

T.C.
YÜZÜNCÜ YIL ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**SIÇANLARDA OLUŞTURULAN KAS YARALANMASINDA
VİTAMİN C, SELENYUM VE TERAPÖTİK ULTRASON
UYGULAMASININ BİYOKİMYASAL VE HİSTOPATOLOJİK
ETKİLERİNİN ARAŞTIRILMASI**

Necati Muhammed TAT
FİZYOLOJİ ANABİLİM DALI
(TIP PROGRAMI)
YÜKSEK LİSANS TEZİ

DANIŞMANLAR

1. DANIŞMAN: Doç. Dr. Yasin TÜLÜCE
2. DANIŞMAN: Prof. Dr. Mehmet KARA

VAN – 2013

T.C.
YÜZÜNCÜ YIL ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**SIÇANLARDA OLUŞTURULAN KAS YARALANMASINDA
VİTAMİN C, SELENYUM VE TERAPÖTİK ULTRASON
UYGULAMASININ BİYOKİMYASAL VE HİSTOPATOLOJİK
ETKİLERİNİN ARAŞTIRILMASI**

Necati Muhammed TAT
FİZYOLOJİ ANABİLİM DALI
(TIP PROGRAMI)
YÜKSEK LİSANS TEZİ

Jüri Başkanı
Doç. Dr. Yasin TÜLÜCE

Üye
Yrd. Doç. Dr. Halil ÖZKOL

Üye
Yrd. Doç. Dr. Ramazan ÜSTÜN

TEZ KABUL TARİHİ
..... / / 2013

KABUL VE ONAY

Doç. Dr. Yasin TÜLÜCE danışmanlığında Necati Muhammed TAT tarafından hazırlanan “Sıçanlarda Oluşturulan Kas Yaralanmasında Vitamin C, Selenyum Ve Terapötik Ultrason Uygulamasının Biyokimyasal Ve Histopatolojik Etkilerinin Araştırılması” isimli bu çalışma tarihinde aşağıdaki jüri tarafından Fizyoloji Anabilim Dalında yüksek lisans tezi olarak kabul edilmiştir.

Başkan: Doç. Dr. Yasin TÜLÜCE

İmza:

ye: Yrd. Doç. Dr. Halil ÖZKOL

İmza:

ye: Yrd. Doç. Dr. Ramazan ÜSTÜN

İmza:

Sağlık Bilimleri Enstitüsü Yönetim Kurulu’nun .../.../2013 tarih ve 2013/.... sayılı kararı ile onaylanmıştır.

İmza

Enstitü Müdürü

TEŞEKKÜR

Bana bu araştırmayı yüksek lisans tezi olarak veren, yüksek lisans eğitimim boyunca bilgi ve tecrübelerini aktaran ve tezimin hazırlanmasında destek ve yardımlarıyla yol gösteren değerli danışman hocam Doç. Dr. Yasin TÜLÜCE'ye, yine her türlü desteğini gördüğüm kıymetli hocam Yrd. Doç. Dr. Halil ÖZKOL'a, tezimin devam etmesinde katkıları olan Fizioloji Anabilim Dalı Başkanı Prof. Dr. Mehmet KARA'ya, Fizioloji Anabilim Dalı hocalarıma, deney ve tez aşamasında emeği geçen eşim Ayşe Merve TAT'a, Yrd. Doç. Dr. Serkan YILDIRIM'a, Yrd. Doç. Dr. Cumali ÖZKAN'a, Vet. Dr. Yıldıray BAŞBUğAN'a, Ayşe ŞEKER'e, Araş. Gör. Mustafa ÖZBEK'e, istatistiksel değerlendirmeler aşamasında bana yardımcı olan Doç. Dr. Sıddık KESKİN'e, ayrıca hayatımın her anında destekçim olan başta anne-babama ve bütün aileme teşekkürü bir borç bilirim.

İÇİNDEKİLER

Kabul ve Onay	I
Teşekkür	II
İçindekiler	III
Simgeler ve Kısaltmalar	VI
Tablolar Listesi	VIII
Şekiller Listesi	IX
1. GİRİŞ	1
2. GENEL BİLGİLER	2
2.1. İskelet Kası	2
2.1.1. İskelet kası ve çevresindeki bağ dokusunun yapısı	2
2.1.2. İskelet kası hasarının mekanizması.....	5
2.1.3. Kas yaralanmalarında iyileşmenin basamakları	6
2.1.3.1. Destrüksiyon fazı	7
2.1.3.2. Tamir ve remodeling fazı	9
2.1.4. Kas hasarlarının sınıflandırılması	12
2.1.5. Kas hasarının tanısı	12
2.1.6. Kas yaralanmalarında tedavi prensipleri	13
2.2. Serbest Radikaller	15
2.2.1. Serbest radikallerin kaynakları	16
2.2.2. Serbest radikallerin etkileri	17
2.2.3. Serbest oksijen radikalleri ve reaktif oksijen türleri	19
2.2.4. Serbest radikallerle ilişkili hastalıklar.....	21
2.3. Antioksidan Savunma Sistemleri.....	22
2.3.1. Enzimatik antioksidanlar	23
2.3.2. Non-enzimatik antioksidanlar.....	25
2.4. Çalışmada Takip Ettiğimiz Belirteçler	27
2.4.1. Oksidatif stres belirteçleri (TAS, TOS, OSİ).....	27
2.4.2. Nötrofil infiltrasyon belirteci (MPO).....	28
2.4.3. Enflamasyon belirteçleri (İL-6 ve TNF- α)	28
2.5. Çalışmada Etkinliği Araştırılan Moleküller.....	29

2.5.1. C vitamini (Askorbik asit)	29
2.5.2. Selenyum	31
2.6. Terapötik Ultrason	32
2.6.1. Tanımı	32
2.6.2. Elde edilişi	32
2.6.3. Fiziksel özellikleri	33
2.6.4. Fizyolojik etkileri.....	34
2.6.5. Uygulama teknikleri	36
2.6.6. Dokular üzerindeki etkileri	39
2.6.7. Endikasyonları	41
2.6.8. Kontrendikasyonları.....	41
2.6.9. Kesikli terapötik ultrasonun kullanım alanları.....	42
2.6.10. Kesikli terapötik ultrason ile ilgili yapılmış çalışmalar	43
3. GEREÇ VE YÖNTEM	46
3.1. Gereç	46
3.2. Yöntem	46
3.2.1. Deney gruplarının oluşturulması	46
3.2.2. Kas yaralanmasının oluşturulması	47
3.2.3. Etkinliği araştırılan moleküllerin uygulanması.....	47
3.2.4. Terapötik ultrasonun uygulanması	48
3.2.5. Analizlerde kullanılan kit ve kimyasallar	48
3.2.6. Analizlerde kullanılan cihazlar ve malzemeler	49
3.2.7. Kan ve doku örneklerinin hazırlanması	49
3.3. Analizlerin Yapılması	50
3.3.1. Miyeloperoksidaz (MPO) enzim (EC 1.11.1.7) aktivitesinin tayini	50
3.3.2. Total antioksidan seviyesi (TAS) ölçüm tayini	51
3.3.3. Total oksidan seviyesi (TOS) ölçüm tayini	51
3.3.4. Oksidatif Stress İndeksi (OSİ)'nin hesaplanması	51
3.3.5. İnterlökin-6 (İL-6) sitokininin ölçüm tayini	51
3.3.6. Tümör nekroz faktör (TNF- α) sitokininin ölçüm tayini	51
3.4. Histopatolojik İncelemeler.....	52
3.5. İstatistiksel Analizler	52

4. BULGULAR	53
4.1. Serum Enzimlerinin Analiz Bulguları	53
4.2. Oksidatif Stres ve Nötrofil İnfiltrasyon Belirteçlerinin Analiz Bulguları	56
4.3. Serum Sitokinlerinin Analiz Bulguları	62
4.4. Histopatolojik Bulgular.....	63
5. TARTIŞMA VE SONUÇ	67
ÖZET	73
SUMMARY	74
KAYNAKLAR	75
ÖZGEÇMİŞ	89
EKLER.....	90

SİMGELER VE KISALTMALAR

MTJ	: Miyotendinöz bağlantı
SR	: Sarkoplazmik retikulum
ATP	: Adenozin trifosfat
ECM	: Ekstraselüler matriks
TNF- α	: Tümör nekroz faktör
FGF	: Fibroblast büyüme faktörü
IGF	: İnsulin benzeri büyüme faktörü
TGF- β	: Transforme edici büyüme faktörü
HGF	: Hepatosit büyüme faktörü
PDGF	: Platelet türevli büyüme faktörü
İL-6	: İnterlökin-6
MRI	: Manyetik rezonans görüntüleme
USG	: Ultrasonografi
BT	: Bilgisayarlı tomografi
MR	: Manyetik rezonans
CK	: Kreatin kinaz
LDH	: Laktat dehidrogenaz
AST	: Aspartat aminotransferaz
ALT	: Alanin aminotransferaz
Tn I	: Troponin I
NSAİİ	: Nonsteroid antiinflamatuvar ilaç
ROT	: Reaktif oksijen türleri
NADPH	: Nikotinamid adenin dinükleotid fosfat hidrojen
SOD	: Süperoksit dismutaz
H ₂ O ₂	: Hidrojen peroksit
MDA	: Malondialdehit
DNA	: Deoksiribonükleik asit
RNA	: Ribonükleik asit
KAT	: Katalaz
GSH-Px	: Glutatyon peroksidaz

GST	: Glutatyon-s-transferaz
GSSG-R	: Glutatyon redüktaz
GSH	: Redükte glutatyon
GSSG	: Okside glutatyon
PMNL	: Polimorfonükleer lökosit
TPU	: Kesikli terapötik ultrason
TBARS	: Tiyyabarbitürük asit reaktif maddeler
LIPUS	: Düşük yoğunlukta kesikli ultrason
DMSO	: Dimetilsülfoksit
NFKB	: Nükleer faktör kappa B
JNK	: c-Jun N-terminal kinaz
İL-8	: İnterlökin-8
VEGF	: Vasküler endotelyal büyüme faktörü
bFGF	: Temel fibroblast büyüme faktörü
i.p	: İnteraperitonal

TABLÖLAR LİSTESİ

Tablo 1. Endojen ve eksojen antioksidanlar	23
Tablo 2. MPO aktivitesinin belirlenmesinde kullanılan karışım miktarları.....	50
Tablo 3. Serum enzim sonuçlarının gruplara göre dağılımı ve istatistiksel veriler ...	53
Tablo 4. Kas dokusunda ölçülen TAS, TOS, OSİ ve MPO sonuçlarının gruplara göre dağılımı ve istatistiksel veriler	56
Tablo 5. Kan dokusunda ölçülen TAS, TOS, OSİ ve MPO sonuçlarının gruplara göre dağılımı ve istatistiksel veriler	57
Tablo 6. İL-6 ve TNF- α sitokin sonuçlarının gruplara göre dağılımı ve istatistiksel veriler	62

ŞEKİLLER LİSTESİ

Şekil 1. İskelet kasının yapısı	3
Şekil 2. İskelet kası hücresinin yapıları	5
Şekil 3. Satellit hücreyi etkileyen faktörler	10
Şekil 4. Antioksidan ve serbest radikal ilişkisi.....	16
Şekil 5. Serbest oksijen radikallerinin yol açtığı hasarlar	19
Şekil 6. Çalışmada kas yaralanması oluşturulan gastroknemius kası.....	47
Şekil 7. Sıçanın sol arka baldırına terapötik ultrason uygulanması.....	48
Şekil 8. Serum CK düzeylerinin grafiği	54
Şekil 9. Serum LDH düzeylerinin grafiği.....	54
Şekil 10. Serum ALT düzeylerinin grafiği	55
Şekil 11. Serum AST düzeylerinin grafiği	55
Şekil 12. Kas dokusu TAS sonuçlarının grafiği	58
Şekil 13. Kas dokusu TOS sonuçlarının grafiği	58
Şekil 14. Kas dokusu OSİ değerlerinin grafiği	59
Şekil 15. Kas dokusu MPO aktivitesinin grafiği	59
Şekil 16. Kan dokusu MPO aktivitesinin grafiği	60
Şekil 17. Kan dokusu TAS sonuçlarının grafiği.....	60
Şekil 18. Kan dokusu TOS sonuçlarının grafiği	61
Şekil 19. Kan dokusu OSİ değerlerinin grafiği	61
Şekil 20. Serum İL-6 sonuçlarının grafiği.....	63
Şekil 21. Serum TNF- α sonuçlarının grafiği	63
Şekil 22. K grubunda gastrokinemius kasının normal histolojik yapısı	64
Şekil 23. YK grubunda gastrokinemius kasının normal histolojik yapısı	64
Şekil 24. U grubunda gastrokinemius kasının normal histolojik yapısı	65
Şekil 25. Vit C grubunda gastrokinemius kasının normal histolojik yapısı	65
Şekil 26. S grubunda gastrokinemius kasının normal histolojik yapısı.....	66
Şekil 27. M grubunda gastrokinemius kasının normal histolojik yapısı	66

GİRİŞ

Kas yaralanmaları ya doğrudan şiddete bağlı (darbe, çarpma) ya da dolaylı olarak ani, koordineli olmayan kas hareketleri veya aşırı zorlanma koşulları nedeniyle oluşur. Kastaki iyileşme mekanizmaları ve tedavi basamakları için kabul edilmiş bir sınıflama henüz yoktur.

Kas yaralanmaları gündelik hayatta sıkça karşılaşılan yaralanmalardır. Ancak kas yaralanmaları sporcular için daha büyük bir problemdir. Kas yaralanmaları spor yaralanmalarının önemli bir kısmını oluşturmaktadır. Kas yaralanmaları günlük hayatı etkileyen, iyileşmesi uzun süren, iyileştikten sonra tekrar yaralanması riski yüksek olan, tedavisi zor ve rehabilitasyon kısmı uzun süren bir rahatsızlıktır.

Kas yaralanmalarının hem akut hem de kronik döneminde, fizik tedavi ve rehabilitasyon yapılmaktadır. Fizik tedavi ajanlarından olan terapötik ultrason bir derin ısıtıcıdır. Ancak bu çalışmada, terapötik ultrasonun kesikli modu kullanılmıştır. Terapötik kesikli ultrason (TPU), mikromasaj etkisi ile ödem giderici bir ajandır. TPU, kas dokusundaki dolaşımın artmasını ve iyileşmenin hızlanmasını sağlar (Alfredson ve ark., 2002). Yapılan bazı çalışmalarda TPU'nun kas yaralanmalarında bazı oksidatif stres parametrelerini ve serum kreatin kinaz seviyelerini düşürdüğü bildirilmiştir (Freitas ve ark., 2007). Yapılan başka çalışmalarda kas yaralanmasının oksidatif hasara neden olduğu belirtilmiştir (Freitas ve ark., 2007; Saborido ve ark., 2011). Bu literatür bilgileri ışığında ilk defa bu çalışmada, sıçanlara kas yaralanması oluşturduktan sonra tedavi amacıyla, TPU ile, antioksidan etkileri bilinen selenyum ve C vitamininin kan ve kas dokularındaki etkisinin araştırılması amaçlanmıştır.

2. GENEL BİLGİLER

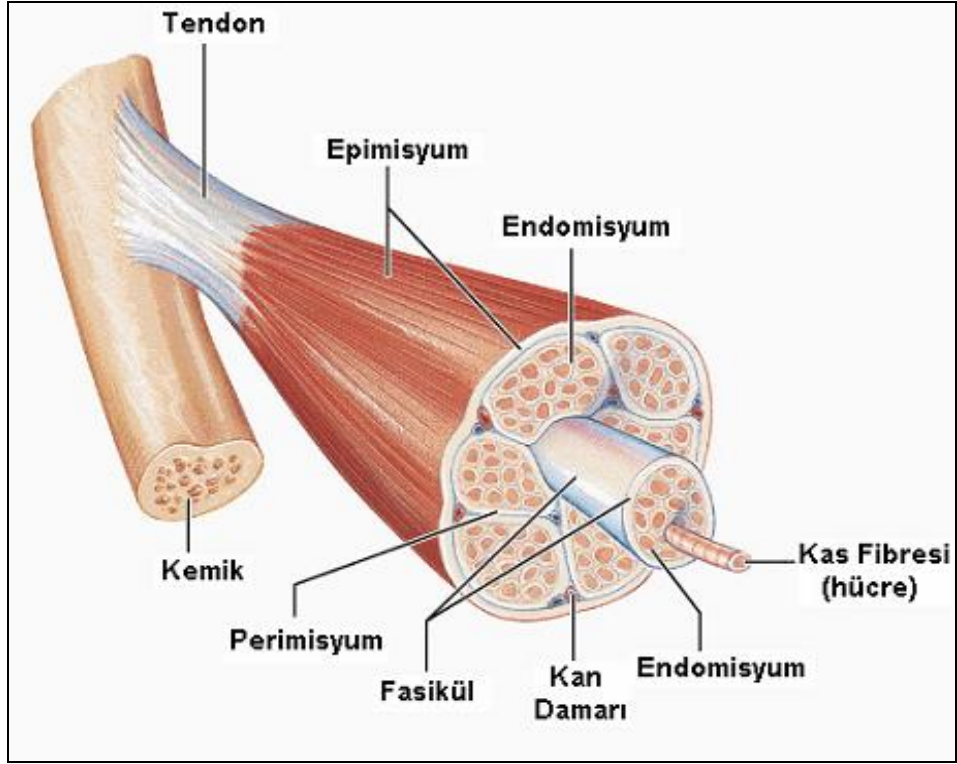
2.1. İskelet Kası

2.1.1. İskelet kası ve çevresindeki bağ dokusunun yapısı

İskelet kasları basit olarak 2 yapıdan meydana gelir. Bunlar kas lifleri ve bağ dokusudur. Kas lifleri, sinirleri ile beraber kasın kontraktıl birimini oluşturur. İskelet kası lifleri şerit benzeri hücrelerdir. Bağ dokusu ise her kas hücrelerini birbirine bağlar ve kas liflerinin beraberce eklem hareketine katılıp, lokomasyonun başarılı şekilde oluşmasını sağlar. Her kas lifi kemiğe yaklaşırken inceler ve tendonlar aracılığıyla kemiğe tutunur. Bu kas tendon bağlantı bölgesine miyotendinöz bağlantı (MTJ) denir (Tidball ve Daniel, 1986). Tendonlar kasları her iki ucundan kemiklere veya diğer kasların bağ dokusuna bağlarlar. Parlak beyaz görünümlü olan tendonlar, yuvarlak veya yassı bir yapıda olabilirler. Tendonlar, periost zarına tutunurlar veya kemik yapısı içerisine kadar ilerleyerek “Sharpey” lifleri adı verilen oluşumlar ile bağlantı kurarlar.

Her bir kas lifi 3 aşamalı olarak endomisyum, perimisyum ve epimisyum isimli bağ dokusu ile farklı aşamalarda birbirine bağlanmıştır (Takala ve Virtanen, 2000).

İskelet kasını çevreleyen bağ dokusu kılıfına ‘epimisyum’ adı verilir. Epimisyum, kasın içerisine doğru ilerleyerek kası kompartmanlara ayırır. Her kompartmanda yer alan kas demetleri ‘fasikül’ olarak adlandırılır ve bağ dokusu olan ‘perimisyum’ ile sarılıdır. Kas demetlerini oluşturan çok sayıda kas lifini çevreleyen bağ dokusuna ise ‘endomisyum’ adı verilir (Şekil 1) (Appell, 1986). Kas lifleri ve demetlerini saran bağ dokular, kas hücrelerinin kontraksiyon güçlerine dayanması için koruma ve destek sağlar. Kasları besleyen zengin kan damarı ve sinir ağı, kontraksiyonun oluşmasını sağlayan en önemli yapılardır. Kas hücreleri, kasılmak için sinir hücresinden iletim almalıdır. Çoğunlukla bir adet sinire bir adet arter ve en az bir ven eşlik eder. Sinir ve kan damarlarının dalları epimisyumu geçerek kasın içine nüfus ederler. Genellikle tek bir akson birden fazla kas lifini inerve eder. Tek bir sinir hücresi tarafından inerve edilen kas demetlerine ‘motor ünite’ denir.



Şekil 1. İskelet kasının yapısı

http://besyo.ege.edu.tr/profmuzaffercolakoglu/1_2_iskelet_Kasi_ve_KASILMA.pdf

Kas liflerinin dizilimi, kasın uzun eksenine paralel veya oblik yerleşimli olabilir. Oblik dizilimler pennat, bipennat ve daha karmaşık düzenlemeleri içerir. Liflerin bu dizilimleri kasın fonksiyonel ve kontraktıl özelliklerinin belirlenmesinde önemlidir.

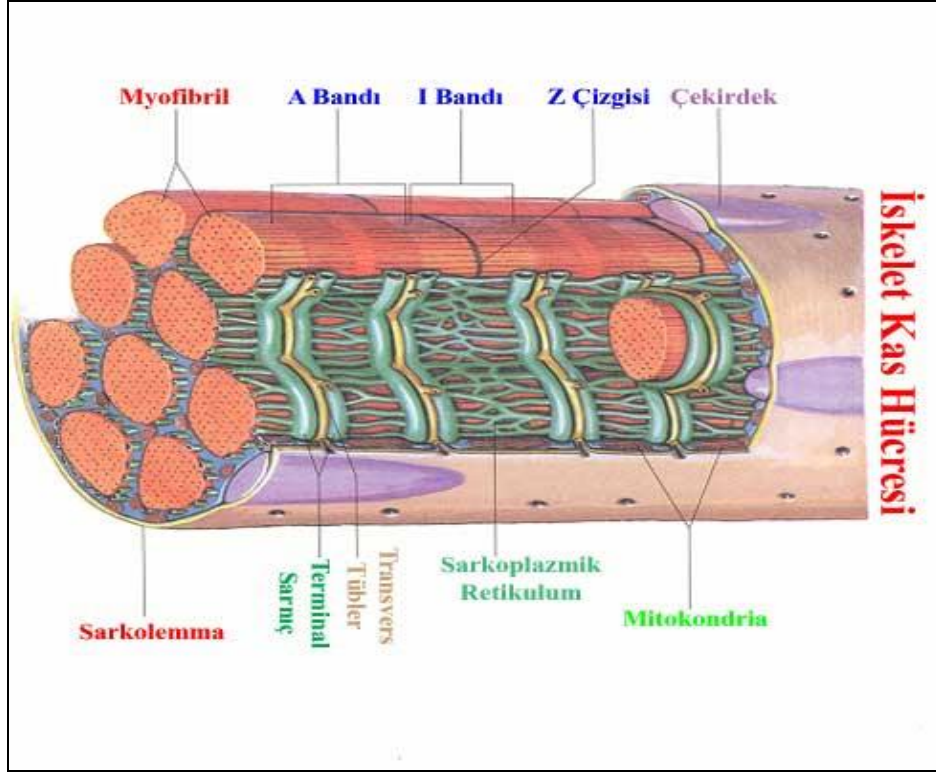
Kas hücresi farklı yapılardan meydana gelmektedir (Appell, 1986).

1) Sarkolemma: Kas lifinin hücre membranıdır. Plazma membranı da denilen hücre membranı, birçok ince kolajen fibril içeren bir polisakkarit tabakadan meydana gelir. Kas lifinin ucunda, sarkolemma'nın yüzey tabakası bir tendon lifiyle kaynaşır. Daha sonra tendon lifleri kas tendonunu oluşturmak üzere demetler halinde birleşir ve kemiğe yapışırlar.

2) Sarkoplazma: Miyofibriller kas lifinde sarkoplazma denilen intraselüler maddelerden oluşan bir matriks içinde asılıdır. Sarkoplazma sıvısı, protein yapıda enzimler, potasyum, magnezyum ve fosfat içerir.

3) Sarkoplazmik retikulum: Sarkoplazma içerisinde bulunan zengin endoplazmik retikuluma kas lifinde sarkoplazmik retikulum (SR) denir. Hızlı kasılan kas tiplerinde sarkoplazmik retikulumun özellikle yoğun olması bu yapının hızlı kas kasılmasında önemli olduğunu gösterir. SR kas kontraksiyonunda kritik bir role sahiptir. SR'nin sarkolemmanın içe doğru yaptığı kıvrımlara T-tübülleri denir. Bu tübüller hücre dışı ile doğrudan bağlantılıdır. SR terminal sisternası T-tübül yakınında yer alır ve kasılma için gerekli kalsiyumun hücre içine salınımından sorumludur. SR'nin uzun olan bölümü de kas gevşemesinin sağlanması için gerekli kalsiyum pompa proteinlerini ($\text{Ca}^{+2}\text{ATPaz}$) içerir.

4) Mitokondriler: Hücrenin enerji santralleri olarak bilinir. Mitokondriler olmadan hücre besinler ve oksijenden önemli miktarda enerji elde edemez. Sonuç olarak tüm hücresel işlevler durur. Mitokondriler tüm sitoplazma bölümlerinde bulunurlar. Ancak hücre içindeki sayıları hücrenin gereksinim duyduğu enerji miktarına göre yüz ile birkaç bin arasında değişebilir. Ayrıca mitokondriler hücrede enerji metabolizmasının yoğun olduğu bölgelerde toplanırlar. Mitokondrinin yapısında lipit çift kat proteinden oluşmuş iki zar vardır. İç membranın oluşturduğu kıvrımlarda oksidatif enzimler bulunur. Mitokondri içindeki boşluk, besinlerden enerji elde edilmesi için gerekli enzimleri içeren bir matriksle doludur. Bu enzimler iç membrana tutunmuş olan enzimlerle işbirliği halinde çalışarak besinlerin oksidasyonunu sağlar. Sonuçta su, karbondioksit ve enerji oluşur. Açığa çıkan enerji, adenosin trifosfat (ATP) adı verilen yüksek enerjili bir bileşiğin sentezlemesi için kullanılır (Guyton ve Hall, 2001).



Şekil 2. İskelet kası hücresinin yapıları

<http://www.cerezforum.com/fen-ve-teknoloji/110255-iskelet-kas-hucreesi.html>

2.1.2. İskelet kası hasarının mekanizması

Günlük hayatta çarpma ve burkulmalar sonucu yumuşak doku yaralanmaları oldukça yaygındır. Özellikle sporcular yumuşak doku yaralanmalarına sıkça maruz kalırlar. Bu yaralanmalar normal rehabilitasyon sonucu rehabilite edilebilen yaralanmalardır. Fakat sporcularda aşırı egzersizle oluşan yumuşak doku yaralanmalarında hücresel düzeyde de bir hasar meydana gelebilmektedir. Bu yaralanma türü terminolojide tam tanımlanmamıştır ancak mikro travma, mikro yaralanma ve kas hasarı terimleri yaygın olarak kullanılmaktadır (Smith ve Miles, 2000). Hasar temel olarak iki yolla açıklanmaktadır. Birincisi alışık olunmayan egzersizdir. İkincisi ise, kas iskemisinin de varlığıyla doku yaralanması sonucu bazı metabolik ve kimyasal olayların ortaya çıkmasıdır.

Kas yaralanmaları sporlarda en sık karşılaşılan yaralanmalardır ve sıklığı %10-55 arasında değişir. Kas yaralanmaları kontüzyon, strain ya da laserasyon şeklinde gerçekleşir (Jarvinen ve Lehto, 1993; Garrett, 1996). Strain, en sık görülen kas

yaralanma türüdür. Yaralanmaların %90'ını kontüzyon ve strain oluşturur. Laserasyonlar ise kas yaralanmalarının en az görülen şeklidir.

Strainlerde, kas üstüne aşırı gerim kuvveti uygulanmıştır. Bu gerim kuvveti kasın dayanabileceğinden fazla olduğunda, MTJ yakınında rüptüre neden olur. Kas strainleri sıklıkla 2 eklem arasında çalışan yüzeyel kas gruplarında, özellikle de rectus femoris, semitendinosus ve gastrokinemius kaslarında meydana gelir. (Garrett, 1996; Smith ve Miles, 2000; Karahan ve Erol, 2004). En sık kas-tendon bileşkesinde (miyotendinöz bileşke şekli %97) görülür. Kas periferinde sinyal değişiklikleri ile karakterize olan epimisyal şekil sıklığı ise %3'tür. Kontüzyon ise genellikle künt travmaya bağlı gelişir. Kasın bütünlüğü bozulmaz. İntramusküler ve interstisyel hemoraji gelişir. Kontüzyon yaralanmaları kas ani, ağır, kompresif güce maruz kaldığında meydana gelir. Bu tip kas travmaları temas sporlarında meydana gelir. Sprint ve zıplama sporlarında ise kas straini görülebilmektedir (Garrett, 1996; Crisco ve ark., 1994).

2.1.3. Kas yaralanmalarında iyileşmenin basamakları

Kas ile kemik dokunun iyileşmesi birbirinden farklıdır. İskelet kası tamir süreci ile iyileşirken, kemik rejenerasyon ile iyileşir. Vücuttaki herhangi bir doku yaralandığında çoğunlukla skar ile iyileşir, ancak bir kemik doku kırıldığında bu dokuya özgü bir iyileşme süreci başlar. Yaralanmış kas dokusunun iyileşmesi ise yaralanmanın tipine (kontüzyon, strain, laserasyon) bağlı olmaksızın belli bir şekil gösterir (Hurme ve ark., 1991). Bu iyileşme süreci 3 basamaktan oluşur;

Miyofibril rüptürü ve takip eden kas lifi nekrozu, rüptüre kas güdükleri arasında hematoma formasyonu ve enflamatuvar hücre cevabı ile karakterize *destrüksiyon fazı*,

Nekroze dokunun fagositozu, kas lifi rejenerasyonu, aynı zamanda gelişen bağ doku skarı, yaralı alanda kapiller ağ oluşumunu içeren *tamir fazı*,

Rejenere kas liflerinin maturasyonu, skar dokunun kontraksiyonu ve reorganizasyonu, kasın fonksiyonel kapasitesinin tamirinden oluşan *remodeling fazı*.

2.1.3.1. Destrüksiyon fazı

Kas rüptürü: Eksternal güçlerin kompresyonu ile iskelet kasında yaralanma ortaya çıkar. Rüptür darbe alanının yakınında ya da darbe alanında meydana gelir. Kas gerilmesinde ise yaralanma MTJ'nin yakınında kasın bittiği yerde olur. Kasılmış bir kasta, kontüzyonun neden olduğu yaralanma, gevşek bir kas dokusuna göre daha yüzeysel gerçekleşir. Hasar kemiğe yakın yerde olduğunda darbenin basıncı kas, kemik yüzeyleri ile komprese olur ve kas liflerine öyle iletilir (Hurme ve ark., 1991; Smith ve Miles, 2000; Miyake ve ark., 2001; Mc Neil, 2002).

Miyofibrillerin nekrozu: Kas yaralandığında aşırı mekanik güç, her bir kas lifi boyunca yayılır ve rüptüre kas güdüğündeki yırtılan sarkoplazmada sonlanır. Kas lifleri çok uzun ise darbenin olduğu yerde başlayan nekrozun kas lifinin tamamı boyunca ilerleme riski mevcuttur. Ancak özel bir yapı olan kontraksiyon bantları, yırtılmış plazma membranının tamirinde koruyucu bariyer görevi yapar (Hurme ve ark., 1991). Yapılan bazı çalışmalarda ise, hasarlanan plazma membranında görülen lizozomal veziküllerin geçici membran görevi yaparak plazma membranının kurtarılmasında çok önemli rol oynadığı gösterilmiştir (Miyake ve ark., 2001; Mc Neil, 2002).

Enflamasyon: Kas lifinin yaralanması sırasında, kas içindeki kan damarları da genellikle yırtılır. Bu nedenle kandaki enflamatuvar hücreler yaralanma bölgesine direk olarak ulaşır (Tidball, 1991; Toumi ve Best, 2003). Enflamasyon reaksiyonun başlangıcında, satellit hücreler ve kas liflerinin nekroze olan kısımları çeşitli maddeler salgılar. Bu maddeler enflamatuvar hücrelerin ekstravazasyonu için kemoatraktan görevi görürler (Tidball, 1995; Chazaud ve ark., 2003; Hirata ve ark., 2003). Yaralanan kas dokusunda aktive olmuş makrofaj ve fibroblastlar bulunur. İsmi geçen hücreler kemotaktik sinyaller (büyüme faktörleri, sitokinler, kemokinler) salgırlar. Ayrıca bu hücreler kendi bünyelerinde de büyüme faktörleri depolarlar. Bu depolanmış büyüme faktörleri çevredeki sağlam hücrelerce sentezlenir. Bu faktörler ekstraselüler matriks (ECM) elemanları ve proteoglikanlar yardımı ile inaktive şekilde bekletilirler. Doku hasarı başladığında bu büyüme faktörlerinin salınımı ve aktivasyonu gerçekleşir. Bu faktörler direk olarak tamir sürecini başlatırlar (Rak ve Kerbel, 1997).

