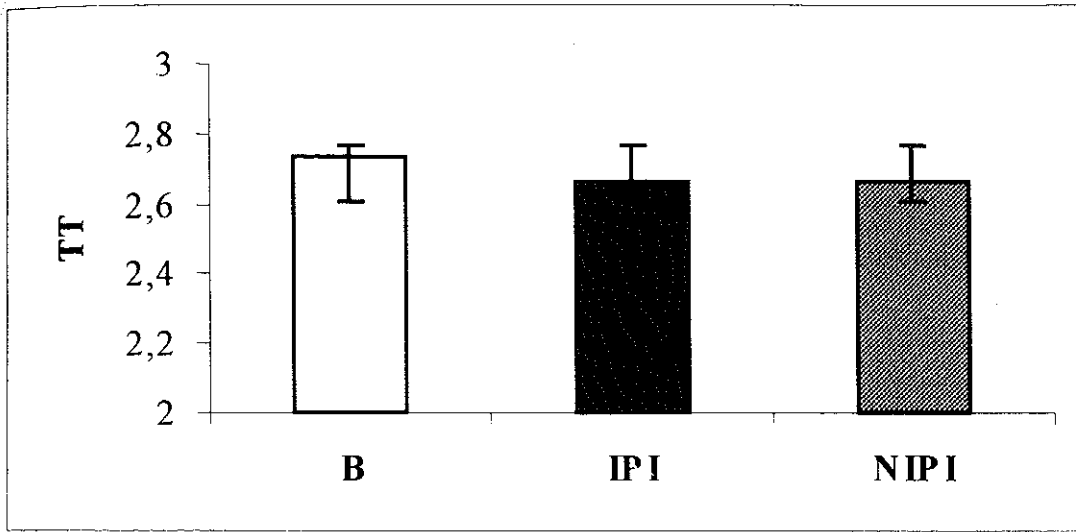
Şekil 5. Reperfüzyon dönemi sonrasında eritrosit agregasyonu (n=10)

B: Başlangıç, IR: İskemik-reperfüzyon, NIR: Non-iskemik-reperfüzyon

(n=10) * : Başlangıç değerinden fark; $p < 0.01$

-Eritrosit deformabilitesi

Gerek iskemi uygulanmasının bitiminden hemen sonra alınan örnekler (2.66 ± 0.07 / 2.66 ± 0.13), gerekse reperfüzyon dönemi sonunda alınan örnekler (2.65 ± 0.19 / 2.67 ± 0.09) başlangıç değerlerine göre (2.73 ± 0.08 / 2.82 ± 0.19) önemli bir fark oluşturacak ölçüde değişiklik göstermemişlerdir (Şekil 6 ve 7)



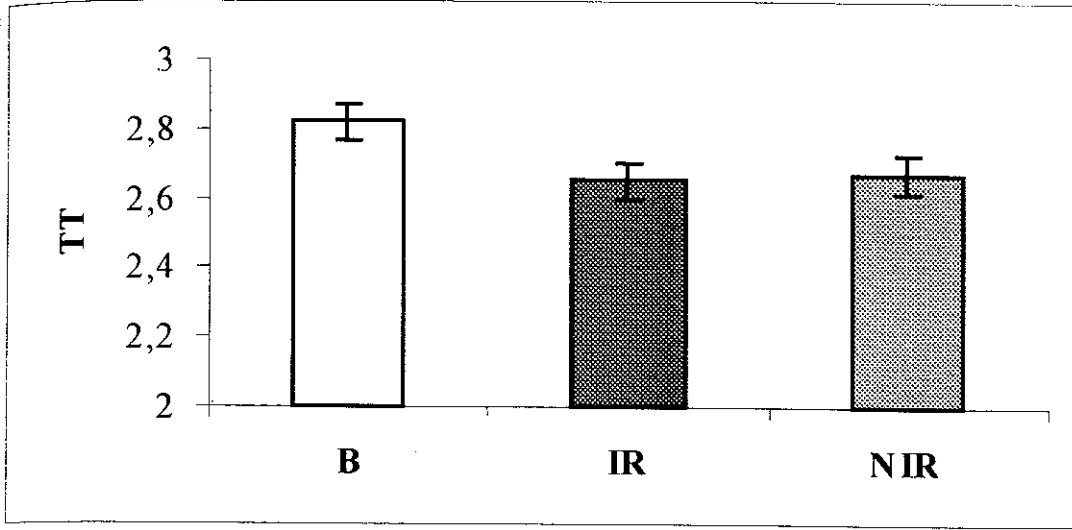
Şekil 6 İskemi sonrasında eritrosit transit zamanları (n=10)

