

T.C
DİCLE ÜNİVERSİTESİ
TIP FAKÜLTESİ
GÖĞÜS CERRAHİ ANABİLİM DALI

**AKCİĞER İSKEMİ REPERFÜZYON HASARINDA
MELATONİN VE N-ASETİLSİSTEİNİN ETKİLERİ**

UZMANLIK TEZİ
Dr. ATILLA DURKAN

TEZ DANIŞMANI
DOÇ. DR. REFİK ÜLKÜ

DİYARBAKIR 2009

DÜHADEK ONAY TARİHİ : 12/03/2008 (Sayı : 18)

İÇİNDEKİLER

1. Ön sayfalar

1.1. İç Kapak	I
1.2. İçindekiler Dizini	II
1.3. Şekiller ve Tablolar Dizini	III
1.4. Resimler Dizini	II
1.5. Kısaltmalar	II

2. Özet Sayfaları

2.1 .Özet	III
2.2 Summary	II

3. Tez metni

3.1. Giriş	1
3.2. Amaç	3
3.3. Genel Bilgiler	4
3.3.1. Hücre Zedelenmesi	4
3.3.1.1 Hücre zedelenmesi Nedenleri	4
3.3.1.2 Hücre zedelenmesinin Mekanizması	5
3.3.1.3 İskemik ve Hipoksik Zedelenme	6
3.3.1.4 Membran zedelenmesinin oluşumunda dört potansiyel neden	
suçlanmaktadır	7
3.3.2. İskemi-Reperfüzyon Hasarı	8
3.3.3 Melatonin	12
3.3.3.1 Melatoninin sentezi ve metabolizması	12
3.3.3.2 Melatoninin etki mekanizması	13
3.3.3.3 Melatoninin Antioksidan Özelliği	13
3.3.3.4 Melatoninin toksik yan etkileri	14
3.3.4 N-Asetilsistein	14
3.3.4.1 N-asetilsisteinin Yan Etkileri	16
3.3.5 Antioksidanlar	16
3.3.5.1 Antioksidan sistemin başlıca elemanları	16
3.3.5.1.1 Enzimler	16
3.3.5.1.2 Suda çözünen radikal tutucular	16
3.3.5.1.3 Yağda çözünen radikal tutucular	17
3.3.5.1.4 Metal iyonlarını bağlayan proteinler	18
3.3.5.2 Etki mekanizmalarına göre antioksidan savunma sistemi	18
3.3.6 BAL	18
3.3.6.1 Bronkoalveolar Lavaj Uygulaması	18
3.3.6.2 BAL SIVISI	19
3.3.6.3 BAL'da Diferansiel Hücre Sitolojisi	20

3.3.6.4 BAL Sonuçları	20
3.3.6.5 BAL'da Kontraendikasyonlar	20
3.3.7 Akciğer Transplantasyonunda Kullanılan Solusyonlar	21
3.3.7.1 Kullanılan Solusyonların içeriği	21
3.3.7.2 Akciğerin Flush Solusyonu Saklama Isısı	22
3.3.7.3 Farmakolojik Ajan Eklenmesi	23
3.3.7.3.1 Steroidler	23
3.3.7.3.2 Prostaglandinler	23
3.3.7.3.3 SOR Temizleyiciler	23
3.3.7.3.4 Kalsiyum Kanal Blokerleri	24
3.3.7.3.5 PAF Antagonistleri	24
3.3.7.3.6 Kompleman Aktivasyon İnhibisyonu	24
3.3.7.3.7 Lökosit Azaltıcılar	24
3.3.8 MDA	24
3.4. Gereç ve yöntemler	26
3.4.1 Cerrahi Prosedür ve Deney Grupları	26
3.4.2 Deney Gruplarının Dağılımı	26
3.4.3 Anestezi	26
3.4.4 Standart Diseksiyon	27
3.4.5 Cerrahi Prosedür	27
3.4.6 Deney Grupları	30
3.4.7 Örneklerin Hazırlanması	31
3.4.7.1 MDA Ölçümü	31
3.4.7.2 TAOK Ölçümü	31
3.4.7.3 BAL'da Nötrofil Hücrelerinin Değerlendirilmesi	32
3.4.7.4 Akciğerin Histopatolojik Değerlendirilmesi	32
3.4.7.5 İstatistik	33
3.5 Bulgular	35
3.5.1 Histopatolojik Bulgular	41
3.6. Tartışma	45
3.7. Sonuç	56
4. Kaynaklar	57
5. Özgeçmiş	64

ŞEKİLLERİN DİZİNİ

- 1-İskemi-Reperfüzyon hasarında endotel hücre hasarı
- 2-İ/R hasarında ATP azalması ve SOR ‘nin etkinliği
- 3-İskemi sonrası hücre içi Ca^{+2} artışı ve membran hasarı gelişimi
- 4-MDA değerlerinin grafiksel olarak karşılaştırılması
- 5-TAOK değerlerinin grafiksel olarak karşılaştırılması
- 6-MDA ve TAOK değerlerinin grafiksel olarak karşılaştırılması
- 7-Grupların BAL (%) Nötrofil değerlerinin grafiksel olarak karşılaştırılması
- 8-MDA, TAOK ve Nötrofil (%) oranlarının grafiksel olarak karşılaştırılması

TABLolar DİZİNİ

- 1-Akciğer transplant programında kullanılan E-C ve LPDS ‘nun karşılaştırılması
- 2-Deney gruplarının dağılımı
- 3-Alveolar hemorajinin derecelendirilmesi
- 4-Parankimal lezyonların derecelendirilmesi
- 5-Akciğer Alveolar hemoraji değerlerinin ve Parankim Hasarının puanlandırılması
- 6-Grumlardan elde edilen ortalama MDA değerleri ve standart sapması
- 7- Grumlardan elde edilen ortalama TAOK değerleri ve standart sapması
- 8-Grumlardaki BAL Nötrofil (%) oranlarının ortalama ve standart sapma değerleri

RESİMLERİN DİZİNİ:

RESİM 1 : Hücre zedelenmesinde serbest radikallerin rolü

RESİM 2 : Ratın tespit edilmesi ve trakeostomi kanülü ile ventilatöre bağlanıp havalandırılması

RESİM 3 : Pectotal kasların sağda ve solda serbestleştirilmesi - kesilmesi

RESİM 4a : Sternumun ortaya konması

RESİM 4b : Sternotomi ile her iki akciğer ve kalbin ortaya konması

RESİM 5 : Sol hilusun dönülmesi

RESİM 6 : Sol pulmoner hilusa atravmatik klemp konması

RESİM 7a : BAL sıvısında nötrofil hücreleri izlenmekte

RESİM 7b : BAL sıvısında nötrofil hücreleri izlenmekte

RESİM 8-a : Normal Akciğer dokusu

RESİM 8-b : Hafif fokal İnflamasyon

RESİM 9-a : Orta Derece Perivasküler, Peribronşial Konjesyon ve İnflamasyon

RESİM 9-b : Şiddetli İntrapulmoner –İnterstisyel Ödem ile Şiddetli Vasküler Konjesyon ve Tromboz

RESİM 10 : Alveolar Hemoraji (GRADE 0)

RESİM 11 : Alveolar Hemoraji (GRADE 1)

RESİM 12 : Alveolar Hemoraji (GRADE 2)

RESİM 13 : Alveolar Hemoraji (GRADE 3)

KISALTMALAR

I/R	İskemi ve reperfüzyon
Mel	Melatonin
NAC	N-Asetilsistein
SOR	Serbest Oksijen Radikali
XO	Ksantin Oksidaz
İL	İnterlökin
MDA	Malondialdehit
BAL	Bronkoalveolar lavaj
SOD	Süperoksid dismutaz
TRANS	Transplantasyon
TAOK	Total antioksidan kapasite
GST	Glutadyon S Transferaz
NAT	Hidroksiindol O metil Transferaz
LPO	Lipid peroksidasyonu
TCA	Trikloraasetik asit
TBA	Tribarbütik asit
GSSG	Okside glutatyon
GSSG-R	Glutatyon redüktaz
GSH	Glutatyon
GSH-Px	Glutatyon peroksidaz
NAD⁺	Yükseltgenmiş nikotinamid adenin dinükleotid
NADH	İndirgenmiş nikotinamid adenin dinükleotid
OH⁻	Hidroksil radikali
E-C	Euro-Collins
W-S	Wisconsin Solusyonu
LPDS	Low potasyum dekstran solusyonu
LPEC	Low potasyum Euro-Collins
DPDS	Düşük Potasyumlu Dekstran Solüsyonu
PG	Prostoglandin
NAT	N-asetiltransferaz
HIOMT	Hidroksi İndol O-Metil Transferaz
L	Litre

mg	Miligram
dl	Desilitre
mL	Mililitre
nmol	Nanomol
mmol	Milimol
μmol	Mikromol
ip	intra peritoneal

ÖZET

İ/R hasarı akciğer transplantasyonunda mortalite ve morbitideyi etkileyen önemli etkenlerden bir tanesidir. İ/R hasarı konusunda birçok çalışma yapılmış olup, Melatonin ve NAC 'ın İ/R hasarında akciğeri koruyucu etkisi olduğu birçok çalışmada gösterilmiştir. Bizim yaptığımız bu çalışmada Melatonin ve/veya NAC akciğer İ/R hasarındaki koruyucu etkisini LPDS eşliğinde göstermeye çalıştık.