Büyüme faktörleri ve sitokinler ile ilgili olarak tümör nekroz faktörün (TNF- α) yaralanmış kas dokunun iyileşmesinde direk rolü vardır. Eğer TNF- α 'nın aktivitesi inhibe olursa, iskelet kasının iyileşmesinde çok büyük yetmezlik gelişir (Wilkin ve ark., 2004). İndirekt olaraksa, fibroblast büyüme faktörü (FGF), insülin benzeri büyüme faktörü (IGF), transform edici büyüme faktörü- β (TGF- β) ailesi, hepatosit büyüme faktörü (HGF), interlökin-1 β ve interlökin-6 (İL-6), platelet türevli büyüme faktörü (PDGF) gibi büyüme faktörleri hasarlı iskelet kasında eksprese edilir. Bunların iskelet kasındaki ekspresyonu mikro travmalara yol açar. Bu durum şok travma ve eksternal gerilmeye bağlı fizyolojik durumlarda da olur (Perrone ve ark., 1995; Burkin ve Kaufman, 1999). Bu büyüme faktörlerinin çeşitli hücrelerin aktivasyonunu sağladığı bilinmektedir. Ayrıca kas dokunun rejenerasyonunda da görevlidirler. Ayrıca bu büyüme faktörleri, satellit hücre denilen kas lifi öncülü hücrelerin potansiyel aktivitörüdür. Bu hücrelerin bazıları satellit hücre proliferasyonunu uyardığı gibi, multinükleer kas lifleri içindeki mikrotübüllerin füzyonunu da sağlar (Best ve ark., 2001; Charge ve Rudnicki, 2004).

İskelet kasındaki yaralanmayı takiben, bu bölgedeki sayıca en çok olan hücreler polimorfonükleer lökosit (PMNL) hücreleridir (Hurme ve ark., 1991; Brickson ve ark., 2001; St Pierre Schneider ve ark., 2002; Brickson ve ark., 2003). Fakat ilk gün içinde bu hücreler monositlerle yer değiştirme başlar. Enflamasyonun temel prensibine göre de bu monositler makrofajlara dönüşür. Makrofajlar da nekrotik materyalin proteolizini ve fagositozunu sağlayan lizozomal enzimleri salgırlar. Böylece nekrotik materyal temizlenmiş olur (Hurme ve ark., 1991; Tidball, 1995; Best ve Hunter, 2000; Farges ve ark., 2002). Hasarlı kas liflerinin etrafını saran bazal membran silindirleri ise, makrofajların tutunmasını uyarır. Satellit hücreler ise yeni kas lifi oluşumunda iskelet görevi görür (Hurme ve ark., 1991; Grounds, 1991; Hurme ve Kalimo, 1992). Bu hücreler, çevresindeki nekrotik materyaller tarafından fagosit edilirler. Fagosit edilen bu hücreler bir yandan da, rejenere olan hücrelere dönüşümünü uyarıcı faktörlerin salınmasını sağlar (Yamaguchi ve ark., 1990; Chazaud ve ark., 2003). Kas hasarı sonucunda enflamatuvar hücrelerin kas içi invazyonu hızlı ve ardışık bir şekilde artar. Bu hücrelerin invazyonu kasın iyileşme, yenilenme ve büyüme sürecinde günler ve haftalar boyu devam edebilir. Kasın tamiri ve yenilenmesi ile enflamasyon arasındaki bu ilişkinin yararlı olabileceği gibi yaklaşımlar mevcutken bunun kas hasarını arttırdığı

ve kas gelişiminde tamamen yararlı olmadığına dair çalışmalar da mevcuttur (Yamaguchi ve ark., 1990).

Nötrofillerin de kas hasarını arttırdığı deneysel çalışmalarda gösterilmesine rağmen, kasın tamir ve yenilenme sürecindeki fonksiyonları açık bir şekilde ortaya konulmamıştır. Egzersizi takip eden 1 saat içinde nötrofillerin invazyonu başlar ve 5 gün süreyle yüksek kalabilir. Bunun yanında nötrofillerin sitolitik ve sitotoksik moleküller salgıladığı, bu yolla kasta veya diğer sağlıklı dokularda hasara neden olduğu da bildirilmiştir (Yao ve ark., 1996).

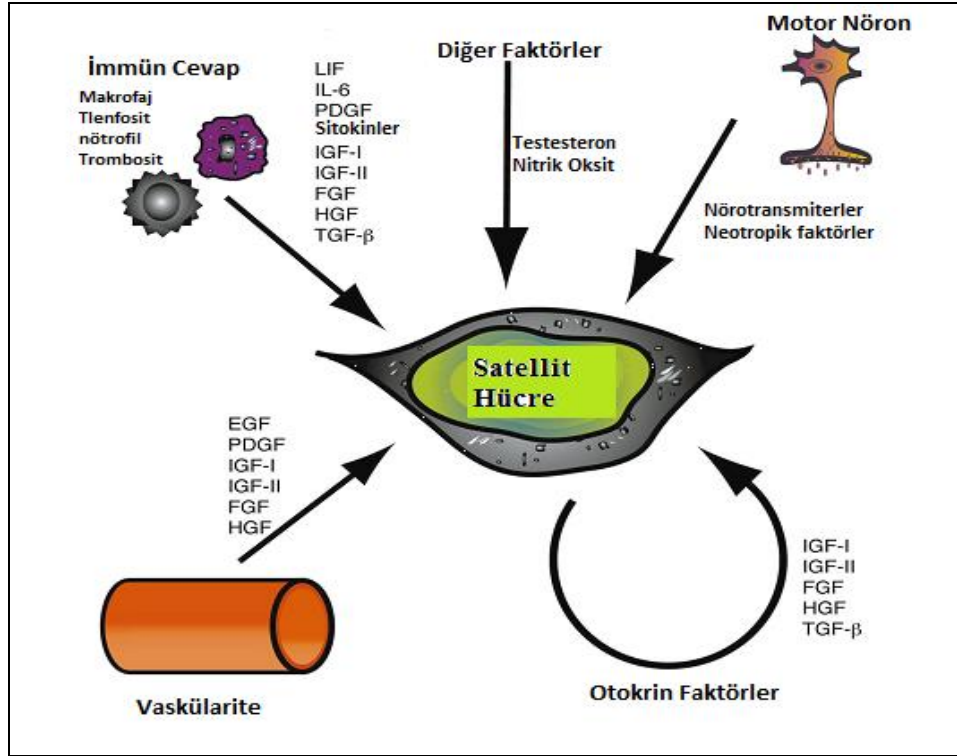
2.1.3.2. Tamir ve remodeling fazı

Destruksiyon fazı başladığında, yaralanan kasın tamiri müşterek iki süreç ile devam eder. Bu süreçler, kas liflerinin ve sinirlerin rejenerasyonu ile bağ doku skarının oluşumudur. Bu denge halindeki iki sistem kasın kontraktıl fonksiyonunu geri kazanabilmesinde çok önemlidir (Hurme ve ark., 1991).

Kas liflerinin rejenerasyonu: Kas lifleri geri dönüşümsüz postmitotik hücreler olarak sınıflandırılır. Ancak iskelet kasının rejenerasyonu intrensek bir mekanizma ile kontrol edilir. Satellit hücreler denen diferansiye olmayan öncü hücreler fetüs döneminden itibaren her bir kas lifinin bazal laminasının altında uzanır (Hurme ve Kalimo, 1992; Kalimo ve Järvinen, 1997; Rantanen, 1999). Yaralanmaya cevap olarak bu hücreler öncelikle proliferer olur, sonra miyoblastlara farklılaşır, sonunda da multinükleer miyotübleri oluşturmak üzere birleşirler. Yeni oluşturulan multinükleer miyotübler, travmanın olduğu yerdeki yaralı kas liflerinin bir kısmı ile füzyona uğrarlar. Ardından kas lifinin rejenere olan kısmı normal yapısındaki hali olan, çapraz çizgilenme ile ilk hallerine dönerler (Hurme ve Kalimo, 1992). Hafif bir gerim ile oluşan basit yaralanmalarda bile satellit hücreler acilen çoğalmaya başlar. Ancak yaralanmanın zayıf ve hızlı olması nedeniyle miyoblast dönüşümü olmadan satellit hücre aktivitesi durdurulur (Aarimaa ve ark., 2004).

Satellit hücreler bu işlevlerini yerine getirmek için sıkı bir genetik kontrole ihtiyaç duyarlar (Şekil 3) (Cannon ve St Pierre, 1998; Li ve Huard, 2002). Miyogenez sürecinde satellit hücreler, hücre döngüsünün ilerleyişinin kontrolünü, yara dokusundan

gelen sinyaller ile sağlarlar. Bu süreç, spesifik genlerin genetik programla indüklenmesi veya baskılanması şeklinde düzenlenir (Cohn ve Campbell, 2000).



Şekil 3. Satellit hücreyi etkileyen faktörler

Aydın'ın uzmanlık tezinden alınmıştır (Aydın, 2010).

Kas dokunun iyileşme kapasitesi yaşla birlikte azalmaktadır. Azalan kapasite satellit hücre sayısı ya da aktivitesindeki azalma ile ilişkili değildir. Yaşlanmış kasların rejenerasyon kapasitesinin azalması, rejenerasyonun tüm fazlarının yaşla birlikte yavaşlaması ile ilişkilendirilmiştir (Jarvinen ve ark, 1983).

Bağ dokusu skarının oluşumu: İskelet kasındaki hasardan hemen sonra, rüptüre kas lifleri arasında hematoma ile dolu bir yapı oluşur. Birinci gün, enflamatuvar hücreler hematoma fagosite edip kan hücrelerini ortadan kaldırmaya başlarlar (Hurme ve ark., 1991; Tidball, 1995; Cannon ve St Pierre, 1998). Kan kaynaklı fibrin ve fibronektin, erken granülasyon dokusunu kurmak üzere çapraz bağ yaparlar. Bu noktada, ECM, bu sürecin gerçekleştiği ve fibroblastların göç ettiği ortamı oluşturur. Granülasyon dokusundaki bu fibroblastların bir kısmı miyojenik hücrelerden oluşurlar (Li ve Huard, 2002). Ayrıca, bu yeni oluşan doku, yaralanmış kasın maruz kalacağı kuvvete ve gerime

dayanıklılığı belirler. Sonrasında fibroblastlar ECM'deki protein ve proteoglikanların tamirini üstlenir (Lehto ve ark., 1986; Hurme ve ark., 1991; Goetsch ve ark., 2003).

Kas içindeki bağ dokusu miktarı, kas belli bir süre tam olarak immobilize edilmediği sürece yeteri kadar gelişmez (Lehto ve ark., 1985a).

Bağ dokusu skarı travmanın erken döneminde hasarlı iskelet kasının en zayıf noktasında oluşmaya başlar. Bu bağ dokunun gerim gücü tip 1 kolajen sentezi arttıkça artar (Lehto ve ark., 1985a; Lehto ve ark., 1985b; Kaariainen ve ark., 1998). Travmadan yaklaşık olarak 10 gün sonra skar doku maturasyonu hasarlı kasın en zayıf kısmındaki noktaya ulaşır. Fakat nadiren de olsa, bu bağ dokusu yeterince oluşmazsa rejenere miyofibriller ile skar doku arasındaki yeni oluşturulan MTJ'lerde rüptür meydana gelebilir. Ancak kasın hasardan önceki kuvvetine ulaşabilmesi için daha uzun zamana ihtiyaç vardır. İskelet kası hasarlarının çoğunda fibröz skar dokusu olmadan iyileşme sağlanabilir. Ancak fibroblast proliferasyonu bazı yaralanmalarda çok fazla olabilir ve böylece yoğun skar doku oluşumuna neden olur. Bu durum sıklıkla büyük kas travmaları ve rüptür olgularında gelişir. Böyle durumlarda skar doku mekanik bariyer görevi yapar ancak hasar alanındaki kas rejenerasyonunu tamamen bozabilir (Jarvinen, 1975; Jarvinen, 1976; Kaariainen ve ark., 1998).

Yaralı kas dokusunun vaskülarizasyonu: Hasarlı bölgeye vasküler destek, rejenerasyonun ilk basamağıdır. Ayrıca bu vasküler destek, hasarlı dokunun morfolojik ve fonksiyonel iyileşme sürecinin başlangıcıdır. Yeni oluşan kapillerler, kan damarlarının güdüklerinden hasarlı bölgelere doğru gelişirler. Böylece hasarlı alana yeterli oksijen desteği sağlanarak, miyofibrillerin rejenerasyon için gerekli metabolik ihtiyaçları karşılanmış olur (Jarvinen, 1976; Jozsa ve ark., 1980). Genç miyotübler birkaç mitokondri ve sınırlı aerobik metabolizma kapasitesine sahip olmalarına karşın yüksek miktarda anaerobik metabolizma kapasitesine sahiptirler. Rejenerasyonun son aşamalarında, aerobik metabolizma multinükleer kas lifleri için temel enerji kaynağını oluşturur.

Miyofibrillerin ECM'ye adezyonu: Kas lifleri koptuğunda, tendon-kas-tendon ünitesinin devamlılığı rüptür kısmında bozulmuş olur. Rüptüre kas güdüklerinde kontraktıl kuvvet yolları aracılığıyla iletilememektedir. Böylece kas güdükleri

kontraksiyon sırasında itilirler. Rejenere olan kas liflerinin uçları skar dokusuna nüfuz eder ve rejenerasyon süresi boyunca yaralanan kas güdüklerinin huni şeklindeki görüntüsüne neden olur (Hurme ve ark., 1991; Hurme ve Kalimo, 1992). Rejenere olan kas lifleri, miyofibrillerin bozulmamış ve rejenere olan kısımlarında bulunan ECM'ye adezyon kuvveti uygularlar (Kaariainen ve ark., 2000; Sorokin ve ark., 2000; Allikian ve ark., 2004). Bu kas liflerinin lateral ECM'ye tutunması kas güdüklerinin hareketini kısıtlar. Böylece iyileşme tamamlanmadan hasarlı kasın tekrar rüptüre olmasını engeller (Kaariainen ve ark., 2000; Kaariainen ve ark., 2002). ECM, büyüme faktörlerinin ve sitokinlerin aktivitesini modifiye eder. Ayrıca büyüme faktörlerinin ihtiyaç halinde hızla salıverilebilmesi için rezervuar görevi görür. Böylece büyüme faktörleri parçalanmaktan korunmuş olur.

2.1.4. Kas hasarlarının sınıflandırılması

Daha önce de bahsedildiği gibi kas hasarı klinik olarak strain, kontüzyon ve laserasyon şeklinde olabilir. Kas içi kan damarları travma sonucunda torsiyone olur. Sonuçta kas arasında ve içinde hematom meydana gelir.

Kas hasarının sınıflaması ile ilgili kullanılan ortak bir sınıflandırma bulunmamakla birlikte semptomlara göre bir sınıflandırma yapılmıştır. Geçmişte yapılmış Ryan's sınıflandırması değiştirilmiş ve bugünkü haliyle kullanılmaktadır (Mishra ve ark., 2009). Bu sınıflamaya göre seviye 1'de birkaç kas lifi yırtılmıştır. Aktiviteyle ağrı ve minimal şişlik mevcuttur. Seviye 2'de orta derecede kas lifi yırtılması vardır ancak fasyanın bütünlüğü bozulmamıştır. Yara yeri palpasyonla hassas ve kas ağrılıdır. Seviye 3'te çok sayıda kas lifi yırtılmıştır ve fasyanın bütünlüğü bozulmuştur. Kas ağrılı ve palpasyonla hassastır. Kas fonksiyonu ise tamamen kaybolmuştur. Seviye 4'te ise kas lifi ve fasyanın tamamı yırtılmıştır. Kas ağrılıdır ve ekimozun palpasyonu ile defekt oluşabilir.

2.1.5. Kas hasarının tanısı

Kas hasarının tanısı travmanın oluşum mekanizmasının dikkatlice öğrenilmesi ile başlar. Tanı koyma işlemi inspeksiyon ve palpasyonu içeren fizik muayene ile devam eder. Sonrasında yaralı kasın fonksiyonlarının test edilmesi gerekir. Hematom

kasın derinlerinde yerleşik ve küçükse fark edilmesi güç olabilir. Fakat görüntüleme yöntemleri (USG, BT, MR) hasarın saptanmasında daha kesinlik sağlar (Aspelin ve ark., 1992; De Smet ve Best, 2000; Slavotinek ve ark., 2002). Kas yaralanmalarında, MR kas hasarının varlığını doğrular ve lezyonun çok iyi karakterize edilmesini sağlar. Ayrıca MR'nin USG'den daha üstün olduğu gösterilmiştir (Jarvinen ve Lehto, 1993).

Hasarın görsel ve miktarsal olarak tanımlanabildiği MRI yöntemi ve biyopsi bulgularının değerlendirildiği histokimyasal yöntemler de kas hasarının tanımlanmasında kullanılan doğrudan yöntemlerdir (Hildebrand ve ark., 1994). Ancak bu yöntemlerden biyopsi, invaziv olduğu için genellikle tercih edilmemektedir.

1999 yılına kadar yapılan kas hasar çalışmalarında kullanılan ölçüm yöntemlerinin değerlendirildiği bir çalışmada, kas hasarının değerlendirilmesinde %63 kas ağrısı, %52 kan proteinleri ve %50 maksimal istemli kasılma gücü kullanıldığı belirtilmiştir (Warren ve ark., 1999).

Kas hasarının tanısında kullanılan biyokimyasal parametrelerin en önemlisi kreatin kinaz (CK) olmasına rağmen miyogloblin, laktat dehidrogenaz (LDH) ve kas yapı proteinleri de hasarı gösterebilmektedir. Ancak LDH ve aspartat aminotransferaz (AST), duyarlılık ve özgüllüklerinin düşük olması nedeniyle fazla tercih edilmemektedir (Gibler ve ark., 1990).

Son yıllarda ise daha farklı maddeler ortaya çıkmıştır. Kalp-yağ asidi bağlayıcı protein, troponin I (TnI) ve α -aktin bunlardan bazılarıdır. α -aktin kas zedelenmelerinin saptanmasında yeni ve oldukça güvenilir bir iskelet kası belirtecidir. α -aktinin erken ölçümü kas zedelenmesi şüphesinin aydınlanmasını sağlar. Dolayısıyla etkin ve zamanında tedaviye başlanmasını ve böylece optimal sürede aktiviteye dönüşü sağlayabilir. Hızlı ve yavaş miyozin (48-72 saat), seviye 1 yaralanmalarının tanınmasında faydalıdır (Martinez ve ark., 2007; Guerrero ve ark., 2008).

2.1.6. Kas yaralanmalarında tedavi prensipleri

Yaralı kas dokusunun acil tedavisinde, istirahat, soğuk uygulama, kompresyon ve elevasyon (RICE) temel prensiptir. Bu dört uygulamadaki amaç yaralanan alanda kanamayı önlemektir. Yumuşak doku yaralanmalarında RICE'nin yararlarını araştıran

deneysel çalışmalarda bu tedavinin faydalı olduğu gösterilmiştir (Guerrero ve ark., 2008).

Erken mobilizasyon yaralı alana daha hızlı ve yoğun damar desteğinin kurulmasını sağlar. Ayrıca erken mobilizasyonla, rejenere olan kas liflerinin paralel organizasyonu daha iyi olmaktadır. Ancak, hasarlı kasın mobilizasyonunun en uygun şekli tam olarak açıklanmamıştır. Yapılan bazı deneysel çalışmalarda, akut dönemde yapılan aktif mobilizasyonun daha geniş bağ doku skarına yol açtığı gösterilmiştir. Buna bağlı olarak kasın kompresyonunun bozulduğu da ileri sürülmüştür (Jarvinen, 1975). Ayrıca akut dönem aktif mobilizasyonu tekrarlayan rüptür yaralanmalarına neden olmaktadır. Akut dönemde yapılan immobilizasyon ile, yeni oluşan granülasyon dokusunun, kas kontraksiyonları sonucu meydana gelen gerim kuvvetine dayanıklılığı artmaktadır (Jarvinen, 1975; Jarvinen, 1976; Lehto ve ark., 1985a; Jarvinen ve Lehto, 1993). Ancak immobilizasyona akut faz (ilk birkaç gün) döneminden sonra da devam edilirse kas iyileşmesindeki remodeling fazın olumsuz yönde etkileneceği bildirilmiştir (Jarvinen, 1975).

Yaralanma semptomları travmadan 3 ile 5 gün sonra yok olduğunda, doku hasarının tekrar değerlendirilip kas içi kanamaya ve aşırı doku hasarına karşı dikkatli olunmalıdır. Böylece cerrahi müdahalenin gerekebileceği durumlar atlanmamış olacaktır. Görüntüleme yöntemleri (USG, MR) bu durumlarda oldukça yol göstericidir (Takala ve Virtanen, 2000). Ayrıca, fluktuasyon mevcutsa hasar alanına aspirasyon uygulaması gerekli olabilir.

İyileşmenin erken fazında farklı nonsteroid antiinflatuvar ilaç (NSAİİ) kullanımının enflatuvar hücre reaksiyonunu azalttığı bulunmuştur. Buna karşın NSAİİ'nin iyileşme sürecine, gerim kuvvetine, hasarlı kasın kontraksiyon yeteneğine yan etkisinin olmadığı gösterilmiştir (Jarvinen ve ark., 1992; Obremsky ve ark., 1994). Ayrıca NSAİİ'ler aktive olmuş satellit hücrelerin ve miyotblerin proliferasyon yeteneğini bozmamaktadır (Thorsson ve ark., 1998). Ancak NSAİİ'ler kas yaralanmalarında kas iyileşmesinin erken fazında kullanılmalıdır. Çünkü uzun dönem kullanımlarında iskelet kasının rejenerasyonuna zarar vermektedir (Mirsha ve ark., 1995).

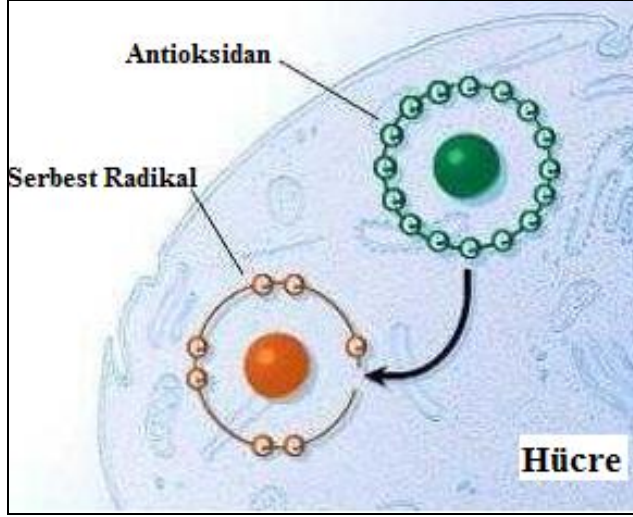
Kas yaralanmalarının tedavisinde, genellikle akut dönem geçtikten sonra çeşitli fizik tedavi modaliteleri kullanılmaktadır. Bunlardan terapötik ultrason sürekli moduyla derin ısıtıcı etkisi için kesikli moduyla ise ödem giderici, enflamasyonu azaltıcı ve mikromasaj etkileri için kullanılmaktadır. Günümüzde spor hekimliğinde ve yumuşak doku yaralanmalarında ultrason uygulaması çok popülerdir. Avrupa, Japonya ve ABD’de, ultrason tedavisi sporcularda kas hasarı tedavisinde rutin olarak uygulanmaktadır (Warden, 2003).

Yapılan bazı çalışmalarda, kas hasarı oluştuğunda oksidatif hasarın meydana geldiği gösterilmiştir (Freitas ve ark., 2007; Saborido ve ark., 2011). Bu literatür bilgisine dayanarak kas yaralanmalarının tedavisinde antioksidan suplementasyonunun da tedaviye yardımcı olacağı düşünülebilir.

2.2. Serbest Radikaller

Serbest radikaller, bir veya daha fazla ortaklanmamış elektron ihtiva eden atom veya moleküllerdir. Çevrelerindeki atom ve moleküllere adeta saldırırlar. Çok kısa ömürlüdürler. Ancak, radikal olmayan maddeler ile reaksiyona girip onları da radikal yapmaları ve bir dizi zincir reaksiyonu başlatıp, birçok radikal oluşturmalarından dolayı oldukça tehlikelidirler. Başka moleküller ile kolayca elektron alışverişine giren bu moleküllere "oksidan moleküller" veya "reaktif oksijen türleri (ROT)" denmektedir (Halliwell ve Gutteridge, 1992; Akkuş, 1995). Biyolojik sistemlerdeki en önemli serbest radikaller, oksijenden oluşan radikallerdir. Oksijen, metabolizmada en son suya indirgenirken, kısmi olarak indirgenmesi ile de çok sayıda reaktif oksijen türleri oluşmaktadır. Oksidasyona neden olan serbest radikaller arasında süperoksit anyonlar (O_2^-), hidrojen peroksit (H_2O_2), hidroksil radikali ($OH\cdot$), hipoklorik asit, kloroaminler, azot dioksit, ozon ve lipid peroksitler sayılabilir (Akkuş, 1995).

Hidrojen peroksit membranlardan kolaylıkla geçip hücreler üzerinde bazı fizyolojik rollere sahip olabilir ancak çiftlenmemiş elektrona sahip olmadığından radikal olarak adlandırılmaz. Bu nedenle ROT, süperoksit gibi radikaller, ayrıca hidrojen peroksit gibi radikal olmayanlar için ortak olarak kullanılan bir terimdir (Mc Cord, 1993).



Şekil 4. Antioksidan ve serbest radikal ilişkisi
<http://naturesofscandinaviaa.blogcu.com/antioksidan-nedir/11136198>

2.2.1. Serbest radikallerin kaynakları

Serbest radikaller başlıca 3 yolla oluşurlar;

1. Kovalent bağların homolitik kırılması
2. Normal bir molekülün elektron kaybetmesi
3. Normal bir moleküle elektron transferi (Southorn ve Powis, 1988; Cheeseman ve Slater, 1993).

Serbest radikaller normal hücrel metabolizma ürünleri olarak üretilebildiği gibi birçok dış kaynağın etkisi ile de oluşabilir. Serbest oksijen radikallerinin kaynakları, endojen ve ekzojen olmak üzere iki başlık altında toplanır:

A) Eksojen kaynaklar

- Antineoplastik ajanlar (Nitrofurantoin, bleomisin, doxorubicine gibi)
- Radyasyon
- Alkol ve uyuşturucu maddeler
- Stres
- Güneş ışığı
- Isı şoku

- Çevresel ajanlar (Hava kirliliği yapan fotokimyasal maddeler olan hiperoksi, pestisitler, sigara dumanı, solventler; anestezikler, aromatik hidrokarbonlar gibi) (Ceyhan ve ark., 1996).

B) Endojen kaynaklar

- Küçük moleküllerin otooksidasyonu sonucu oluşan rektif metabolik ürünler (Tioller, katekolaminler, hidrokinonlar, flavinler, tetrahidroproteinler, antibiyotikler gibi)
- Enzimler ve proteinler (Ksantin oksidaz, triptofan dioksijenaz, hemoglobin gibi)
- Mitokondrial elektron transport sistemi
- Endoplazmik retikulum ve nükleer membran elektron transport sistemleri
- Peroksizomlar (Oksidazlar, flavoproteinler)
- Plazma membranı (Lipoksijenaz, prostoglandin sentetaz, fagositlerde NADPH oksidaz, lipid peroksidasyonu)
- Oksidatif stres yapıcı durumlar (İskemi, travma, intoksikasyon gibi)
- Yaşlanma
- Fagositik hücrelerin aktive olması sonucu ortaya çıkan solunumsal patlama (Ceyhan ve ark., 1996).

2.2.2. Serbest radikallerin etkileri

Serbest radikal mekanizmalarının, mitokondrial oksidasyon, hemoglobin tarafından oksijen transportu ve sitokrom P450 aktivitesi gibi birçok fizyolojik reaksiyonlarda temel rol oynadığı düşünülmektedir. Ayrıca prostaglandinlerin sentezi sırasında açığa çıkan bir serbest radikal ara ürünü, prostaglandinlerin akışını ve dolayısıyla enflamatuvar süreci düzenlemektedir. Savunma sisteminin koruyucu etkisini aşacak şekilde fazla oluşmaları halinde, bazı zararlı etkiler meydana gelebilmektedir. Oldukça reaktif olduklarından potansiyel olarak toksik, mutajenik ve karsinojeniktirler (Morrow ve ark., 1991; Mc Cord, 1993). Serbest radikallerin etkileri genel olarak aşağıdaki gibi sınıflandırılabilir:

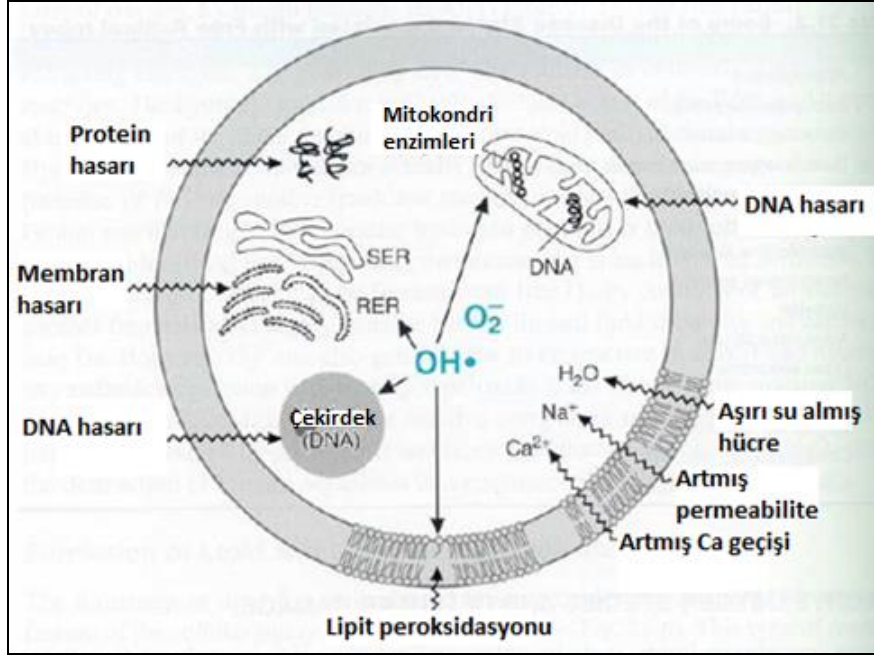
A) Lipid peroksidasyonu: Serbest radikallerin hücrede başlattığı en önemli ve zararlı etki lipid peroksidasyonudur. Çoklu doymamış yağ asitlerinin serbest radikaller ile oksidasyonu lipid peroksidasyonu olarak tanımlanır. Lipid peroksidasyonu biyolojik

membranlarda akıcılığın kaybına, membran potansiyelinde azalmaya, hidrojen ve diğer iyonlara karşı geçirgenliğin artışı sonucu hücrenin hasarına böylece hücre içeriğinin serbestleşmesine neden olur. Lipid peroksidasyonunun son ürünlerinden biri olan malondialdehit (MDA), membran bileşenlerinin polimerizasyonuna ve çapraz bağ yapmalarına yol açar. Bu da, hücre yüzeyinin durumunu, enzim aktivitesini ve iyon transportunu etkileyebilir (Girotti, 2000; Ertan ve ark., 2001).

B) Protein oksidasyonu: Serbest radikaller ile oluşan protein oksidasyonunun sonucu olarak metionin sülfokside, histidin oksihistidine veya asparagine, tirozin ditirozine ve sistein disüflitlere dönüşür. Böylece proteinlerin bağlanma özelliklerinde ve enzim aktivitelerinde farklılaşmaya neden olarak hücre fonksiyonlarında bozulmalara yol açabilir (Girotti, 2000; Ertan ve ark., 2001).

C) Karbohidratlar üzerindeki etkileri: Fizyolojik pH ve ısıda, glukoz gibi monosakkaridlerin otooksidasyonu sonucu H_2O_2 , peroksitler ve okzoaldehidler meydana gelir. Oluşan okzoaldehidler, DNA, RNA ve proteinlere bağlanabilme ve aralarında çapraz bağlar oluşturma özelliklerinden dolayı antimitotik etki gösterirler. Böylece kanser ve yaşlanma olaylarında rol oynarlar (Akkuş, 1995).

D) Nükleik asitler ve DNA'ya etkileri: Radyasyonla oluşan serbest radikaller, DNA'yı etkileyerek mutasyona neden olur ve hücre ölümüne yol açarlar. Bu zararlı etki nükleik asit baz modifikasyonlarından oluşan kromozom değişikliklerine veya DNA'daki diğer bozukluklara bağlıdır. Hidroksil radikali, bazlarla kolayca reaksiyona girer. Hidrojenperoksit ise membranlardan kolayca geçip hücre çekirdeğindeki DNA'ya ulaşır ve hücre fonksiyonlarının bozulmasına hatta ölümüne yol açar (Agrawal ve ark., 2001).



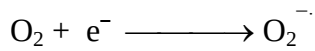
Şekil 5. Serbest oksijen radikallerinin yol açtığı hasarlar

<http://tr.pdfsb.com/readonline/5a315a4b6651352f586e5a2b4448566b55513d3d-4433607>

2.2.3. Serbest oksijen radikalleri ve reaktif oksijen türleri

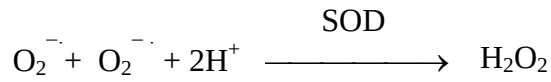
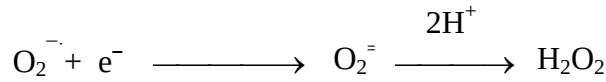
Düşük seviyelerdeki ROT, pek çok biyokimyasal süreçte kaçınılmazdır. Bu süreçler arasında, hücrede farklılaşmayı, hücre içi mesajlamayı, hücrenin gelişmesi ya da büyümesinin durdurulmasını, hücre ölümünü, bağışıklığı ve mikroorganizmalara karşı savunmayı sayabiliriz. Aksine yüksek dozlarda ROT ve/veya ROT'un yeterince uzaklaştırılamaması oksidatif stres ile sonuçlanır. Bu durum da ciddi metabolik bozukluklara ve biyolojik makromolekül hasarlarına neden olabilir (Matés ve ark., 1999). Başlıca reaktif oksijen türleri şunlardır:

A) Süperoksit radikali ($O_2^{\cdot-}$): Hemen tüm aerobik hücrelerde oksijenin bir elektron alarak indirgenmesi sonucu, serbest süperoksit radikal anyonu ($O_2^{\cdot-}$) meydana gelir.