B: Başlangıç, IPI: İskemik-postiskemik, NIPI: Non-iskemik-postiskemik

Biyokimyasal parametreler

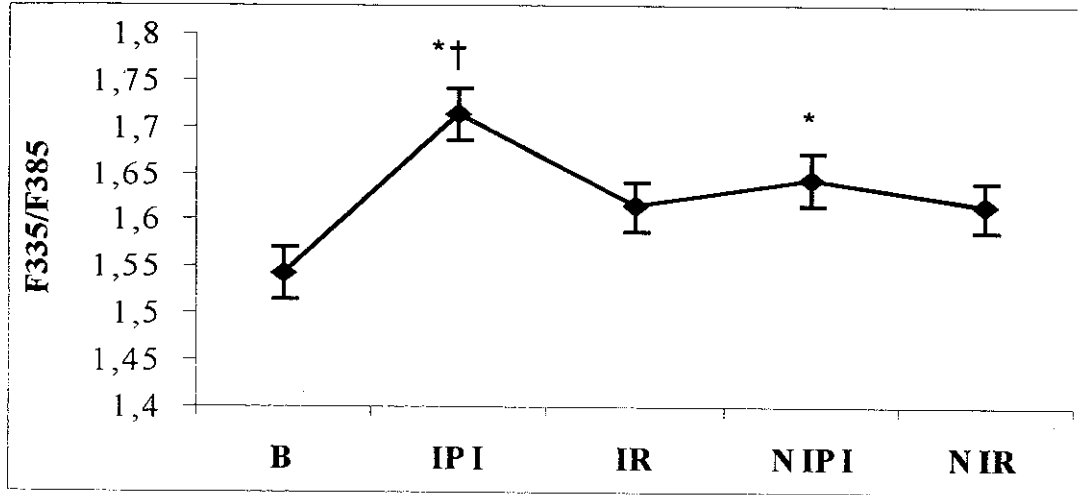
-Hücre içi kalsiyum değerleri

Hem kontrol bacakta hem iskemi uygulanan bacakta iskemi sonrasında hücre içi kalsiyum değerleri (1.64 ± 0.05 / 1.71 ± 0.05) başlangıç değerine göre (1.54 ± 0.06) istatistiksel olarak önemli bir artış göstermiştir ($p < 0,05$). Ayrıca iskemi uygulanan taraftaki artış (1.71 ± 0.05) kontrolden de (1.64 ± 0.05) önemli olarak farklı bulunmuştur ($p < 0,05$) Her iki bacakta da izlenen bu değişiklikler reperfüzyon döneminin ardından geri dönmüştür (Şekil 8)



Şekil 7. Reperfüzyon dönemi sonrasında eritrosit transit zamanları (n=10)

B: Başlangıç, IR: İskemik-reperfüzyon, NIR: Non-iskemik-reperfüzyon



Şekil 8 Farklı dönemlere ait hücre içi kalsiyum konsantrasyonu değerleri (n=7)

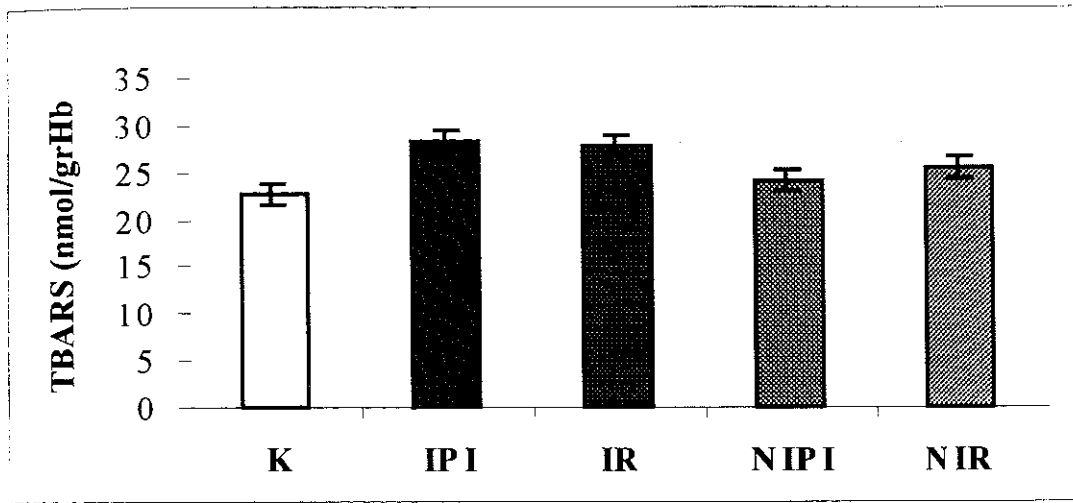
B: Başlangıç, IPI: İskemik-postiskemik, IR: İskemik-reperfüzyon,

NİPI: Non-iskemik-postiskemik, NIR: Non-iskemik-reperfüzyon

* Başlangıç değerinden fark; $p < 0,05$ †; Kontrol bacadan fark; $p < 0,05$

TBARS değerleri

Gerek kontrol gerekse iskemi uygulanan bacakta iskemi bittikten hemen sonra (24.0 ± 2.67 / 28.2 ± 5.24) ve reperfüzyondan sonra (25.4 ± 3.40 / 27.8 ± 3.70) ölçülen TBARS değerleri başlangıç değerine göre (22.6 ± 4.14) istatistiksel olarak önemli bir fark ortaya koymamıştır. Yine kontrol bacak ile iskemi uygulanan baktan alınan örnekler arasında da bir fark bulunmamıştır (Şekil 9)



Şekil 9 Farklı dönemlere ait thiobarbituric acid reactive substance (TBARS) değerleri (n=7). B: Başlangıç, IPI: İskemik-postiskemik, İR: İskemik-reperfüzyon, NIPI: Non-iskemik-postiskemik, NIR: Non-iskemik-reperfüzyon

TARTIŞMA

İskemi-reperfüzyon hasarının gelişiminde oksidatif stresin rolü bugüne kadar başta kalp dokusu olmak üzere değişik dokularda yapılan in vitro ve in vivo çalışmalarla ortaya konmuştur (36,39,57,69,81,100) Oksidatif stresi doğuran oksijen serbest radikalleri, iskemi sırasında tetiklenen bir mekanizmayla reperfüzyon sırasında endotel hücrelerinde ksantin oksidaz-hipoksantin reaksiyonu sonucu açığa çıkabilecekleri gibi (38,70,108), aktive olmuş nötrofillerden de kaynaklanabilirler (29,39,44,123) Oksijen serbest radikallerinin iskemi-reperfüzyon hasarında rol oynadıkları görüşünü destekleyen önemli bir kanıt, iskemiye uğramış dokularda reperfüzyon sonrasında oksidatif denatürasyon ürünlerinin (lipid peroksidasyon ürünleri, okside glutatyon gibi) artmış bulunmasıdır (46,94,106) Gerek doku kaynaklı gerekse dokuda aktive olan nötrofillerin açığa çıkaracakları oksijen serbest radikalleri, oksidatif strese yatkın olan bir takım özellikleri nedeniyle eritrositlerde yapısal ve fonksiyonel değişiklikler oluşmasına yol açarak doku perfüzyonunu olumsuz yönde etkileyebilir (5,6,8,12,68,113,115,116)