Çalışmada 48 adet Spraque-downey 300 mgr erkek ratlarda Akciğer İ/R hasarında Melatonin ve/veya NAC 'ın etkisini değerlendirmeyi amaçladık. Bu çalışma Dicle Üniversitesi Hayvan Yerel Etik Kurulu tarafından onaylandı ve yaklaşık 8 ay kadar çalışma sürdü.

Çalışmada 48 adet rat denek olarak 8 farklı grupta kullanıldı.

1. Grup: sol akciğerde iskemi
2. Grup: sol akciğerde iskemi + M
3. Grup: sol akciğerde iskemi + NAC
4. Grup: sol akciğerde iskemi + M + NAC
5. Grup: sol akciğerde iskemi + reperfüzyon
6. Grup: sol akciğerde iskemi + reperfüzyon + M
7. Grup: sol akciğerde iskemi + reperfüzyon + NAC
8. Grup: sol akciğerde iskemi + reperfüzyon + M + NAC

Denekler Na-Pentotal ile uyutuldu. Trakeostomi açılarak entube edildi ve mekanik ventilatöre bağlandı. Tidal volüm 10 ml /kg solunum dk'da 70 olarak ventile edildi. Median sternotomi uygulandı , daha sonra pulmoner arterden heparinize edildi. Pulmoner hilus 2 saat klempe edilerek iskemi sağlandı. Daha sonra klemp kaldırılarak 2 saat reperfüzyon sağlandı. Daha sonra bütün ratlar kalpten yapılan ponksiyon işlemi ile sakrifiye edildi.

Alınan sol akciğerin 1/3 lük kısmı Işık Mikroskopi altında İ/R hasarı değerlendirildi. Akciğerde İ/R bağlı olarak gelişebilecek alveolar hemoraji ve Akciğerdeki inflamatuvar yanıtla ilgili gelişebilecek ödem ve inflamasyon değerlendirildi. Geri kalan akciğerde İ/R hasarının göstergesi olabilecek MDA düzeyi bakıldı.

Ayrıca ratlardan alınan kanda serum TAOK düzeyi ve sol akciğer BAL sıvısında Nötrofil yüzdesine bakıldı.

SUMMARY

Ischemia-reperfusion injury is one of the important factors effecting on mortality and morbidity in lung transplantation. There are many studies about I/R injury and these studies showed that Melatonin and NAC have protective effect on lung against I/R injury . In the present study, we have tried to show the protective effect of Melatonin and NAC together LPDS on lung I/R injury .

Our study was performed on 48 male Sprague-downey rats weighting 300 g . We aimed to evaluate the effect of Melatonin and NAC on lung I/R injury in these rats. This study was approved by Dicle University (Animal Local Ethical Committee) and it has continued eight months.

A total of 48 rats were used as samples in 8 different groups :

1. group : left lung ischemia
2. group : left lung ischemia + Melatonin
3. group : left lung ischemia + NAC
4. group : left lung ischemia + Melatonin + NAC
5. group : left lung ischemia + reperfusion
6. group : left lung ischemia + reperfusion + Melatonin
7. group : left lung ischemia + reperfusion + NAC
8. group : left lung ischemia + reperfusion + Melatonin + NAC

Samples were anesthetized with Na-Pentotal. They were intubated through a tracheostomy and connected to mechanic ventilator. They were ventilated with a tidal volume of 10 ml/kg at 70 breaths / min. Median sternotomy was performed after this heparin was injected into pulmonary artery. The hilum of pulmonary was clamped to keep ischemia during 2 hours. Then clamp was removed for 2 hours reperfusion.

1/3 of the left donor lung was assessed for I/R injury under the Light Microscope. It was evaluated alveolar hemoragia which depends on I/R injury in the lung and odema and inflammation that depend on the inflammation response of the lung. It was determined the level of MDA which may be a semptom of I/R injury in the rest of the lung.

Additionally, it was assessed the level of seruma TAOK in blood of rats and the rate of neutrofil in left lung BAL.

GİRİŞ

Organ transplantasyonu son 20 yıldır dünyada gelişmekte olan bir konudur. Tıpta ilerlemelerin devam etmesi ile organ nakli konusunda çalışmalar hızla ilerleyerek böbrek, akciğer, kemik iliği, göz ve karaciğer gibi organların transplantasyonları yapılmaktadır. Bununla birlikte akciğer dokusunun hassaslığı, karmaşık yapısı, operasyon öncesi hazırlık ve operasyon sonrası hastanın bakımı, operasyonun tekniği ve birçok başka faktörlerden dolayı akciğer transplantasyonu konusu biraz gecikmeye uğramıştır (1, 2).

Akciğer transplantasyonunda uygun alıcı ve vericinin bulunması, cerrahi iskemi süresi, organın korunması ve saklanması, kullanılan farmakolojik ajanlar ve post operatif hastanın bakımı gibi bir çok faktör transplantasyonu etkilemektedir (3,4,5,6). Bu konu ile ilgili birçok çalışma yapılmaktadır. Bu çalışmada akciğer iskemi-reperfüzyon hasarında Melatonin ve N-asetilsisteinin (NAC) etkilerini ele alındı.

Bilindiği gibi doku ve organların iskemi / reperfüzyon (İ/R) hasarında birçok hücreler, mediatörler, reseptörler, oksijen radikalleri gibi çok sayıda faktör rol oynar (7). Yapılan çalışmalarda başlıca nötrofil olmak üzere kompleman ve diğer PMNL'ler endotel hasarında etkili olduğu görülmüştür (3). Ayrıca yapılan çalışmalarda İ/R hasarında rol alan serbest oksijen radikallerinin özellikle de reperfüzyon aşamasında olmak üzere İ/R hasarında rol oynadıkları gözlenmiştir (8).Yapılan bir çok çalışmada Melatonin hormonunun antioksidan özelliğinin olduğu ve serbest oksijen radikallerine karşı akciğeri İ/R hasarına karşı koruduğu görülmüştür. NAC ise potent bir antioksidan ve antienflamasyon etkisi olan tiol grubu bir birleşiktir. Mukolitik özelliği olan bir farmakolojik ajandır ve İ/R hasarına karşı akciğeri koruduğu bilinmektedir (9,10).

Ayrıca organ transplantasyonlarında kullanılan flush solüsyonları, bu solusyonların soğuk iskemi süreleri ve ısıları, koruyucu farmakolojik ajanların kullanım yerleri hakkında çalışmalar mevcuttur. Akciğer transplantasyonlarında flush solüsyonu olarak Euro-Collins (E-C), Low Potasyumlu Dekstran Solüsyonu (LPDS), Wisconsin Solüsyonu (W-S) ve diğer solüsyonlar kullanılmaktadır. Yapılan çalışmalarda DPDS (Düşük Potasyum Dekstran Solüsyonu)'nun akciğeri daha iyi koruduğu görülmüştür. Bundan dolayı deneyimizde DPDS'yi kullanıldı.

Çalışmamızda Akciğer İ/R hasarında, daha önce akciğeri koruduğu bilinen antioksidan özelliği olan Melatonin ile yine antioksidan ve mukolitik özelliği olan NAC birlikte kullanıldı. Akciğer flush solüsyonu olarak DPDS kullanıldı. Deneyde 48 adet

ağırlıkları 250-300 mg arasında değişen Sprague-Dowley erkek cinsi ratlar kullanıldı. Her bir grupta altı adet denek olmak üzere toplam sekiz farklı grup oluşturuldu.