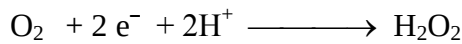
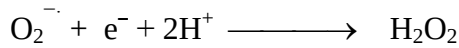


Hem çevresel etkenler, hem de organizmalardaki enzimatik ve enzimatik olmayan tepkimelerle en çok ve en kolay oluşan oksijen radikali süperoksit radikalidir.

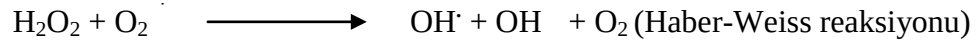
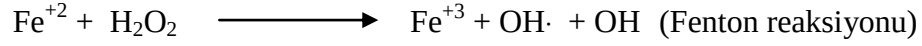
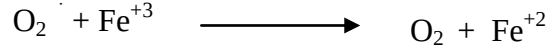
Bu molekül bir serbest radikal olarak bilinmesine rağmen, biyolojik dokularda fazla hasar oluşturmaz. Hidrojen peroksidin kaynağı olması ve geçiş metalleri iyonlarının indirgeyicisi olması bakımından önemlidir (Greenwald, 1991). Hücresel ortamlarda üretilen süperoksit, indirgeyici ya da oksitleyici olarak davranabilir. Aldığı elektronu metal iyonuna, sitokrom C'ye veya bir radikale verirse tekrar oksijene oksitlenir. Süperoksit anyonu bir elektron daha alırsa peroksit anyonuna indirgenir. Aerobik canlılarda süperoksitlerin H_2O_2 'ye çevrilmesi katalitik aktivitesi çok yüksek bir enzim olan süperoksit dismutaz (SOD) tarafından katalizlenmektedir. Süperoksit, özellikle hafif asidik ortamlarda SOD olmadan da kendiliğinden dismutasyonla da H_2O_2 'ye dönüşebilir (Kılınç, 1989).



B) Hidrojen peroksit radikali (H_2O_2): Oksijenin enzimatik olarak iki elektronla indirgenmesi ya da süperoksitin bir elektron alması sonucu peroksit molekülü oluşur. Peroksit molekülü, 2 hidrojen atomu ile birleşerek hidrojen peroksidi (H_2O_2) meydana getirir. Hidrojen peroksit normal olarak her aerobik hücrede bulunur. Bu radikal, hücre solunumu sırasındaki çeşitli metabolik işlemler ve oksidatif stres sonucunda üretilir (Gutteridge, 1991).



Hidrojen peroksit bir serbest radikal olmadığı halde ROT kapsamına girer. Çünkü hidrojen peroksit, Fe^{+2} veya diğer geçiş metallerinin varlığında Fenton reaksiyonu ve süperoksit radikalinin ($O_2^{\cdot -}$) varlığında Haber-Weiss reaksiyonu sonucu, en reaktif ve zarar verici serbest oksijen radikali olan hidroksil radikali ($OH^{\cdot}$) oluşturur. H_2O_2 'nin ortamdan uzaklaştırılmasını, antioksidan enzimlerden olan katalaz ve peroksidaz sağlar (Cheeseman ve Slater, 1993).



C) Hidroksil radikali (OH[·]): Hidroksil radikali (OH[·]), Fenton reaksiyonu ve Haber-Weiss reaksiyonu sonucu hidrojen peroksitten oluşmaktadır. Ayrıca suyun yüksek enerjili iyonize edici radyasyona maruz kalması sonucunda da oluşur (Bishop ve Janet, 1996). Hücre nükleusundaki membran bariyerleri kolayca geçmesi ve mutajenik olarak DNA'yı etkilemesinden dolayı en güçlü radikaldir. Hidroksil radikalleri birikerek membran bütünlüğünü bozar ve hücrenin kollabe olmasına neden olur. Hidroperoksitlerden son ürün olarak toksik ve reaktif olan aldehytler de oluşabilir. Bunlardan en önemlilerden biri de MDA'dır (Akkuş, 1995; Uysal, 1998).

D) Singlet (tekli) oksijen (¹O₂): Singlet oksijenin ortaklanmamış elektronu yoktur, bu nedenle radikal değildir. Ancak reaktivitesi çok yüksektir. Vücutta, pigmentlerin oksijenli ortamda ışığı absorplamasıyla, hidroperoksitlerin metal varlığındaki yıkım tepkimelerinde ya da kendiliğinden dismutasyon tepkimeleri sırasında oluşabilir (Akkuş, 1995).

E) Nitrik oksit: Fazla miktarlarda nitrik oksit, direkt olarak lipid peroksidasyonuna neden olur. Nitrik oksit, moleküler oksijenle reaksiyona girerek nitrojen dioksiti, nitrojen dioksit ise hidrojen peroksit ile reaksiyona girerek süperoksit radikalini meydana getirir (Barbor ve Harris, 1994).

2.2.4. Serbest radikallere ilişkili hastalıklar

Oksidatif stres, reaktif oksidan oluşumu ve antioksidan savunma arasındaki dengenin oksidanlar yönünde bozulması olarak açıklanabilir. Serbest radikaller pek çok hastalık sürecinde önemli rol oynarlar. Bunların en önemlisi kanserdir. Birçok doku ve organ kanserinde serbest radikallerin etkileri kanıtlanmıştır. Bunun yanı sıra, alzheimer, parkinson, huntingtons hastalıkları ve multiple skleroz gibi nörodejeneratif hastalıkların; romatoid artrit, glomerulonefrit gibi immun sistem hastalıklarının; ateroskleroz, iskemi

gibi dolaşım sistemi hastalıklarının; gastrointestinal sistem, yangı ve hastalıklarının, down sendromu ve diyabet gibi genetik ve metabolik hastalıkların; nefrit ve hepatit gibi organ hastalıklarının; katarakt, glokom gibi oftalmik problemlerin; pnömoni, astım, hipoksi gibi akciğer hastalıklarının serbest radikallerle bağlantılı olduğu tespit edilmiştir (Ono ve ark., 1991; Aruoma, 1998; Matés, 1999; Ediz ve ark., 2011; Özkol ve ark., 2012; Tülüce ve ark., 2012; Özkol ve ark., 2013). Ayrıca kas hastalıklarında (Terrill ve ark., 2013) ve bu tez çalışmasında deneysel olarak oluşturulan kas yaralanmalarında (Freitas ve ark., 2007; Saborido ve ark., 2011) da serbest radikallerin arttığı gösterilmiştir.

2.3. Antioksidan Savunma Sistemleri

ROT oluşumunu ve bunların meydana getirdiği hasarı önlemek için vücutta birçok savunma mekanizmaları gelişmiştir. Bunlar “antioksidan savunma sistemleri” veya kısaca “antioksidanlar” olarak bilinirler. Antioksidan etki tipleri dört başlık altında toplanabilir (Akkuş, 1995; Sözman, 1997).

Bunlar:

1-Toplayıcı etki (Serbest oksijen radikallerini etkileyerek onları tutma veya çok daha zayıf yeni bir moleküle çevirme işlemi)

2-Baskılayıcı etki (Serbest oksijen radikalleriyle etkileşip onlara bir hidrojen aktararak aktivitelerini azaltma veya inaktif şekle dönüştürme işlemi)

3-Zincir kırıcı etki (Serbest oksijen radikallerini kendilerine bağlayarak reaksiyon zincirini kıran etki)

4-Onarıcı etki (Tamir fonksiyonu) olarak sayılır.

Antioksidanlar, endojen ve ekzojen kaynaklı olarak başlıca iki ana grupta sınıflandırılır. Bunlar Tablo 1’de özetlenmiştir (Reilly ve ark., 1991; Akkuş, 1995; Bekerecioğlu ve ark., 1998).

Tablo 1. Endojen ve eksojen antioksidanlar

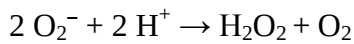
Eksojen Antioksidanlar	Endojen Antioksidanlar
1) Ksantin oksidaz inhibitörleri: Allopurinol, Folik asit, Pterin aldehid 2) NADPH oksidaz inhibitörleri: Lokal anestezikler, Kalsiyum kanal blokerleri, Adenozin, NSAİİ 3) Demir redoks döngüsünün inhibitörleri Desferroksamin, Sellüloplazmin 4) Glutasyon peroksidaz aktivitesini artıranlar: Glutasyon, Melatonin, N-Asetil Sistein 5) Non enzimatik serbest radikal toplayıcılar: Mannitol, Lazoroidler, Dimetil-tiyoüre	1) Enzimatik olanlar: Süperoksitdismutaz (SOD) Katalaz (CAT) Glutasyon peroksidaz (GSH-Px) Glutasyon-S-Transferazlar (GST) Mitokondriyal sitokrom oksidaz 2) Nonenzimatik olanlar: α -tokoferol, Ferritin, β -karoten, Bilirubin Askorbik asit, Glutasyon, Melatonin, Sistein Seruloplazmin, Metiyonin, Transferrin Ürat, Miyogloblin, Laktoferrin Hemoglobin, Albumin

Antioksidan savunma enzimatik veya nonenzimatik olarak gerçekleşebilir.

2.3.1. Enzimatik antioksidanlar

İlk ve temel antioksidan savunma, enzimatik olarak yapılmaktadır. Bunlardan en önemli olan intraselüler enzimler aşağıdaki gibi belirtilmiştir:

A) Süperoksit dismutaz (SOD): Aslında tek bir enzim değil, bir enzim grubudur. Süperoksit radikallerinin hidrojen peroksite dismutasyonunu katalizlemektedir. Bu enzim grubunun katalizlediği reaksiyon aşağıda gösterilmiştir:



Yapısında metal bulunmasından dolayı metalloenzim grubundan sayılmaktadır. Bu enzimin insanda var olan iki farklı tipi olan Cu-Zn SOD ve Mn-SOD ilk defa McCord ve Fridowich tarafından 1969 yılında ortaya çıkarılmıştır (Mc Cord ve Fridowich, 1969).

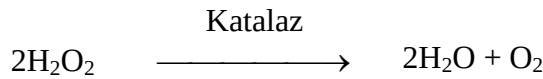
SOD aktivitesi, yüksek oksijen kullanımı olan dokularda özellikle eritrositlerde fazladır. SOD, fagosite edilmiş bakterilerin intraselüler ortamda öldürülmesinde de rol

oyunar. Bu sebepten SOD granülosit fonksiyonu için çok önemlidir. Lenfositlerde de fazla miktarda SOD bulunmaktadır (Akkuş, 1995).

B) Katalaz (KAT): KAT, tüm hücre tiplerinde değişik konsantrasyonlarda bulunan, dört tane hem grubu içeren bir hemoproteindir. Eritrositler yüksek oranda katalaz içermekte olup, katalaz aktivitesinin % 98'inden fazlasını sağlar (Akkuş, 1995).

KAT enzim aktivitesinin en yüksek olduğu dokular, karaciğer ve böbrek dokuları, en düşük seviyede olduğu dokular ise destek dokularıdır. Bu enzim dokularda başlıca mitokondri ve peroksizom partiküllerine bağlı olarak bulunur. Ancak KAT, endoplazmik retikulumda ve sitoplazmada da aktivite göstermektedir. Ayrıca KAT, ortamda oluşan hidrojen peroksiti direkt olarak suya dönüştürür. Ortamdaki H_2O_2 konsantrasyonunun düşük olduğu hallerde, hidrojen peroksiti substrat olarak kullanan diğer antioksidan enzimler (glutasyon peroksidaz gibi) devreye girerek hidrojen peroksiti ortamdan uzaklaştırırlar. KAT enzimi peroksizomlarda daha etkin iken, GSH-Px enzimi başlıca sitozol ve mitokondride daha etkindir.

KAT enziminin katalizlediği reaksiyon şu şekildedir;



Katalazın indirgeyici aktivitesi, hidrojen peroksit ve metil, etil hidroperoksitleri gibi küçük moleküllere karşıdır. KAT, büyük moleküllü lipid hidroperoksitlerine ise etki etmez (Agar ve ark., 1986; Akkuş, 1995).

C) Glutasyon peroksidaz (GSH-Px): Yapısında selenyum bulundurduğu için metalloenzim grubunda değerlendirilir. Sitozol ve mitokondride bulunabilir. Enzim aktivitesi, NADPH'a bağımlıdır. Düşük konsantrasyonlardaki H_2O_2 , öncelikle glutasyon peroksidaz tarafından temizlenir. Bu enzim, redükte glutasyonun okside glutatyona çevrildiği invitro ortamda gerçekleşen reaksiyonda, hidrojen peroksidi yüksek spesifite ile kullanarak onu detoksifiye etmektedir (Akkuş, 1995).

Reaksiyon şu şekildedir;

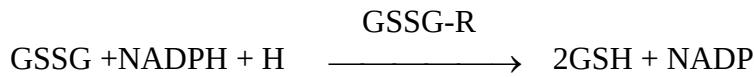


(GSH=Redükte glutatyon, GSSG=Okside glutatyon, GSH-Px=Glutatyon peroksidaz)

GSH-Px'in fagositik hücrelerde önemli fonksiyonları vardır. GSH-Px, solunum patlaması sırasında serbest radikal peroksidasyonu sonucu fagositik hücrelerin zarar görmelerini engeller. Eritrositlerde de GSH-Px oksidan strese karşı en etkili antioksidandır. GSH-Px aktivitesindeki azalma, hidrojen peroksidin artmasına ve şiddetli hücre hasarına yol açar (Halliwell ve Gutteridge, 1992).

D) Glutatyon s-transferaz (GST): GST'ler, glutatyonun (GSH) konjugasyonundan sorumlu fonksiyonel enzimler olarak bilinirler. Bu enzim elektrofilik substratlarla glutatyonun konjugasyonunu katalizleyen detoksifiye edici bir izoenzimdir (Hayes ve Strange, 1995). GST'ler glutatyon içerisinde bazı grupların yer değiştirmesi, yeni grupların eklenmesi ve çıkarılması gibi birçok olayı yürütmektedir (Hollingworth ve Dong, 2008). GST, ksenobiyotik ve karsinojenlere karşı hücrel savunmada yer alır. GST, indirgenmiş GSH'ı konjugasyon yoluyla daha fazla çözünebilir ve daha kolay ayrıştırılabilir bileşiklere dönüştüren, intraselüler bir protein ailesidir (Mantle ve ark., 1990; Mannervik ve ark., 1992; Hayes ve Pulford, 1995).

E) Glutatyon redüktaz (GSSG-R): Okside haldeki glutatyonun, indirgenmiş glutatyonla dönüşümünü katalizler. Redükte glutatyon, antioksidan enzimler tarafından kullanılmaktadır (Akkuş, 1995).



2.3.2. Non-enzimatik antioksidanlar

Non-enzimatik antioksidanlardan endojen olanlar, glutatyon, sistein, melatonin, seruloplazmin, transferrin, miyogloblin, hemoglobin, ferritin, bilirubin, metiyonin, urat, laktoferrin, albümin; ekzojen olanlar ise vitaminler, a-tokoferol (vitamin E), β-karoten-retinol (vitamin A), askorbik asit (vitamin C), folik asit (folat), mineral olanlar ise

selenyum, bakır, çinko, polifenoller, flavonoidler olarak sayılabilir (Misso ve ark., 2005).

Redükte glutatyon (GSH), glutamat, sistein ve glisin içeren bir tripeptid antioksidandır. GSH, peroksidaz reaksiyonu için zorunlu bir co-substrat olmakla birlikte güçlü bir nükleofildir. Bu nedenle $O_2^{\cdot -}$, $OH^{\cdot}$ ve 1O_2 ile reaksiyona girerek, onları nötralize eder (Levine ve Kidd, 1986). Proteinlerdeki sülfidril gruplarını indirgenmiş halde tutarak onların okside olmasını engeller (Urso ve Clarkson, 2003).

Vitamin E, tokoferol yapısında olup dört tipi mevcuttur. Bu vitaminin en fazla bulunan şekli α -tokoferoldür. Vitamin E, dokulardaki en önemli zincir kırıcı antioksidandır (Akkuş, 1995). Hücre membranlarının lipid kısımlarında ve ekstraselüler sıvılarda bulunarak lipid peroksidasyonuna karşı ilk sıradaki koruma mekanizmasıdır. Lipid peroksit zincirini kırarak zincirleme devam eden lipid peroksidasyonu reaksiyonlarını durdurur (Miquel ve ark., 2006).

Vitamin C, güçlü bir redükleyici ajan ve antioksidandır (Sinclair ve ark., 1990). Askorbik asit, suda eriyen peroksil radikallerini ve/veya lipid peroksidasyonu ürünlerini etkisiz hale getirmede birincil etkiye sahip bir antioksidandır. Ayrıca α -tokoferol ve askorbik asit sinerjistik etki göstermektedirler. Çünkü E vitamini radikaller ile reaksiyona girdiğinde kendisi radikal form olan tokoferoksil radikaline dönüşmektedir. C vitamini ise membranlara bağlanmış tokoferoksil radikalini aktif α -tokoferole çevirerek E vitaminin dayanıklılığını artırmaktadır. Bu nedenle oksidasyon sonucu C vitamini tükenmedikçe E vitaminin tükenmesi söz konusu değildir (Cowie, 2002).

Vitamin A, zincir kırıcı antioksidan olarak işlev görür. Retinol etkili bir peroksil radikali süpürücüsüdür (Vince, 1999). β - karoten ise antioksidan özelliğe sahip olup süperoksit radikalinin kuvvetli bir süpürücüsüdür. Özellikle singlet oksijeni tutarak oksidasyon stresine karşı hücreyi korumaktadır (Umemura ve Yokota, 1997; Esselty, 2000).

Melatonin, yüksek lipofilik özelliği olup membranları kolaylıkla geçer. Özellikle $OH^{\cdot}$ radikalini ortadan kaldırmada çok etkili bir antioksidandır (Yazıcı ve Köse, 2004). Sistein, serbest radikal ve hipoklorit toplayıcısıdır (Akkuş, 1995). Seruloplazminin ise

SOD benzeri bir etki gösterdiği düşünülmektedir. Bu antioksidan, demirin +2 değerlikli halden +3 değerlikli hale yükseltgenmesini sağlayarak Fenton reaksiyonunun inhibe olmasını sağlar. Bu sayede serbest radikal oluşmasını engeller. Ürik asit, normal plazma konsantrasyonlarında $O_2^{\cdot-}$ ve $OH^{\cdot}$ gibi radikalleri temizler. Albümin geçiş metallerini bağlar. Ayrıca bu antioksidan, lipithidroperoksid ve hipoklorid toplayıcısıdır (Misso ve ark., 2005). Transferrin, dolaşımdaki serbest demiri bağlayarak antioksidan özellik gösterir. Bilirubin, serbest radikal tutucusudur. Bu antioksidan, $O_2^{\cdot-}$ ve $OH^{\cdot}$ radikallerini toplar (Ayçiçek ve ark., 2005). Glukoz, $OH^{\cdot}$ radikal tutucusudur (Nakano ve ark., 1999). Piruvat ise güçlü bir antioksidandır ve H_2O_2 'yi bağlayıcı özelliği vardır (Zhou, 2001).

2.4. Çalışmada Takip Ettiğimiz Belirteçler

2.4.1. Oksidatif stres belirteçleri (TAS, TOS, OSİ)

Plazmada antioksidanlar bir etkileşim içinde bulunurlar. Genel olarak bu maddeler sinerjistik olarak çalışmaktadırlar. Bu etkileşimden dolayı, bileşenlerin tek başlarına yaptıkları etkinin toplamından daha fazla bir etki oluşmaktadır. Bu sinerjizme örnek glutatyonun askorbatı, askorbatın da tokoferolü yeniden aktifleştirmesi gösterilebilir. Ayrıca bir antioksidandaki azalma diğerindeki artış ile kompanse edilebilmektedir. Bu sebeple total antioksidan seviyenin (TAS) ölçümü, antioksidanların tek tek ölçümünden daha değerli bilgiler vermektedir. Kanın antioksidan durumunu saptamada, bireysel antioksidanlardan çok bunların toplam antioksidan değerini veren TAS ölçümü, giderek yaygınlaşmaktadır (Romay ve ark., 1996; Erel, 2004).

Reaktif oksijen türleri laboratuvarlarda ayrı ayrı belirlenebilir. Ancak bu işlemler zor, zaman alıcı ve pahalıdır. Son zamanlarda yapılan bazı çalışmalarda, toplam oksidanların durumu, total oksidan seviye (TOS) ölçülerek izlenmiştir (Erel, 2005). Ayrıca TAS ve TOS ölçülerek, belirlenmesi çok zor olan ve henüz bilinmeyen oksidan ve antioksidanların da ölçülmesi sağlanabilir (Bölükbaş ve ark., 2005). Oksidatif stres indeksi (OSİ) ise, TOS'un TAS'a oranı olarak belirlenmektedir (Kösecik ve ark., 2005).

2.4.2. Nötrofil infiltrasyon belirteci (MPO)

Miyeloperoksidaz (MPO) enzimi, nötrofillerdeki sitoplazmik granüllerde bol miktarda bulunmaktadır. Bu enzim nötrofil aktivasyonu esnasında ekstrasellüler alana salınır ve H_2O_2 'yi hipoklorik asite dönüştürür. MPO'nun inhibisyonu ise hedef hücrelerdeki nötrofil aracılı DNA kırılmalarına neden olmaktadır. MPO, enfeksiyon ve/veya enflamasyonun modülasyonunda kritik bir enzimdir. Çünkü MPO, nötrofillerin hem mikrobisidal hem de proinflatuvar aktivitesi ile ilişkilidir (Reynolds ve ark., 2006).

Serbest oksijen radikalleri hem dokuya doğrudan zarar vermekte hem de PMNL'lerin hasarlı dokuda birikmesine neden olmaktadır. Dokuya gelen aktive PMNL'ler, MPO, elastaz, proteaz, kolajenaz, laktoferrin ve katyonik proteinler gibi enzimlerini açığa çıkarırlar. Bu enzimler hem dokudaki hasarı artırır hem de daha fazla radikal oluşumuna neden olurlar. MPO, çeşitli bileşikler (elektron ya da hidrojen donörleri) okside edebilen bir enzim substrat kompleksi oluşturmak için, substratı olan H_2O_2 ile birleşir. Bu oksidasyon sonucu çeşitli yollarla organizmayı etkileyebilen toksik ajanlar meydana gelir. Bu ajanlar ise hücre ölümüne yol açabilir. Nötrofillerin primer fonksiyonu fagositoz ve mikroorganizmaların sindirimidir. Ancak bu hücrelerden toksik ajanların sızıntısı veya sekresyonu yakın hücrelere zarar verir. Fagositik kaynaklı oksidasyonlar ototoksik, immünosüpresif ve mutajenik etkiler gösterirler. Kısacası doku hasarı sonucu dokularda nötrofil birikimi olur. Bu nötrofillerden ortama salınan serbest radikaller de doku hasarına neden olur (Özbal, 2000).

2.4.3. Enflamasyon belirteçleri (İL-6 ve TNF- α)

Sitokinler, organizmanın enfeksiyon, enflamasyon ve immünolojik reaksiyonlar gibi çeşitli uyaranlara yanıtında anahtar rol oynarlar. Bu maddeler, lenfoid ve non-lenfoid birçok hücreden salgılanabilen düşük molekül ağırlıklı proteinlerdir (Dinarello, 2000). TNF- α , interlökinlerle aktive edilen monosit ve makrofajlarda sentezlenip salınan efektör sitokinlerdendir (Abul ve ark., 2000). TNF- α , enfeksiyon bölgesine nötrofil ve monositlerin çekilmesini sağlar. Bu molekül, vasküler endotel hücrelerinde adezyon moleküllerinin ekspresyonunu artırır. Ayrıca ciddi enfeksiyonlarda fazla miktarlarda yapılarak sistemik ve patolojik olaylara neden olur (Balkwill, 2000). TNF-

α , enflamasyonun erken döneminde ortaya çıkar ve benzer ortak sinyal molekülleri üzerinden etki göstererek İL-6 üretimini kontrol eder. İL-6 sitokininin ise, B ve T hücre fonksiyonlarının düzenlenmesi, nötrofillerin oksidatif patlaması ve serbest radikallerin salınması gibi birçok fonksiyonu vardır. Ayrıca İL-6, proinflatuvar sitokinlerin sistemik aktivasyonunun bir göstergesi olarak da değerlendirilir (Hastürk ve ark., 2009). İL-6, çeşitli biyolojik aktivitelere sahip proinflatuvar sitokinlerden biridir. Temel hücre kaynakları, monositler/makrofajlar, fibroblastlar, T lenfositleri, endotelial hücreler, astrositler, mikrogialar ve mast hücreleridir. İL-6'nın, İL-1 ve TNF- α ile sinerjizm göstererek immün yanıtı uyarıcı bir etkisi de vardır. Multiple miyelom, romatoid artrit, sistemik lupus eritematozus, travma ve bakteriyel enfeksiyon gibi patolojik durumlarda artmaktadır (Song ve Leonard, 2000).

2.5. Çalışmada Etkinliğini Araştırılan Moleküller

2.5.1. C vitamini (Askorbik asit)

Askorbik asit, bir heksoz türevi olup, beyaz kristaller halinde bulunur. Suda ve etil alkolde çözünür. α -askorbik asit (redüksiyon ajanı) ve α -dehidroaskorbik asit (okside türevi) olmak üzere iki önemli yapısı mevcuttur. Vücutta çoğunlukla indirgenmiş formda bulunmasına karşın, her iki yapı da biyolojik olarak aktiftir. Bu iki yapı birbirine kolaylıkla dönüşebilirler. Dönüşüm için glutatyon dehidrogenaz ve askorbat oksidaz enzimleri gereklidir. Dehidroaskorbik asidin daha fazla okside olması “diketogulonik asidi” oluşturur ve sonuçta vitamin özelliği kaybolur (Aksoy, 2000).

Birçok bitki ve hayvan D-glukoz veya D-galaktozdan glukuronik asit yoluyla C vitamini sentezleyebilir. Glukoz çeşitli basamaklardan sonra D-glukorinik aside çevrilir ve α -gulonate dönüşür. α -gulono- γ -laktona dönüşen bu yapı 2-keto- α -gulonolaktone okside olur. Bu oksidasyon basamağında α -gulono- γ -lakton kısıtlıdır. Reaksiyonun son basamağında α -askorbik asit oluşur. İnsanlar, kobaylar, alabalık ve somon balıkları bu sentezi yapamaz. Çünkü α -gulono- γ -lakton oksidaz enzimleri yoktur (Aksoy, 2000).

İnsanda C vitamini buccal mukoza, mide ve ince bağırsakta emilir. Buccal mukozada vitamin pasif difüzyonla alınır. Diyetle alınan miktarın %70'i emilir. Vitamin C depo edilmemesine karşın hipofiz, adrenal bezler, göz lenslerinde ve lökositlerde

konsantrasyonu yüksektir. Kanda ve dokularda indirgenmiş formda bulunur ve okside formu %10'dan azdır. Erişkin bir insanda yarılanma ömrü 20 gündür. Günlük dönüşümü 1 mg/kg olup total olarak vücutta bulunan miktarı 1500 mg'dır (Aksoy, 2000).

C vitamini katabolizması diketogulonik aside hidrolize olmasından sonra treonik ve oksalik aside oksidasyonu ile olur (Aksoy, 2000).

İnsanda C vitamini atım formları asorbat-2-sülfat, liksonik asit, ksilonik asit ve ksilozdur. Az miktarda C vitamini (%2) karbondioksite metabolize olur ve solunum ile çıkarılır. C vitamininin oksidatif metabolizması hemosiderozlu hastalarda yüksektir (Aksoy, 2000).

C vitamini güçlü bir antioksidan olup, serbest radikallere bir ya da iki elektron verir. Askorbik asit, monodihidroaskorbik asit yoluyla dehidroaskorbata okside olur. Bu ara ürün vücudun antioksidan savunmasında reaktif oksijen ve serbest radikallere karşı doku tahribatını önler. Askorbik asidin antioksidan hareketi diğer indirgen ajanların varlığında (GSH ve NAD gibi) daha güçlüdür. Bu indirgenler askorbik asidin oksidasyon ürününe dönüşüne yardımcı olurlar (Aksoy, 2000).

Askorbik asit nöradrenalin sentezi için gereklidir. Fizyolojik şartlar altında adrenalin okside olmaya eğilimlidir. Fakat bunu askorbik asit önler. ATP'den cAMP oluşumunu adenil siklaz aktive eder. Askorbik asit cAMP'yi 5'-AMP'ye fosfodiesteraz enzimini inhibe ederek indirger. Böylece askorbik asit cAMP'nin doku düzeyini, onun sentezini uyararak ve degregasyonunu düşürerek artırır (Aksoy, 2000).

Askorbik asit, güçlü bir redüktör (indirgen) ajan olmasından dolayı nitrit toplar. Nitritin kaynağı gıdalardaki nitrattır. Nitrat emildikten sonra buccal kavitedeki mikroorganizmalar tarafından nitrite çevrilir, mideye gelir, orada amin veya amidlerle nitros bileşiklerini oluşturur. C vitamini nitrosaminlerin oluşumunu önleyen güçlü bir ajandır. Çünkü nitritle aminlerden daha hızlı reaksiyona girer. Böylece nitriti indirger, kendisi de okside dehidroaskorbik asit olur ve amin oluşumu böylece önlenir (Aksoy, 2000).

C vitamininin, lökositlerdeki yüksek konsantrasyonu akut hastalıklarda, enfeksiyonda, travmada hızla düşer. Hamilelik, yaşlılık, kortikosterid tedavisi, kanser diyabet gibi durumlarda plazma ve lökositlerde C vitamini düzeyinin düşük olduğu saptanmıştır. C vitamini, alerjik reaksiyonları azaltmakta ve interferon üretimini arttırmaktadır. Biyolojik sistemlerdeki en önemli fonksiyonları, antioksidan rolü olması, serbest radikalleri tutması, detoksifikasyonda rol oynaması, demir ve folat gibi besin öğelerinin kullanımında önemli bir rol oynamasıdır. Yetersizliğinde halsizlik, kas ve eklemlerde ağrı, hassas diş eti, saç folikülleri etrafında hiperkeratoz görülür. Klinik yetersizlik belirtisi olan “skorbüt” kolajen doku sentezinin inhibe olmasından kaynaklanmaktadır (Aksoy, 2000).

C vitamini, folik asidin aktif forma dönüşmesindeki ve demirin emilmesindeki fonksiyonundan dolayı, yetersizliği halinde sekonder megaloblastik anemi ve hipokromik anemi gelişmektedir (Aksoy, 2000).

Reaktif oksijen ürünlerinden hidroksil radikali ve süperoksit anyonu endotel disfonksiyonuna neden olmaktadır. Yapılan çalışmalar göstermiştir ki askorbik asit, reaktif oksijen ürünlerinin oluşumunu azaltmakta, aldoz redüktazı ve proteinlerin glukolizasyonunu inhibe etmektedir (Zanardo ve ark., 2003).

2.5.2. Selenyum

1850 yılında İsveçli kimyacı Berzelius tarafından keşfedilen selenyum, periyodik tablonun 4. peritodunda ve 6. grubunda yer alır. Selenyum, atom numarası 34 olan, kimyasal olarak sülfüre benzeyen esansiyel bir elementtir (Schwarz, 1976; Fox, 1992).

Elemental S (0), selenit (+2), selenit (+4) ve selenat (+6) olmak üzere dört doğal oksidasyon durumu vardır. İnorganik selenat ve selenit formları başlıca suda bulunurken, organik selenyum bileşikleri (SM, Secys) daha çok tahıl ve sebzelerde yer alır (Ademoğlu ve Gürdal, 2006).

Selenyum, serbest radikallerin üretimini önlemek için gerekli olan glutatyon peroksidaz enziminin aktivitesinin sağlanması için önemli bir kofaktördür (Fox, 1992). Glutatyon peroksidaz, tüm dokular ve vücut sıvılarında bulunan yapısında dört Se

atomu içeren, antioksidan etkili bir enzimdir. Se, bütün organlarda, özellikle adrenal korteks, karaciğer, pankreas ve hipofizde bulunur. Mitokondrilerde ATP sentezinde ve koenzimlerin biyosentezinde rol oynar. İmmünolojik olaylarda E vitamini ile birlikte antikor üretimini artırıcı etki gösterir. Selenyum eksikliği, serbest radikallerin birikimine bağlı hücre membranlarının hasarı ile birlikte seyreder. Ayrıca E vitamini, glutatyon ve sülfürlü aminoasitlerle birlikte hidrojen peroksit ve lipithidroperoksitlerin yol açtığı oksidatif hasarın azaltılması veya önlenmesinde rol oynar (Ademoğlu ve Gürdal, 2006).