Bu çalışmanın ortaya koyduğu en belirgin sonuç, hem iskemi uygulanan hem de uygulanmayan bacakta reperfüzyon süresinin sonunda alınan kan örneklerinde ölçülen agregasyon parametresinin başlangıç değerine göre anlamlı şekilde azalmış olarak bulunmasıdır (Şekil 5) Bu azalma iskemi uygulanan tarafta %44, kontrol kabul edilen tarafta ise %34 dolayında bir oranla gerçekleşmiştir

Bugün mekanizmasının geçerliliği konusunda henüz kesin bir sonuca varılmamış farklı iki hipotez (köprüleme hipotezi ve kemiosmotik hipotez) bulunmasına karşın, eritrosit agregasyonun kısmen süspansiyon ortamının bileşimine, kısmen de hücrel faktörlere bağlı olarak değişen bir fenomen olduğu iyi bilinmektedir (67,90,120) Hücrel faktörler sınıfında en önemli faktör olarak eritrosit membran yüzey yükü bulunur. Bu yükü oluşturan yapılar içinde en önemlisi, membranın dış yüzeyine yerleşmiş olan sialik asit molekülleridir. Bu yapı hücrelerin birbirinden ayrılmasını artıran, böylece agregasyonu azaltan itici bir kuvvet oluşturur. Bu nedenle eritrositlerin enzimatik işlemlerle (nöraminidaz, tripsin, kimotripsin, pronaz gibi) muamele edilmeleri onların elektriksel yüzey özelliklerini ve agregasyon şeklini değiştirebilir (91). Bu çalışmada, reperfüzyon süresi sonundaki agregasyon parametrelerinde başlangıç değerine göre izlenen önemli ölçüde azalma, Başkurt ve arkadaşlarının eritrosit reolojik özelliklerini değişik paternlerde etkilediklerini düşünerek, hücre içinde veya dışında süperoksit anyonu oluşturan iki farklı mekanizmayı model olarak kullandıkları çalışmanın bulguları ile uyumludur (8). İskemi-reperfüzyon hasarı gibi eritrositin dışında oluşan oksijen serbest radikallerinin, eritrosit yüzeyinde bir etkiyle eritrosit agregasyonunu etkilemiş olabileceği düşünülebilir. Ayrıca iskemi uygulanmayan bacadan alınan örneklerde de başlangıç değerine oranla agregasyonda bir inhibisyon izlenmiş olması, bu çalışmada lökosit aktivasyonu yada lökositlerden salınan proteolitik enzimlerin (elastaz gibi) de rol oynamış olabileceklerini destekleyici bir bulgudur.

Eritrositlerde oksidatif hasarın biyokimyasal sonuçları başlıca; membran lipidlerinin peroksidasyonu, hemoglobinin oksidasyonu sonucu methemoglobin

oluşumunda artma, membran proteinleri içinde ve/veya membran proteinleri ile hemoglobin arasında çapraz bağlantılar oluşumu ve protein yıkımı şeklinde sıralanabilir (4,8,113). Oksijen serbest radikal hasarının eritrositlerde doğuracağı fonksiyonel sonuçlar ise pasif katyon geçirgenliğinde artma, buna karşın deformabilitede azalmadır (34,68,113,115,116) Bu çalışmanın bulgularına göre eritrosit deformabilitesinde, her iki bacadan alınan örneklerde gerek iskemi sonlandırıldıktan sonra, gerekse reperfüzyon döneminden sonra yapılan ölçümler sonucu başlangıç değerine oranla anlamlı bir değişiklik izlenmemiş olması literatüre zıt düşen bir tablo gibi görünmektedir (Şekil 6,7) Ancak eritrosit deformabilitesini ölçmek için kullandığımız yöntemin, eritrositlerin kendi çaplarından daha küçük çaptaki mikrokanallara sahip filtreden geçiş süresini ölçme esasına dayandığı dikkate alınır, eritrositin hacmindeki bir değişikliğin deformabilite değişikliğini baskılamış olabileceği söylenebilir. Ayrıca bu çalışmada eritrosit deformabilitesinde bir değişikliğin izlenmemiş olması, Uyeseka ve arkadaşlarının oksidan hasarın etkisi altında eritrosit deformabilitesindeki bozulmanın doz bağımlı olduğunu bildirdikleri çalışmanın sonuçlarıyla uyumludur (115) Öte yandan Başkurt ve arkadaşlarının eritrosit deformabilitesi değişikliğinin serbest radikalın oluşum şekline bağlı olduğunu gösterdikleri çalışma, bu çalışmanın negatif bulgularını açıklayabilir (8)

Çalışmamızın ortaya koyduğu bir diğer sonuç, iskemi sonlandırıldıktan sonra alınan örneklerde iskemik bacadaki ortalama eritrosit hacmi azalması ve buna paralel ortalama eritrosit hemoglobin konsantrasyonu artışıdır. Bu durum, pasif katyon geçirgenliğinde ve buna bağlı olarak sıvı çıkışında artış olduğunu gösterir. Kupinski ve arkadaşlarının iskelet kasında iskemi-reperfüzyon hasarının

mikrovasküler protein geçirgenliğinde geçici bir artışa yol açtığını gösterdikleri çalışmanın sonuçları da göz önüne alındığında ekstraselüler sıvı osmolalitesindeki değişime cevap olarak da böyle bir değişikliğin meydana gelmiş olabileceği düşünülebilir (59)