AMAÇ

Terminal dönem akciğer hastalıklarının tedavisinde cerrahi yöntem tüm dünyada güncelliğini koruyan bir konudur.

Bazı merkezlerde transplantasyon işlemi yapılmakta olup, konu ile ilgili çalışmalar devam etmektedir. Akciğer transplantasyonunda organın alınması, saklanması, uygun koruma solüsyonunda bekletilmesi, koruyucu farmakolojik ajanların seçimi, iskemi süresi ve İ/R hasarının önlenmesine karşı tam bir görüş birliği yoktur.

Akciğerin hassas yapısı, transplantasyon sonrası % 20-30 oranında akut greft reaksiyonu gelişebilmesi ve İ/R hasarında multipıl nedenlerin etken olması gibi faktörlerden dolayı bu çalışma planlanarak akciğer İ/R hasarının incelenmesi amaçlanmıştır.

Akciğeri iskemiden koruduğu bilinen ve antioksidan etkinliği de olan melatonin ile bir glutatyon prokürsörü olan akciğeri koruyucu ve antioksidan özelliği olan mukolitik NAC beraber kullanılması ve ayrıca iskemi-reperfüzyon hasarında organ koruyucu solüsyon olarak da DPDS kullanılması planlanmıştır.

Deney sonucunda akciğer İ/R hasarının değerlendirilmesinde bir gösterge olabilecek Total Antioksidan Kapasite (TAOK) ve serum MDA (Malondialdehit) düzeyi ile NAC ve Melatoninin LPDS'de akciğerdeki etkinliğini değerlendirilerek bu iki maddenin akciğer alveoler hemorajisinde ve parankim hasarı üzerindeki etkinliğinin incelenmesi ve BAL'da nötrofil hücreleri sayılarak akciğer İ/R hasarında melatonin ve NAC'ın etkinliği araştırılması hedeflenmiştir.

GENEL BİLGİLER

HÜCRE ZEDELENMESİ

Hücre zedelenmesi, herhangi bir hücrenin kendisinden kaynaklanabilen yada dış etkenlerden dolayı zarar görmesidir. Hücrede moleküler veya yapısal değişikliklerle başlar. Hücre zedelenmesi bir noktaya kadar reversibl (geri dönüşlü) , fakat ciddi veya kalıcı stresle irreversibl (geri dönüşümsüz) olabilir ve sonuçta ölümle sonuçlanabilir.

HÜCRE ZEDELENMESİNİN NEDENLERİ :

- Hipoksi
- Kimyasal etkenler ve ilaçlar
- Fiziksel etkenler
- Mikrobiyolojik etkenler
- İmmun mekanizmalar
- Genetik defektler
- Beslenme dengesizlikleri
- Yaşlanma

Hipoksi: Aerobik oksidatif solunumu etkileyen, son derece önemli ve genel bir hücre zedelenmesi ve ölüm nedenidir. Hipoksi; 1.Lümendeki trombüs ya da vasküler hastalık nedeni ile arteriyel ya da venöz akım bozulunca görülen kanlanma kaybı 2. Kalp, solunum yetersizliğine bağlı yetersiz kan oksijenlenmesi 3. Anemi veya karbonmonoksit zehirlenmesinde olduğu gibi kanın oksijen taşıma gücünün kaybı nedeni ile oluşabilir.

Kimyasal Etkenler ve İlaçlar: Birçok kimyasal etkenler, radyasyon ve ilaçlar hücre zedelenmesine neden olabilir.

Fiziksel Etkenler : Travma, aşırı sıcak ya da soğuk, beklenmedik atmosfer basıncı değişiklikleri, ve elektrik enerjisi hücre üzerinde geniş etkiler gösterir.

Mikrobiyolojik Etkenler: Bu etkenler submikroskopik viruslardan büyük parazitlere kadar değişkenlik gösteren gruptur. Bu ikisi arasında riketsiya, bakteri, fungus ve daha gelişmiş parazitler bulunur.

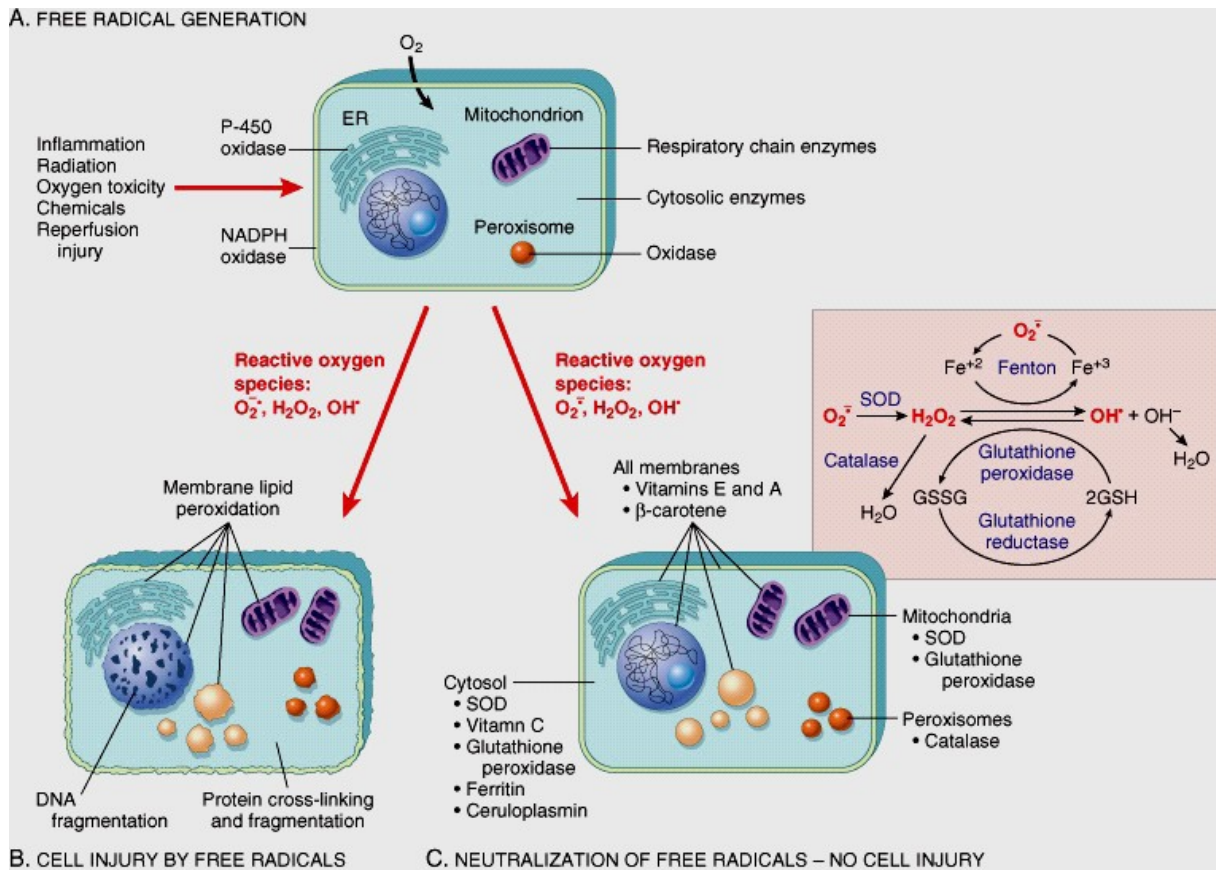
İmmunolojik Reaksiyonlar: Anaflaktik reaksiyon ve yabancı proteinlere karşı gelişen en tipik örnektir.

Genetik Bozukluklar : Down Sendromu, Orak hücreli Anemideki (Hb S) yapımı gibi protein yapısındaki değişiklikler sonucu hücre zedelenmesi oluşur.

Beslenme Dengesizlikleri: Protein kalori yetersizlikleri mahrumiyet içindeki ülkelerin en belirgin sorunlarıdır.

Yaşlanma: Yıllar boyunca serbest radikallerin oluşumunu sonuçlayan zedelenmelerin birikimi hücre yaşlanmasının çeşitli yönlerden sorumlusu olabilir. Yaşlanma sonucu olarak özellikle kalp, karaciğer ve beyin gibi çeşitli dokularda hücre içi kahverengi sarı renkli granüllü lipofuksin pigmenti birikir.

HÜCRE ZEDELLENMESİNİN MEKANİZMALARI: Oksijen hücre zedelenmesinde temel bir rol oynar. (Resim 1) (11) İskemideki hücre zedelenmesinin patogenezi kesinlikle oksijen yetersizliğidir. Ayrıca serbest oksijen radikal türevleri lipid peroksidasyonuna ve hücre yapılarının bozulmasına neden olur.