2.6. Terapötik Ultrason

2.6.1. Tanımı

Ses, maddesel ortamda longitudinal olarak yayılan mekanik dalgalardır. Frekansı 16.000–20.000 Hz arasında değişen sesler insan kulağı tarafından duyulabilir. Bu frekansın altındaki ses dalgalarına "infrason", üstündekilere "ultrason" denir. Tedavi amacıyla kullanılan ultrason dalgalarının frekansı 0.5–3.5 Mhz arasındadır (Kalyon, 1995; Basford, 1998; Tuncer, 2000). Ultrasonun yoğunluk birimi watt'tır. Ancak başlık yüzeyi göz önüne alınarak watt/cm² olarak belirtilir (Tuncer, 2000). Ayrıca ultrason 1952'de bir fizik tedavi aracı olarak kabul edilmiştir (Kalyon, 1995).

2.6.2. Elde edilişi

Bazı kristallerin ses enerjisini elektrik enerjisine çevirme özelliği vardır. Buna "piezo-elektrik olay" denir. Bu olay tersine çevrilecek olursa yüksek frekanslı elektrik akımlarından yüksek frekanslı ses dalgaları elde edilebilir. Başka bir deyişle elektrik enerjisinden mekanik enerji salınarak ultrason elde edilir (Kalyon, 1995; Tuncer, 2000).

Bir ultrason cihazının iki ana bölümü vardır (Kalyon, 1995; Tuncer, 2000):

- 1) Şehir akımını istenilen frekansa yükselten bir üreteç
- 2) Yüksek frekanslı akımın ses enerjisine dönüştürüldüğü başlık (transduser).

Başlık kısmında 1 veya 3 Mhz frekans üretebilen bir titreşim kaynağı bulunur. Bu amaçla kuvartz, baryum titanat ve lityum sülfat kristalleri kullanılır. Kristalin

titreşim frekansı, maruz kaldığı frekansa eşittir. Bu kristaller yüksek frekanslı elektrik enerjisine maruz kaldıklarında periyodik olarak şekil değişikliğine uğrarlar (Kalyon, 1995; Tuncer, 2000).

Başlıktan çıkan ses demeti bir süre silindir biçiminde ilerler ve daha sonra belli bir açı ile birbirinden uzaklaşarak yayılır. Bu açı başlığın çapına ve sesin frekansına bağlıdır. Başlık ve sesin frekansı ne kadar büyükse ses demeti o kadar uzak bir bölgeye silindirik şekilde ulaşır. En çok ses yoğunluğunun olduğu bu bölgeye "yakın alan" denir. Buradan itibaren ses demeti daha homojendir fakat azalarak seyreder. Bu bölgeye ise "uzak alan" denir. Tedavide yakın alanın uzaklığı önemlidir. Pratikte yüzey alanı 4 cm² ve 0.8–1 cm² olan iki çeşit başlık kullanılmaktadır (Kalyon, 1995; Tuncer, 2000).

2.6.3. Fiziksel özellikleri

Ultrasonik dalgalar ses dalgaları gibi katı, sıvı ve gaz ortamlarda yayılırlar. Bu ortamlarda yayılırken ortamın özelliklerine bağlı olarak farklı hızlarda ilerlerler. Hızları havada 343 m/sn, yağ dokusunda 1440 m/sn, kas dokusunda 1585 m/sn ve kemik dokusunda 3360 m/sn'dir (Tuncer, 2000). Ultrason enerjisi bir dalga hareketiyle yayıldığı için, bütün dalga hareketleri gibi, farklı ortamların ortak yüzeylerinde yansıma ve kırılmaya uğrarlar. Katı, sıvı ve gaz ortamlarda yayılıp, ortamın özelliğine bağlı olarak farklı hızda ilerlerler ve ortamdaki partiküllerin basınç dalgaları yönünde titreşimine neden olurlar. Yansıyan ve kırılarak diğer ortama geçen ultrason dalgaları arasındaki orana "akustik impedans" denir. Akustik impedans küçük ise geçiş büyük olur, büyük ise geçiş küçük olur (Füzün, 1990).

Ultrasonik dalgaların dokularda absorpsiyonu ve ara yüzeylerden yansıması esnasında ısı enerjisi açığa çıkar. Bu olay terapötik ısıyı oluşturur. Yansımanın görüntülenmesi ultrasonun tanısal kullanımının da temelini oluşturur. Yağ dokusu, kas dokusu ve yumuşak dokuların yoğunlukları arasındaki fark çok azdır ve çok az yansıma olur. Ancak kas ve kemik ortak yüzeyinde iki doku arasında büyük fark olması nedeniyle en fazla (yaklaşık % 26.8) yansıma burada meydana gelir. Bu da periostta yerel ısı oluşumuna ve periost ağrısına neden olur (Füzün, 1990; Kalyon, 1995; Tuncer, 2000).

Ultrasonik dalgalar doku içinde çeşitli oranlarda absorbe olurlar. Böylece başlangıçtaki yoğunluk giderek azalır. Yoğunluğun yarıya düştüğü derinliğe "yarı değer" denir. Frekans arttıkça yarı değer derinliği azalır. Kolajen ve protein içeriği fazla olan dokularda absorpsiyon daha yüksektir (Füzün, 1990; Kalyon, 1995; Tuncer, 2000). Absorpsiyon yağ dokusunda azdır, kemik dokusunda ise en fazladır. Başlıktan gelen dalgalarla yansıyan dalgalar kesişerek belli noktalarda aşırı ısınmaya neden olabilir. Dokular arasında kemikler en yoğun ısınan organlar olduğu halde kemiklerin arka yüzlerini etkilemek mümkün değildir. Çünkü kemiklere gelen ultrasonik enerji büyük oranda yansır. Kemiğe giren enerji ise kemik dokusu tarafından absorbe edilir. Kas dokusunda da ultrason iyi absorbe edilir, ancak kasların yüksek oranda vaskülarize olmaları nedeniyle ısı hızla kaybedilir. Daha az vaskülarize olan tendon, ligaman gibi yapılar ısıyı daha uzun süre muhafaza ederler (Byl ve ark., 1995; Basford, 1998). Kortikal kemikte en fazla (yaklaşık 5–6 °C), cilt altı yağ dokusunda ise en düşük seviyede (1–2 °C) sıcaklık artışı olur (Basford, 1998).

Cerrahi implantlar doku ile dokular arasındaki yüzeylerde, yansımaya ve bu bölgede artmış enerji absorpsiyonuna neden olurlar. Daha önceleri bu bölgedeki ısı artışının doku içinde yanıklara neden olabileceği düşünülürdü. Yapılan araştırmalar sonucunda yansıma ile çevrede yoğunlaşan ısının, iletkenliği yüksek olan metal tarafından alındığı, diğer bölgelere iletildiği, çevre ısısının yükselmediği bu sayede yanık oluşmadığı belirlenmiştir. Metal implant varlığında uygulanabilecek tek diatermi ajanı ultrasondur (Kalyon, 1995; Tuncer, 2000; Byl ve ark., 1995).

2.6.4. Fizyolojik etkileri

Ultrasonun dokularda termal ve termal olmayan etkileri vardır. Ultrasonun genel etkisi, temelde termal etkisine bağlıdır. Ultrasonun termal olmayan etkilerinin ise rolü daha azdır (Kalyon, 1995; Basford, 1998; Tuncer, 2000; Weber ve Brown, 2000).

1) Termal etkiler: Ultrason enerjisinin dokular tarafından absorbe edilmesi ile ısı enerjisi açığa çıkar. Ortaya çıkan ısı miktarı dokunun absorpsiyon özelliğine, uygulama süresine, dozuna, uygulama şekline bağlı olarak değişir. Ultrason kas, kemik gibi derin dokularda ve bu dokuların ara yüzeylerinde daha çok ısı meydana getirir (Tuncer, 2000). Tedavi dozunda ultrason uygulamasından sonra periferel arteriel kan akımı artar.

Hem arter hem de vende genişleme olur. Ayrıca bunların geçirgenliklerinde de artış olur. Hücre zarının geçirgenliğinde ve hücre potansiyelinde artış meydana gelir. Ayrıca doku metabolizması da artar (Kalyon, 1995; Byl ve ark., 1995; Tuncer, 2000).

Derin ısıtıcı modalitelerinin 3 cm veya daha derin dokularda sıcaklığı arttırdığı düşünülmektedir (Demmink ve ark., 2003). Hafif ısı artışında (1 °C-2 °C) her derece için % 13 metabolik hızda artış meydana gelirken, orta dereceli (2 °C-4 °C) ısı artışlarında kas spazmı, ağrı, kronik enflamasyonda azalma ve kan akımında artma meydana gelir. Yüksek dereceli ısı artışlarında (> 4°C) kolajen dokunun viskoelastik özelliklerinde azalma gelişir (Castel, 1993; Draper ve ark., 1995). İstenilen dokularda istenilen ısıya ulaşmak üzere yoğunluk, frekans, enerji transfer modu ve statik veya dinamik uygulama gibi ultrason tedavi parametreleri kullanılır (Demmink ve ark., 2003). Ölü memeli dokularında sadece frekans değiştirilip diğer tüm tedavi parametrelerin sabit tutularak yapıldığı bir çalışmada uygulamadan 3 dk sonra istenilen ısı artışları görülmemiştir. Çalışmacılar termal kondüksiyon yolu ile ısıнын kaybedildiği sonucuna varmışlardır. Ayrıca dokudaki ısı artışının sadece ultrasonun yoğunluk dağılımına değil ultrasonun geçtiği dokunun da termal ve akustik etkilerine bağlı olduğu belirtilmiştir (Demmink ve ark., 2003).

Yapılan çalışmalarda, nonperfüze dokuda kan dolaşımının soğutucu etkisinin olmaması nedeni ile çok fazla ısınma riskinin göz önüne alınması önerilmiştir. Sonuç olarak ısı oluşumunda ultrason frekansı kadar dokunun termal kondüksiyonu ve akustik özellikleri ile tedavi zamanı da önemli rol almaktadır (Demmink ve ark., 2003).

2) Termal olmayan etkiler: Termal olmayan etkilerin mekanizması tam olarak açıklanamamıştır. Ultrasonun termal olmayan etkileri kavitasyon, duran dalga oluşumu ve akustik akım olarak özetlenebilir (Tuncer, 2000; Weber ve Brown, 2000).

Kavitasyon: Ultrasonun en önemli mekanik etkisidir. İçinde erimiş gaz bulunan sıvılarda, ses dalgaları gevşeme fazında ortam basıncı düştüğü için baloncuklar oluşturur. Sıkışma fazında ise ya bu baloncuklar sıvı içinde dağılır ya da birleşerek büyürler. Bu olaya "kavitasyon" denir. Kavitasyon iki şekilde olur (Füzün, 1990; Basford, 1998; Tuncer, 2000): Dengeli kavitasyon birkaç mikronluk küçük gaz taneciklerinin ultrasonik basınç dalgalarının etkisiyle ileri geri hareketidir. Bu hareket

ultrason tedavisi sırasında ortaya çıkar. Bu esnada hücre zarının geçirgenliği artar ve potansiyeli değişir. Dengesiz kavitasyon ise terapötik ultrason dozlarından daha yüksek dozlarda ortaya çıkar ve hızla büyüyen baloncuklar gelişerek hücre harabiyeti meydana getirir. Bunun sonucunda hemoliz, nekroz ve kanama görülür. Özellikle göz ve eklem gibi sıvı içeren kapalı boşluklar risk altındadır. Bu etkiden kaçınmak için uygun dozlar kullanılmalı ve sürekli aynı noktaya tedavi uygulamamaya özen gösterilmelidir (Kalyon, 1995; Basford, 1998).

Duran dalga oluşumu: Ultrason dalgaları, yoğunlukları farklı iki ortam arasındaki yüzeyde kısmen yansırken, emilir veya iletilirler. Başlığın sabit uygulanması sonucunda yansıyan ve ortama geri dönen dalgaların üst üste binmesi ile duran dalga oluşumuna meydana gelir. Bundan kaçınmak için hareketli uygulama önerilir (Weber ve Brown, 2000).

Akustik akış etkisi: Ultrason ile ortamdaki kabarcıklar veya hücreler gibi titreşen küçük cisimlerin etrafında mikroskobik ölçülerde bir hareket görülür. Bu durum, hücre membran geçirgenliğini etkiler. Ultrason bu yönüyle de terapötik amaçlı kullanılabilir (Weber ve Brown, 2000). Yapılan çalışmalarda doku tamirinde ultrasonun nontermal etkileri içinde akustik akış etkisinin daha etkili olduğu gösterilmiştir. Yapılan çalışmalarda, ultrasonun, akustik akış etkisi ile fibroblastlarda diffüzyon oranı ve membran permeabilitesini değiştirebileceği söylenmiştir. Böylece Ca^{+2} 'un hücreler tarafından alımının artabileceği ve sonuçta hızlanmış kolajen sentezi olacağı da belirtilmiştir (Freider ve ark., 1988; Mortimer ve Dyson, 1988).

2.6.5. Uygulama teknikleri

Tedaviye başlamadan önce tedavi edilecek bölge kontrol edilmeli, duyu bozukluğu ve cilt lezyonu araştırılmalıdır. Üç tip uygulama tekniği vardır (Carlsted ve ark., 1986a; Duffy, 1995; Cook ve ark., 2002).

A) Doğrudan temas tekniği: Sabit veya sıvazlama tekniği ile iki şekilde uygulanır. Sabit direk temas tekniğinde dokunun aşırı ısınma riski olduğundan bu teknik fazla tavsiye edilmez. Alan çok dar ve küçük ise tavsiye edilebilir. Bu uygulamada

yoğunluk çok düşük tutulmalı, ara madde yoğun kullanılmalı ve hasta yakından gözlenmelidir (Kalyon, 1995; Weber ve Brown, 2000).

Sıvazlama tekniği, en sık kullanılan tekniktir. Ultrasonik enerjinin herhangi bir noktada yoğunlaşmasını önlemek amacıyla başlık hiç kaldırılmadan ya dairesel ya da uzunluğuna hareket ettirilir. Bu şekilde daha yüksek yoğunlukta, daha büyük alanı tedavi etmek mümkündür (Kalyon, 1995). Tedavi başlığı cilde tam temas ettirilerek uygulanır. Hava kötü bir iletken ortam olduğundan, başlık ile cilt arasında hava boşluğu kalmaması için vazelin, sıvı parafin veya jelatin içeren özel pomadlar ara madde olarak kullanılmalıdır (BASFORD, 1998; Weber ve Brown, 2000).

B) Su içi uygulama tekniği: Aşırı duyarlı veya topuk, dirsek, el ve ayak gibi yüzeyi düzgün olmayan bölgelerin tedavisinde kullanılır (BASFORD, 1998). Başlık cilt yüzeyinden 1–2 cm uzaklıkta ve yüzeye paralel tutularak longitudinal olarak yavaş yavaş hareket ettirilir. Burada ses dalgaları su aracılığıyla vücuda aktarılmaktadır (Füzün, 1990; Byl ve ark., 1995; BASFORD, 1998; Tuncer, 2000; Weber ve Brown, 2000). Tedavi edilecek dokunun yüzeyden uzaklığının yarısı kadar mesafede ultrason başlığının tutulması da önerilmiştir (Draper ve ark., 1995).

C) Su yastığı tekniği: Düzensiz kemik yüzeylerde gazı alınmış su ile dolu plastik keseler kullanılabilir. Başlık-kese ve cilt-kese aralarına ara madde sürülmesi ihmal edilmemelidir. Başlık cilt üzerindeki gibi hareket ettirilmelidir (Tuncer, 2000).

Terapötik ultrason uygulamasında doz, süre ve frekans sonuçları etkileyen en önemli parametrelerdir (Turner, 1989).

1) Doz: Yoğunluk seçimi patolojiye, dokunun derinliğine ve alanın büyüklüğüne bağlı olarak değişir. Tedavi amacıyla kullanılan ultrason dozları üç grupta toplanır (Kalyon, 1995): düşük yoğunluk ($0.1-0.8 \text{ W/cm}^2$), orta yoğunluk ($0.8-1.5 \text{ W/cm}^2$), yüksek yoğunluk ($1.5-3.0 \text{ W/cm}^2$). Ayrıca düşük yoğunluklu ultrason $0.125 - 3 \text{ W/cm}^2$ ve yüksek yoğunluklu ultrason ise $\leq 5 \text{ W/cm}^2$ olarak da sınıflama yapılmıştır (TerHaar, 1999). Özellikle yüksek protein içeren tendon ve ligament gibi dokularda düşük yoğunluk, derin dokularda yüksek yoğunluk kullanılır (BASFORD, 1998; Tuncer, 2000; Byl ve ark., 1995; Weber ve Brown, 2000). Düşük yoğunluklu ultrason tedavisinde

hasara karşı normal fizyolojik cevapların stimülasyonu veya ilaç penetrasyonu gibi bazı uygulamalarının hızlandırılması amaçlanmaktadır. Yüksek yoğunluklu ultrason uygulamasında ise seçici olarak kontrollü doku yok edilmesi veya geri dönüşümsüz hasarlanması amaçlanır (TerHaar, 1999). Ultrasonun terapötik kullanımından başka farklı dozlarda diagnostik ve cerrahi kullanımı da mevcuttur (Ng ve Liu, 2002).

2) Süre: Tedavi edilecek alanın büyüklüğüne göre 3–10 dakika arasında değişir. Pratik olarak her 10 cm² lik alan için 1 dakika hesabı yapılabilir. 10 dakika süre aşılmamalıdır. Ultrason tedavisi genellikle günde bir kez uygulanır.

3) Frekans: Ultrason enerjisinin penetrasyonu azalan frekans ile artmaktadır. Bu fenomen 1948 yılında Hüter tarafından tanımlanmıştır (Demmink ve ark., 2003). Ultrason frekansı yükseldikçe, yüzeye yakın dokularda bu enerjinin absorpsiyonu artar. Daha düşük frekanslı ultrason uygulamalarında ise daha derin dokulara kadar enerji penetre olabilmekte ve absorpsiyon gerçekleşmektedir. Penetrasyon derinliği, absorbe edilen enerji ve ısı miktarı birbiri ile ilişkilidir (Ward ve Robertson, 1996). Sonuç olarak tedavi edilmek istenen dokunun derinliğine göre 0.8–3 Mhz arası frekans seçilebilir. Bu seçim ile termal veya termal olmayan etkiler ultrason enerjisinin geçtiği doku boyunca elde edilebilir (Demmink ve ark., 2003; McDiarmid ve ark., 1996). 1 Mhz ultrasonun 2.5–5 cm derinliğindeki dokular için, 3 Mhz ultrasonun ise <2.5 cm derinliğindeki dokular için kullanılması gerektiği önerilmiştir (Gann, 1991).

1 Mhz frekans ve 1 W/cm² şiddette ultrason uygulamasının nonperfüze dokuda 0.86 °C/dk ısı artışı sağladığı bulunmuştur. Ancak perfüze dokularda bu kadar ısı artışı mümkün değildir. Doku ısının, 3 Mhz frekansındaki uygulamada 1 Mhz uygulamasına göre daha hızlı arttırdığı görülmüştür (Johns, 2002).

Ultrasonun uygulanması: Sürekli veya kesikli şekilde uygulanabilir. Sürekli ultrason dokuları ısıtmak amacıyla kullanılır. Kesikli ultrason uygulaması ile termal etki en aza indirilerek nontermal etkiler daha belirgin hale gelir. (Kalyon, 1995; Byl ve ark., 1995; Tuncer, 2000; Weber ve Brown, 2000). Kesikli uygulamada uyarılar arasında bir zaman periyodu olması nedeniyle uyarı esnasında ortaya çıkan az miktardaki ısı da dokular tarafından elimine edileceğinden termal etkileri fazla görülmez. Meydana gelen etki daha çok mekanik veya biyolojik değişikliklere bağlıdır. Bu uygulama atermik

diatermi olarak da adlandırılır. Kesikli uygulama sonucunda yüksek frekanslı akım alçak frekanslı akım haline gelir. Ancak atımların içeriğinin yüksek frekans karakterinde olduğu unutulmamalıdır (Kalyon, 1995). En sık kullanılan kesikli rejimler 2:2 ve 2:8'dir (TerHaar, 1999). Kesikli ultrason uygulamalarında verilen yoğunluk atım oranı düzeyinde azalır (Kalyon, 1995).

Fonoforezis: Çeşitli maddelerin cilt üzerine sürülmesi ve bu bölgeye ultrason uygulanarak penetrasyonunun artırılması esasına dayanır. En çok lokal anestezi, steroid ve antiinflamatuvar ilaçlar kullanılır (Kalyon, 1995; Basford, 1998; Tuncer, 2000; Byl ve ark., 1995; Weber ve Brown, 2000). Ayrıca son yıllarda kemoterapötik, trombolitik tedavilerde ve gen transferlerinde de kullanımı mevcuttur (Ng ve Liu, 2002).

2.6.6. Dokular üzerindeki etkileri

Ultrasonun doku iyileşmesini arttırıcı etkisi pek çok çalışmada gösterilmiştir. Ayrıca ultrason, enflamasyonun yatışmasını hızlandırarak, proliferasyon fazına geçilme sürecini hızlandırabilir (Freider ve ark., 1988; Jackson ve ark., 1991; Hunter, 2001; Alfredson ve ark., 2002; Stephenson ve ark., 2003; Bjur, 2005; Riley, 2005). Yapılan çalışmalarda ultrason tedavisinin yara alanında PMNL ve mast hücre sayısında azalma, fibroblast sayısında, kolajen yapımında, yara kırılma kuvvetinde ve doku hidroksiprolin seviyesinde ise artma sağladığı gösterilmiştir (Mortimer ve Dyson, 1988; Young ve Dyson, 1990; Ramirez ve ark., 1997; Beker ve ark., 2001). Ayrıca ultrason, hücre bölünmesini hızlandırarak kolajen sentezini, aktif iyileşme fazında arttırır (Young ve Dyson, 1990; Ramirez ve ark., 1997; Tsai ve ark., 2005).

Ultrason ödem, ağrı ve skar oluşumunu azalttığı iddiası ile yaygın bir şekilde kullanılmaktadır (Lehman, 1982). Ultrason, interstisyel sıvının hareketini artıran mikromasaj etkisi ile ödemi azaltarak doku iyileşmesi kolaylaştırır. Ultrasonun ısı etkisi ile skar dokuların ve yapışıklıkların elastikiyeti artar (Carlsted ve ark., 1986b; Duffy, 1995; Chenu ve ark., 1998; Cook ve ark., 2002; Alfredson, 2005).

Ultrason, büyük protein molekülleri içeren kolajenöz dokuları daha fazla ısıtabilir. Bu dokular yüzeysel kortikal kemik, periost, menisküs, sinovyum, eklem

kapsülü, myofasyal noktalar, kas içi skarlar, fibrotik kas, tendon kılıfları ve majör sinir kökleridir. Bu dokuların ısıtılması sonucunda tendon veya skar dokusu gibi kolajenöz dokuların esnekliğinde artma, eklem katılığında azalma, ağrıda azalma, kan akımında artma, kas spazmında azalma gibi etkiler elde edilebilir (TerHaar, 1999). Eklem kapsülü de tendonlar gibi bol miktarda kolajen içerdiğinden eklem kontraktürlerinde hareket genişliğini artırmak için germe egzersizlerinden önce uygulanabilir (Kalyon, 1995). Kontrakte kolajen dokular ultrason ile yeterli ve selektif olarak ısıtılabilir. Bu dokularda ısının artmasıyla esneklikte de artma olur. Böylece egzersizleri yapmak daha kolay olur (Lehman, 1982). Ultrason, ağrılı periferik sinir hastalıklarında analjezi oluşturur.

Ultrasonun sinir elektrik aktivitelerini değiştirmesi ve analjezik etkisi, sinir ve kas hücrelerinin membranında Na iyon geçirgenliğini etkilenmesiyle de açıklanabilir (Carlsted ve ark., 1986a; Duffy, 1995; Chenu ve ark., 1998; Cook ve ark., 2002). Sinir dokusu ultrason enerjisini kaslardan daha çok emer ve böylece sinir iletim hızı artar. Yüksek dozlarda ultrason ise sinir ve ganglionlar üzerine inhibitör etki yaparak geçici bloklara neden olur. Ultrasona en duyarlı olan sinir lifleri, C tipi sinir lifleridir. Ultrason ağrı eşiğini yükselterek ağrıyı azaltır. Sempatik sinirler ve ganglionlar üzerine uygulandığında damarlanma ve cilt ısısında artma olur (Kalyon, 1995). Ultrasonun tedavi edici dozlarda, kemik üzerine zararlı etkisinin olmadığı gösterilmiştir. Ayrıca kırık iyileşmesinde ultrason ile yapılan çalışmaların çoğunda osteogenezisin arttırdığı bildirilmektedir (Byl ve ark., 1995; Basford, 1998). Ancak ultrason yüksek dozlarda uygulandığında patolojik kırıklara yol açabilir (Byl ve ark., 1995).

Kesikli ultrasonun ise antiinflamatuvar ve çeşitli dokularda rejenerasyonu uyarıcı etkilerinin olduğu bilinmektedir. Ayrıca antiödem ve analjezik etkilerinin de olduğu ileri sürülmüştür (Griifn ve ark., 1970; Clarke ve Stenner, 1976; Patrick, 1978; Middlemast ve Chotterjee, 1978; Binder ve ark., 1985; Johns, 2002). Ultrasonun ödemi azaltıcı etkisi, mikromasaj özelliğine bağlanmıştır. Analjezik etki mekanizması tam olarak anlaşılmamakla birlikte, kesikli dalgaların otonom sinir sistemi üzerindeki etkileriyle açıklanmıştır (Patrick, 1978). Bununla birlikte analjezik etkinin, iyileşmeyi hızlandırıcı ve rejenerasyonu uyarıcı etkiye sekonder olarak da ortaya çıkabileceği belirtilmiştir (Patrick, 1978). Sürekli ultrasonun, kan akımını, membran permeabilitesini ve bağ doku esnekliğini arttırıcı etkileri ile sinir iletimini değiştirici etkileri de vardır.

Biyolojik olayların büyük bir kısmı ısı yükselmesine bağlıdır. Biyolojik membranların geçirgenliğinin sadece ultrasonun termal etkisi ile değil aynı zamanda nontermal etkisi ile de değiştiği bulunmuştur. Bu nontermal etki iyonların membranda difüzyon hızını artırır (Lehman, 1982).

2.6.7. Endikasyonları

- Yumuşak doku romatizmaları; myofasial ağrı sendromu, tendinit, bursit, epikondilit,
- Dupuytren kontraktürü, fibrositis, skalen antikus sendromu
- Raynaud fenomeni, kronik deri ülserleri, bası yaraları, psöriazis, paget hastalığı, nörofibromatozis, tortikolis
- Tendon yaralanmaları
- Kırık iyileşmesi
- Travma ve hareketsizliğe bağlı yumuşak doku sertlikleri, eklem kontraktürleri
- Dejeneratif eklem hastalıkları
- Ankilozan spondilit, romatoid artrit gibi enflamatuvar hastalıkların inaktif dönemleri
- Radikülitler, postherpetik nevralji, meniere hastalığı
- Yara, yanık, greft ve dekübit ülserlerinin tedavisi
- Kompleks bölgesel ağrı sendromu (Lehman, 1982; Carlsted ve ark, 1986b; Kvist, 1991; Astrom ve Westlin, 1992; Chenu ve ark., 1998; TerHaar, 1999; Cook ve ark., 2002; Cetti ve ark., 2003; Alfredson, 2005; Bjur, 2005).

2.6.8. Kontrendikasyonları

- Göz sıvısında kavitasyon yaparak geridönüşümsüz hasara yol açar.
- Amnion sıvısında kavitasyon, fetusta ısıya bağlı malformasyon yapabileceğinden gebe uterus üzerine uygulanmamalıdır.

- Direkt uygulanırsa omurilik sıvısında kavitasyon yapabilir ve santral sinir sistemi hücrelerinde hasara yol açabilir. Bu nedenle spina bifida, laminektomi gibi durumlarda lezyon üzerine uygulanmamalıdır.
- Duyusu azalmış veya kaybolmuş bölgelere özel önlemler alınarak uygulanabilir.
- Polietilen ve diğer plastik materyalin kullanıldığı artroplastilerde uygulanmamalıdır. Bu materyallerin ultrason enerjisini daha fazla emme özellikleri olduğu için eklemde erime ve gevşeme olabilir.
- Kalbin aksiyon potansiyelini ve kasılabilirliğini değiştirdiği için kalbe doğrudan uygulanmamalıdır.
- Kardiak pace-maker kullananlara uygulanmamalıdır.
- Neoplazmlar üzerine uygulandığında doza bağlı olarak tümör hasarı ve tümör büyümesinde artmaya neden olabilir.
- X- ışını, radyum veya radyoaktif izotop uygulamaları sırasında ve sonrasında kullanılmamalıdır. Yakın zamanda radyoterapi yapılmış bölgelere uygulanmamalıdır.
- Anestezik bölgeleri olan kişilerde ultrason uygulaması kontrendikedir.
- Arteriyel ve venöz dönüşüm bozukluğu bulunan bölgelere uygulanmamalıdır.
- Tromboflebit gibi durumlarda ultrason uygulanması embolinin rüptürüne neden olabilir. Bu nedenle o bölgeye uygulanmamalıdır.
- Akut enfeksiyonlarda uygulanmamalıdır.
- Hemofilide, hemartrozda, büyük hematomlarda ve hemorajik diyatezi olan kişilerde kanamayı provoke edebilir.
- Gonadlar ve epifiz plakları üzerine uygulamadan kaçınılmalıdır (Carlsted ve ark, 1986a; Duffy, 1995; Chenu ve ark., 1998; Cetti ve ark., 2003).

2.6.9. Kesikli terapötik ultrasonun kullanım alanları

- Yumuşak doku travmaları (Ödemi gidermek amaçlı)

- Skar dokusu
- Bası yaraları ve variköz ülserler
- Kırıklar (Kalyon, 1995).

2.6.10. Kesikli terapötik ultrason ile ilgili yapılmış çalışmalar

Gastroknemius kasına kontüzyon yaralanması oluşturulmuş sıçanlarla yapılan bir çalışmada, 3 Mhz frekansta ve 1.5 W/cm² yoğunlukta kesikli ultrason tedavisi uygulanmıştır. Çalışmada, tedavinin, hasarlı kas dokusunda erken evrelerde satellit hücre proliferasyonunu artırarak miyorejenerasyona olumlu katkıda bulunduğu ancak miyotüb oluşumu ve morfolojik değişikliklere katkıda bulunmadığı sonucuna varılmıştır (Rantanen ve ark., 1999).

Deneysel kas yaralanması oluşturulmuş başka bir çalışmada terapötik kesikli ultrason (TPU) uygulanmıştır. Alınan doku örneklerinde, oksidatif stres parametrelerinden tiyobarbitürik asit reaktif maddeler (TBARS), protein karbonil içeriği, katalaz ve SOD aktivitelerine bakılmıştır. Ayrıca serum CK düzeyleri de ölçülmüştür. Serum CK düzeylerinin, sadece kas yaralanması yapılan hayvanlarda arttığı görülmüştür. Sham grubuna göre TBARS, kas yaralanması sonrası değişmemiştir. Kas yaralanması sonrasında protein karbonil içeriğinin arttığı tesbit edilmiştir. Katalaz ve SOD aktiviteleri kas yaralanma sonrası 1. gün artmış ancak 3. ve 5. günlerde değişmemiştir. Yalnız kesi yapılan gruptaki hayvanlara kıyasla TPU uygulanan kas yaralanmalı hayvanlarda TBARS düzeyleri azalmıştır. Protein karbonil içerik değerlendirmesinde ise benzer sonuçlar bulunmuştur. TPU uygulanan gruptaki hayvanlarda özellikle kas yaralanmasının ilk gününde, katalaz ve SOD aktivitelerinin azaldığı belirlenmiştir. Bu çalışma ile TPU'nun, dokuları oksidatif hasara karşı koruması yönünde başarılı olduğu gösterilmiştir (Freitas ve ark., 2007).

Deneysel kas yaralanması oluşturulmuş bir çalışmada, düşük yoğunlukta kesikli ultrason (LIPUS) ve dimetilsülfoksit (DMSO) tedavisi ile, TNF- α , İL-1 β , nükleer faktör kappa B (NFkB) protein düzeyleri ve c-jun n-terminal kinaz (JNK) gibi enflamatuvar belirteçlerin azaltıldığı gösterilmiştir (Engelmann ve ark, 2012).

Kontüzyonla kas yaralanması oluşturulmuş bir başka çalışmada düşük yoğunluklu ultrason tedavisi değişik yoğunluklarda uygulanmıştır. Hayvanlar A, B, C, D olmak üzere dört gruba ayrılmış. A grubuna 0.25 W/cm^2 ve 1 Hz, B grubuna 0.5 W/cm^2 ve 2 Hz, C grubuna 0.75 W/cm^2 ve 3 Hz, D grubuna 0.25 W/cm^2 ve 3 Hz olmak üzere uygulanmış. Sonuçta günlük 5 dakika, frekansı 3 Hz ve yoğunluğu 0.25 W/cm^2 olan ultrason uygulamasının kontüzyonla oluşturulmuş kas hasarının tamirinde daha etkili olduğu kanısına varılmıştır (Shu ve ark, 2011).

Daha önceleri iskelet kası hücreleri bir hasar aldığında bu hasarın kalıcı olduğu, bölünme ve rejenerasyonun olmadığı düşüncesi hakimdi. Son zamanlarda yapılan çalışmalarda, iskelet kası hücrelerinin yenilenme açısından güçlü bir kapasiteye sahip olduğu ve bu rejenerasyonun MSC'ye yani satellit hücre proliferasyonuna bağlı olduğu gösterilmiştir (Richard-Bulteau ve ark., 2008). Kas yaralanması olduğu zaman, MSC aktive olur ve kas prekürsör hücrelerinde çoğalma ve farklılaşma meydana gelir (Rantanen ve ark., 1999).