Normal eritrositlerde sitoplazmik viskozitenin belirli sınırlar içinde sabit tutulması büyük ölçüde hücrenin katyon ve su kapsamının kontroluyla gerçekleşir (77,101) Hücrenin su kapsamının kontrolü aynı zamanda yüzey alanı-hacim ilişkisinin korunması için de zorunludur Eritrosit metabolik aktivitesinin sağladığı enerjinin önemli bir bölümü bu kontrolü sağlayan aktif iyon pompaları tarafından kullanılmaktadır Eritrosit membranında yer alan iki önemli aktif pompa (Na-K ATPaz ve Ca-ATPaz) sitoplazmanın düşük sodyum, yüksek potasyum ve düşük kalsiyum konsantrasyonlarını fizyolojik sınırlar içinde korurlar (77) Hücre içi kalsiyum düzeyi artınca, kalsiyum bağımlı potasyum kanalları aktive olarak hücreden potasyum ve buna bağlı sıvı kaybı gerçekleşir Bu durum "Gardos etkisi" olarak bilinir (33). Böyle bir sonuç eritrosit şekil değiştirme yeteneğini bozar Hatta, ATP'nin tükenmesi ile ekinositik şekle dönüşüm görülebilir (18,71 102) Bununla birlikte kalsiyum artışı ile transglutaminaz aktivasyonu sonucu membran proteinleri arasında özellikle glutamin ve lizin aminoasitleri bağlantıları ile çapraz bağlantılar geliştiği bildirilmiştir (109). Bir başka çalışmada ise bu değişikliklerin kalmodulin inhibitörleri ile önlendiğinin gösterilmiş olması eritrosit iskelet protein ağının dinamik yapısının düzenlenmesinde ve böylece şekil değiştirme yeteneğinin kontrolünde hücre içi kalsiyumunun anahtar rol oynadığına ilişkin önemli kanıtlar elde edilmiştir (79) Çalışmamızın verileri iskeminin sonlandırılmasının hemen

ardından alınan kan örneklerinde yapılan ölçüm sonucu hücre içi kalsiyum değerlerinin başlangıç değerine oranla iskemi uygulanan tarafta daha belirgin olacak şekilde arttığını göstermektedir (Şekil 8) Bu değişikliğe paralel olarak, iskemi uygulanan bacadan alınan örneklerde ölçülen ortalama eritrosit hacmi değerlerinin uygulanmayan bacadan alınan örneklerde ölçülen değere göre düşük bulunması Gardos etkisini doğrular niteliktedir

Sonuç olarak bu çalışmanın verileri, iskemi-reperfüzyon hasarının öncelikli şekilde eritrosit agregasyon yeteneğini değiştirdiğini ortaya koymuştur. Ancak, gözlenen bu hemoreolojik değişimin doku perfüzyonunu ne ölçüde etkileyeceği konusunda yorum yapmaya yetecek delil elde edilememiştir. Buna rağmen iskemi-reperfüzyon hasarını önlemeye yönelik klinik uygulamalar içerisinde eritrosit mekaniğinin önemini ortaya çıkaracak ileri düzeyde çalışmalara ihtiyaç olduğu anlaşılmıştır

ÖZET

Bu çalışma, iskemi-reperfüzyon hasarında eritrosit yapısal ve fonksiyonel özelliklerinin ne şekilde etkilendiğini incelemek üzere planlanmıştır. Akut arka bacak iskemi-reperfüzyon modeli uygulanan deneylerde 34 adet dişi albino sıçan kullanılmıştır. Bir bacak femoral arterinde 10 dk. iskemi uygulamanın ardından 15 dk. süreyle reperfüzyon sağlanırken, diğer bacak kontrol olarak kabul edilmiştir. Her iki femoral venden reperfüzyon dönemi sonunda alınan kan örneklerinde eritrosit agregasyonu, başlangıç değerine göre önemli ölçüde azalmış olarak bulunmuştur ($p<0.01$). Eritrosit deformabilitesi ve tiobarbitürik asit reaktif ürün düzeylerinde ise bir değişiklik izlenmemiştir. İskemi sonlandırıldıktan sonra, kontrol bacağına göre iskemik tarafta ortalama eritrosit hacmi düşük, ortalama eritrosit hemoglobin konsantrasyonu ise artmış olarak bulunmuştur. Buna ilave olarak, bu dönemde her iki tarafta da eritrosit içi kalsiyum düzeylerinin başlangıç değerine göre önemli ölçüde yüksek bulunmuş olması çalışmamızın ortaya koyduğu bir diğer bulgudur. Bu çalışma sonuç olarak, iskemi-reperfüzyon fenomeninin başta agregasyon olmak üzere eritrosit reolojik özelliklerini etkilediğini göstermiştir. Deformabilitede bir değişiklik yokken böyle bir sonucun ortaya çıkmış olması, diğer hücrel faktörlerin (eritrosit yüzey yükü gibi) lökosit aktivasyonu ve oksidan stres gibi dış kaynaklı faktörlerden etkilenmiş olabileceğini düşündürmüştür.

SUMMARY

The effects of ischemia-reperfusion injury on the functional and structural properties of erythrocytes has been investigated in a rat hindlimb model. Thirtyfour female albino rats were used in the study. Ten minutes of ischemia and fifteen minutes of reperfusion periods were applied to one of the hindlimbs, while the other was accepted as control. Erythrocyte aggregation was significantly decreased in both hindlimbs compared to baseline value after the reperfusion ($p < 0.01$). No alteration was found in neither erythrocyte deformability nor thiobarbituric acid reactive substance levels. After the ischemia period, mean corpuscular volume was found to be significantly lower and mean corpuscular hemoglobin concentration was found to be significantly higher in ischemic hindlimb, compared to control. Additionally, cytoplasmic calcium concentrations were significantly higher in both hindlimbs compared to baseline value. In conclusion, this study suggested that ischemia-reperfusion phenomenon could effect primarily erythrocyte aggregation. While no alteration was found in deformability and thiobarbituric acid reactive substance levels, the inhibition of aggregation suggested that other cellular factors (ie erythrocyte surface charge) could be effected by external sources such as leukocyte activation and oxidant stress.