Resim 1 : Hücre zedelenmesinde serbest radikallerin rolü

İSKEMİK VE HİPOKSİK ZEDELENME

Geri Dönüslü Zedelenme :

Hipoksinin ilk zarar verdiği yer hücrenin aerobik solunumudur. Örneđin hipoksi mitokondriyumdaki oksidatif fosforilasyonu engeller. ATP oluşumu yavaşlar ve durur. Özellikle hücre zarının qubain duyarlı adenosin trifosfat aktivitesinin azalması , zarda aktif sodyum pompasının yetersizliğine yol açarak hücre içi sodyum birikimine ve hücreden potasyumun dışarı atılımına yol açar. Solit materyalin birikimine izoozmotik su birikimi eşlik ederek akut hücresel şişme meydana gelir.

Hücresel ATP azlığı adenosin monofosfat (AMP) artımı ile birlikte dir. Fosfofrüktokinaz enzimini uyarır, anaerobik glikoz hızı artarak glikojenden ATP oluşumu ile hücre enerji kaynakları korunur. Glikoliz , laktik asit ve fosfat türevlerinden hidroliz sonucu oluşan inorganik fosfat birikimini sonuçlar ve buda hücre içi pH'yı düşürür.

Daha sonra ise granüllü endoplazma retikulumdan ribozomların ayrılması ve polizomların monozomlara parçalanması eşlik eder. Eğer hipoksi devam ederse hücre sel değışikler devam eder ve zar geçirgenliği artar, mitokondriyon fonksiyonları azalır. Hücre yüzeyinde tomurcuklar oluşur. Sitoplazmada ya da dışında organel zarları gibi plazmadan köken alan konsantrik laminalı myelin şekiller görülür. Bu sırada mitokondriyonlar normal, şişmiş ya da gerçekten yoğunlaşmıştır. Endoplazmik retikulumu genişlemiştir ve tüm hücre belirgin olarak şişmiştir. Bu bozuklukların tümü geri dönüşlüdür.

Geri Dönüşsüz Zedelenme: Yapısal olarak mitokondriyon ve kristalarında aşırı vakuolizasyon, plazma zarında aşırı zedelenme, lizozomlarda şişme ve özellikle eğer iskemik alan yeniden beslenirse hücre içine yoğun kalsiyum tutulumu ile birlikte dir. Amorf kalsiyumdan zengin yapılar mitokondriyon matriksinde birikmeye başlar.

Geri dönüşsüz zedelenme mekanizmaları: Geri dönüşsüzlüğü karakterize eden iki olay vardır: Birincisi mitokondriyon bozukluğunun reperfüzyon ve reoksijenasyonuna rağmen düzeltilemeyişi (oksidatif fosforilasyon ve ATP yapımının gerçekleşmemesi) ve ikinci olarak membran görevlerinin çok ciddi bozukluğudur.

Membran zedelenmesinin oluşumunda dört potansiyel neden suçlanmaktadır

1. Membran fosfolipidlerinin giderek artan kaybı:

İskemik karaciğerde, geri dönüşsüz zedelenme membran fosfolipid kapsamının belirgin azlığı ile birliktedir. Fosfolipid kaybının bir açıklaması; iskemide sitozolik kalsiyum konsantrasyonunun uyarılmasıyla endojen fosfolipazların aktivasyonu sonucu fosfolipidlerin parçalanmasının artışıdır. Oksijen kaybı, mitokondrium ve endoplazma retikulumu içinde kalsiyum artıklarının birikimine ve hücre içi kalsiyum artışına sebep olur. Fosfolipidlerin sürekli kaybı ATP-bağımlı fosfolipidlerin yeniden yapımına veya dönüşümüne neden olur.

2. Hücre iskelet anomalileri:

İskemide hücre iskeletinden hücre membranının ayrılması hücre şişmesinde görülür ve gerilme ve rüptüre karşı membran duyarlılığını arttırır. Hücre iskelet proteinlerinin parçalanması hücre içi proteazlarının sitozolik kalsiyum artışıyla aktivasyonu sonucudur.

3. Toksik Oksijen Radikalleri:

İleri derecede toksik olan kısmen oksijenasyonu azalmış türevler, hücre membran ve diğer hücre yapılarında zedelenmeye yol açar. İskemik dokuda artan böylesi oksijen radikalleri kan akımı düzeldikten sonra reperfüzyon zedelenmesine neden olur. Toksik oksijen türevlerinin büyük ölçüde reperfüzyon sırasında iskemi alanında infiltrate olan polimorfonükleer lökositler tarafından yapıldığı düşünülmektedir. Eğer reperfüzyon oluşmaz ise öldürücü iskemik zedelenme sonuçta gelişir, fakat toksik oksijen türevleri görülmez.

4. Lipid Yıkım Ürünleri:

İskemik hücrelere, membranlar üzerinde deterjan etkisi olan fosfolipidlerin parçalanması sonucu katabolik ürünler birikir.

Özetle; hipoksi oksidatif fosforilasyonu etkiler ve hayati olan ATP yapımını engeller; kritik noktadan sonra membran zedelenmesi oluşur. Kalsiyum hücre ölümünde yapısal değişikliklerin potansiyel mediatörüdür.

İSKEMİ-REPERFÜZYON HASARI

Organizmada bir organ yada dokuda kan akımı kesilirse iskemik hasar oluşur. Bu hasar her organ için farklı olabilir. İskeminin şiddeti , iskeminin süresine ,organ boyutuna , ortamın ısisına ve transplantasyon aşamasında kullanılan farmakolojik solusyonuna bağlı olabilir. Reperfüzyon sırasında ise organlar tekrar kanlanmaya başlar. Bu kanlanma ile ortama salınan toksik metabolitler başta endotel olmak üzere dokuda ve organizmanın birçok yerinde harabiyet meydana getirirler (12). İskemi sırasında bozulan hücre yapı ve fonksiyonları, reperfüzyonun gerçekleşmesiyle oluşan serbest oksijen radikallerine karşı hücreyi dahada duyarlı hale getirmektedir . Bu nedenle iskemi hasarın süresi ne kadar uzunsa reperfüzyon hasarı da o derece ciddi olmaktadır.