Çalışmalar, ultrasonun promot hücre çoğalmasını, protein sentezini ve sitokin üretimini artırdığını göstermiştir (Fu ve ark., 2008).

Gastroknemius kasında laserasyon yaralanması oluşturulmuş bir çalışmada, 1 Mhz frekansında ve 0.5 W/cm^2 yoğunluğunda kesikli ultrason tedavisinin, miyoblastik farklılaşma ve hasarlı kas rejenerasyonuna olumlu etkide bulunduğu gösterilmiştir (Piedade ve ark., 2008).

Yapılan başka bir çalışmada, ultrasonun İL-8, temel fibroblast büyüme faktörü (bFGF) ve vasküler endotelial büyüme faktörü (VEGF) üretimini artırdığı bulunmuştur. Bu çalışmada ultrasonun kas hasarı tamirinde kas lifi anjiyogenezini artırabileceği sonucuna varılmıştır (Reher ve ark., 1999).

Aslında günümüzde yapılan çalışmalarda, ultrasonun kas iyileşme mekanizmasına etkinliği yine de kesin değildir. Daha önceki bazı çalışmalarda, çalışmanın kötü tasarlanmış olması, ultrason uygulamalarının tam olarak doğru yapılamaması, eski model ultrason cihazlarının kullanımı, uygunsuz ajan kullanımı gibi nedenlerden dolayı kas hasarı iyileşme mekanizmasında ultrasonun etkinliğinin tam

olarak yansıtılamadığı düşünülmektedir (Anderson, 2000; McBrier ve ark., 2007). Ancak, günümüzde spor hekimliğinde ve yumuşak doku yaralanmalarında ultrason uygulaması gayet popülerdir. Avrupa, Japonya ve ABD’de, ultrason tedavisi sporcularda kas hasarı tedavisinde rutin olarak uygulanmaktadır (Warden, 2003).

3. GEREÇ VE YÖNTEM

Bu çalışmanın analizleri, Yüzüncü Yıl Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalı Enzimoloji Laboratuvarı'nda yapılmıştır. Deneyler Yüzüncü Yıl Üniversitesi Deney Hayvanları Ünitesinde gerçekleştirilmiştir.

3.1. Gereç

Çalışmada başlangıç ağırlıkları 250-300 g arasında değişen Wistar türü albino erkek sıçanlar kullanılmıştır. Bu hayvanlar Yüzüncü Yıl Üniversitesi Deney Hayvanları Ünitesinden sağlanmıştır. Sıçanlar araştırma süresince çelik kafeslerde, her kafeste en fazla 4 hayvan olacak şekilde tutulmuştur. Hayvanlar bu süre içinde istedikleri kadar su içip yem yiyebilmişlerdir. Barındırıldıkları oda, 12 saat aydınlık - 12 saat karanlık olacak şekilde ayarlanmıştır. Ayrıca laboratuvarın oda sıcaklığı termometre ile nemi higrometre ile ölçülerek sıcaklığın 23 ± 1 °C 'yi aşmaması için laboratuvar sürekli olarak aspiratör ile havalandırılmıştır.

3.2. Yöntem

3.2.1. Deney gruplarının oluşturulması

Denekler kontrol (K), yalnız kesi (YK), terapötik ultrason (U), vitamin C (Vit C), selenyum (S) ve Miks (M) grup olmak üzere gruplara ayrıldı. Çalışmada oluşturulacak toplam 6 grup her grupta 6 adet sıçan olacak şekilde aşağıdaki işlemlere tabi tutuldu. Bütün gruplara normal sıçan yemi (protein %24, lysine %1, metionin %0.6 , sistein %0.4, selüloz %7, NaCl %1, kalsiyum %1-2 ve enerji 2650 kcal/kg) ve musluk suyu verildi. 1. gruptaki sıçanlara, diğer gruplara intraperitoneal (i.p) uygulama yapıldığı için sonuçlar açısından farklılık olmaması için i.p olarak fizyolojik su verildi. 2. gruptaki sıçanlara sadece kas yaralanması gerçekleştirildi ve 1. grupta olduğu gibi i.p olarak fizyolojik su verildi. 3., 4., 5. ve 6. gruptaki sıçanlara kas yaralanması yapıldıktan 24 saat sonra 2 günde bir toplam 3 kez olacak şekilde uygulamalar yapıldı. 3. gruptaki sıçanlara terapötik ultrason uygulandı ve ultrason uygulamalarından sonra i.p olarak fizyolojik su verildi. 4. gruptaki sıçanlara vitamin C, 5. gruptaki sıçanlara ise selenyum i.p olarak enjekte edildi.

6. gruptaki sıçanlara vitamin C + selenyum i.p olarak enjekte edildi ve enjeksiyon öncesinde terapötik ultrason uygulandı.

3.2.2. Kas yaralanmasının oluşturulması

Kasta doğrudan insizyon yapılarak oluşturulan kas yaralanma modeli esas alındı. Sıçanlar i.p enjeksiyonla ketamin (100 mg/kg) verilerek anestezi edildi. Sıçanların baldırları tıraş edildikten sonra longitudinal olarak künt bir kesi yapıldı. Subkutanöz katman geçilip gastroknemius kasına ulaşıldı. Gastrokinemius kası distalden proksimale doğru uzunluğunun %60'ı, genişliğinin %75'si, derinliğinin de %50'si olacak şekilde kesildi (Menetrey ve Kasemkijwattana, 2000; Chan ve ark., 2003).



Şekil 6. Çalışmada kas yaralanması oluşturulan gastroknemius kası

3.2.3. Etkinliği araştırılan moleküllerin uygulanması

Vitamin C: Kas yaralanmasından 24 saat sonra 2 günde bir 3 doz vitamin C verildi. Her doz 500 mg/kg olacak şekilde i.p olarak uygulandı (Khassaf ve ark., 2003).

Selenyum: Kas yaralanmasından 24 saat sonra 2 günde bir 3 doz selenyum verildi. Her doz 1.5 mg/kg olacak şekilde i.p olarak uygulandı (Özdil ve ark., 2004).

3.2.4. Terapötik ultrasonun uygulanması

Terapötik ultrason, 6 dk süreyle ve 1.0 Mhz frekans dozunda uygulandı (Silveira ve ark., 2012). Ultrason 1 w/cm² yoğunluk dozuyla uygulandı (Freitas ve ark., 2007). Ayrıca tedavide ultrason başlığı dairesel olarak hareket ettirildi (Saliba ve ark., 2007). Ultrason ayarlanan dozlarda, sıçanın rastgele seçilen sol bacağına arka baldır kısmına ultrason jeli ile uygulandı.



Şekil 7. Sıçanın sol arka baldırına terapötik ultrason uygulanması

3.2.5. Analizlerde kullanılan kit ve kimyasallar

TAS ölçüm kiti (Rel Assay Diagnostics), TOS ölçüm kiti (Rel Assay Diagnostics), İL-6 ölçüm kiti (Rat İL-6 Platinum ELISA eBioscience), TNF- α ölçüm kiti (Rat İL-6 Platinum ELISA eBioscience), Trishidroksimetilaminometan, EDTA-Na₂, o-dianizidin-HCl, hidrojen peroksit (H₂O₂), potasyumdihidrojen fosfat (KH₂PO₄), HTAB (MA: 364.5-hexadecy three methyl ammonium bromide).

3.2.6. Analizlerde kullanılan cihazlar ve malzemeler

Radwag AS 220/X hassas terazi, TTS 3 digital yellow line vorteks, Orion 3 star pH metre, Aurigo cerrahi set, Bandelin Sonopuls ultrasonik homojenizatör, Hettich Universal 320R soğutmalı santrifüj, otomatik pipet Socorex Swiss Brand, Siemens derindonduruculu buzdolabı, Genesys 10 UV Scanning spektrofotometre, ELISA reader and washer DAS.

3.2.7. Kan ve doku örneklerinin hazırlanması

Kan ve doku örneklerinin alınması: Bütün gruptaki deneklere enjeksiyonlar ve ultrason uygulamaları yapıldıktan 24 saat sonra 100 mg/kg ketamin i.p verilerek anestezi uygulandı. Kan dokusu örnekleri genel anestezi altında hayvanların kalbinden enjektörler yardımıyla alınıp tam kan örnekleri için EDTA'lı tüplere, serum elde etmek için ise biyokimya tüplerine aktarıldı. Toplanan kas dokusu örnekleri ise % 0.9'luk fizyolojik suda yıkama işleminden geçirilerek laboratuvarında inceleme zamanına kadar -75 °C'de derin dondurucuda tutuldu. TAS, TOS, OSİ ile MPO enzim aktivitesi spektrofotometrik yöntemle elde edilen doku süpernatantlarında daha sonra ölçüldü. Histopatolojik inceleme için ise hayvanlardan alınan kas dokusu örnekleri %10'luk tamponlu formalin içinde tespit edildikten sonra patoloji laboratuvarına gönderildi.

Serum örneklerinin hazırlanması: Biyokimya tüplerine aktarılan kanlar 3000 rpm ve +4 °C'de 5 dk santrifüj edilerek serum örnekleri hazırlandı. Serumların bir kısmı, CK, LDH, AST, alanin aminotransferaz (ALT) enzim seviyelerinin ölçülmesi için biyokimya laboratuvarına gönderildi. Kalan serum örnekleri ise İL-6 ve TNF- α sitokinlerinin ELISA yöntemiyle tayin edilinceye kadar -75 °C'de derin dondurucuda bekletildi.

Tam kan örneklerinin hazırlanması: EDTA'lı tüplere alınan tam kan örnekleri önce 1:1 oranında saf su ile hemoliz edildi. Elde edilen hemolizat, 3000 rpm ve +4 °C'de 5 dk santrifüj edilerek üstte kalan berrak süpernatant, prespitanattan ayrılarak başka bir tüpe aktarıldı. Analizler için bu tam kan örnekleri kullanıldı.

Doku homojenatlarının hazırlanması: Muamele sonrası derin dondurucuda bekletilen kas dokusu örneklerinden 0.1 g doku alınarak üzerine 1900 μ l soğuk fosfat tamponu (PBS) ilave edilirdi. Elde edilen karışım soğuk tutulmak kaydıyla ultrasonik

homojenizatörde (2 dk) homojenize edildi. Elde edilen homojenatlar uygun deney tüpleri içerisinde soğutmalı santrifüjde 3500 rpm’ de +4 °C sıcaklıkta 30 dk santrifüj edildi. Kas dokusundan elde edilen süpernatantlar analizler için kullanıldı (Xia ve ark., 1994; Marklund, 1990).

3.3. Analizlerin Yapılması

3.3.1. Miyeloperoksidaz (MPO) enzim (EC 1.11.1.7) aktivitesinin tayini

MPO tamponu hazırlanması: 50 mM KH_2PO_4 , %0.5 HTAB (MA: 364.5-hexadecyl three methyl ammonium bromide) içeren fosfat tamponu saf suda çözülerek ve pH 6.0’ya ayarlandı.

Ölçüm karışımı hazırlanması: 50 mM KH_2PO_4 (MA:136.09) 0.167 mg/ml o-dianizidin-HCl ve %0.0005 H_2O_2 içeren ölçüm karışımı üç ayrı tartım yapılarak saf suda çözündü ve pH 6’ya ayarlandı.

Ölçüm işlemi: Tablo 2’deki miktarlar uygun şekile karıştırılarak ölçüm yapıldı.

Tablo 2. MPO aktivitesinin belirlenmesinde kullanılan karışım miktarları

	KÖR	NUMUNE	SON KONSANTRASYON
Ölçüm Karışımı	2.880 ml	2.880ml	52 nM KH_2PO_4 : 0.17 mg/ml o-dianizidin-HCl: %0.0005 H_2O_2
Numune	-	0.120 ml	-
MPO Tamponu	0.120 ml	-	-

Ölçüm 3 ml küvette 460 nm’de yapıldı. Absorbanslar 3 dk boyunca 15 saniyede bir kaydedildi. Absorbans aralığındaki azalmanın lineer olduğu kısımda dakika başına absorbans azalması tespit edilerek aşağıdaki formülden EU hesaplandı.

Çıkan sonuçlar doku için U/g doku $\times$ seyreltme, tam kan için U/mL $\times$ seyreltme faktörü olarak ifade edilir (Bradley ve ark., 1982).

3.3.2. Total antioksidan seviyesi (TAS) ölçüm tayini

TAS ölçümü için Rel Assay Diagnostics marka kit kullanılmıştır. Kit prosedürlerinde belirtildiği gibi spektrofotometre cihazında 660 nm’de ölçüm yapılmıştır. Reaksiyon hızı standart yöntem olan Trolox ile kalibre edilmektedir. Birimi Trolox equivalent/L’dir (Erel, 2004).

3.3.3. Total oksidan seviyesi (TOS) ölçüm tayini

TOS ölçümü için Rel Assay Diagnostics marka kit kullanılmıştır. Kit prosedürlerinde belirtildiği gibi spektrofotometre cihazında 530 nm’de ölçüm yapılmıştır. Birimi $\mu\text{mol H}_2\text{O}_2$ Equivalent/L’dir (Erel, 2005).

3.3.4. Oksidatif stres indeksi (OSİ)’nin hesaplanması

Total Oksidan Seviyesi / Total Antioksidan Seviyesi şeklinde bölünerek OSİ hesaplandı. Birimi AU (Arbitrary Unit) olarak kabul edildi (Kösecik ve ark., 2005).

3.3.5. İnterlökin-6 (İL-6) sitokininin ölçüm tayini

Serumda bakılan İL-6 sitokininin ölçümü için Rat İL-6 Platinum ELISA (marka: eBioscience katalog no: BMS625) kiti kullanıldı. Kit prosedürlerinde belirtildiği şekilde ELISA cihazı (ELISA reader and washer DAS) ile 450 nm’de ölçüm yapıldı. Birimi pg/mL’dir (Tirgan ve ark., 2012).

3.3.6. Tümör nekroz faktör (TNF- α) sitokininin ölçüm tayini

Serumda bakılan TNF- α sitokininin ölçümü için Rat TNF- α Platinum ELISA (marka: eBioscience katalog no: BMS622) kiti kullanıldı. Kit prosedürlerinde belirtildiği şekilde ELISA cihazı (ELISA reader and washer DAS) ile 450 nm’de ölçüm yapıldı. Birimi pg/mL’dir (He ve ark., 2012).

3.4. Histopatolojik İncelemeler

Alınan doku örnekleri %10'luk tamponlu formalinde tespit edildikten sonra parafin bloklara gömülerek mikrotomla 4µm'lik kesitler alındı. Kesitler hematoxilen-eozin boyası ile boyanarak Yüzüncü Yıl Üniversitesi Veteriner Fakültesi Patoloji Laboratuvarı'nda araştırma mikroskopunda incelendi. Kas dokusunda fibroz doku ve enflamasyonun olup olmadığına bakıldı.

3.5. İstatistiksel Analizler

Üzerinde durulan özellikler için tanımlayıcı istatistikler, medyan, ortalama, standart sapma, minimum ve maksimum değer olarak ifade edilmiştir. Bu özellikler bakımından grupları karşılaştırmada Kruskal- Wallis testi kullanılmıştır. Farklı grupları belirlemede Dunnet testi kullanılmıştır. Hesaplamalarda istatistiki anlamlılık düzeyi %5 olarak alınmış ve hesaplamalar için SPSS istatistik paket programı kullanılmıştır.

4. BULGULAR

Gündelik hayatta ve sporlarda sıkça karşılaşılan bir rahatsızlık olan kas yaralanmaları ile ilgili yapılan bu çalışmadan elde edilen bulgular, tablolar ve grafikler halinde, kendi içinde başlıklara ayrılmış şekilde aşağıda verilmiştir. Gruplar K, YK, U, Vit C, S ve M olarak adlandırılmıştır.

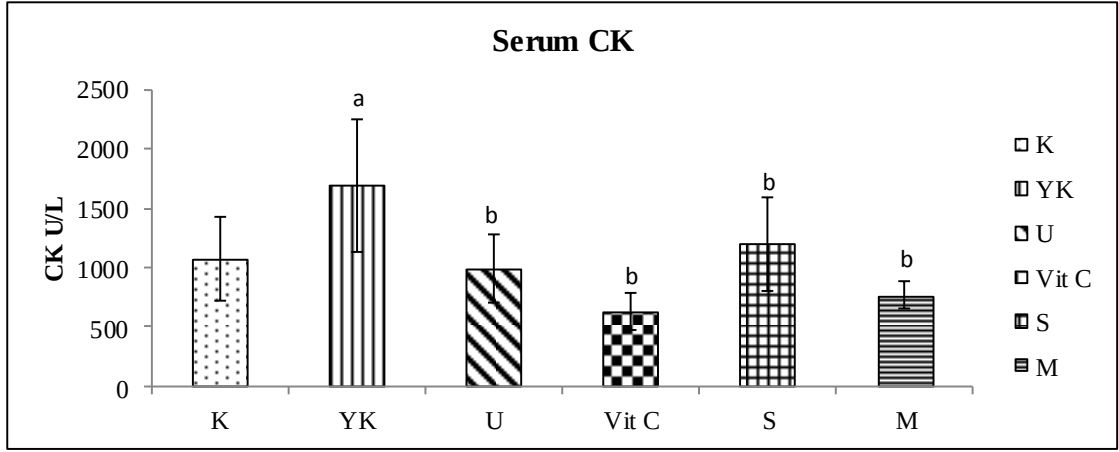
4.1. Serum Enzimlerinin Analiz Bulguları

Serum CK, LDH, ALT, AST enzim seviyeleri biyokimyasal yöntemlerle incelenmiştir. Elde edilen sonuçlar ve istatistiksel analizler Tablo 3'te verilmiştir.

Tablo 3. Serum enzim sonuçlarının gruplara göre dağılımı ve istatistiksel veriler

	Grup	Medyan	Ort.	St. Sap.	Min.	Maks.	p.
CK	K	999.0	1072.0 bc	349.9	550.0	1556.0	0.001
	YK	1477.0	1692.5 a	574.9	1169.0	2446.0	
	U	938.5	988.2 bcd	282.7	651.0	1379.0	
	Vit C	613.0	627.5 d	155.1	458.0	900.0	
	S	1268.0	1201.9bc	392.4	770.0	1577.0	
	M	739.5	766.5 cd	111.3	637.0	971.0	
LDH	K	1943.0	1745.2 ab	417.6	1080.0	2096.0	0.004
	YK	2080.0	2008.4 a	169.1	1715.0	2136.0	
	U	1886.5	1827.4 a	283.8	1409.0	2128.0	
	Vit C	1232.0	1332.9 bc	440.9	855.0	2064.0	
	S	1320.0	1251.4 c	329.7	759.0	1669.0	
	M	1688.0	1628.5 bc	396.7	931.0	2155.0	
ALT	K	34.0	33.9 b	3.1	29.0	38.0	0.043
	YK	53.5	49.9 a	6.5	41.0	55.0	
	U	43.3	44.6 ab	13.1	30.0	70.0	
	Vit C	36.5	39.0 ab	11.0	27.0	57.0	
	S	43.0	41.0 ab	8.8	29.0	51.0	
	M	42.5	41.5 ab	5.1	32.0	47.0	
AST	K	98.0	98.5 c	17.7	78.0	127.0	0.001
	YK	177.5	215.0 a	70.6	155.0	315.0	
	U	157.5	157.2 b	31.1	120.0	212.0	
	Vit C	149.0	162.5 b	50.7	119.0	261.0	
	S	156.5	157.9 b	38.4	116.0	215.0	
	M	178.5	177.0 ab	40.0	115.0	228.0	

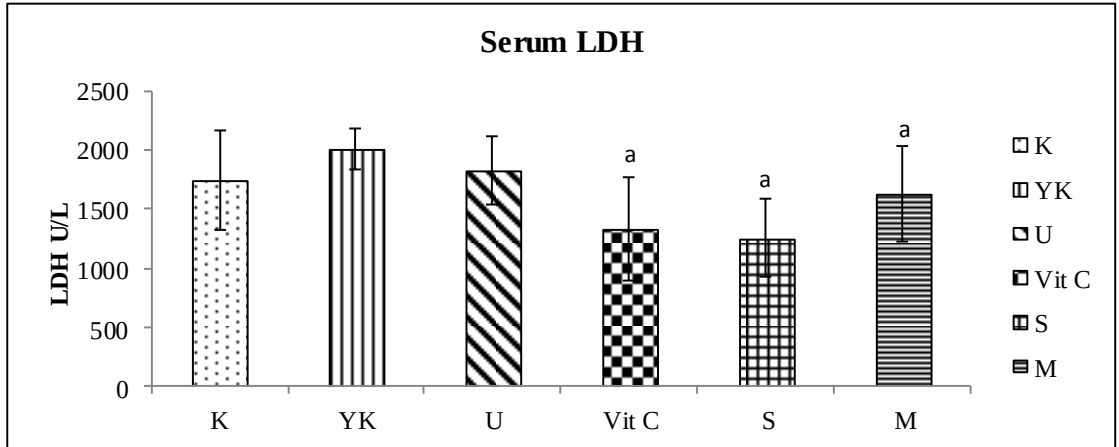
Farklı harfi alan gruplar arası fark anlamlıdır ($p < 0.05$ anlamlı).



Şekil 8. Serum CK düzeylerinin grafiği

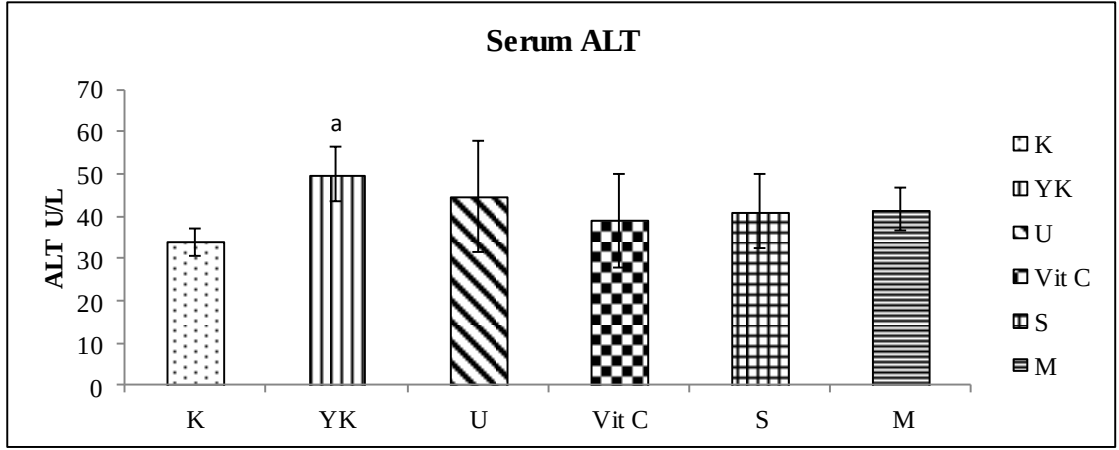
a: K grubuna göre farklılık anlamlıdır.

b: YK grubuna göre farklılık anlamlıdır.



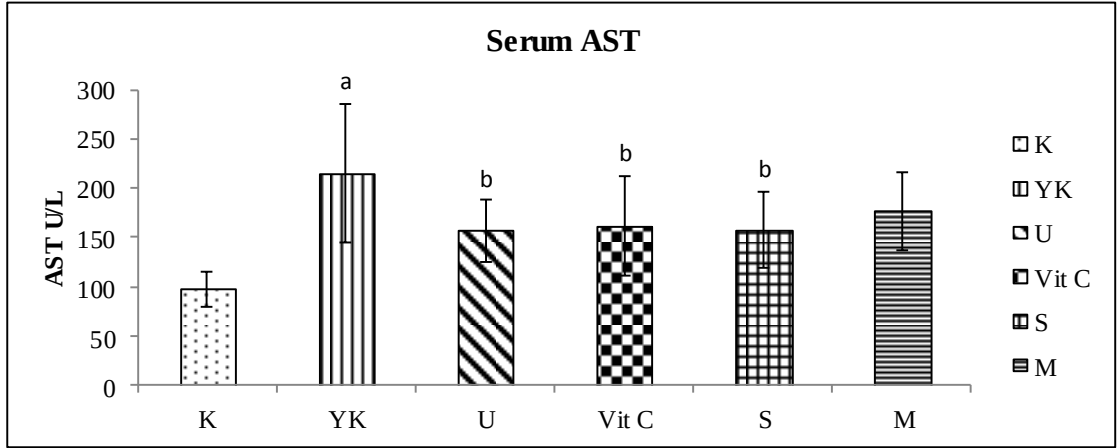
Şekil 9. Serum LDH düzeylerinin grafiği

a: YK grubuna göre farklılık anlamlıdır.



Şekil 10. Serum ALT düzeylerinin grafiği

a: K grubuna göre farklılık anlamlıdır.



Şekil 11. Serum AST düzeylerinin grafiği

a: K grubuna göre farklılık anlamlıdır.

b: YK grubuna göre farklılık anlamlıdır.

4.2. Oksidatif Stres ve Nötrofil İnfiltrasyon Belirteçlerinin Analiz Bulguları

Kas ve kan dokusunda ölçülen TAS, TOS, OSİ oksidatif stres belirteçlerinin; nötrofil infiltrasyon belirteci olan MPO'nun tanımlayıcı istatistikleri ve karşılaştırmalı sonuçları Tablo 4 ve Tablo 5'te verilmiştir.

Tablo 4. Kas dokusunda ölçülen TAS, TOS, OSİ ve MPO sonuçlarının gruplara göre dağılımı ve istatistiksel veriler

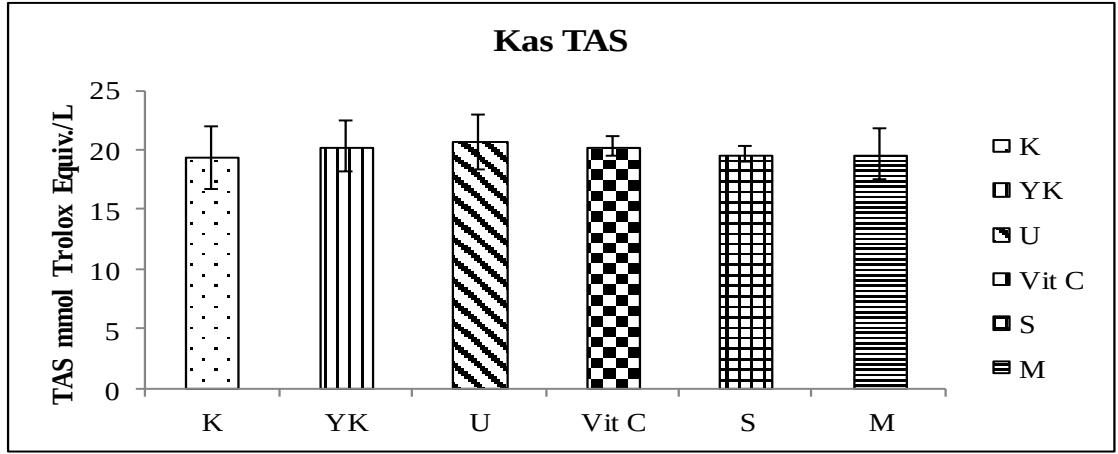
	Grup	Medyan	Ort.	St. Sap.	Min.	Maks.	p.
Kas-TAS	K	18.8	19.3	2.6	16.1	22.9	0.757
	YK	20.5	20.3	2.1	16.1	23.0	
	U	21.0	20.7	2.28	18.0	23.3	
	Vit C	20.0	20.3	0.8	19.5	21.5	
	S	19.7	19.7	0.6	19.1	20.8	
	M	18.9	19.6	2.1	17.9	23.2	
Kas-TOS	K	62.0	60.0 bc	19.9	30.6	87.2	0.002
	YK	58.9	61.9 ab	8.1	53.9	78.2	
	U	62.0	62.2 ab	6.7	53.0	74.6	
	Vit C	70.6	66.3 ab	5.6	61.1	73.7	
	S	49.0	47.9 c	4.5	42.2	54.0	
	M	46.3	47.3 c	6.0	40.4	58.4	
Kas-OSİ	K	3.2	3.1	0.8	1.9	4.7	0.154
	YK	3.1	3.1	0.5	2.6	4.3	
	U	3.0	3.0	0.4	2.5	3.5	
	Vit C	3.5	3.3	0.1	3.1	3.4	
	S	2.1	2.4	0.3	2.0	2.8	
	M	2.0	2.4	0.5	1.9	3.2	
Kas-MPO	K	3.6	3.8	1.2	2.0	5.7	0.385
	YK	4.8	4.4	1.0	3.2	5.6	
	U	3.5	3.9	1.0	2.7	5.4	
	Vit C	4.1	4.4	1.0	3.8	5.7	
	S	3.9	4.2	0.9	3.4	5.7	
	M	4.9	5.0	1.4	3.6	7.2	

Farklı harfi alan gruplar arası fark anlamlıdır (p<0.05 anlamlı).

Tablo 5. Kan dokusunda ölçülen TAS, TOS, OSİ ve MPO sonuçlarının gruplara göre dağılımı ve istatistiksel veriler

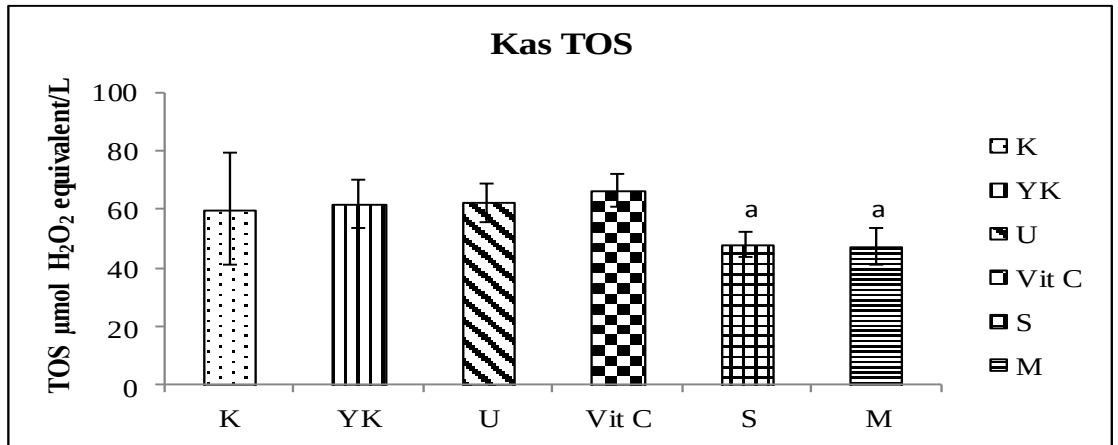
	Grup	Medyan	Ort.	St. Sap.	Min.	Maks.	p.
Kan-MPO	K	98.2	98.5 c	11.8	80.8	116.3	0.001
	YK	115.3	119.4 a	12.6	99.6	136.2	
	U	101.5	103.7 ab	11.3	89.5	117.8	
	Vit C	77.3	73.6 c	8.8	59.4	81.2	
	S	116.2	111.5 ab	19.0	79.3	131.3	
	M	121.2	118.1 a	17.5	84.2	132.8	
Kan-TAS	K	17.6	17.6	2.3	12.9	20.3	0.078
	YK	15.9	16.0	0.9	14.5	17.3	
	U	18.3	18.2	1.2	16.7	20.1	
	Vit C	18.4	17.9	1.9	15.5	19.6	
	S	16.8	17.19	0.9	16.3	18.7	
	M	17.6	17.4	0.6	16.2	17.9	
Kan-TOS	K	176.4	167.8	24.8	131.5	197.7	0.569
	YK	180.9	177.9	19.4	150.6	200.0	
	U	187.6	187.9	46.8	114.6	243.8	
	Vit C	175.3	189.9	41.8	150.6	242.7	
	S	173.6	173.0	30.3	138.2	212.4	
	M	157.9	161.0	26.1	127.0	196.6	
Kan-OSİ	K	8.9	9.7	2.1	7.6	13.8	0.622
	YK	11.7	11.2	1.6	8.7	12.8	
	U	9.9	10.4	2.8	6.8	14.6	
	Vit C	9.5	10.8	3.2	7.7	15.5	
	S	10.4	10.1	1.8	7.5	12.0	
	M	9.0	9.2	1.3	7.3	11.0	

Farklı harfi alan gruplar arası fark anlamlıdır (p<0.05 anlamlı).