KAYNAKLAR

- 1)Agnillo D.F., Chang T.M.S.: Reduction of hydroxyl radical generation in a rat hindlimb model of ischemia-reperfusion injury using crosslinked hemoglobin superoxide dismutase-catalase. *Art Cells Blood subs and Immob. Biotech* 25:163-180,1997
- 2)Aktan Ö A , Yalçın S A : Ischemia-reperfusion injury. reactive oxygen metabolites and the surgeon *Turk J Med Sci* 28:1-5,1998
- 3)Ames A , Wright R.L , Kowada M , Thurtson J.M . Majino G : Cerebral ischemia; The no-reflow phenomenon *Am J Pathol* 52:437-452,1968
- 4)Başkurt O.K , Yavuzer S : Some hematological effects of oxidants In: Nriagu J.O , Simmons M , eds *Environm Oxidants Advances in environmental science and technology* NewYork-Chichester-Brisbane-Toronto-Singapore: John Willey & Sons, Inc 12:405-423,1994
- 5)Başkurt O.K , Edremitlioğlu M , Temiz A : In vitro effects of in vivo activated leukocytes on red blood cell filterability and lipid peroxidation *Clin Hemorheol* 14:591-596,1994
- 6)Başkurt O.K : Activated granulocyte induced alterations in red blood cells and protection by antioxidant enzymes *Clin Hemorheol* 16:49-56,1996
- 7)Başkurt O.K , Temiz A , Meiselman J.H : Red blood cell aggregation in experimental sepsis *J Lab Clin Med* 130:183-190 1997.
- 8)Başkurt O.K , Temiz A , Meiselman J.H : Effect of superoxide anions on red blood cell rheologic properties *Free Rad Biol and Med* 24:102-110,1998

- 9)Başkurt O K , Meiselman H J , Kayar E : Measurement of red blood cell aggregation in a "plate-plate" shearing system by analysis of light transmission. Clin Hemorheol and Microcirc 19:307-314,1998
- 10)Başkurt O K , Fisher I C , Meiselman H J : Sensitivity of the cell transit analyzer (CTA) to alterations of red blood cell deformability: Role of cell size-por size ratio and sample preparation. Clin Hemorheol 16:753-765,1996
- 11)Bekerecioğlu M , Uğraş S , Dilek O N , Tercan M , Özyazgan İ : Serbest radikaller; Temel görüşler, biyokimyası, fizyopatolojisi ve cerrahi ile ilgileri Sendrom. 85-95,1998
- 12)Beuk J R , Mirjam G A , Kurvers A J M , Bonke H , Tangelder G , Heineman E : Ischemia-reperfusion injury in rat mesenteric venules; Red blood cell velocity and leukocyte rolling J Ped Surg 31:512-515,1996
- 13)Chang T M S : Reperfusion injury Blood Subs and Oxygen Carriers New York:Marcel Dekker, Inc 1993
- 14)Chasis J A , Shohet S B : Red cell biochemical anatomy and membrane material properties Ann Rev Physiol 49:237-248,1987
- 15)Chiao J J , Kirschner R E , Fantini G A : Iron delocalization occurs during ischemia and persists on reoxygenation of skeletal muscle J Lab Clin Med 124:432-438,1994
- 16)Chien S , Sung L A : Physicochemical basis and clinical implications of red blood cell aggregation Clin Hemorheol 7:71-91,1987
- 17)Chien S : Red cell deformability and its relevance to blood flow Ann Rev Physiol 49:177-192,1987

- 18) Clark M R , Mohandas N , Feo C , Jacobs M S : Separate mechanisms of deformability loss in ATP-depleted and Ca-loaded erythrocytes J Clin Invest 67:531,1981
- 19) Cochrane C G : Mechanisms of oxidant injury of cells Molec Aspects Med 12:137-147,1991
- 20) Crinnion J.N., Homer V.S., Hatton R., Rarkin S.M., Gough M.J.: Role of neutrophil depletion and elastase inhibition in modifying skeletal muscle reperfusion injury Cardiovasc Surg 2:749-753,1994.
- 21) Crinnion J.N., Homer V S , Parkin S M , Gough M.J.: Role of neutrophil-endothelial adhesion in skeletal muscle reperfusion injury Br J Surg 83:251-254,1996.
- 22) Davies K J A , Goldberg A L : Oxygen radicals stimulate intracellular proteolysis and lipid peroxidation by independent mechanisms in erythrocyte J Biol Chem 262:8220-8226,1987
- 23) Dintenfass L : Rheology of blood in diagnostic and preventive medicine. London Butterworths: 1-259,1976
- 24) Dormandy J A , Nash G : Importance of red cell aggregation in venous pathology Clin. Hemorheol 7:119-125,1987
- 25) Dufilho M D , Garestier T M , Devynck M A : Fluorescence measurements of free calcium concentration in human erythrocytes using the calcium indicator fura 2-AM Cell Calcium 9:167-179 1988
- 26) Evans E.A., Celle P L : Intrinsic material properties of erythrocyte membrane indicated by mechanical analysis of deformation Blood 45:29-43,1975

- 27) Fantini G A , Yoshioka T : Deferoxamine prevents lipid peroxidation and attenuates reoxygenation injury in postischemic skeletal muscle. *Am J Physiol* 264:H1953-1959,1993
- 28) Fisher T M , Stohr L M , Schmid S H : The red cell as a fluid droplet: Tank tread-like motion of human erythrocyte membrane in shear flow. *Science* 202:894-896,1978
- 29) Forbes T L , Harris K A , Jamieson W G , DeRose G , Carson M , Potter R F : Leukocyte activity and tissue injury following ischemia-reperfusion in skeletal muscle. *Microvasc Res* 51: 275-287,1996
- 30) Forman B M , Virmani R , Puett D W : Mechanisms and therapy of myocardial reperfusion injury. *Circulation* 81:69-78,1990
- 31) Friederichs E , Winkler H , Tillmann W : Influence of the red blood cell calcium ion concentration on the erythrocyte aggregation in stasis. *Biochem Med. Metab Biol* 41:85-92,1989
- 32) Ganong W F : Review of Medical Physiology. In: Ganong W F , ed. California: Appleton & Lange, Inc. 17th edition. 569,1996
- 33) Gardos G : The function of calcium in the potassium permeability of human erythrocytes. *Biochim Biophys Acta* 30:653,1958
- 34) Girotti A W , Thomas J P , Jordan J E . Xanthine oxidase-catalyzed crosslinking of cell membrane proteins. *Arc Biochem Biophys* 251:639-653,1986
- 35) Goldberg A L , Boches F S : Oxidized proteins in erythrocytes are rapidly degraded by the adenosine triphosphate-dependent proteolytic system. *Science* 215:1107-1109,1982
- 36) Grace P A : Ischemia-reperfusion injury. *Br J Surg* 81:637-647,1994