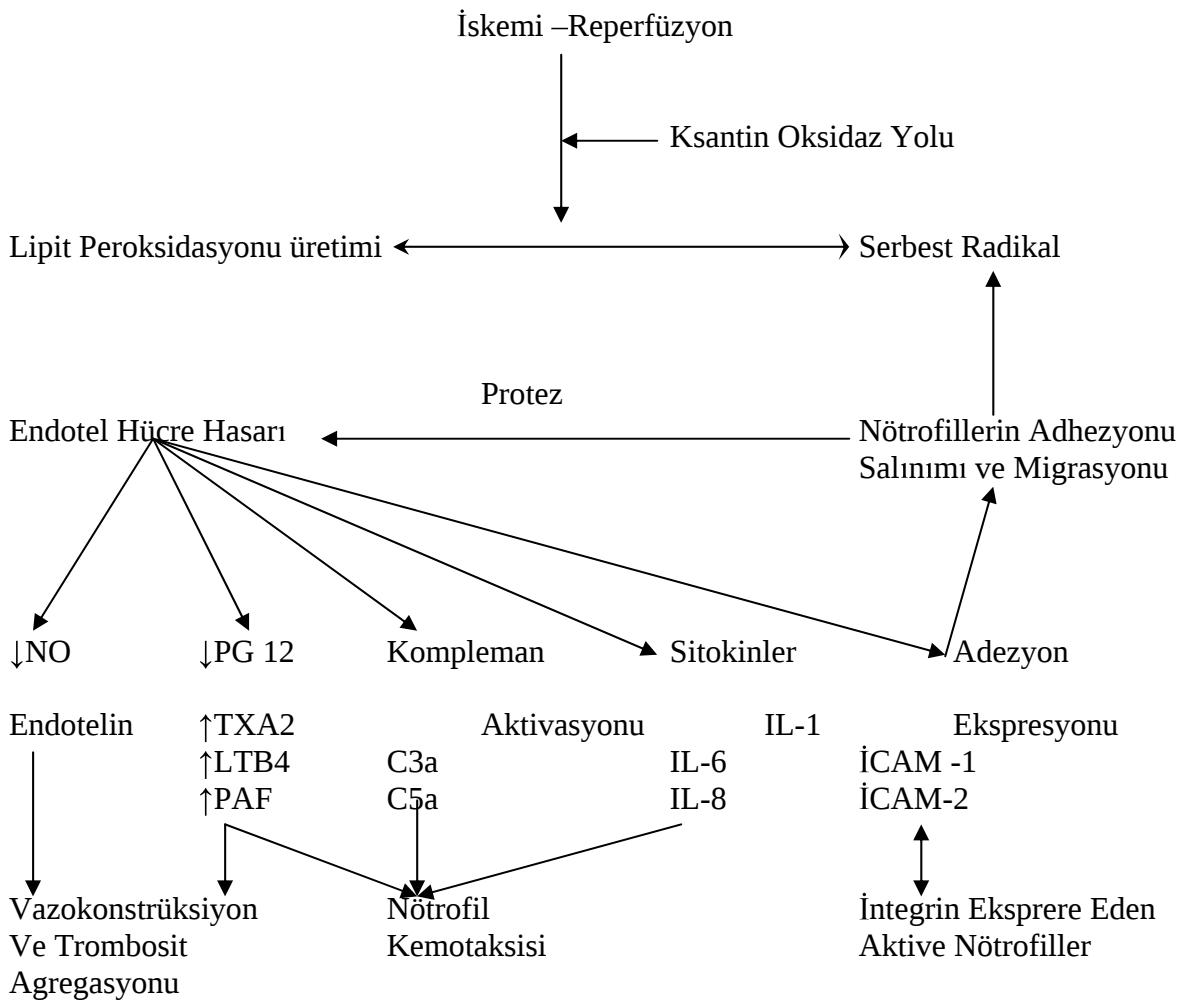
Akciğerde İ/R hasarı konusunda çok sayıda çalışma mevcuttur. I/R hasarı , fizyopatolojisi , İ/R hasarında kullanılan farmakolojik ajanlar ve İ/R ‘da akciğeri koruyucu flush solusyonları ve daha birçok konu hala araştırılmaktadır. Yapılan çalışmalarda İ/R ‘da akciğerde mikrovasküler geçirgenlikte artma, ödem, pulmoner vasküler rezistansda artış, gaz değişiminde bozulma meydana gelmektedir (13). Erken İ/R hasarı, akciğer nakillerinden sonra %10-20 oranında görülebilir (14).

İ/R hasarı akciğerin yetersiz saklanması, artmış kapiller permeabilite, uygunsuz ortam ısisı, farmakolojik ajanların uygun dozda verilmemesi, AC yıkama solusyonu yetersizliği ve cerrahi yöntemlerin yetersizliği gibi birçok sebep neden olabilmektedir (15). İ/R hasarı sadece lokal bir olay değildir, sistemik etkisi ile birçok organda hasara yol açmaktadır. İ/R hasarı bir dokuda şekillendiğinde, hasarın oluşmasına aracılık eden mediatörler vasıtasıyla başka dokularda da hasara neden olmaktadır (8). Barsaklarda İ/R ile oluşan serbest oksijen radikalleri uzak yerlerdeki organlarda (kalp, akciğerler gibi) vasküler hasara neden olabilmektedir.

İ/R sırasında vucutta bir takım değişiklikler meydana gelir. PMNL, mediatörler, komplemanlar ve Süper Oksit Radikalleri (SOR) ortama salınırlar (8,15,16). Bunlardan biri olan SOR stres, enflamasyon, kanser, travma gibi pek çok sistemik hastalıklar nedeni ile sistemik dolaşıma salınırlar ve hücrelere çok zarar verirler. Yapılan çalışmalarda İ/R hasarından özellikle SOR ve Nötrofiller (17) sorumlu tutulmuşlardır. İ/R hasarında SOR ‘leri sistemik dolaşıma çıkarlar ve bütün protein, lipid, enzimler ve diğer hücresel elemanlar ile reaksiyona girerek onların yapısını bozarlar ve hücresel mediatörlerin (18) ortama salınmasına neden olurlar. Bu mediatörler endotel başta olmak üzere bütün vasküler ve konnektif dokuda hasar oluşturup, hücreler arası bağların ayrılmasına ve hücreler arası kaçağın meydana gelmesine neden olur. Hücrelerin yapısı, fonksiyonu

bozulur. Ayrıca endotelden salgılanan PGI₂ / Tr-A₂ dengeside bozulur ve Tr-A₂ artar, doku içinde trombozlar meydana gelir, kan akımı sağlanamaz.

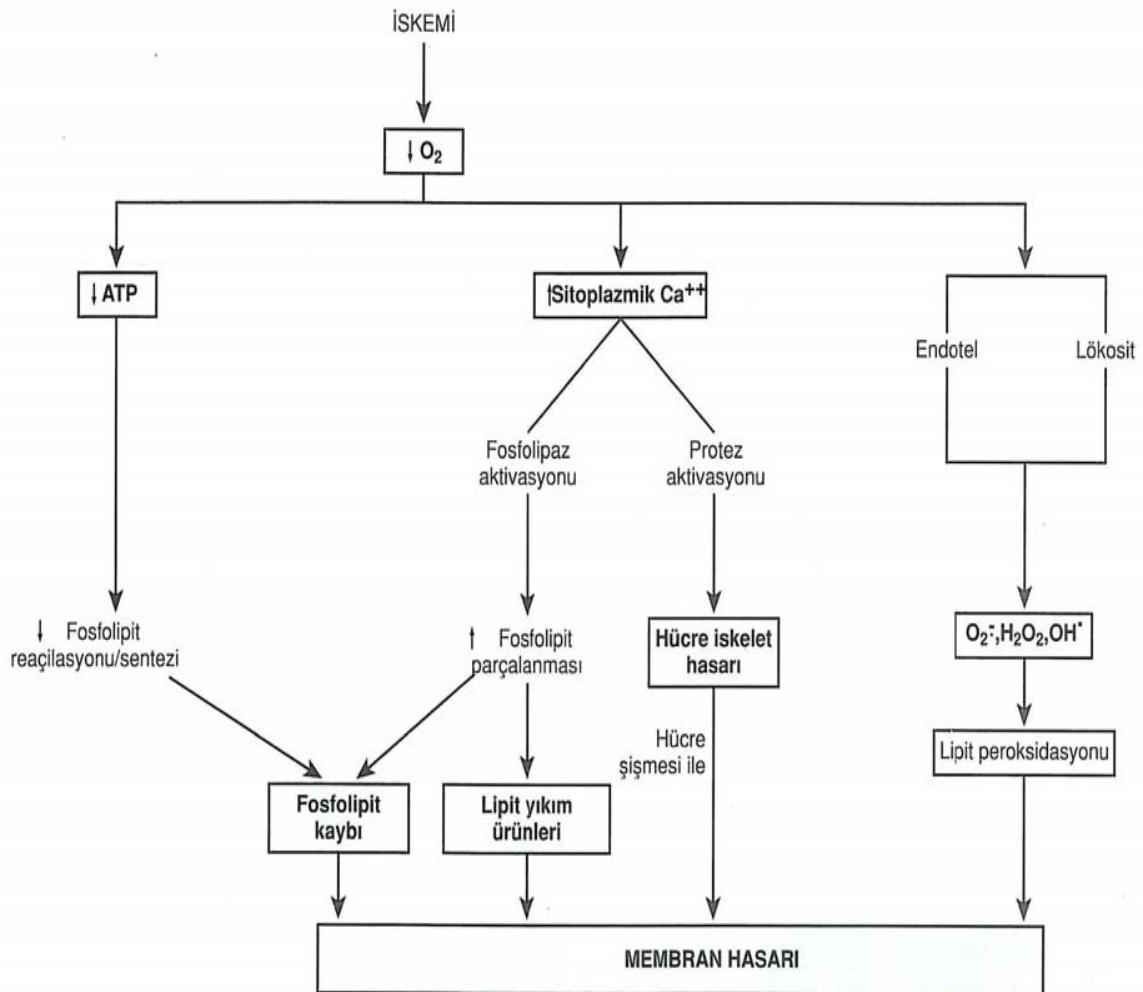
Bu reaksiyonlar sırasında endotelden ayrıca kompleman ve Nötrofilleri uyaran TNF, PAF, IL-1 ve IL-8 gibi mediatörler ortama salınır, endotel üzerinde yer alan ICAM-1 reseptörleri sayısı artar ve bu reseptörlere nötrofiller yapışarak daha fazla hücre hasarı meydana gelmesine neden olurlar. (şekil 1) (19)



Şekil 1: İskemi reperfüzyon hasarında endotel hücre hasarı.