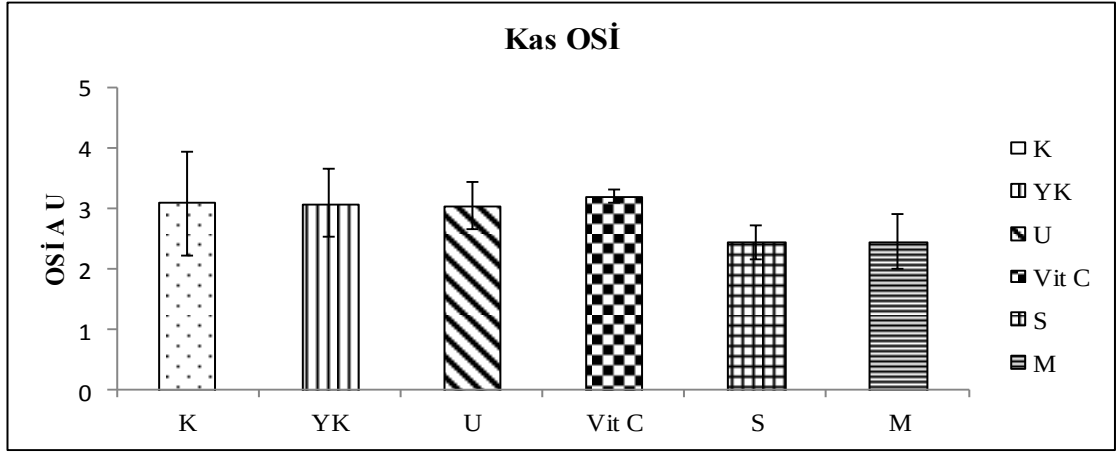
Şekil 12. Kas dokusu TAS sonuçlarının grafiği

Kas dokusunda bakılan TAS ölçüm sonuçlarına göre gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık bulunmamıştır.



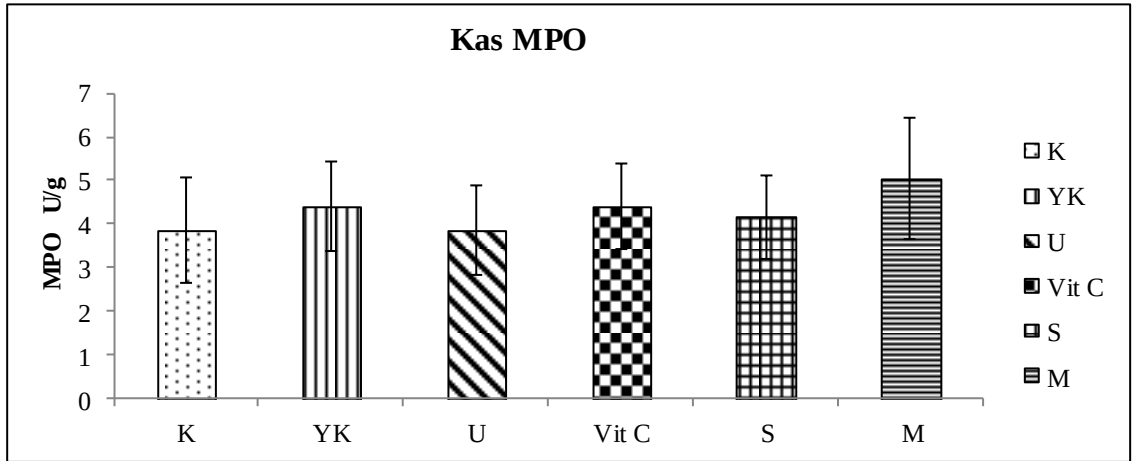
Şekil 13. Kas dokusu TOS sonuçlarının grafiği

a: YK grubuna göre farklılık anlamlıdır.



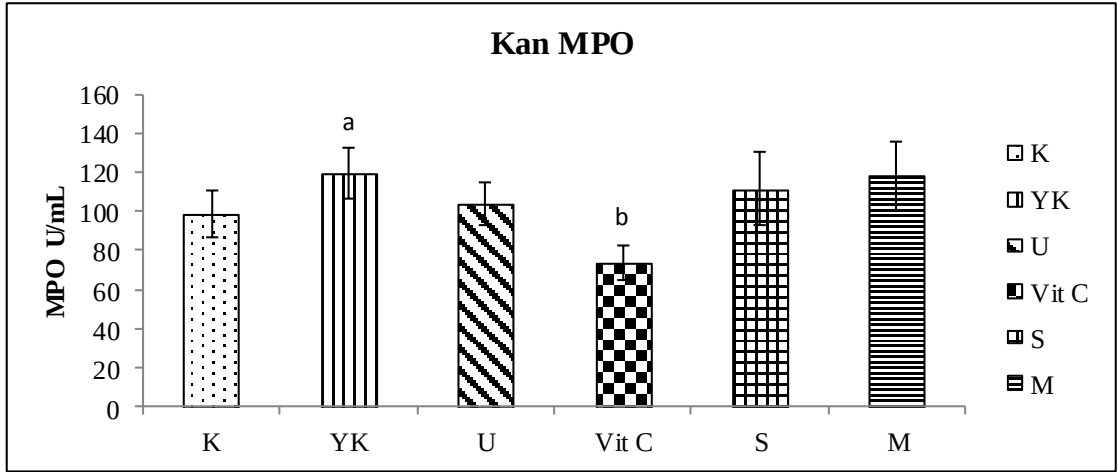
Şekil 14. Kas dokusu OSI değerlerinin grafiği

Kas dokusunda bakılan TAS ölçüm sonuçlarına göre gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık bulunmamıştır.



Şekil 15. Kas dokusu MPO aktivitesinin grafiği

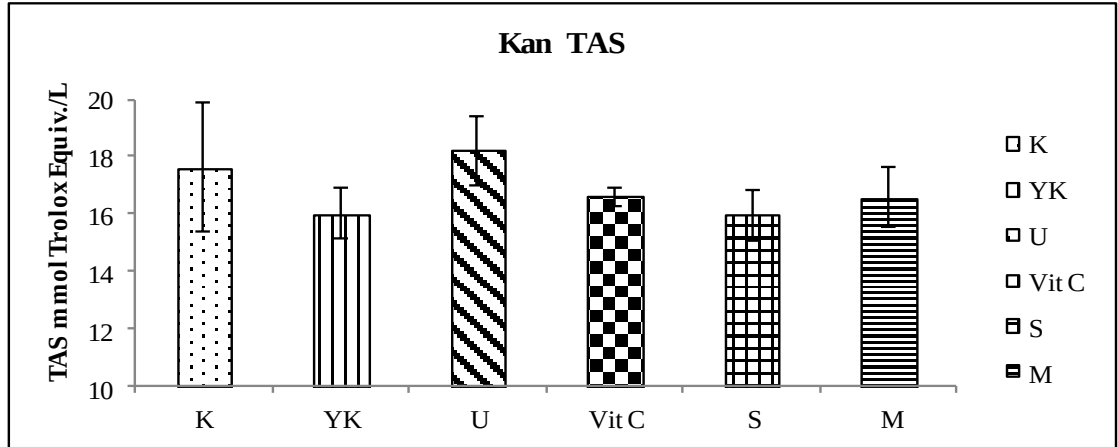
Kas dokusunda bakılan MPO ölçüm sonuçlarına göre gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık bulunmamıştır.



Şekil 16. Kan dokusu MPO aktivitesinin grafiği

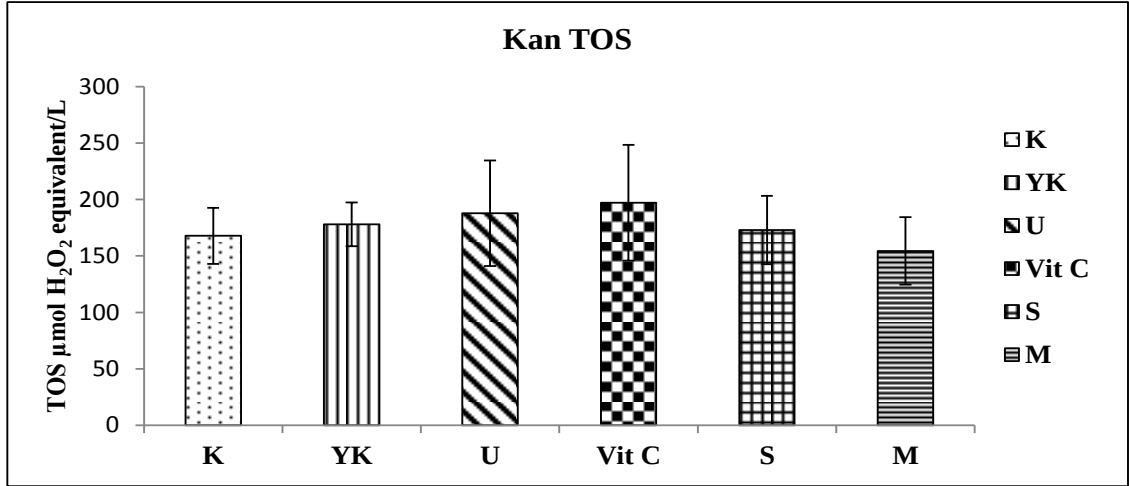
a: K grubuna göre farklılık anlamlıdır.

b: YK grubuna göre farklılık anlamlıdır.



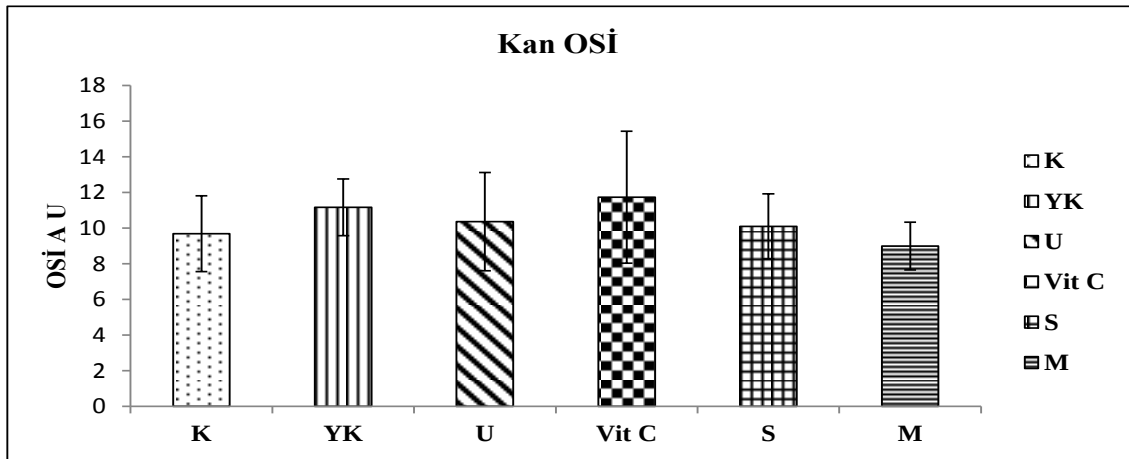
Şekil 17. Kan dokusu TAS sonuçlarının grafiği

Kan dokusunda bakılan TAS ölçüm sonuçlarına göre gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık bulunmamıştır.



Şekil 18. Kan dokusu TOS sonuçlarının grafiği

Kan dokusunda bakılan TOS ölçüm sonuçlarına göre gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık bulunmamıştır.



Şekil 19. Kan dokusu OSI değerlerinin grafiği

Kan dokusunda bakılan OSI ölçüm sonuçlarına göre gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık bulunmamıştır.

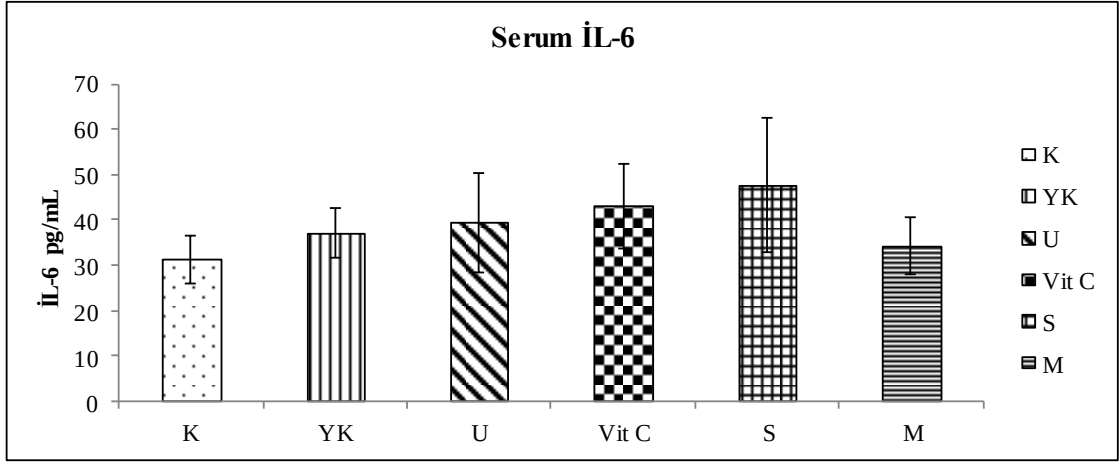
4.3. Serum Sitokinlerinin Analiz Bulguları

Serum İL-6 ve TNF- α sitokinlerinin analizleri ELISA yöntemiyle gerçekleştirilmiştir. Ölçümlerden elde edilen sonuçlar ve karşılaştırmalı istatistikleri Tablo 6’da verilmiştir.

Tablo 6. İL-6 ve TNF- α sitokin sonuçlarının gruplara göre dağılımı ve istatistiksel veriler

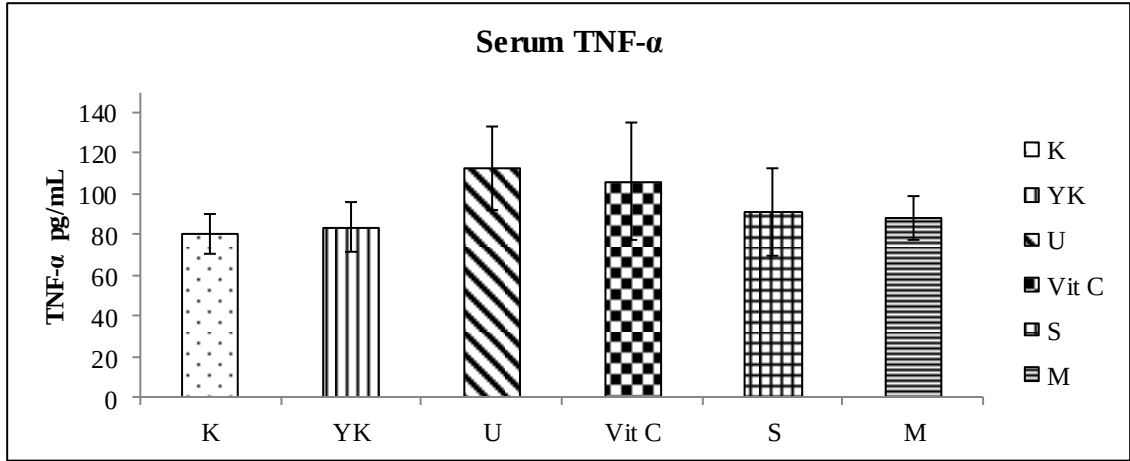
	Grup	Ort.	St. Sap.	Min.	Maks.	p.
İL-6	K	31.3	5.9	27.6	40.1	0.152
	YK	37.2	6.5	29.2	43.2	
	U	39.4	10.9	29.2	56.5	
	Vit C	43.05	9.4	32.5	54.5	
	S	47.6	14.9	25.4	63.5	
	M	34.3	6.5	24.4	40.6	
TNF- α	K	80.6	9.8	72.8	93.1	0.087
	YK	83.8	12.3	71.5	100.7	
	U	114.7	21.9	84.8	139.4	
	Vit C	106.3	28.7	76.9	139.6	
	S	91.1	21.1	71.5	129.9	
	M	88.4	10.7	75.3	103.2	

$p < 0.05$ ise gruplar arası farklılıklar istatistiksel olarak anlamlıdır.



Şekil 20. Serum İL-6 sonuçlarının grafiği

Serumda bakılan İL-6 sitokininin ölçüm sonuçlarına göre gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık bulunmamıştır.

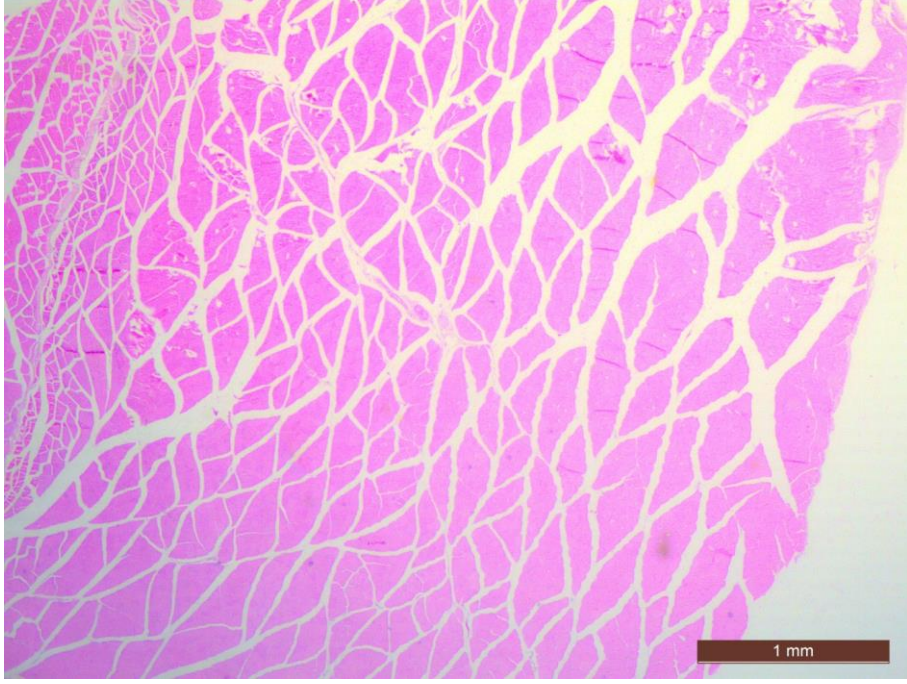


Şekil 21. Serum TNF-α sonuçlarının grafiği

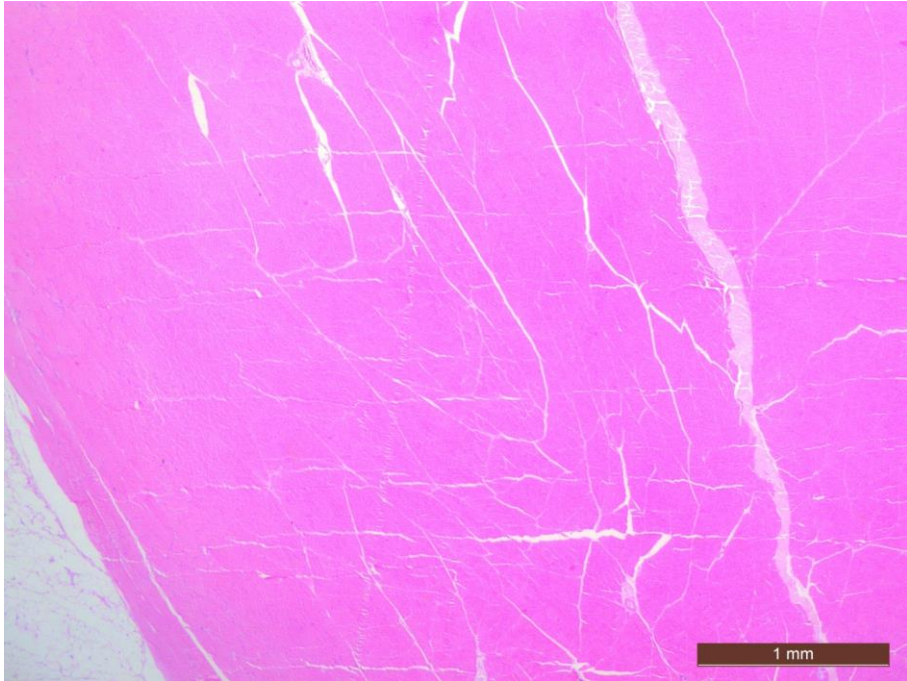
Serumda bakılan TNF-α sitokininin ölçüm sonuçlarına göre gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık bulunmamıştır.

4.4. Histopatolojik Bulgular

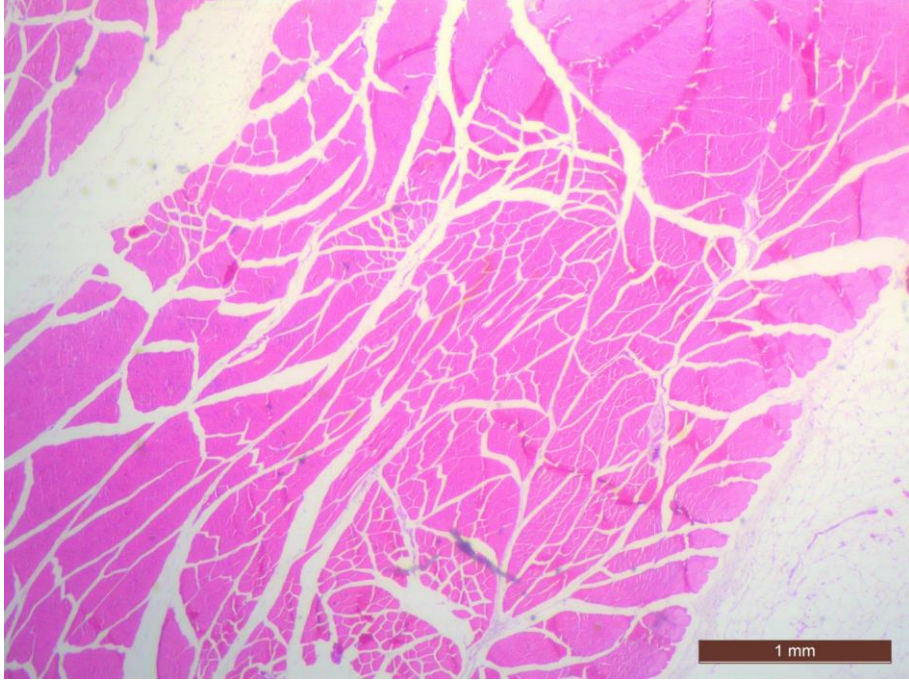
Yapılan mikroskopik incelemede K, YK, U, Vit C, S ve M grupları arasında anlamlı bir farklılık görülmedi. Bütün gruplarda gastrokinemius kasının normal histolojik yapısı gözlemlendi (Şekil 22, 23, 24, 25, 26, 27).



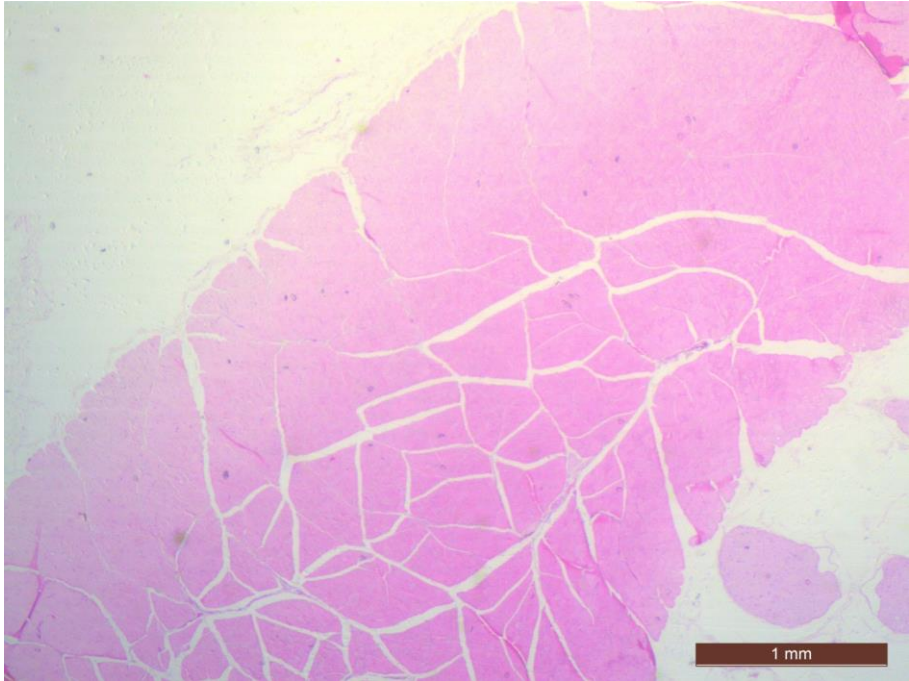
Şekil 22. K grubunda gastrokinemius kasının normal histolojik yapısı (Hx E).
Bar=1mm.



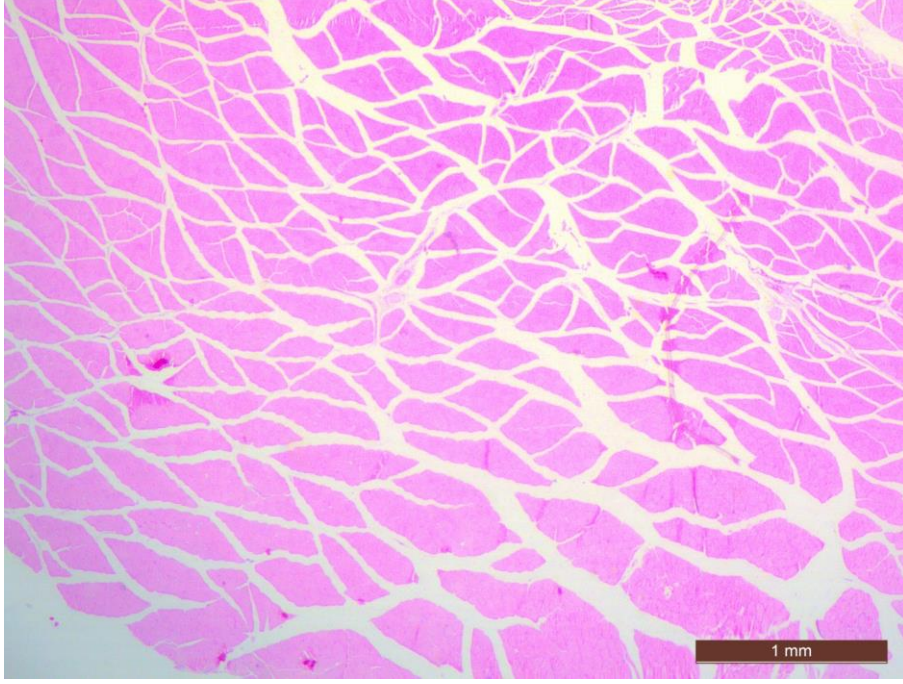
Şekil 23. YK grubunda gastrokinemius kasının normal histolojik yapısı (Hx E).
Bar=1mm.



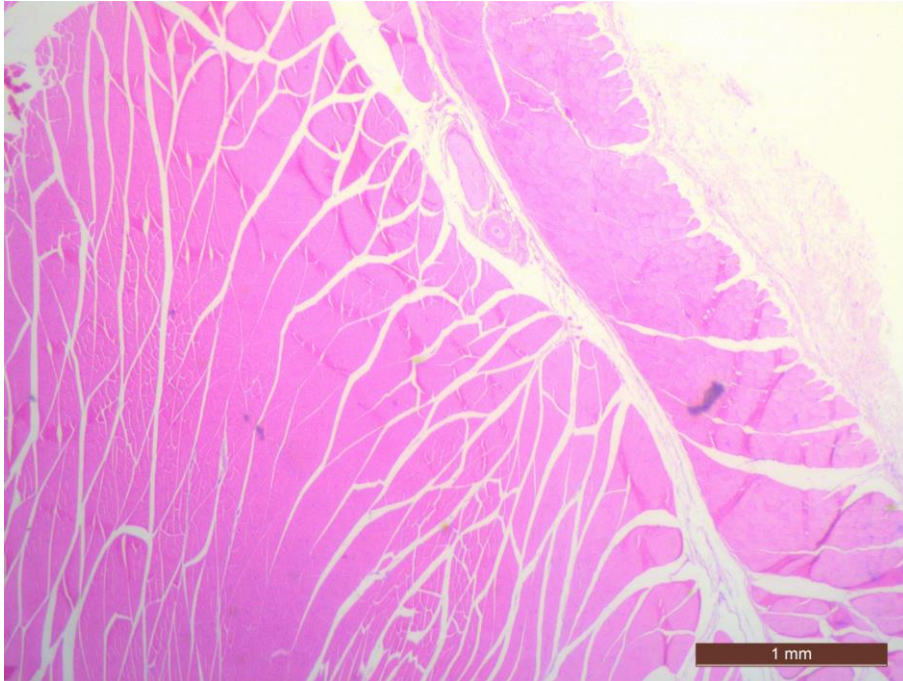
Şekil 24. U grubunda gastrokinemius kasının normal histolojik yapısı (HxE).
Bar=1mm.



Şekil 25. Vit C grubunda gastrokinemius kasının normal histolojik yapısı (HxE).
Bar=1mm.



Şekil 26. S grubunda gastrokinemius kasının normal histolojik yapısı (HxE).
Bar=1mm.



Şekil 27. M grubunda gastrokinemius kasının normal histolojik yapısı (HxE).
Bar=1mm.

5. TARTIŞMA VE SONUÇ

Kas yaralanmaları hem gündelik hayatta hem de spor esnasında sıkça karşılaşılan iskelet sistemi problemlerindendir. Spor yaralanmalarının %10-55 kadarını kas yaralanmaları oluşturur. Kas yaralanmaları fonksiyon bozukluklarına yol açabilir çünkü kasta iyileşme mekanizması yavaştır (Shu ve ark., 2011). Hafif düzeyde kas yaralanmaları tedaviye ihtiyaç kalmadan iyileşebilirken daha ağır yaralanmalar tedaviye gereksinim duyar. Kas yaralanmalarının tedavisinde terapötik ultrason sıkça kullanılmaktadır (Warden, 2003). Yapılan bu çalışmada kas yaralanması oluşturulan sıçanlarda terapötik ultrason tedavisi ve antioksidan etkisi bilinen C vitamini ve selenyum verilmiştir. Verilen bu tedavilerin yalnız ve kombine uygulanmasının birbirlerine, kontrol ve yalnız kesi gruplarına göre etkinlikleri araştırılmıştır. Çalışmada model olarak sıçan tercih edilmesinin nedeni sözkonusu hayvanlarda doku iyileşmesinin çok hızlı olmasının bildirilmesiydi (Van Zutphen ve ark., 2003). Sıçanlarda serum CK, LDH, AST, ALT, İL-6, TNF- α ; kan ve kas dokusu TAS, TOS, MPO, OSİ parametrelerine bakılmış ve bulgular aşağıdaki gibi değerlendirilmiştir.

CK özellikle iskelet kası, kalp kası ve beyinde bulunan bir enzimdir. Beyin içeriğindeki CK, nerdeyse hiçbir zaman kan beyin bariyerini aşarak dolaşıma geçemez. Bu nedenle dolaşımda ölçülen CK düzeyinin kaynağı, iskelet ya da kalp kası ağırlıklıdır. İskelet ya da kalp kası travması ya da nekrozu bu enzimin dolaşım düzeyini yükseltir. Bu nedenle CK düzeyinde yükselme durumlarında, öncelikle iskelet ya da kalp kası harabiyeti aranmalıdır (Lawrence ve Amadeo, 1996; Carl ve Edward, 1999; Acques, 2000). Bu tez çalışmasında sadece kas yaralanması oluşturulan ve herhangi bir tedavi verilmeyen YK grubunda, kesi veya tedavi yapılmayan K grubuna göre serum CK seviyesi anlamlı düzeyde artmıştır (Tablo 3 ve Şekil 8). Bu bulunan sonuç yukarıda verilen literatürle uyumludur. Tedavi verilen bütün gruplarda (U, Vit C, S ve M) ise serum CK seviyeleri yalnız kesi yapılan YK grubuna göre anlamlı olarak azalmıştır (Tablo 3 ve Şekil 8). Yapılan bir çalışmada, Bothrops jararacussu zehiri ile iskelet kası hasarı oluşturulan farelerde ultrason tedavisinin serum CK seviyesini düşürdüğü gösterilmiştir (Saturnino-Oliveira ve ark., 2012). Terapötik ultrason tedavisinin kan akımını hızlandırarak doku iyileşmesini artırdığı bulunmuştur (Alfredson ve ark., 2002). Ayrıca terapötik ultrasonun, uygulanan bölgede intersitisyel sıvının hareketini artıran

mikromasaj etkisi göstererek ödemi azalttığı gösterilmiştir (Alfredson ve ark., 2005). Bu tez çalışmasında, ultrasonun, bu özelliklerine ve yukarıda verilen literatüre dayanılarak, doku iyileşmesini artırıp serum CK seviyesini düşürdüğü ileri sürülebilir. Yapılan çalışmalarda kas hasarı olduğunda, intraselüler oksidan-antioksidan denge bozulduğu ve oksidatif hasarın meydana geldiği gösterilmiştir (Freitas ve ark., 2007; Saborido ve ark., 2011). C vitamini ROT'un zarar verici etkilerini engeller (Akkuş, 1995). Yapılan bir çalışmada, diyafram kasına tekrarlayan miyonekroz oluşturulan farelerde C vitamininin serum CK seviyesini düşürdüğü gözlenmiştir. Bu düşüş C vitamininin antioksidan özelliğinden dolayı ROT'u azaltmasına dayandırılmıştır (Tonon ve ark., 2012). Bu tez çalışmasında C vitamininin serum CK seviyesinin düşürmesi, verilen literatürlerle de uyumlu olarak, C vitamininin antioksidan özelliğinden dolayı ROT'u düşürmesine ve böylece hasarlı dokuların iyileşmesini hızlandırmasına bağlanabilir. Selenyum, glutatyon peroksidaz enziminin yapısında bulunur. Glutatyon peroksidaz ise oksidatif hasarın azalması veya önlenmesinde rol oynar. Ayrıca selenyum eksikliğinde serbest radikallerin birikimine bağlı hücre membranlarında hasar meydana gelir (Âdemoğlu ve Gürdal, 2006). Kas hastalığı olan Steinert hastalığıyla ilgili bir çalışmada, selenyumun serum CK seviyelerini düşürdüğü ve kas hasarını azalttığı öne sürülmüştür (Rossi ve ark., 1990). Bu tez çalışmasında, selenyumun antioksidan mekanizmasındaki önemli etkisinden dolayı ROT'un azaltılmasını sağladığı ve hasarlı dokuların iyileşmesine katkıda bulunarak serum CK seviyesini düşürdüğü söylenebilir. Vit C grubunda S grubuna göre serum CK seviyesinde anlamlı bir düşme görülmektedir. Bu bulguya dayanarak serum CK'yı düşürmede C vitamininin selenyuma göre daha etkili olduğu düşünülebilir. Ayrıca Vit C grubunda serum CK seviyesi K grubuna göre anlamlı olarak daha düşüktür. C vitamini de verilen M grubunda da serum CK seviyesi K grubuna göre düşüktür ancak istatistiksel olarak anlamlı değildir. Yapılan bir çalışmada, C vitamininin endotel hücrelerinin geçirgenliğini azaltarak endotel bariyer fonksiyonunu iyileştirdiği savunulmaktadır (May ve Qu, 2010). Bu tez çalışmasında, verilen literatür bilgisine dayanılarak, C vitamininin serum CK seviyesini kontrol grubunun da aşağısına çekmesinin nedeni, C vitamininin hücre membran geçirgenliğini azaltarak serum CK seviyesini düşürmesine bağlanabilir.