- 37) Granger D N , Benoit J N ; Suzuki M , Grisham B M : Leukocyte adherence to venular endothelium during ischemia-reperfusion *Am J Physiol* 257:G683-688,1989
- 38) Granger D.N. : Role of xanthine oxidase and granulocytes in ischemia-reperfusion injury *Am J Physiol* 255:H1269-1275,1988
- 39) Granger D N , Korthius R J : Physiologic mechanisms of postischemic tissue injury *Ann Rev Physiol* 57:311-332,1995.
- 40) Halliwell B , Gutteridge J M , Cross E C : Free radicals, antioxidants, and human disease; Where are we now? *J Lab. Clin. Med.* 119:598-620,1992
- 41) Harris A G , Steinbauer M , Leiderer R , Messmer K : Role of leukocyte plugging and edema in skeletal muscle ischemia-reperfusion injury *Am J Physiol* 273:H989-996,1997
- 42) Harris A G , Skalak T.C : Effects of leukocyte-capillary plugging in skeletal muscle ischemia-reperfusion injury *Am J Physiol* 271:H2653-2660,1996
- 43) Hebbel R P , Leung A , Mohandas N : Oxidation-induced changes in microrheologic properties of the red blood cell membrane *Blood* 76:1015-1020,1990
- 44) Hernandez A.L , Grisham M B , Twohig B , Arfors K E , Harlan J M , Granger D N : Role of neutrophils in ischemia-reperfusion induced microvascular injury *Am J Physiol* 253:H699-703,1987
- 45) Hochmuth R M , Waugh R : Erythrocyte membrane elasticity and viscosity *Ann Rev Physiol* 49:209-219,1987

- 46)Homer V , Gough M.J.: Role of lipid mediators in the pathogenesis of skeletal muscle infarction and edema during reperfusion after ischemia Br J Surg 81:1500-1503,1994
- 47)Homer V , Crinnion J.N , Gough M.J.: Role of thromboxane A2 in muscle injury following ischemia Br J Surg 81:974-976,1994
- 48)Indström J P , Soussi B , Elander A , Bylund F A C : Purine metabolism after in vivo ischemia and reperfusion in rat skeletal muscle Am J Physiol 258:H1668-1673,1990
- 49)Iwahori Y , Ishiguro N , Shimizu T , Kondo S , Yabe Y , Oshima T , Iwata H , Sendo F : Selective neutrophil depletion with monoclonal antibodies attenuates ischemia-reperfusion injury in skeletal muscle J Reconstr Microsurg 14:109-116,1998
- 50)Jennings R B , Shen A.C : Calcium in experimental myocardial ischemia Recent advances in studies on cardiac structure and metabolism In: Bajusz E . Rona G , eds , University Park: Baltimore, Inc: 639-655,1972
- 51)Jerome N S , Akimitsu T , Korthuis J.R.: Leukocyte adhesion, edema and development of postischemic capillary no-reflow Am J Physiol 267:H1329-1336,1994
- 52)Kayaalp S O : Rasyonel tedavi yönünden tıbbi farmakoloji Kayaalp S O , ed Ankara Feryal, Inc 6 Baskı (2):1629-1631,1992
- 53)Kinoshita Y , Monafó W W : Nerve and muscle blood flow during hindlimb ischemia and reperfusion in rats J Neurosurg 80:1078-1084,1994

- 54)Kishi M , Tanaka H , Seiyama A , Takaoka M , Matsuoka T , Yoshioka T , Sugimoto H : Pentoxifylline attenuates reperfusion injury in skeletal muscle after partial ischemia. *Am J Physiol* 274:H1435-1442,1998
- 55)Klausner J M , Paterson S , Goldman G , Kobzik L , Rodzen C , Lawrence R , Valeri C R , Sherpo D , Hechtman H B : Postischemic renal injury is mediated by neutrophils and leukotrienes. *Am J Physiol* 256:F794-802,1989
- 56)Kondo H : Peroxynitrite induced hemolysis of human erythrocytes and its inhibition by antioxidants. *FEBS Lett* 413:236-238,1997
- 57)Korthius R J , Granger D N , Townsley M I , Taylor A E : Ischemia-reperfusion injury: Role of oxygen-derived free radicals. *Am J Physiol* 256:H217-249,1989
- 58)Kubes P , Ibbotson G , Russel J : Role of platelet activating factor in ischemia-reperfusion induced leukocyte adherence. *Am J Physiol* 259:G300-305,1990
- 59)Kupunski M A , Bock M E R , Bell R D : Skeletal muscle ischemia-reperfusion causes transitory increase in microvascular protein permeability. *Am J Physiol* 273:H303-309,1997
- 60)Kuypers F A , Scott M D , Schott M A , Lubin B , Chiu D I Y : Use of ektacytometry to determine red cell susceptibility to oxidative stress. *J Lab Clin Med* 116:535-545,1990
- 61)Lefer M A , Xin-Liang M : PMN adherence to cat ischemic-reperfused mesenteric vascular endothelium under flow: role of P-selectin. *J Appl Physiol* 76:33-38,1994
- 62)Leff J A , Kennedy D A , Terada L S , Emmett M , McCutchan H J , Walden D L , Repine J : Reperfusion of ischemic skeletal muscle causes erythrocyte hemolysis