Ayrıca iskemi ile birlikte hücrede ATP başta olmak üzere bütün enerjili fosfat yapıları yıkılır, hücre bütünlüğü bozulur ve SOR ortaya çıkar. SOR dış halkasında eşitlenmemiş bir e⁻ bulunan atom veya moleküllerdir. Hücresel solunum ile moleküler oksijenin %98 suya %2 si süperoksit radikaline dönüşerek ortadan kalkar. Bu toksik

İskemi sırasında anaerobik metabolizma fonksiyonları çalışmaya başlar. Hücrenin asidik hale gelmesi ile hücre membranı bozulur, Ca^{+2} hücre içine girer. Aynı zamanda ATP inozin ve hipoksantine indirgenir. Reperfüzyon sırasında hipoksantin Ca^{+2} aracılığı ile moleküler O_2 serbest oksijen radikallerine (süperoksit, hidrojen peroksit, hidroksil) yıkılır ve oluşan serbest O_2 radikalleri, hasarlanmış hücre duvarındaki yağ asitleri ile etkileşerek Lipid Peroksidasyon reaksiyonu meydana gelir. İskemi ile birlikte ATP yıkımı ile hücre içi ATP kaybı meydana gelir. Na-K kanalları çalışmaz ve hücre içi Ca^{+2} artışı olur. Ca^{+2} iyonu hücre içi enzimleri aktive edip hücre hasarını artırır (15,20,21). Ayrıca hücreden salınan Aroşidonik asit metabolitleri, aktive olmuş komplemanlar ve sitokinler nötrofil agregasyonunu artırır. Nötrofillerin adezyonu, SOR'nin salınımına, elastaz ve kollejenaz gibi enzimlerin salınımına ve AC dokusunda harabiyete neden olurlar.(Şekil 3) (22)



Şekil 3: İskemi sonrası hücre içi Ca^{+2} artışı ve membran hasarı gelişimi

Lipid peroksidasyonu sonucu aldehitler, hidrokarbonlar, MDA oluşur. Serbest oksijen radikallerini göstermek için lipid peroksidasyon son ürünü olan MDA gösterilmesine dayanır.

Bütün bu mekanizmalar aslında iç içe girmiş ve birbirini döngü şeklinde uyaran merkezler ile zincir devam eder. Mekanizmaların merkezinde Endotel, Nötrofil, Trombosit bulunmaktadır. Bu hücreler ya sayılan mediatörlerin etkisi ile aktifleşmekte ve inflamatuvar cevap ile birlikte doku hasarına sebep olmakta yada bizzat başka mediatörler salgılayarak doku hasarına sebep olur.

MELATONİN

Pineal bez biyolojik olarak aktif bir çok bileşik salgılar ve en önemli salgısal ürünü melatonindir (N-asetil-5-metoksitriptamin). Melatonin 232 molekül ağırlıklı bir moleküldür.

Melatonin adını, kurbağa derisinde pigment hücrelerindeki melanin granüllerinin agregasyonuna neden olmasından dolayı almıştır. Melatoninin organizmada varlığı ilk defa 1958’de Lerner ve ark. tarafından gösterilmiş (23,24). İnsanda ve sıçanda melatonin sekresyonunun karanlıkta arttığı ve ışığa maruz kalmakla inhibe olduğu bilinmektedir. Melatoninin ayrıca uykusuzlukta ve üreme fonksiyonlarının düzenlenmesinde, serbest radikallerin toksik etkisinin önlenmesinde etkili olduğu kabul edilmiştir.

Melatoninin sentezi ve metabolizması

Triptofan, sistemik dolaşımdan pineal glanda aktif transport ile geçer. **Triptofan**, önce triptofan hidroksilaz ile orto pozisyonundan hidroksillenerek 5-hidroksitriptofana dönüşür. Bunu aromatik aminoasit dekarboksilazların kataliz ettiği dekarboksilasyon reaksiyonu izler. Oluşan ürün önemli bir biyolojik amin olan **5-hidroksitriptamin** (serotonin)’dir. Pineal bez serotonin konsantrasyonu açısından vücutta en zengin organdır. Serotonin, **N-asetiltransferaz (NAT)** ve **hidroksi indol O-metil transferaz (HİOMT)**’ın birbirini takip eden aktiviteleri ile son ürün melatonine dönüşür.

Triptofan →5-Hidroksi (Triptofan) →5-Hidroksi Triptamin (**serotonin**)

Serotonin→..... →.....→**Melatonin**

NAT HİOMT

Pineal bezde melatonin sentezi sirkadiyen bir ritm gösterir ve karanlık faz boyunca maksimum noktasına ulaşır. Bu ritm suprakiazmatik nükleuslar tarafından algılanan ışık-karanlık dönüşümü ile sağlanır. Karanlığın başlamasıyla birlikte sinir uçlarından noradrenalin salgılanır; bu da pinealositlerdeki beta adrenerjik reseptörleri uyarır. Adenilat siklaz aktivitesinin artmasıyla oluşan cAMP, NAT sentezini uyarır. NAT enzimatik aktivitesinin gece boyunca artışı serotonin düzeylerini düşürür, buna bağlı olarak N-asetilserotonin ve melatonin düzeylerini artırır.

Melatonin sentezinde, pineal gland ve retinada bulunan iki enzim önemli rol oynamaktadır; NAT enzimi ile HIOMT enzimi. Bu enzimlerin salınımı; gündüz ışıktaki azalmasına karşın, gece karanlıkta 100 kata ulaşan bir artma göstermektedir.

Pinealositlerde üretilen melatonin çok hızlı bir şekilde bu hücrelerin komşuluğunda yer alan kapillerlere bırakılmak suretiyle sistemik kan dolaşımına karışmaktadır. Lipofilik özelliği nedeniyle vücuttaki tüm doku ve sıvılara kolayca melatonin dağılabilmektedir.

Melatoninin etki mekanizması

Melatoninin lipid çözünürlüğünün iyi olması nedeni ile hücre membranını kolaylıkla geçebilmektedir. Hedef dokulardaki etkisini, bu dokularda yer alan spesifik reseptörler aracılığı ile yapmaktadır. Ayrıca bu reseptörlerin hücrenin nükleus kısmında da olduğu söylenmektedir.

Son yıllarda yapılan çalışmalarda melatonin reseptörünün G proteine bağlı reseptör ailesine ait olduğu gösterilmiştir. İmmün sisteme ait hücrelerde etkisini ise **cAMP** üzerinden gösterirler (25). Ayrıca melatoninin reseptörden bağımsız etkileri de vardır ve bu etkilerinde aracı olarak **kalmodulin** kullanılır ve Ca^{+2} la ilişkili olan hücre içi olaylar değişikliğe uğratılır.

Melatoninin Antioksidan Özelliği :

Melatonin hormonunun antioksidan özelliğinin olduğu bilinmektedir. Organizmada aerobik solunum aşamasında oksijenin %5 lik kısmı hidroksil radikali ($OH^{\cdot}$), hidrojenperoksit radikali (H_2O_2), süperoksit anyon radikali ($O_2^{\cdot-}$) ya da single oksijen radikali ($O_2^{\cdot-}$) olarak taşınmaktadır (26). Bu oksijen radikalleri bilindiği gibi hücre zarına toksik ürünlerdir. Bu radikaller hücre zarına direkt etki edip, hücre zarındaki fosfolipidler ile reaksiyona girerek hücre zarı bütünlüğünü bozmaktadır. Melatonin, işte bu oksijen radikallerine karşı hücreyi koruyan antioksidan ajanlardan biridir (26).

Melatonin vücuda her yoldan uygulanabilen, hızla absorbe olabilen ve ileri derecede lipofilik özelliği nedeniyle tüm dokulara kolayca diffuz olabilen bir maddedir. Serbest radikal giderici etki için herhangi bir membran reseptörü bağlantısına ihtiyaç göstermediği yapılan çalışmalarda gösterilmiştir. Ayrıca melatoninin antioksidan savunma sisteminde rol alan süperoksit dismutaz ve nitrikoksit sentetaz gibi enzim aktivitelerini de değiştirdiği rapor edilmiştir.

Melatonin hormonu diğer antioksidanlarla etkileşime girerek onların etkinliğini artırır. Vit C, tiriloks ya da GSH ile in vitro ortamda inkübe edildiğinde her üçüyle sinerjik etki gösterdiği ve in vitro serbest radikal oluşumunu azalttığı gösterilmiştir (27,28).