LDH dolaşımında, LDH 1, 2, 3, 4 ve 5 olarak adlandırılan 5 izoenzimi bulunur. İzoenzimlerinin yaygın doku dağılımı nedeniyle, birçok doku ve organ hastalığında total LDH aktivitesi yükselir. Akut kas hasarında da LDH seviyesinin yükselmektedir

(Acques, 2000; John, 2001). Bu tez çalışmasında LDH seviyeleri için YK grubunda K grubuna göre artma vardır ancak istatistiksel olarak anlamlı değildir. Vit C, S ve M tedavi gruplarında YK grubuna göre LDH seviyelerinde istatistiksel olarak anlamlı düşme vardır (Tablo 3 ve Şekil 9). Ethanol ile indüklenen karaciğer hasarı oluşturulan bir çalışmada vitamin E, C ve selenyum kombinasyonunun serum LDH seviyesini düşürdüğü gösterilmiştir. Bu tez çalışmasında da C vitamini ve selenyumun antioksidan özelliklerinden dolayı ROT'u azaltarak hasarlı dokuların iyileşmesine katkıda bulunup serum LDH seviyesini düşürdüğü söylenebilir. S grubunda ise K grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı bir düşme vardır (Tablo 3 ve Şekil 9). Yapılan bir çalışmada selenyumun kolorektal hücrelerde membran stabilitesini artırdığı gösterilmiştir (Ghadi ve ark., 2012). Bu tez çalışmasında da selenyumun antioksidan özelliğinden dolayı membran stabilitesini artırarak serum LDH seviyesini kontrol grubuna göre daha düşük düzeylerde tuttuğu düşünülebilir.

ALT, daha çok karaciğer hasarını göstermek için kullanılan bir enzim olsa da kas hasarında da artan bir enzimdir (Lawrence ve Amadeo, 1996; Acques, 2000). Verilen literatürle uyumlu olarak bu tez çalışmasında da serum ALT seviyesi K grubuna göre YK grubunda anlamlı olarak artmıştır (Tablo 3 ve Şekil 10). Tedavi gruplarının hepsinde YK grubuna göre bir düşme vardır ancak istatistiksel olarak anlamlı değildir. Ultrasonun kan akımını hızlandırarak doku iyileşmesini artırması (Alfredson ve ark., 2002), C vitamini ve selenyum gibi antioksidanların ise ROT'u azaltarak (Akkuş, 1995) dokuların iyileşmesini katkıda bulunup serum ALT seviyelerini düşürdüğü söylenebilir.

AST enzimi de daha çok karaciğer hasarını göstermek için kullanılsa da kas distrofileri, intramüsküler enjeksiyonlar ve kas travması gibi durumlarda artabilmektedir (Lawrence ve Amadeo, 1996; Acques, 2000; John, 2012). Bu çalışmada AST düzeyi YK grubunda K grubuna göre anlamlı düzeyde artmıştır. M grubu hariç diğer tedavi gruplarında ise YK grubuna göre anlamlı düzeyde düşme görülmektedir (Tablo 3 ve şekil 11). U grubuna verdiğimiz terapötik ultrason tedavisinin kan akımını hızlandırarak doku iyileşmesini artırdığı bulunmuştur (Alfredson ve ark., 2002). Başka bir çalışmada ultrasonun, uygulanan bölgede intersitisyel sıvının hareketini artıran mikromasaj etkisi göstererek ödemi azalttığı gösterilmiştir (Alfredson ve ark., 2005). Kas yaralanması oluşturulmuş sıçanlarda ultrason tedavisinin serum CK seviyesini düşürdüğü

gözlemlenmiştir (Freitas, 2007) ancak serum AST düzeyine bakılmamıştır. Bu çalışmada, ultrason tedavisinin bu özellikleri sayesinde serum AST seviyesini düşürdüğü söylenebilir. Ethanol ile indüklenen karaciğer hasarı oluşturulan bir çalışmada vitamin E, C ve selenyum kombinasyonunun serum AST seviyesini düşürdüğü gösterilmiştir. Bu tez çalışmasında da C vitamini ve selenyumun antioksidan özelliklerinden dolayı ROT'un azaltılmasına ve hasarlı dokuların iyileşmesine katkıda bulunarak serum AST seviyesini azalttığı düşünülebilir. M grubuna verdiğimiz kombine tedavi de serum AST düzeyini YK grubuna göre düşürmüştür ancak istatistiksel olarak anlamlı değildir. Bu bulguya göre miks tedavinin serum AST düzeyini düşürmede çok etkin olmadığı söylenebilir.

MPO enzimi nötrofillerdeki sitoplazmik granüllerde bol miktarda bulunmaktadır. Bu enzim nötrofil aktivasyonu esnasında ekstrasellüler alana salınır ve H₂O₂'yi hipoklorik asite dönüştürür. MPO, enfeksiyon ve/veya enflamasyonun modülasyonunda kritik bir enzimdir. Çünkü nötrofillerin hem mikrobisidal hem de proinflatuvar aktivitesi ile ilişkilidir (Reynolds ve ark., 2006). Kas yaralanması oluşturulan bir çalışmada nötrofil infiltrasyonunu değerlendirmek için MPO enzim tayini yöntemini önermişlerdir (Schneider ve Tidus, 2007). Bu tez çalışmasında K grubuna göre YK grubunda, kan dokusu MPO enzim aktivitesi anlamlı olarak yükselmiştir. Tedavi gruplarından sadece Vit C grubunda kan dokusu MPO enzim aktivitesi YK grubuna göre anlamlı olarak düşmüştür. Diğer tedavi gruplarında da YK grubuna göre düşme vardır ancak istatistiksel olarak anlamlı değildir (Tablo 5 ve Şekil 16). MPO, enflamasyon bölgesine kemotaksis ile gelen nötrofillerin aktivasyonu sonucu artan bir enzimdir. Bu tez çalışmasında, C vitamininin kan MPO enzim aktivitesini düşürmesi, kas hasarıyla artmış olan ROT'un (Saborido ve ark., 2011) oluşturduğu hücre hasarı ve enflamasyonun zarar verici etkilerinin C vitamini tarafından engellemesi (Akkuş, 1995) ile açıklanabilir. İskelet kasına iskemi-reperfüzyon hasarı yapılan bir çalışmada, oral C vitamini alımının, nötrofiller tarafından üretilen ROT'u azaltarak nötrofil infiltrasyonunu düşürdüğü ileri sürülmüştür (Kearns ve ark., 2001). Verilen literatür bilgisi bu tez çalışmasındaki bulguları desteklemektedir. Kan dokusu MPO enzim aktivitesinde gruplar arası değişiklikler istatistiksel olarak anlamlıdır (Tablo 5 ve Şekil 16). Ancak kas dokusu MPO enzim aktivitesindeki gruplar arası değişiklikler anlamlı değildir (Tablo 4 ve Şekil 15). Bu farklılığın olası nedeni şöyle açıklanabilir; antioksidanlar, hücre membran bütünlüğünü artırarak (Qiao ve ark., 1993; Kearns ve ark., 2010) yaralanmış kas

dokusunda iyileşmenin uyarılmasını sağlayabilir. İyileşmenin artmasıyla bu hücrelere gelen nötrofil sayısı da azalır. Ancak kandaki nötrofil sayılarındaki düşme kas dokusundakiyle zamanlama açısından uyum göstermeyebilir ve kan dokusundaki düşmeler kas dokusuna göre daha uzun sürebilir. Yapılan bir çalışmada, eğitilmiş ve eğitimsiz sıçanlara yüksek yoğunlukta yüzme egzersizi yaptırılarak kas hasarı oluşturulmuştur. Eğitilmiş sıçanlarda plazma MPO enzim aktivitesi eğitimsiz sıçanlara göre anlamlı olarak düşük bulunmuştur. Ancak kas dokusundaki MPO aktivitesinde gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlılık bulunmamıştır (Morozov ve ark., 2006). Örnek verilen literatürdeki bulgular da bu tez çalışmasındaki bulguları desteklemektedir.

Bu tez çalışmasında, kas dokusunda bakılan TAS (Tablo 4 ve Şekil 12) ve kan dokusunda bakılan TAS (Tablo 5 ve Şekil 17) ölçüm sonuçlarında istatistiksel olarak bir farklılık bulunmamıştır. Kas dokusunda bakılan OSİ ölçüm sonuçlarında istatistiksel olarak anlamlılık olmamasına karşın S ve M gruplarında fark edilir bir şekilde düşme görülmüştür (Tablo 4 ve Şekil 14). Kan OSİ sonuçlarında da S ve M gruplarında düşme görülmüştür (Tablo 5 ve Şekil 19). OSİ sonuçlarındaki bu düşme TOS'un bu gruplarda azalmasından kaynaklanmaktadır. Kas dokusunda bakılan TOS ölçüm sonuçlarında ise S ve M gruplarında YK grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı bir düşme görülmüştür (Tablo 4 ve Şekil 13). Selenyum, serbest radikallerin üretimini önlemek için gerekli olan, doymamış yağ asitlerinden türeyen peroksitleri yok ettiği düşünülen glutatyon peroksidaz enzim aktivitesinin sağlanması için önemli bir kofaktördür (Fox, 1992). Yapılan bir çalışmada selenyumun glutatyon peroksidaz gibi bazı enzimatik antioksidanların aktivitesini artırarak ROT'u azalttığı bulunmuştur (Wojewoda ve ark., 2010). Başka bir çalışmada selenyumun henüz bilinmeyen bir fizyolojik fonksiyonu sayesinde kas dokusunda oksidatif stresi azalttığı ileri sürülmektedir (Betancor ve ark., 2012). Bu tez çalışmasında da selenyumun kas dokusundaki oksidatif hasarı azaltarak TOS'ta azalma sağladığı düşünülebilir. Kan dokusu TOS ölçüm sonuçlarında da S ve M gruplarında YK grubuna göre düşme görülmüştür. Bu düşüş kas dokusu TOS ölçüm seviyeleri ile uyumludur ancak istatistiksel olarak anlamlı değildir (Tablo 4 ve Şekil 13).

Bu tez çalışmasında yapılan histopatolojik incelemede gruplar arasında anlamlı farklılıklara rastlanmamıştır (Şekil 22-23-24-25-26-27). Bu çalışmada örnek alınan kas yaralanma modelinde (Chan ve ark., 2003) oluşturulan kesinin bistüri ile düzgün ve kas

liflerinin uzunlamasına yapılması ayrıca sakrifikasyon işleminin yaralanmayı takip eden 6. günde yapılması dokuların büyük oranda iyileşmesine olanak sağlamıştır. Bu bulgu histopatolojik incelemede gruplar arasında anlamlı farklılık olmamasının nedeni olarak açıklanabilir.

Yapılan bazı çalışmalarda, egzersizle indüklenen kas hasarında İL-6'nın (Choi ve ark. 2013) ve TNF- α 'nın (Enos ve ark., 2013) arttığı gösterilmiştir. Yapılan çalışmalar dikkate alındığında kas hasarı sonrası enflamasyonun artmasıyla birlikte İL-6 ve TNF- α 'nın artması beklenmektedir. Bu tez çalışmasında yapılan kas yaralanmasında, kontrol grubuna göre kesi yapılan gruplarda İL-6 ve TNF- α sitokinlerinde artış vardır ancak istatistiksel olarak anlamlılık bulunmamıştır (Tablo 6, Şekil 20-21). TNF- α ve İL-6 sitokinlerinin istatistiksel olarak anlamsız çıkmasının nedeni, sakrifikasyon işleminin kas yaralanmasının 6. gününde yapılması ve sıçanların metabolizmalarının çok hızlı olması (Van Zutphen ve ark., 2003) nedeniyle bu süre içinde sıçanların büyük oranda iyileşerek gruplar arası farklılığın ortadan kalkması olarak açıklanabilir.

Bu tez çalışmasında histopatolojik incelemenin, kas dokusunda ölçülen MPO enzim aktivitesinin ve TNF- α , İL-6 sitokinlerinin ölçümlerinin istatistiksel olarak anlamsız olması birbirini destekleyen bulgulardır. Bu çalışmadaki sonuçlara bakıldığında, 6 gün içerisinde, yaralanmış kas dokusu seviyesinde önemli düzeyde iyileşmenin olduğu söylenebilir.

Sonuç olarak, bu çalışma ultrason tedavisinin dışında vitamin C ve selenyum tedavilerinin de kas yaralanmalarında faydalı olduğunu ortaya çıkarmıştır. Burada elde edilen bulguların desteklenmesi için daha ileri çalışmalara ihtiyaç vardır.

ÖZET

Tat MN. Sıçanlarda oluşturulan kas yaralanmasında yalnız ve kombine uygulanan vitamin C, selenyum ve terapötik ultrason tedavisinin biyokimyasal ve histopatolojik etkilerinin araştırılması. Yüzüncü Yıl Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Fizyoloji Anabilim Dalı Yüksek Lisans Tezi, Van, 2013. Kas yaralanmaları sıklıkla görülen yumuşak doku yaralanmalarıdır. Kas yaralanmaları sunucunda oksidatif hasarın arttığı bildirilmektedir. Terapötik ultrason tedavisi bu tür yaralanmalarda sıklıkla uygulanmaktadır. Bu çalışmada, deneysel olarak oluşturulan kas yaralanmasında ultrason tedavisi ile bazı antioksidan maddelerin tedavi etkinliği karşılaştırıldı. Bu amaçla bazı serum enzimleri, oksidatif stres belirteçleri, nötrofil infiltrasyon belirteci olan miyeloperoksidaz (MPO) aktivitesi, enflamasyon belirteci olarak interlökin-6 ve tümör nekroz faktör- α ölçülmesinin yanısıra histolojik inceleme gerçekleştirildi. Herbiri altı adet Wistar türü albino erkek sıçandan oluşan toplam 6 grup oluşturuldu. Bu gruplar kontrol (K), yalnız kesi (YK), ultrason (U), vitamin C (Vit C), selenyum (S) ve miks (M) olarak isimlendirildi. K grubu dışındaki bütün hayvanlarda gastrocnemius kasının kesilmesi yoluyla kas yaralanması oluşturuldu. YK grubundaki sıçanlara tedavi uygulanmadı. Geriye kalan 4 gruptaki hayvanlara ise yaralanma oluşturulduktan 24 saat sonra 2 günde bir toplam 3 defa tedavi uygulandı. Bu gruplardaki sıçanlara terapötik ultrason tedavisi, vitamin C, selenyum veya bunların kombine olarak verilmesi uygulandı. Altıncı günde bütün hayvanlar sakrifiye edildi. Biyokimyasal ve histolojik analizler için kan ve kas dokuları alındı. Yalnız kesi grubu serum enzimleri yönünden kontrol grubu ile kıyaslandığında CK, AST ve ALT aktivitesinde istatistiksel olarak anlamlı ($p<0.05$) artışlar görülürken LDH'da görülen yükselme anlamlı değildi. Neredeyse bütün tedavi gruplarında CK, ALT ve AST seviyesi kontrol grubuna anlamlı olarak yaklaşırken ($p<0.05$), LDH seviyesindeki düşüşler anlamlı değildi. Hem kan hem de kas dokusunda gerçekleştirilen biyokimyasal analizlerin çoğunun gruplardaki değişimi birbirine paraleldi. Gruplardaki total antioksidan seviye (TAS)'deki değişimlerin anlamsız olduğu görüldü. Total oksidan seviye (TOS) ve oksidatif stres indeksi (OSİ)'nin yalnız kesi grubunda arttığı, tedavi gruplarından S ve M'de ise azaldığı görüldü. Ancak değişimlerden sadece kas dokusunda bakılan TOS'un tedavi gruplarındaki düşüşünün istatistiksel olarak anlamlı olduğu bulundu ($p<0.05$). MPO aktivitesi yalnız kesi grubunda artmış, tedavi gruplarının neredeyse hepsinde azaltılmıştır. Bununla beraber sadece kan dokusu MPO enzim aktivitesinde, YK grubundaki artış ve tedavi gruplarından Vit C grubundandaki azalış istatistiksel olarak anlamlıydı ($p<0.05$). Serum enflamasyon belirteçlerinin (İL-6 ve TNF- α) değişimi ile histolojik bulgular incelendiğinde ise gruplar arasında önemli bir fark olmadığı görülmüştür. Bu çalışma ultrason tedavisinin dışında vitamin C ve selenyum tedavilerinin de kas yaralanmasında faydalı olduğunu ortaya çıkarmıştır. Burada elde edilen bulguların desteklenmesi için daha ileri çalışmalara ihtiyaç vardır.

Anahtar sözcükler: Sıçan, Kas Yaralanması, Terapötik Ultrason, Vitamin C, Selenyum, Oksidatif Stres.

SUMMARY

Tat MN. Investigation of biochemical and histopathological effects of vitamin C, selenium and therapeutical ultrasound application on muscular injury formed in rats. Yuzuncu Yıl University Health Science Institute, Department of Physiology, Van-Turkey. The muscular injury is an soft tissue injury type which occurs frequently. The increased oxidative damage has been reported after muscular injury. Therapeutic ultrasound is frequently applied in such injuries. In this study, the efficiency of therapeutic ultrasound treatment and various antioxidant substances was compared in experimental muscular injury. For this purpose some serum enzymes, oxidative stress biomarkers, myeloperoxidase (MPO) activity (neutrophil infiltration index), inflammation markers such as interleukin-6 (IL-6) and tumor necrosis factor- α (TNF- α) were evaluated together with histopathological examination. Six groups each enclosing 6 Wistar albino male rats were constituted. These groups were control, only injury (OI), ultrasound (U), vitamin C (Vit C), selenium (S) and mix (M). The muscle injury was formed in all groups except those of control through laceration of gastrocnemius muscle. No treatment was performed in OI group. Treatment was applied three times every other day after 24 hours of injury in remaining four groups. Therapeutic ultrasound, vitamin C, selenium and combination of them was applied respectively to the rats of these groups. All the rats were sacrificed in the sixth day. Blood and tissue samples were obtained for biochemical and histological analyses. While OI group compared to control in terms of serum enzymes, significant ($p<0.05$) elevations of CK, AST and ALT as well as slight increase of LDH was observed. CK, ALT and AST levels reversed to control values in almost all treatment groups ($p<0.05$) as well as slight decrease of LDH was observed. Alterations of biochemical analyzes were parallel to each other in all groups both in muscle tissue and blood. The shifts in total antioxidant level were insignificant. Total oxidant status (TOS) and oxidative stress index (OSI) increased in OI group and it decreased in S and M. However; among these alterations only TOS in muscle tissue was found to be statistically significant ($p<0.05$). While MPO activity increased in OI group, it decreased almost in the treatment groups. However only the increase on MPO in the blood tissues of OI group and the decrease in Vit C group were statistically significant ($p<0.05$). There were not any marked alteration between groups in terms of serum inflammation markers (IL-6 and TNF- α) and histological findings. In conclusion results of this study revealed that apart from therapeutic ultrasound treatment, supplementation of vitamin C and selenium may also be useful in the treatment of muscular injury. However further studies are needed to support these results.

Key words: Rats, Muscular injury, Therapeutic ultrasound, Vitamin C, Selenium, Oxidative stress.

KAYNAKLAR

- Aarimaa V, Rantanen J, Best T, Schultz E, Corr D, Kalimo H (2004). Mild eccentric stretch injury in skeletal muscle causes transient effects on tensile load and cell proliferation. *Scand J Med Sci Sports*, 14, 6, 367-72.
- Abul KA, Lichtman HA, Pober J (2000). Cytokines. *Cell Mol Immunol*, 235-269.
- Acques W (2000). Interpretation of Diagnostic Tests, Seventh edition, New York.
- Ademoğlu E, Gürdal F (2006). Biyokimya: Eser ve Ultraeser Elementler. 2. Baskı, Güven Yayınevi, İstanbul.
- Agar NS, Sadrzadeh SM, Hallaway PE, Eaton JW (1986). Erythrocyte catalase. A somatic oxidant defense. *J Clin Invest*, 77, 319-321.
- Agrawal A, Chandra D, Kale RK (2001). Radiation induced oxidative stress: II Studies in liver as adistant organ of tumor bearing mice. *Mol Cell Biochem*, 224, 1-2.
- Akkuş İ (1995). Serbest Radikaller ve Fizyopatolojik Etkileri, 1. baskı. Konya, Mimoza Yayınları, 1-132.
- Aksoy M (2000). Beslenme Biyokimyası 1. Hatipoğlu Yayınevi, Ankara, 622.
- Alfredson H (2005). The chronic painful Achilles and patellar tendon: research on basic biology and treatment. *Scand J Med Sci Sports*, 15, 252-259.
- Alfredson H, Bjur D, Thorsen K, Lorentzon R (2002). High intratendinous lactate levels in painful chronic Achilles tendinosis. An investigation using microdialysis technique. *J Orthop Res*, 20, 934-938.
- Allikian MJ, Hack AA, Mewborn S, Mayer U, McNally EM (2004). Genetic compensation for sarcoglycan loss by integrin alpha7 beta1 in muscle. *J Cell Sci*, Aug 1, 117, 3821-30.
- Anderson JE (2000). A role for nitric oxide in muscle repair: Nitric oxide-mediated activation of muscle satellite cells. *Molecular Biology of the Cell*, 11, 1859-1874.
- Appell HJ (1986). Skeletal muscle atrophy during immobilization. *Int J Sports Med*, 7, 1, 1-5.
- Aruoma OI (1998). Free radicals, oxidative stress, and antioxidants in human health and disease. *Am Oil Chemists Soc*, 75, 199-212.
- Aspelin P, Ekberg O, Thorsson O, Wilhelmsson M, Westlin N (1992). Ultrasound examination of soft tissue injury of the lower limb in athletes. *Am J Sports Med*, 20, 5, 601-3.
- Åström M, Westlin N (1992). No effect of piroxicam on Achilles tendinopathy. A randomized study of 70 patients. *Acta Orthop Scand*, 63, 631-634.
- Ayçiçek A, Erel Ö, Koçyiğit A (2005). Increased oxidative stress in infants exposed to passive smoking. *Eur J Pediatr*, 164, 775-778.

- Aydın GC (2010). Tavşanlarda Oluşturulan Kontüzyonel Kas Yaralanmasında Trombositten Zenginleştirilmiş Plazma (Tzp) Uygulamasının İyileşme Üzerine Etkisi. Süleyman Demirel Üniversitesi Tıp Fakültesi, Spor Hekimliği Anabilim Dalı, Uzmanlık Tezi, 80 s.
- Balkwill F (2000). Transgenic and knockout mice in cytokine research. *Cytokine Molecular Biology*, 186.
- Barbor DA, Harris SR (1994). Oxygen free radicals and antioxidants: A review. *Am Pharmacy*, 34, 9, 26-35.
- Basford JR (1998). Physical Agents. In: DeLisa JA, Gans Bm (eds), *Rehabilitation Medicine Principles and Practice* (3rd ed). Lippincott- Raven Publishers, Philadelphia, 488–499.
- Bekercioğlu M, Uğraş S, Dilek ON, Tercan M, Özyazgan İ (1998). Serbest radikaller; temel görüşler, biyokimyası, fizyopatolojisi ve cerrahi ile ilgileri. *Sendrom*, 10, 3, 85-95.
- Best TM, Hunter KD (2000). Muscle injury and repair. *Phys Med Rehabil Clin N Am*, 11, 2, 251-66.
- Best TM, Shehadeh SE, Levenson G, Michel JT, Corr DT, Aeschlimann D (2001). Analysis of changes in mRNA levels of myoblast- and fibroblast-derived gene products in healing skeletal muscle using quantitative reverse transcription-polymerase chain reaction. *J Orthop Res*, 19, 4, 565-72.
- Betancor MB, Caballero MJ, Terova G, Saleh R, Atalah E, Benítez-Santana T, Bell JG, Izquierdo M (2012). Selenium inclusion decreases oxidative stress indicators and muscle injuries in sea bass larvae fed high-DHA microdiets. *Br J Nutr*, 108, 12, 2115-2128.
- Binder A, Hodge G, Greenwood AM, Hazleman BL (1985). Is therapeutic ultrasound effective in treating soft tissue lesions. *British Medical Journal*, 290, 512–514.
- Bishop ML, Janet LP (1996). *Free Radicals in Clinical Chemistry: Principles, Procedures, Correlations*. 3rd ed. Philadelphia, New York, 765-777.
- Bjur D, Alfredson H, Forsgren S (2005). The innervation pattern of the human Achilles tendon studies on the normal and tendinosis tendon using markers for generally, sensory and sympathetic innervations. *Cell Tiss Res*, 320, 201–206.
- Bölükbaş C, Bölükbaş FF, Horoz M, Aslan M, Çelik E, Erel Ö (2005). Increased oxidative stress associated with the severity of the liver disease in various forms of hepatitis B virus infection. *BMC Infect Dis*, 31, 5, 95.
- Bradley P, Priebat DA, Christensen RD, Rothstein G (1982). Measurement of cutaneous inflammation: estimation of neutrophil content with an enzyme marker. *J Invest Dermatol*, 78, 206-209.
- Brickson S, Hollander J, Corr DT, Ji LL, Best TM (2001). Oxidant production and immune response after stretch injury in skeletal muscle. *Med Sci Sports Exerc*, 33, 12, 2010-2015.

- Brickson S, Ji LL, Schell K, Olabisi R, St Pierre Schneider B, Best TM (2003). M1/70 attenuates blood-borne neutrophil oxidants, activation, and myofiber damage following stretch injury. *J Appl Physiol*, 95, 3, 969-976.
- Burkin DJ, Kaufman SJ (1999). The $\alpha 7 \beta 1$ integrin in muscle development and disease. *Cell Tissue Res*, 296, 1, 183-190.
- Byl N, Cameron M, Kloth LC (1995). Treatment and prevention: goals and objectives. In: Myers RS (ed), *Saunders Manual of Physical Therapy Practice*. WB Saunders, Philadelphia, 630-635.
- Cannon JG, St Pierre BA (1998). Cytokines in exertion-induced skeletal muscle injury. *Mol Cell Biochem*, 179, 1-2, 159-167.
- Carl AB, Edward RA (1999). *Tietz Textbook of Clinical Chemistry*. 3rd ed., London.
- Carlsted CA, Madsen K, Wredmark T (1986a). The influence of indomethazin on collagen synthesis during tendon healing in the rabbit. *Prostaglandins*, 32, 3, 335-358.
- Carlsted CA, Madsen K, Wredmark T (1986b). The influence of indomethazin on tendon healing. A biomechanical and biochemical study. *Arch Orthop Trauma Surg*, 105, 6, 332-336.
- Castel JC (1993). Therapeutic Ultrasound. *Rehab Ther Products Rev*, jan/feb 22-32.
- Cetti R, Junge J, Vyberg M (2003). Spontaneous rupture of the Achilles tendon is preceded by widespread and bilateral tendon damage and ipsilateral inflammation: a clinical and histopathologic study of 60 patients. *Acta Orthop Scand*, Feb, 74, 1, 78-84.
- Ceyhan A, Günal S, Çıkan T, Bababalım M, Ünal N (1996). Serbest radikaller ve anestezi. *Sendrom*, 65-69.
- Chan YS, Li Y, Foster W, Horaguchi T, Somogyi G, Fu FH (2003). Antifibrotic effects of suramin in injured skeletal muscle after laceration. *J Appl Physiol*, 95, 2, 771-780.
- Charge SB, Rudnicki MA (2004). Cellular and molecular regulation of muscle regeneration. *Physiol Rev*, 84, 1, 209-238.
- Chazaud B, Sonnet C, Lafuste P, Bassez G, Rimaniol AC, Poron F (2003). Satellite cells attract monocytes and use macrophages as a support to escape apoptosis and enhance muscle growth. *J Cell Biol*, 163, 5, 1133-1143.
- Cheeseman KH, Slater TF (1993). An introduction to free radical biochemistry. *Br Med Bull*, 49, 3, 479-480.
- Chenu C, Sere CM, Raynal C, Burt-Pichat B, Delmas PD (1998). Glutamate receptors are expressed by bone cells and involved in bone resorption. *Bone*, 22, 295-299.
- Choi M, Park H, Cho S, Lee M (2013). Vitamin D(3) supplementation modulates inflammatory responses from the muscle damage induced by high-intensity exercise in SD rats. *Cytokine*, May 10.
- Clarke GR, Stenner L (1976). Use of therapeutic ultrasound. *Physiotherapy*, 62, 6, 185-190.

- Cohn RD, Campbell KP (2000). Molecular basis of muscular dystrophies. *Muscle Nerve*, 23, 10, 1456-71.
- Cook JL, Khan KM, Pudram C (2002). Achilles tendinopathy. *Manuel Therapy*, 7, 3, 121-130.
- Cowie MR (2002). Coronary Risk-Time For a More Sophisticated Approach, *Eur Heart J*, 23, 589-591.
- Crisco JJ, Jokl P, Heinen GT, Connell MD, Panjabi MM (1994). A muscle contusion injury model. Biomechanics, physiology, and histology. *Am J Sports Med*, 22, 5, 702-10.
- De Smet AA, Best TM (2000). MR imaging of the distribution and location of acute hamstring injuries in athletes. *AJR Am J Roentgenol*, 174, 2, 393-9.
- Demmink JH, Helders PJ, Hobæk H, Enwemeka C (2003). The variation of heating depth with therapeutic ultrasound frequency in physiotherapy. *Ultrasound Med Biol*, 29, 1, 113-118.
- Dinarello CA (2000). Proinflammatory cytokines. *Chest*, 118, 503-508.
- Draper DO, Castel JC, Castel D (1995). Rate of temperature increase in human muscle during 1 MHZ and 3 MHZ continuous ultrasound. *J Orthop Sports Phys Ther*, 22, 145-150.
- Duffy FJ (1995). Growth factors and canine flexor tendon healing initial studies in uninjured and repair models. *J Hand Surg*, 20, A, 645.
- Ediz L, Hız Ö, Özkol H, Gülcü E, Toprak M, Ceylan MF (2011). Relationship between anti-CCP antibodies and oxidant and anti-oxidant activity in patients with rheumatoid arthritis. *Int J Med Sci*, 8, 2, 139-147.
- Engelmann J, Vitto MF, Cesconetto PA, Silveira PC, Possato JC, Pinho RA, Paula MM, Victor EG, De Souza CT (2012). Pulsed ultrasound and dimethylsulfoxide gel treatment reduces the expression of pro-inflammatory molecules in an animal model of muscle injury. *Ultrasound Med Biol*, 38, 8, 1470-1475.
- Enos RT, Davis JM, McClellan JL, Murphy EA (2013). Indomethacin in combination with exercise leads to muscle and brain inflammation in mice. *J Interferon Cytokine Res*, May 7.
- Erel Ö (2004). A novel automated direct measurement method for total antioxidant capacity using a new generation, more stable ABTS radical cation. *Clin Biochem*, 37, 277-285.
- Erel Ö (2005). A new automated colorimetric method for measuring total oxidant status. *Clin Biochem*, 38, 1103-1111.
- Ertan T, Soran A, Kılıç M, Aşlar AK, Koç M, Cengiz Ö (2001). Kan Malondialdehid ve total antioksidan seviyesinin (TAS) önemi. *Cerrahi Tıp Bülteni*, 2(4), 154-167.
- Esselty CB (2000). In cholesterol lowering, moderation kills. *Cleve Clin J Med*, 67, 8, 560-564.