- and decreases subsequent oxidant-mediated lung injury *J Lab Clin Med* 118:352-358,1991
- 63)Leff J A , Repine E J : Blood cells and ischemia-reperfusion injury *Blood cells* 16:183-192,1990
- 64)Lehr A H , Menger D M , Messmer K : Impact of leukocyte adhesion on myocardial ischemia-reperfusion injury; conceivable mechanisms and proven facts *J Lab Clin Med* 4:539-545,1993
- 65)Lopez L , Duck I M , Hunt W A : On the shape of the erythrocyte *Biophys J* 8:1228-1235,1968
- 66)Lowe G D O : Nature and clinical importance of blood rheology. In: Lowe G D O , ed *Clinical Blood Rheology*. CRC Press, Inc Florida Volume 1:1988
- 67)Lowe G D O , Barbanel J C : Plasma and blood viscosity In: Lowe G D O , ed *Clinical Blood Rheology* CRC Press, Inc Florida Volume 1:1-10,1988
- 68)Mary A , Bonne C , Modat G : Erythrocyte deformability in an in vitro model of hypoxia-reoxygenation protective effects of superoxide dismutase and catalase *Clin Hemorheol* 12:287-296,1992
- 69)McCord J M : Oxygen derived free radicals in postischemic tissue injury *N Eng J Med* 312:159-163,1985
- 70)McCutchan H J , Schwappach J R , Enquist E G , Walden D L , Terada L S , Reiss O K : Xanthine oxidase-derived H_2O_2 contributes to reperfusion injury of ischemic skeletal muscle *Am J Physiol* 258:H1415-1419,1990
- 71)McKenney J , Valeri C R , Mohandas N , Fortier N , Giorgio A , Synder L M : Decreased in vivo survival of hydrogen peroxide-damaged baboon red blood cells *Blood* 76:206-211,1990

- 72) Meiselman J H : Red blood cell role in rbc aggregation: 1963-1993 and beyond.
Clin Hemorheol 13:575-592, 1993
- 73) Menger D M , Pelikan S , Steiner D , Messmer K : Microvascular ischemia-reperfusion injury in striated muscle; significance of "reflow paradox" Am J Physiol 263:H1901-1906, 1992
- 74) Menger D M , Steiner D , Messmer K : Microvascular ischemia-reperfusion injury in striated muscle ; significance of "no-reflow" Am J Physiol 263:H1892-1900, 1992.
- 75) Mohandas N , Chasis J A : Red blood cell deformability, membrane material properties and shape: Regulation by transmembrane, skeletal and cytosolic proteins and lipids Semin Hematol 30:171-192, 1993
- 76) Mohandas N , Chasis J A , Shohet S B : The influence of membrane skeleton on red cell deformability, membrane material properties and shape Semin Hematol 20:225-242, 1983
- 77) Mohandas N . Shohet S B : The role of membrane associated enzymes in regulation of erythrocyte shape and deformability Clin Hematol 10:223-237, 1981
- 78) Moore T M , Khimenko P , Adkins W K , Miyasaka M , Taylor A E: Adhesion molecules contribute to ischemia and reperfusion induced injury in the isolated rat lung J Appl Physiol 78:2245-2252, 1995
- 79) Murakami J . Maeda N , Kon K , Shiga T : A contribution of calmodulin to cellular deformability of calcium-loaded human erythrocytes Biochim Biophys Acta 863:23, 1986

- 80)Natarajan V : Oxidants and signal transduction in vascular endothelium J Lab Clin Med 125:26-37,1995.
- 81)Nayler G W : The role of oxygen radicals during reperfusion J Cardiovasc Pharm.20:14-17,1992
- 82)Nolte D , Hecht R , Schmid P , Botzlar A , Menger M D , Neumueller C , Sinowatz F , Vestweber D , Messmer K : Role of Mac-1 and ICAM-1 in ischemia-reperfusion injury in a microcirculation model of BALB/C mice Am J Physiol 267:H1320-1328,1994
- 83)Nolte D , Lehr A H , Menger D M , Messmer K : Pharmacological intervention of postischemic leukocyte endothelium interaction in striated muscle Clin Hemorheol 12:83-91,1992
- 84)Opie L H , Dphil M D : Reperfusion injury and its pharmacologic modification Circulation 80:1049-1062,1989
- 85)Oredsson S , Ovarfordt P , Plate G : PMN leukocytes increase reperfusion injury in skeletal muscle. Int Angiol 14:80-88,1995
- 86)Özdem S S , Şadan G : Serbest oksijen radikallerinin oluşumu ve klinik açıdan önemi Akd Ü Tıp Fak Derg 11:63-71,1994
- 87)Özdem S S , Şadan G : Miyokardiyal iskemi-reperfüzyon zedelenmesi ve farmakolojik tedavisi Akd Ü Tıp Fak Derg 10:93-101,1993
- 88)Petrasek P F , Lindsay I F , Romaschin A D , Walker P M : Plasma activation of neutrophil CD18 after skeletal muscle ischemia; a potential mechanism for late systemic injury Am J Physiol 270:H1515-1520,1996
- 89)Petrasek P F , Homer V , Walker P M : Determinants of ischemic injury to skeletal muscle J Vasc Surg 19:623-631,1994

- 90) Rampling M.W : Red cell aggregation and yield stress In: Lowe G D O , ed
Clinical Blood Rheology CRC Press, Inc Florida Volume 1.1988
- 91) Rampling M W , Pearson M.J: Enzymatic degradation of the red blood cell
surface and its effect on rouleaux formation Clin Hemorheol 14:531-538,1994
- 92) Reilly M P , Schiller H.J , Bulkley G B : Pharmacologic approach to tissue injury
mediated by free radicals and other reactive oxygen metabolites Am J Surgery
161:488-503,1991
- 93) Reynolds J.M , Mc Donagh P F : Early in reperfusion, leukocytes alter perfused
coronary capillarity and vascular resistance Am J Physiol 256:H982-989,1989.
- 94) Rubin B B , Chang G , Liauw S , Young A , Romaschin D A , Walker M P :
Phospholipid peroxidation deacylation and remodeling in postischemic skeletal
muscle Am J Physiol 263:H1695-1702,1992.
- 95) Schmid-Schonbein H : Fluid dynamics and hemorheology in vivo: the
interactions of hemodynamic parameters and hemorheological "properties" in
determining the flow behaviour of blood in microvascular networks In: Lowe
G D O , ed Clinical Blood Rheology Florida: CRC Press, Inc 129-219:1988
- 96) Schmid-Schonbein H , Wells R E : Fluid drop-like behaviour of erythrocyte-
disturbance in pathology and its quantification. Biorheology 7:227-234.1971.
- 97) Schon S H , Wells R E : Fluid drop-like transition of erythrocyte under shear.
Science 165:288-291.1969
- 98) Seekamp A , Mulligan S M , Till O G , Smith W , Miyasaka M , Tamatani T ,
Todd F , Ward A : Role of β_2 integrins and ICAM-1 in lung injury following
ischemia-reperfusion of rat hindlimbs Am J Path 143:464-470,1993