Yapılan çalışmalarda Melatoninin hormonunun 5-lipooksijenaz enziminin inhibe ettiği gösterilmiştir. Bu enzim allerjik ve enflamasyon reaksiyonlarında anahtar rol oynayan lökötrienlerin sentezinde görev yapar. Melatoninin 5-lipookijenaz aktivitesini inhibe etmesinin enflamasyonu ve sonuçta serbest radikal hasarını azaltacağı düşünülebilir.

Melatoninin antioksidan özellikleri aşağıda sıralanmıştır :

- 1-Oksidatif fosforilasyonun etkinliğini artırır
- 2-Antioksidan enzimleri uyarır
- 3-Geniş ve yaygın hücre içi dağılım gösterir
- 4-Tüm morfolojik bariyerleri geçer
- 5-Hücre membranını stabilize eder
- 6-Proinflatuvar stokinleri azaltır
- 7-Adezyon molekülleri azaltır
- 8-Oksijenden türeyen radikalleri etkisiz hale getirir

Melatoninin toksik yan etkileri

Yapılan çalışmalarda melatoninin çok yüksek dozlarda (300 mg/kg/gün'ü aşan) ve uzun süreli kullanım durumlarında bile toksik bir yan etkisi görülmemiştir.

N-ASETİL SİSTEİN

N-Asetilsistein (NAC) doğal bir aminoasit olan L-sisteinin N-asetillenmiş türevine verilen isimdir (29). Potent antioksidan ve antienflatuvar özelliği olan tiol bileşiğidir ve bu durum bileşiğe nükleofilik özellik kazandırır. Kimyasal formülü $C_5H_9NO_3S$, moleküler ağırlığı 163,2 gr/mol'dür. En iyi ve en eski bilinen etkisi mukolitik

etkisidir. Aynı zamanda iyi bilinen bir GSH prekürsörüdür. Dokularda, özellikle akciğer dokusunda yüksek konsantrasyonda bulunur.

NAC antioksidan bir maddedir. Akciğer ve karaciğerde glutatyon sentezine sistein vericisi olarak katılır ve glutatyon sentezini artırır. Plazma proteinlerine bağlanma oranı %50'dir. Eliminasyon yarı ömrü 6.25 saattir. NAC organizmadan başlıca böbrekler ve karaciğer yolu ile atılır (30).

Moleküler yapısı ile hücre içine kolayca girebilen Asetilsistein, burada deasetillenerek L-sisteine dönüşür. L-sistein bir glutatyon prekürsörüdür ve glutatyon sentezini artırır. Glutatyon ise endojen ve eksojen sitotoksik maddelerin, oksijen radikallerinin hücreye zarar vermesini önleyen hücre bütünlüğünün ve işlevlerinin devamlılığı için çok önemli, endosellüler mekanizmada temel rolü olan yüksek reaktiflikte bir tripeptittir.

Glutatyon redükte (GSH) ve okside (GSSG) olmak üzere iki şekilde bulunur. Glutatyonun redükte formu oksidatif hasara karşı korumada çok önemli rol oynar (31).

NAC en yaygın kullanılan mukolitik ilaç olup, etkinliğini herhangi bir mukokinetikten daha fazla olduğu bildirilmektedir. NAC, sahip olduğu sülfidril grubu ile mukus glikoproteini içerisindeki disülfid bağlarını koparma yeteneği sayesinde, mukoid ve mukopürülan sekresyonlar üzerine mukolitik etki gösterir. Bronşial sekresyonların atılımını ve solunumunu kolaylaştırarak akciğer fonksiyonlarının düzenlenmesine yardımcı olur.

NAC'in, SOR tarafından oluşturulan doku hasarına karşı koruyucu etkisi olduğu ve bu etkisini GSH düzeyini artırarak, direkt scavenger etki göstererek gerçekleştirdiği bildirilmektedir. GSH direkt olarak serbest sülfidril grubu aracılığıyla hidrojenperoksit, süperoksit, hidroksil ve alkoksil radikalleri ile etkileşime girebilmekte, böylece hücreyi oksidanların, elektrofilik maddelerin, serbest radikallerin hasarına karşı korumada önemli bir rol üstlenmektedirler (32).

NAC'nin kullanıldığı değişik hastalıklar arasında kanser, kardiovasküler hastalıklar, metal toksisitesi ve karaciğerin parasetamol toksisitesi sayılabilir (29).

NAC, asetaminofen toksisitesinde ve alkol toksisitesinde 10–18 saat içinde verildiği takdirde karaciğeri hasardan korumakta ve mortaliteyi azaltmaktadır. Yapılan çalışmalar göstermiştir ki, İdiopatik pulmoner fibrozisli hastalarda, epiteliyal yüzey sıvısının GSH değerleri normal değerlerin yaklaşık %51'i kadar az bulunmuştur. Bu hastaların tedavisinde NAC kullanılabilir. Akciğerlerdeki bu GSH defisitinin mekanizması tam olarak açıklanamamıştır.

N-asetilsisteinin Yan Etkileri

İlaç intoleransına bağlı deri döküntüleri, kaşıntı, bulantı, kusma, ürtiker gibi yakınmalar görülebilir. Çok nadir olmakla beraber flushing, anjioödem, geçici hipotansiyon ve taşikardi gibi semptomlar da bildirilmiştir (30).

ANTIÖKSİDANLAR

Reaktif oksijen türevlerinin vücutta meydana getirdiği hasarları önlemek üzere vücutta görev yapan savunma sistemlerine antioksidan savunma sistemleri adı verilir (33). Antioksidanlar, hem direkt, hem de dolaylı olarak ksenobiyotiklerin, ilaçların, karsinojenlerin ve toksik radikal reaksiyonların istenmeyen etkilerine karşı hücreleri koruyan maddelerdir (34,35,36).

Antioksidan sistemin başlıca elemanları :

A-Enzimler :

a. Süperoksit dismutaz (SOD); süperoksit radikalının hidrojen peroksit ve moleküler oksijene dönüşümünü sağlayan bir metaloenzimdir. Bütün hücrelerde bulunmaktadır (37).

b. Katalaz; yapısında protoporfirinIX Fe (HEM) grubu içerdiğinden bir hemoprotein olarak kabul edilmiştir. Hidrojen peroksit'i moleküler oksijene ve suya parçalayan reaksiyonu katalizlemektedir. Kan, kemik iliği, karaciğer, böbrek ve mukoza membranında yüksek miktarda bulunmaktadır. Peroksidaz aktivitesi de bulunmaktadır (38,39).

c. Glutatyon peroksidaz (GSH-PX); memeli eritrositlerinde varlığı ilk kez 1957 yılında Mills tarafından gösterilmiştir. GSH-PX, lipid peroksidasyonunun başlamasını ve gelişmesini engelleyici özellikte tetramer yapısında bir enzimdir (40,41).

d. Glutatyon redüktaz (GSH-Red); NADPH varlığında oksitlenmiş glutatyonun indirgenme reaksiyonunu katalizlemektedir. Bu oksido-redüksiyon enziminin, koenzimi NADPH, prostetik grubu ise FAD'dir (42,43).

e. Glutatyon transferaz (GST)

B-Suda çözünen radikal tutucular:

a. Glutatyon (GSH); Başta karaciğer olmak üzere pek çok dokuda yüksek düzeylerde bulunan ve glutamat, sistein ve glisinden sentezlenebilen bir tripeptittir (44).