- Farges MC, Balcerzak D, Fisher BD, Attaix D, Bechet D, Ferrara M (2002). Increased muscle proteolysis after local trauma mainly reflects macrophage-associated lysosomal proteolysis. *Am J Physiol Endocrinol Metab*, 282, 2, 326-35.
- Fox MJ (1992). Selenium: Nutritional implications and prospects for therapeutic medicine. *Meth Find Exp Clin Pharmacol*, 14, 4, 275-287.
- Freider S, Weisberg J, Fleming B, Stanek A (1988). A pilot study: The therapeutic effect of ultrasound following partial rupture of Achilles tendons in male rats. *J Orthop Sports Phys Ther*, 10, 39-46.
- Freitas LS, Freitas, TP, Silveira PC (2007). Effect of therapeutic pulsed ultrasound on parameters of oxidative stress in skeletal muscle after injury. *Cell Biology International*, 31, 482-488.
- Fu SC, Shum WT, Hung LK (2008). Low-intensity pulsed ultrasound on tendon healing: A study of the effect of treatment duration and treatment initiation. *Am J Sports Med*, 36, 1742-1749.
- Füzün S (1990). Clayton'un Elektroterapi Kitabı (Çeviri, 9. baskı). Güven Kitabevi,
- Gann N (1991). Ultrasound: Current concepts. *Clin Manage*, 11, 64-69.
- Garrett WE (1996). Jr Muscle strain injuries. *Am J Sports Med*, 24, 6, 2-8.
- Ghadi FE, Malhotra A, Ghara AR, Dhawan DK (2012). Selenium as a modulator of membrane stability parameters and surface changes during the initiation phase of 1,2 dimethylhydrazine induced colorectal carcinogenesis. *Mol Cell Biochem*, 369, 1-2, 119-26.
- Gibler WB, Lewis LM, Erb RE, Makens PK, Kaplan BC, Vaughn RH (1990). Early detection of acute myocardial infarction in patients presenting with chest pain and nondiagnostic ECGs: serial CK-MB sampling in the emergency department. *Ann Emerg Med*, 19, 12, 1359-1366.
- Girotti AW (2000). Lipid hydroperoxide generation, turnover and effector action in biological systems. *J Lipid Res*, 39, 1529-1542.
- Goetsch SC, Hawke TJ, Gallardo TD, Richardson JA, Garry DJ (2003). Transcriptional profiling and regulation of the extracellular matrix during muscle regeneration. *Physiol Genomics*, 14, 3, 261-271.
- Greenwald RA (1991). Oxygen radicals, inflammation and arthritis: pathophysiological considerations and implications for treatments. *Semin Arthritis Rheum*, 20, 4, 219-240.
- Griifn JE, Echternach JL, Bowmaker KL (1970). Results of frequency differences in ultrasound therapy. *Phys Ther*, 50, 4, 481-486.
- Grounds MD (1991). Towards understanding skeletal muscle regeneration. *Pathol Res Pract*, 187, 1, 1-22.
- Guerrero M, Guiu-Comadevall M, Cadefau JA, Parra J, Balias R, Estruch A (2008). Fast and slow myosins as markers of muscle injury. *Br J Sports Med*, 42, 7, 581-584.

- Gutteridge JMC (1994). Biological origin of free radicals and mechanisms of antioxidant protection. *Chem Biol Inter*, 91, 133-140.
- Guyton AC, Hall JE (2001). Tıbbi Fizyoloji. (Çavuşoğlu, H. (Ed.), Çev.). Ankara: Nobel Tıp Kitabevi.
- Halliwell B, Gutteridge JMC (1992). Free Radicals in Biology and Medicine, second ed, Clarendon Press, Oxford, 12, 1, 93-95.
- Hastürk A, Atalay B, Çalışaneller T, Özdemir O, Oruçkaptan H, Altınors N (2009). Analysis of serum pro-inflammatory cytokine levels after rat spinal cord ischemia/reperfusion injury and correlation with tissue damage. *Turk Neurosurg*, 19, 353-359.
- Hayes JD, Pulford DJ (1995). The glutathione S-transferase supergene family regulation of GST and the contribution of the isoenzymes to cancer chemoprotection and drug resistance. *Biochem Mol Biol*, 30, 445-600.
- Hayes JD, Strange RC (1995). Potential contribution of the glutathione S-transferase supergene family to resistance to oxidative stress. *Free Rad Res Commun*, 22, 193-207.
- He GZ, Zhou KG, Zhang R, Wang YK, Chen XF (2012). Impact of intestinal ischemia/reperfusion and lymph drainage on distant organs in rats. *World J Gastroenterol*, 18, 48, 7271-7278.
- Hildebrand A, Romaris M, Rasmussen LM, Heinegard D, Twardzik DR, Border WA (1994). Interaction of the small interstitial proteoglycans biglycan, decorin and fibromodulin with transforming growth factor beta. *Biochem J*, 1, 302, 527-534.
- Hirata A, Masuda S, Tamura T, Kai K, Ojima K, Fukase A (2003). Expression profiling of cytokines and related genes in regenerating skeletal muscle after cardiotoxin injection: a role for osteopontin. *Am J Pathol*, 163, 1, 203-215.
- Hollingworth RM, Dong K (2008). The Biochemical and Molecular Genetic Basis of Resistance to Pesticides in Arthropods: Global Pesticide Resistance in Arthropods, Cromwell, UK, 40-90.
- Hunter G (2001). The conservative management of Achilles tendinopathy. *Phys Ther in Sport*, 1, 1, 6-14.
- Hurme T, Kalimo H (1992). Activation of myogenic precursor cells after muscle injury. *Med Sci Sports Exerc*, 24, 2, 197-205.
- Hurme T, Kalimo H, Lehto M, Jarvinen M (1991). Healing of skeletal muscle injury: an ultrastructural and immunohistochemical study. *Med Sci Sports Exerc*, 23, 7, 801-810.
- Jackson BA, Schwane JA, Stracher BC (1991). Effect of ultrasound therapy on the repair of Achilles tendon injuries in rats. *Med Sci Sports Exerc*, 23, 171-176.
- Jarvinen M (1975). Healing of a crush injury in rat striated muscle a histological study of the effect of early mobilization and immobilization on the repair processes. *Acta Pathol Microbiol Scand A*, 83, 3, 269-282.

- Jarvinen M (1976). Healing of a crush injury in rat striated muscle. 4. Effect of early mobilization and immobilization on the tensile properties of gastrocnemius muscle. *Acta Chir Scand*, 142(1), 47-56.
- Jarvinen M, Aho AJ, Lehto M, Toivonen H (1983). Age dependent repair of muscle rupture. A histological and microangiographical study in rats. *Acta Orthop Scand*, 54, 1, 64-74.
- Jarvinen MJ, Einola SA, Virtanen EO (1992). Effect of the position of immobilization upon the tensile properties of the rat gastrocnemius muscle. *Arch Phys Med Rehabil*, 73, 3, 253-257.
- Jarvinen MJ, Lehto MU (1993). The effects of early mobilisation and immobilisation on the healing process following muscle injuries. *Sports Med*, 15, 2, 78-89.
- John BH (2001). Clinical Diagnosis and Management By Laboratory Methods. W.B. Saunders Company, 20th ed., New York.
- Johns LD (2002). Nonthermal effects of therapeutic ultrasound: the frequency resonance hypothesis. *J Athletic Train*, 37, 3, 293-299.
- Jozsa L, Reffy A, Demel S, Szilagyi I (1980). Alterations of oxygen and carbon dioxide tensions in crush-injured calf muscles of rat. *Z Exp Chir*, 13, 2, 91-94.
- Kaariainen M, Kaariainen J, Jarvinen TL, Nissinen L, Heino J, Jarvinen M (2000). Integrin and dystrophin associated adhesion protein complexes during regeneration of shearing-type muscle injury. *Neuromuscul Disord*, 10, 2, 121-132.
- Kaariainen M, Kaariainen J, Jarvinen TL, Sievanen H, Kalimo H, Jarvinen M (1998). Correlation between biomechanical and structural changes during the regeneration of skeletal muscle after laceration injury. *J Orthop Res*, 16, 2, 197-206.
- Kaariainen M, Nissinen L, Kaufman S, Sonnenberg A, Jarvinen M, Heino J (2002). Expression of alpha7 beta1 integrin splicing variants during skeletal muscle regeneration. *Am J Pathol*, 161, 3, 1023-1031.
- Kalimo HRJ, Järvinen M (1997). Muscle injuries in sports. *Baillieres Clin Orthop*, 2, 1-24.
- Kalyon TA (1995). Ultrason Tedavisi. Tuna N (editör), Tıbbi Rehabilitasyon. Nobel Tıp Kitapevi, İstanbul, 190-194.
- Karahan M, Erol B (2004). Muscle and tendon injuries in children and adolescents. *Acta Orthop Traumatol Turc*, 38, 1, 37-46.
- Kearns SR, Moneley D, Murray P, Kelly C, Daly AF (2001). Oral vitamin C attenuates acute ischaemia-reperfusion injury in skeletal muscle. *J Bone Joint Surg Br*, 83, 8, 1202-1206.
- Kearns SR, O'Briain DE, Sheehan KM, Kelly C, Bouchier-Hayes D (2010). N-acetylcysteine protects striated muscle in a model of compartment syndrome. *Clin Orthop Relat Res*, 468, 8, 2251-2259.

- Khassaf M, McArdle A, Esanu C, Vasilaki A, McArdle F, Griffiths RD, Brodie DA, Jackson MJ (2003). Effect of vitamin C supplements on antioxidant defence and stress proteins in human lymphocytes and skeletal muscle. *J Physiol*, 549, 2, 645-652.
- Kılınç K (1985). Serbest Oksijen Radikallerinin Biyokimyasal Etkileri ve Metabolizması. *Biyokimya Dergisi*, 2, 60-89.
- Kierszenbaum LA (2006). Histoloji ve Hücre Biyolojisi. Palme Yayıncılık, Ankara, 177-198.
- Kösecik M, Erel Ö, Sevinc E, Selek S (2005). Increased oxidative stress in children exposed to passive smoking. *Int J Cardio*, 100, 61-64.
- Kvist M (2005). Achilles tendon injuries in athletes. *Ann Chir Gynaecol*, 80, 188–201.
- LaBarge MA, Blau HM (2002). Biological progression from adult bone marrow to mononucleate muscle stem cell to multinucleate muscle fiber in response to injury. *Cell*, 111, 4, 589-601.
- Lawrence AK, Amadeo JP (1996). Clinical Chemistry Theory, Analysis and Correlation Third ed., St. Louis: Mosby Inc, USA.
- Lehman FJ (1982). Therapeutic heat and cold. 3rd ed. London, p 404–406, 486–543.
- Lehto M, Duance VC, Restall D (1985a). Collagen and fibronectin in a healing skeletal muscle injury. An immunohistological study of the effects of physical activity on the repair of injured gastrocnemius muscle in the rat. *J Bone Joint Surg Br*, 67, 5, 820-828.
- Lehto M, Jarvinen M, Nelimarkka O (1986). Scar formation after skeletal muscle injury. A histological and autoradiographical study in rats. *Arch Orthop Trauma Surg*, 104, 6, 366-370.
- Lehto M, Sims TJ, Bailey AJ (1985b). Skeletal muscle injury--molecular changes in the collagen during healing. *Res Exp Med (Berl)*, 185, 2, 95-106.
- Levine SA, Kidd PM (1986). Antioxidant adaptation: Its role in free radical pathology. Biocurrents Division. Allergy Research Group, San Leandro, California, 376.
- Li Y, Huard J (2002). Differentiation of muscle-derived cells into myofibroblasts in injured skeletal muscle. *Am J Pathol*, 161(3), 895-907.
- Mannervik B, Awashi Y, Board P, Hayes J, Dilio C, Ketterer B (1992). Nomenclature for human glutathione S transferase. *Biochem J*, 282, 305-308.
- Mantle T, McCusker F, Phillips M, Boyer S (1990). Glutathione S-transferases. *Isoenzymes*, 18, 175-177.
- Marklund SL (1990). Analysis of extracellular superoxide dismutase in tissue homogenates and extracellular fluids. *Methods Enzymol*, 186, 260-265.
- Martinez Amat A, Marchal Corrales JA, Rodriguez Serrano F, Boulaiz H, Prados Salazar JC, Hita Contreras F (2007). Role of alpha-actin in muscle damage of injured athletes in comparison with traditional markers. *Br J Sports Med*, 41, 7, 442-446.
- Matés, JM, Pérez-Gómez C, Núñez de Castro I (1999). Antioxidant Enzymes and Human Diseases. *Clinical Biochemistry*, 32, 8, 595-603.

- May JM, Qu ZC (2010). Chelation of intracellular iron enhances endothelial barrier function: a role for vitamin C. *Arch Biochem Biophys*, 500, 2, 162-168.
- McBrier NM, Lekan JM, Druhan LJ (2007). Therapeutic ultrasound decreases mechano-growth factor messenger ribonucleic acid expression after muscle contusion injury. *Arch Physical Med Rehabil*, 88, 936–940.
- McCord J (1993). Human disease, free radicals and the oxidant / antioxidant balance. *Clin Biochem*, 26, 351 - 357.
- McCord JM, Fridovich I (1969). Superoxide dismutase: an enzymatic function for erythrocuprein. *J Biol Chem*, 224, 6049-6055.
- McDiarmid T, Ziskin MC, Michlovitz SL (1996). Therapeutic ultrasound. In: Michlovitz SL, ed. Thermal agents in rehabilitation. 3rd ed. Philadelphia, PA: F. A. Davis Company, 168–212.
- McNeil PL (2002). Repairing a torn cell surface: make way, lysosomes to the rescue. *J Cell Sci*, 115, 5, 873-879.
- Menetrey CJ, Kasemkijwattana CS (2000). Day Growth factors improve muscle healing in vivo *J Bone Joint Surg*, 82 (2000), pp. 131–137.
- Middlemast SJ, Chotterjee DS (1978). Comparison of ultrasound and thermotherapy for soft tissue injuries. *Physiotherapy*, 64, 11, 331–332.
- Miquel J, Ramirez-Bosca A, Ramirez-Bosca JV, Alperi JD (2006). Menopause: A review on the role of oxygen stress and favorable effects of dietary antioxidants. *Arch Gerontol Geriatr*, 42, 3, 289-306.
- Mishra A, Woodall JJr, Vieira A (2009). Treatment of tendon and muscle using platelet-rich plasma. *Clin Sports Med*, 28, 1, 113-125.
- Misso NL, Brooks-Wildhaber J, Ray S, Vally H, Thompson PJ (2005). Plasma concentrations of dietary and nondietary antioxidants are low in severe asthma. *Eur Respir J*, 26, 257-264.
- Miyake K, McNeil PL, Suzuki K, Tsunoda R, Sugai N (2001). An actin barrier to resealing. *J Cell Sci*, 114, 19, 3487-3494.
- Morozov VI, Tsyplenkov PV, Golberg ND, Kalinski MI (2006). The effects of high-intensity exercise on skeletal muscle neutrophil myeloperoxidase in untrained and trained rats. *Eur J Appl Physiol*, 97, 6, 716-722.
- Morrow LO, Hill KE, Burk RF, Nammour TM, Badr KF, Roberts L (1991). Formation of unique biologically active prostaglandins in vivo by a noncyclooxygenase free radical and catalyzed mechanism. *Adv Prostaglandin Thromboxane Leukot Res*, 21, 125-128.
- Mortimer A, Dyson M (1988). The effect of ultrasound on calcium uptake in fibroblasts. *Ultrasound Med Biol*, 14, 499–506.
- Nakano A, Koyama I, Matsunaga T, Nakajima T, Hirose H, Sato M, Komoda T (1999). Expression of reactive oxygen-related enzymes in human umbilical vein endothelial cells (HUVEC) cultured with high concentrations of glucose. *Rinsho Byori*, 7, 676-681.

- Ng K, Liu Y (2002). Therapeutic Ultrasound: Its application in drug delivery. *Med Res Reviews*, 22, 2, 204–223.
- Obremsky WT, Seaber AV, Ribbeck BM, Garrett WE (1994). Biomechanical and histologic assessment of a controlled muscle strain injury treated with piroxicam. *Am J Sports Med*, 22, 4, 558-561.
- Ono M, Sekiya C, Ohhira M, Namiki M, Endo Y, Suzuki K, Matsuda Y, Taniguchi N (1991). Elevated level of serum Mn-SOD in patients with primary biliary cirrhosis: possible involvement of free radicals in the pathogenesis in primary biliary cirrhosis. *J Lab Clin Med*, 118, 5, 477-483.
- Özbal Y (2000). Temel İmmünoloji. 1. Baskı. İstanbul. Nobel Tıp Kitabevleri.
- Özdil S, Bolkent S, Yanardag R, Arda-Pirincci P (2004). Protective effects of ascorbic acid, dl-alpha-tocopherol acetate and sodium selenate on ethanol-induced liver damage of rats. *Biol Trace Elem Res*, 97, 2, 149-162.
- Özkol H, Musa D, Tülüce Y, Koyuncu I (2012). Ameliorative influence of *Urtica dioica* L against cisplatin-induced toxicity in mice bearing Ehrlich ascites carcinoma. *Dug Chem Toxicol*, 35, 3, 251-257.
- Özkol H, Tuluçe Y, Dilsiz N, Koyuncu I (2013). Therapeutic potential of some plant extracts used in Turkish traditional medicine on streptozocin-induced type 1 diabetes mellitus in rats. *J Membr Biol*, 246, 1, 47-55.
- Patrick MK (1978). Application of therapeutic pulsed ultrasound. *Physiotherapy*, 64, 3, 103–105.
- Perrone CE, Fenwick-Smith D, Vandeburgh HH (1995). Collagen and stretch modulate autocrine secretion of insulin-like growth factor-1 and insulin-like growth factor binding proteins from differentiated skeletal muscle cells. *J Biol Chem*, 270, 5, 2099-2106.
- Piedade MC, Galhardo MS, Battelner CN (2008). Effect of ultrasound therapy on the repair of gastrocnemius muscle injury in rats. *Ultrasonics*, 48, 403–411.
- Qiao Y, Yokoyama M, Kameyama K, Asano G (1993). Effect of vitamin E on vascular integrity in cholesterol-fed guinea pigs. *Arterioscler Thromb*, 13, 12, 1885-1892.
- Rak J, Kerbel RS (1997). bFGF and tumor angiogenesis-back in the limelight. *Nat Med*, 3, 10, 1083-1084.
- Ramirez A, Schwane JA, McFarland C, Starcher B (1997). The effect of ultrasound on collagen synthesis and fibroblast proliferation in vitro. *Med Sci Sports Exerc*, 29, 326–332.
- Rantanen J, Thorsson O, Wollmer P (1999). Effects of therapeutic ultrasound on the regeneration of skeletal myofibers after experimental muscle injury. *Am J Sports Med*, 27, 54–59.
- Reher P, Doan N, Bradnock B (1999). Effect of ultrasound on the production of IL-8, basic FGF and VEGF. *Cytokine*, 11, 416–423.
- Reilly PM, Schiller J, Bulkley GB (1991). Pharmacological approach to tissue injury mediated free radicals and other reactive oxygen metabolites. *Am J Surg*, 161, 488-503.

- Reynolds W, Gaudelus I, Gausson V (2006). Myeloperoxidase promoter polymorphism-463G is associated with more severe clinical expression of cystic fibrosis pulmonary disease. *Mediators Inflamm*, 2006, 1-8.
- Richard-Bulteau H, Serrurier B, Crassous B (2008). Recovery of skeletal muscle mass after extensive injury: Positive effects of increased contractile activity. *Am J PhysiolCell Physiol*, 294, 467–476.
- Riley GP (2005). Gene expression and matrix turnover in overused and damaged tendons. *Scand J Med Sci Sports*, 15, 241–251.
- Romay C, Pascual C, Lissi EA (1996). The reaction between ABTS radical cation and antioxidants and its use to evaluate the antioxidant status of serum samples. *Braz J Med Biol Res*, 29, 175-183.
- Rossi B, Siciliano G, Risaliti R, Muratorio A (1990). Effects of selenium and vitamin E on muscular strength and blood parameters in Steinert disease. *Ital J Neurol Sci*, 11, 1, 37-42.
- Saborido A, Naudí A, Portero-Otín M, Pamplona R, Megías A (2011). Stanazolol treatment decreases the mitochondrial ROS generation and oxidative stress induced by acute exercise in rat skeletal muscle. *J Appl Physiol*, 110, 3, 661–669.
- Saliba S, Mistry DJ, Perrin DH, Gieck J, Weltman A (2007). Phonophoresis and the Absorption of Dexamethasone in the Presence of an Occlusive Dressing. *J Athl Train*, 42, 349–354.
- Saturnino-Oliveira J, Tomaz MA, Fonseca TF, Gaban GA, Monteiro-Machado M, Strauch MA, Cons BL, Calil-Elias S, Martinez AM, Melo PA (2012). Pulsed ultrasound therapy accelerates the recovery of skeletal muscle damage induced by Bothrops jararacussu venom. *Braz J Med Biol Res*, 45, 6, 488-96.
- Schneider BS, Tiidus PM (2007). Neutrophil infiltration in exercise-injured skeletal muscle: how do we resolve the controversy. *Sports Med*, 37, 10, 837-856.
- Schwarz K (1976). Essentiality and metabolic functions of selenium symposium on trace elements. *Med Clin North Am*, 60, 4, 745-775.
- Shu B (2010). Trauma rehabilitation (1st ed.). Beijing: People's Health Publishing Press. China.
- Shu B, Yang Z, Li X, Zhang LQ (2011). Effect of different intensity pulsed ultrasound on the restoration of rat skeletal muscle contusion. *Cell Biochem Biophys*, 62, 2, 329-336.
- Silveira PC, Silva LA, Tromm PT, Scheffer DL, Souza CT, Pinho RA (2012). Effects of therapeutic pulsed ultrasound and dimethylsulfoxide phonophoresis on oxidative stress parameters after injury induced by eccentric exercise. *Ultrasonics*, 52, 5, 650-654.
- Sinclair AJ, Barnet AH, Lunec J (1990). Free radicals and antioxidant systems in health and disease. *Br J Hosp Med*, 43, 334-344.
- Slavotinek JP, Verrall GM, Fon GT (2002). Hamstring injury in athletes: using MR imaging measurements to compare extent of muscle injury with amount of time lost from competition. *AJR Am J Roentgenol*, 179, 6, 1621-1628.

- Smith LL, Miles MP (2000). Exercise Induced Muscle Injury and Inflammation, Lippincott Williams and Wilkins, 401-411.
- Song C, Leonard BE (2000). Stress, the immun system and depression. *Fundamentals of Psychoneuroimmunology*, 75-93.
- Sorokin LM, Maley MA, Moch H, von der Mark H, von der Mark K, Cadalbert L (2000). Laminin alpha4 and integrin alpha6 are upregulated in regenerating dy/dy skeletal muscle: comparative expression of laminin and integrin isoforms in muscles regenerating after crush injury. *Exp Cell Res*, 256, 2, 500-514.
- Southorn PA, Powis O (1988). Free radical in medicine I. Chemical nature and biologic reactions. *Mayo Clin Proc*, 63, 4, 381-389.
- Sözmen EY (1997). Radikal Kavramı ve Oksijen Radikalleri, Temel Biyokimya. ED. T. Onat.1.Baskı, 521-528. Saray Medikal Yayıncılık, İzmir.
- St Pierre Schneider B, Brickson S, Corr DT, Best T (2002). CD11b+ neutrophils predominate over RAM11+ macrophages in stretch-injured muscle. *Muscle Nerve*, 25, 6, 837-844.
- Stephenson K, Saltzman CL, Brotzman BS (2003): Foot and ankle injuries. In: Clinical Orthopaedic Rehabilitation, Brotzman BS, Wilk KE (eds), Mosby, Philadelphia, Pennsylvania, 729-755.
- Takala TE, Virtanen P (2000). Biochemical composition of muscle extracellular matrix: the effect of loading. *Scand J Med Sci Sports*, 10, 6, 321-325.
- Ter Haar G (1999). Therapeutic ultrasound. *Euro J Ultrasound*, 9, 3-9.
- Terrill JR, Radley-Crabb HG, Iwasaki T, Lemckert FA, Arthur PG, Grounds MD (2013). Oxidative stress and pathology in muscular dystrophies: focus on protein thiol oxidation and dysferlinopathies. *Febs J*, 2013, 19.
- Thorsson O, Rantanen J, Hurme T, Kalimo H (1998). Effects of nonsteroidal antiinflammatory medication on satellite cell proliferation during muscle regeneration. *Am J Sports Med*, 26, 2, 172-176.
- Tidball JG (1995). Inflammatory cell response to acute muscle injury. *Med Sci Sports Exerc*, 27, 7, 1022-1032.
- Tidball JG, Daniel TL (1986). Myotendinous junctions of tonic muscle cells: structure and loading. *Cell Tissue Res*, 245, 2, 315-322.
- Tiidus PM (2003). Influence of estrogen on skeletal muscle damage, inflammation, and repair. *Exerc Sport Sci Rev*, 31, 40-44.
- Tirgan N, Kulp GA, Gupta P, Boretsky A, Wiraszka TA, Godley B, Tilton RG, Motamedi M (2012). Nicotine exposure exacerbates development of cataracts in a type 1 diabetic rat model. *Exp Diabetes Res*, 2012:349320.
- Tonon E, Ferretti R, Shiratori JH, Santo Neto H, Marques MJ, Minatel E (2012). Ascorbic acid protects the diaphragm muscle against myonecrosis in mdx mice. *Nutrition*, 28, 6, 686-690.

- Tsai W, Hsu C, Tang F, Chou S, Chen Y, Pang J (2005). Ultrasound stimulation of tendon cell proliferation and upregulation of proliferating cell nuclear antigen. *J Orthop Res*, 23, 4, 970–976.
- Tuncer T (2000). Elektroterapi. Beyazova M, Gökçe Kutsal Y (editörler), Fiziksel Tıp ve Rehabilitasyon. Güneş Kitapevi, Ankara, 785–788.
- Turner SM, Powell ES, Ng SS (1989). The effect of ultrasound on the healing of repaired cockerel tendons: Is collagen cross linkage a factor. *J Hand Surg*, 14B, 428–433.
- Tülüce Y, Özkol H, Koyuncu I (2012). Photoprotective effect of flax seed oil (*Linum usitatissimum L.*) against ultraviolet C-induced apoptosis and oxidative stress in rats. *Toxicol Ind Health*, 28, 2, 99-107.
- Umemura U, Yokota K (1997). Effectiveness of a healthy education class to increase fish intake evaluated by serum fatty acids compositions. *Nippon Koshu Eisei Zasshi*, 44, 12, 901-909.
- Urso ML, Clarkson PM (2003). Oxidative stress, exercise and antioxidant supplementation. *Toxicol*, 189, 41-54.
- Uysal M (1998). Serbest Radikaller, Lipid Peroksidleri ve Organizmada Prooksidan-Antioksidan Dengeyi Etkileyen Koşullar. *Klinik Gelişim II*, 336-341.
- Van Zutphen LFM, Baumans V, Beynen AC (2003). Laboratuvar Hayvanları Biliminin Temel İlkeleri. Özkanlar Matbaacılık Ankara, 28-30.
- Vince P (1999). Antioxidant potential of vitamin A and carotenoids and their relevance to heart disease. *Free Radic Biol Med*, 26, 746-761.
- Ward AR, Robertson VJ (1996). Comparison of heating of noninvolving soft tissue produced by 45 kHz and 1Mhz frequency ultrasound machines. *J Orthop Sports Phys Ther*, 23, 258–266.
- Warden SJ (2003). A new direction for ultrasound therapy in sports medicine. *Sports Med*, 33, 95–107.
- Warren GL, Lowe DA, Armstrong RB (1999). Measurement tools used in the study of eccentric contraction-induced injury. *Sports Med*, 27, 1, 43-59.
- Weber DC, Brown AW (2000). Physical agent modalities. In: Braddom RL (ed), *Physical Medicine and Rehabilitation* (2nd ed). WB Saunders, Philadelphia, 445–448.
- Wilkin LD, Merrick MA, Kirby TE, Devor ST (2004). Influence of therapeutic ultrasound on skeletal muscle regeneration following blunt contusion. *Int J Sports Med*, 25, 1, 73-7.
- Wojewoda M, Duszyński J, Szczepanowska J (2010). Antioxidant defence systems and generation of reactive oxygen species in osteosarcoma cells with defective mitochondria: effect of selenium. *Biochim Biophys Acta*, 1797, 6-7, 890-6.
- Xia E, Rao G, Remmen HV, Heydari AR, Richardson A (1994). Activities of antioxidant enzymes in various tissues of male fischer 344 rats are altered by food restriction. *J Nutr*, 125, 195-201.

Yamaguchi Y, Mann DM, Ruoslahti E (1990). Negative regulation of transforming growth factor-beta by the proteoglycan decorin. *Nature*, 346, 6281, 281-284.

Yao CC, Ziober BL, Squillace RM, Kramer RH (1996). Alpha7 integrin mediates cell adhesion and migration on specific laminin isoforms. *J Biol Chem*, 271, 41, 25598-25603.

Yazıcı C, Köse K (2004). Melatonin: karanlığın antioksidan gücü. *Erciyes Üniversitesi Sağlık Bilimleri Dergisi*, 13, 2, 56-65.

Young SR, Dyson D (1990). Effect of therapeutic ultrasound on the healing of full-thickness excised skin lesions. *Ultrasonics*, 28, 175–180.

Zanardo RC, Costa Cruz JW, Oliveira MA, Fortes ZB (2003). Ascorbic acid supplementation restores defective leukocyte-endothelial interaction in alloxan-diabetic rats. *Diabetes Metab Res Rev*, 19, 1, 60-8.

Zhou FQ (2001). Advantages of pyruvate over lactate in peritoneal dialysis solutions. *Acta Pharmacol Sin*, 5, 385-392.

http://besyo.ege.edu.tr/profmuzaffercolakoglu/1_2_iskelet_Kasi_ve_KASILMA.pdf

<http://www.cerezforum.com/fen-ve-teknoloji/110255-iskelet-kas-hucresi.html>

<http://naturesofscandinaviaa.blogcu.com/antioksidan-nedir/11136198>

<http://tr.pdfsb.com/readonline/5a315a4b6651352f586e5a2b4448566b55513d3d-4433607>

ÖZGEÇMİŞ

1986 yılında Manisa'nın Salihli ilçesinde doğdu. İlkokul eğitimini Salihli'de, orta ve lise eğitimini Konya'da tamamladı. 2008 yılında İstanbul Üniversitesi Fizik Tedavi ve Rehabilitasyon bölümünden mezun oldu. 2011 yılında Yüzüncü Yıl Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Tıp Fakültesi Fizyoloji Anabilim Dalında yüksek lisansa başladı. Çeşitli fizik tedavi merkezlerinde fizyoterapist olarak çalıştı. Evli ve bir çocuk babasıdır.

EKLER

Ek 1: Etik kurul raporu

**T.C.
YÜZÜNCÜ YIL ÜNİVERSİTESİ
HAYVAN DENEYLERİ YEREL ETİK KURULU**

ARAŞTIRMA BAŞVURU ONAY BELGESİ

Araştırmancının Adı	Kas yaralanması oluşturulan sıçanlarda vitamin C, Na ₂ SeO ₃ ve terapötik ultrason tedavisinin yalnız ve kombine uygulandığında antioksidan ve antiinflatuvar etkilerinin araştırılması
Araştırmancının Yürütücüsü	Yrd. Doç. Dr. Yasin TULÜCE
Yardımcı Araştırmacılar	Yüksek Lisans Öğ. N. Muhammed TAT
Kurumu	Tıp Fakültesi
Araştırmancının Tahmini Süresi	4 Ay
Kullanılacak Hayvan Türü ve Sayısı	Sıçan 36 Adet
Destekleyecek Kuruluş (lar)	
Başvuru Tarihi	26.06.2009

KARAR BİLGİLERİ	Karar No:2012/04-JL	Tarih: 03.07.2012
	Yüzüncü Yıl Üniversitesi Tıp Fakültesi öğretim üyesi/elemanı Yrd. Doç. Dr. Yasin TULÜCE sorumluluğunda yürütülmesi planlanan ve yukarıda başvuru bilgileri verilen araştırma projesi gerekçe, amaç ve yöntemler dikkate alınarak ilgi başvuru belgeleri incelendi. Çalışmanın etik açıdan uygun olduğuna, projenin aşağıdaki hususlar dikkate alınarak yürütülmesine ve proje yürütücüsüne iletilmesine oy birliği /oy çokluğu ile karar verildi. 1) Projede herhangi bir değişiklik gerektiğinde kurulumuzdan onay alınması. 2) Projede çalışacağı bildirilen araştırmacılar değişikliği olduğunda kurulumuzdan onay alınması. 3) Deney hayvanları üzerinde yapılacak girişimin başlangıç ve bitiş tarihlerinin bildirilmesi. 4) Çalışma süresinde tamamlanamaz ise ek süre talebinde bulunulması. 5) Çalışma tamamlandığında sonuç raporunun gönderilmesi.	

ETİK KURUL ÜYELERİ		
BASKAN Prof. Dr. Hülya ÖZDEMİR	BASKAN YARDIMCISI Prof. Dr. Murat DEMİREL	
Prof. Dr. Handan MERT	Prof. Dr. Abuzer TAŞ	Doç. Dr. Hasan ÜLKER
Doç. Dr. Mehmet KARACA	Doç. Dr. Fazıl ŞEN	Doç. Dr. Ali İhsan ZENGİNGÜL
Doç. Dr. Fatma İLHAN	Doç. Dr. Nurettin CENGİZ	Yrd. Doç. Dr. Atilla DURMUŞ
Yrd. Doç. Dr. Hüseyin GÜDÜCÜOĞLU	Yrd. Doç. Dr. Şükran SEVİMLİ	
Vet. Hekim Musa CETİN	Zir. Müh. Kenan YILDIRIMOĞLU	

*Bu form YÜHADYEK tarafından doldurulacaktır.