- 99) Seekamp A, Warren S J, Remick G D, Till O G, Ward A: Requirements for TNF- α and IL-1 in limb ischemia-reperfusion injury and associated lung injury
Am J Path 143:453-463,1993
- 100) Seyama A: The role of oxygen-derived free radicals and the effect of free radicals scavengers on skeletal muscle ischemia-reperfusion injury Surgery Today 23:1060-1067,1993
- 101) Shiga T, Maeda N, Kon K: Erythrocyte rheology. Oncology/Hematology 10:9-48,1990
- 102) Shiga T, Sekiya M, Maeda N, Kon K, Okazaki M: Cell age-dependent changes in deformability and calcium accumulation of human erythrocytes Biochim Biophys Acta 814:289,1985
- 103) Shoheit S B, Card T, Clark M, Greenquist A C, Mohandas N, Shelton D, Wyatt J: The erythrocyte "cytoskeleton" and its apparent role in cellular functions In: The function of red blood cells: Erythrocyte pathophysiology New York: A R. Liss Inc 35-58,1981
- 104) Simchon S, Jan K M, Chien S: Influence of reduced red cell deformability on regional blood flow Am J Physiol 253:H898-903,1987
- 105) Siminiak T, Ozowa T: Neutrophil mediated myocardial injury Int J Biochem 25:147-156,1993
- 106) Sirsjo A, Kagedal B, Arstrand K, Lewis D H, Nylander G, Gidlof A: Altered glutathione levels in ischemic and postischemic skeletal muscle; difference between severe and moderate ischemic insult J Trauma 41:123-128,1996

- 107)Smith J K , Grisham M B , Granger D N , Korthuis J : Free radical defense mechanisms and neutrophil infiltration in postischemic skeletal muscle *Am J Physiol* 256:H789-793,1989.
- 108)Smith J K , Carden D L , Korthuis J : Role of xanthine oxidase in postischemic microvascular injury in skeletal muscle *Am J Physiol* 257:H1782-1789,1989.
- 109)Smith B D , La Celle P L , Siefring P L , Lowe K L , Lorand L : Effects of the calcium-mediated enzymatic crosslinking of membrane proteins on cellular deformability. *J Membr Biol* 61:75,1981
- 110)Stocks J , Dormandy T L : The autooxidation of human red cell lipids induced by hydrogen peroxide *Br J Hematol* 20:95-111,1971
- 111)Stoltz J F , Donner M : Hemorheology: Importance of erythrocyte aggregation *Clin Hemorheol* 7:15-23,1987
- 112)Suzuki M , Inaven W , Kvietys P R , Grisham M B , Meininger M , Schelling M E , Granger H J , Granger D N : Superoxide mediates reperfusion induced leukocyte-endothelial cell interactions *Am J Physiol* 257:H1740-1745,1989.
- 113)Synder L M , Fortier N L , Trainor J , Jacobs J : Effect of hydrogen peroxide exposure on human erythrocyte deformability, morphology, surface characteristics and spectrin-hemoglobin cross-linking *J Clin Invest* 76:1971-1977,1985
- 114)Urbaniak J R , Seaber A V , Chen L : Assesment of ischemia and reperfusion injury. *Clin Orthop and Related Res* 334:30-36.1997
- 115)Uyesaka N , Hasegawa S , Ishioka N , Ishioka R , Shio H , Schechter A N : Effects of superoxide anions on red cell deformability and membrane proteins *Biorheology* 29:217-229,1992

- 116)Watanabe H , Kobayashi A , Yamamoto T , Suzuki S , Hayashi H , Yamazaki N : Alterations of human erythrocyte membran fluidity by oxygen derived free radicals and calcium Free Rad Biol Med 9:507-514,1990
- 117)Weiss S J : The role of superoxide in the destruction of erythrocyte targets by human neutrophils J Biol Chem 255:9912-9917,1980
- 118)Wells R , Goldstone J : Rheology of the red cell and capillary blood flow In: Gabelinck H L , Litt M. eds Rheology of biological systems Springfield: Charles C. Thomas , Inc 5-11,1973
- 119)Wells R , Schmid-Schonbein H : Red cell deformation and fluidity of concentrated cell suspensions. J Appl Physiol 27:213-217,1969
- 120)Weng X , Cloutier G , Beaulieu R , Roederer O G : Influence of acute phase proteins on erythrocyte aggregation Am J Physiol 271:H2346-2352,1996
- 121)Wintrobe M.M , Lee G R , Boggs D R , Bithell I C , Foerster J , Athens J W , Lukens J N : Methemoglobin and other disorders usually accompanied by cyanosis In Clin Hematol Lea & Febiger Philadelphia 1011-1020,1981
- 122)Yassin M M , Barros D.A , Parks I G , Soong C V , Halliday M I , McCaigue M D , Erwin P J , Rowland B J : Lower limb ischemia-reperfusion injury causes endotoxaemia and endogenous antiendotoxin antibody consumption but not bacterial translocation Br J Surg 85:785-789,1998
- 123)Yokota J , Minei J P , Fantini G A , Shires I : Role of leukocytes in reperfusion injury of skeletal muscle after partial ischemia Am J Physiol 257:H1068-1075,1989
- 124)Zimmerman B J , Granger D N : Reperfusion induced leukocyte infiltration; Role of elastase Am J Physiol 259:H390-394,1990