GSH'un pek çok metabolik görevi bulunmaktadır;

1-GSHPX, GSH-Red ve GST gibi enzimlerin substratıdır

2-serbest radikallerle ve peroksitlerle reaksiyona girerek hücreleri oksidan hasara karşı korur

3-protein yapısındaki sülfidril ($-SH$) gruplarını indirgenmiş halde tutarak, pek çok protein ve enzimin inaktivasyonunu engeller

4-aminoasitlerin membrandan transportunu sağlar, 5-hemoglobinin methemoglobine dönüşmesini önler (45,46,47,48).

b. Vitamin C; suda çözünen vitaminlerdendir, insanlarda sentezlenemediği için dışarıdan alınmalıdır. Hidroksilasyon reaksiyonlarında indirgeyici ajan olarak görev yapmaktadır. Güçlü bir antioksidandır. Lipid peroksidasyonunu başlatıcı radikalleri temizleyerek, lipitleri ve zarları oksidan hasara karşı korur. E vitamininin rejenerasyonunda da görev alır (35,36,49).

c. Ürik asit; normal plazma konsantrasyonunda antioksidan etki göstermektedir. Demir ve bakır iyonlarını bağlayarak etkisizleştirmektedir. Singlet oksijen, hipoklorit, hidroksil, süperoksit ve peroksil radikallerini temizlemektedir. Lipid radikalleri üzerine etkisi bulunmamaktadır (35,36,49).

d. Glukoz

e. Sistein

C.Yağda çözünen radikal tutucular

a. Vitamin E; yağda çözünen bir vitamindir. Zarda bulunan fosfolipidlerin yapısındaki doymamış yağ asitlerini serbest radikallerin etkisinden koruyan ilk savunma hattını oluşturur. E vitamini, süperoksit ve hidroksil radikallerini, singlet oksijeni, lipid peroksitlerini ve diğer radikalleri indirger (35,36).

b. Karotenoidler ve retinoidler; A vitamininin ön maddesi karoten en önemlisidir. Karotenoidler singlet oksijeni baskılamakta, peroksit radikallerini temizlemektedirler (36).

c. Bilirubin; lipid peroksidasyonunu inhibe ettiği ve süproksit ve hidroksil radikallerinin toplayıcısı olduğu bildirilmiştir (36).

d. Ubikinonlar; lipitlerde çözünen ve izoprenoid takı içeren kinin türevleridir. Oksijen kaynaklı radikaller ve singlet oksijen ile etkileşerek lipit peroksidasyonunun başlamasını ve biyomoleküllerin hasar görmesini engellemektedirler (36).

e. Flavonidler; lipitlerde çözünürler. Lipid peroksidasyonunu başlatan radikalleri tutarak, metal iyonlarını bağlayarak ve radikal oluşturuvcu enzimleri inhibe eder (36).

D. Metal iyonlarını bağlayan proteinler:

- a. Ferritin
- b. Transferrin
- c. Haptoglobulin
- d. Hemopeksin
- e. Seruloplazmin
- f. Albümin

Etki mekanizmalarına göre antioksidan savunma sistemi :

A.Koruyucu antioksidanlar; bunlar serbest radikal oluşumunu baskılar (SOD, katalaz, GSH-PX, GST, karotenoidler, transferin, albümin, haptoglobülin, seruloplazmin) (50).

B.Radikal temizleyici antioksidanlar; zincirin başlamasını ve kırık zincirin uzamasını baskılar (albümin, bilirubin, karotenoidler, ubiquinol, ürik asit, vitamin A, vitamin C, vitamin E) (50).

C.Tamir ve yapım enzimleri; hasarın tamirini ve membranların yeniden yapılanmasını sağlar (DNA tamir enzimleri, lipaz, proteaz, transferaz) (50).

BAL

İlk bronş lavajı 1928 yılında Jackson ve Vicente tarafından bir bronşektazi vakasında pürülan sekresyonların temizlenmesi amacıyla kullanılmıştır. Fiberoptik bronkoskopinin kullanıma girmesiyle Cantrell ve ark. sağlıklı bireylerde bugünkü anlamda ilk Bronkoalveolar Lavajı (BAL) yapmışlardır. Bundan sonraki dönemlerde BAL çeşitli akciğer hastalıklarında alt solunum yollarındaki epitel yüzeylerine ait inflamatuvar ve immün sistemi temsil eden hücre ve diğer sistem elamanlarının incelenmesinde kullanılan bir tanı yöntemi haline gelmiştir. Günümüzde ise malignite ve enfeksiyonların tanısında da rol oynayan yöntemlerden birisidir (46).

Bronkoalveolar Lavaj Uygulaması

Yöntem olarak henüz bir standart yoktur. Sıklıkla transnazal uygulanır. BAL, rutin bronkoskopik inceleme tamamlandıktan sonra uygulanır. BAL öncesinde biopsi ve fırça uygulanmaz. BAL için orta lob veya lingula seçilir (Yatar durumda sıvı hacmi ve hücre sayısı maksimumdur). Üst lobun anatomik yerleşimi nedeniyle elde edilen sıvı hacmi diğer loblara göre daha azdır. Akciğer kanseri, mantar ve bakteri enf. gibi fokal radyolojik infiltrasyon durumlarında lavaj lezyon bölgesinden yapılır (47).

BAL uygulanması için bronkoskop, segmental bir bronşa sıkı bir şekilde yerleştirilir. Öksürük ve bronkospazmın azalması nedeniyle ve oda sıcaklığındaki sıvılara göre daha fazla hücre elde edilmesi amacıyla 37 C° kadar ısıtılmış serum fizyolojik, şırınga ile 5mm/sn akım hızında verilir. Serum fizyolojik mainin geri aspirasyonu, enjektör veya aspiratör ile 50-100 mmhg basınç uygulanarak yapılır (yüksek basınçlar hava yolu kollapsına yol açarak aspire edilen sıvının miktarını azaltır). Tüm BAL sırasında ortalama 100 ml, en fazla 300 ml sıvı uygulanmalıdır (300 ml üzerindeki sıvılarda atelektazi ve ateş gibi komplikasyonlar artar). Derin inspirium ve ekspirium lavaj miktarını artırır. BAL sırasında ve takiben 2lt/dk oksijen uygulanmalıdır. Genellikle verilen sıvının %40-60'ı geri alınır ve canlı hücre oranı %80'dan fazladır.

BAL sıvısı

Hücre, solid materyal, lipidler, enfeksiyon ajanları ve biokimyasal elemanlar içerir. Tüm bunlar distal hava yolları ile pulmoner intertisyumun fizyolojik ve immunolojik durumunu yansıtır. Bu nedenle BAL incelemeleri bir anlamda akciğer patolojisine açılan bir pencere görevi üstlenir. BAL bulguları çok dinamiktir, seri yapılan BAL incelemeleri ile hastalık hakkında önemli bilgiler sağlanabilir.

Normal bir erişkinde 100 ml SF ile BAL yapıldığında ; $10-15 \times 10^6$ hücre ile 1-10 mg protein içeren 40-60 cc sıvı elde edilir (44).

BAL'da Diferansiel Hücre Sitolojisi

Total hücre sayısı	15×10^6
Makrofajlar	%85
Lenfositler	%7-12
T-lenfositler	%70
-T-Helper (CD4) %50	CD4/CD8:1.6
-T-Süpresör (CD8) %30	
T-Killer	%7
B-lenfositler	%5-10
Tiplendirilmeyen lenf.	%15-20
Eozinofiller	%<1
Bazofiller	%<1
Silier Hücreler	%1-3
Eritrositler	%<5

BAL SONUÇLARI

Yaş, cins ve ırkın BAL toplam hücre sayısı ve diferansiel sitoloji üzerinde belirgin etkisi yoktur. Sigara içmeyenlerle eskiden içenler arasında BAL toplam hücre sayısı açısından anlamlı fark saptanmamıştır. Halen sigara içenlerde ise toplam hücre sayısı üç kat daha fazla bulunmuştur. Sigara içenlerde makrofaj sayısı dört kat daha fazla olup bu artış total hücre sayısındaki artıştan daha fazladır. Böylece makrofaj yüzdesi sigara içenlerde içmeyenlere göre anlamlı derecede artmıştır.

Sigara içmeyenlerle eskiden içenler arasında makrofaj yönünden fark bulunamamıştır. Nötrofil sayısı sigara içenlerde içmeyenlere oranla altı kat daha yüksektir. Eskiden sigara içenlerde de nötrofil sayısı içmeyenlere oranla iki kat daha fazladır. T-helper hücreler sigara içenlerde eskiden içen ve içmeyenlere göre anlamlı derecede düşük bulunmuştur.

T-süpresörler ise sigara içenlerde anlamlı derecede artmıştır. Buna göre sigara içenlerde Th/Ts oranı diğer iki gruba göre anlamlı derecede düşüktür. BAL, silyalı ve skuamöz epitel hücreleri ise total hücre sayısının %3'ünü geçmez. Daha yüksek oranlar inflamasyon bulgusudur. Polimorf nüveli lokositler total hücre sayısının %1'i kadardır.

Özellikle nötrofiller BAL sıvısında daha yüksek sayılara ulaştığında şu durumlardan biri söz konusudur:

- Travmaya bağlı kan ile kontaminasyonu mevcuttur
- Hasta sigara içmektedir
- Alveollerde nötrofil artışıyla karakterize kronik bir akciğer hastalığı mevcuttur
- İnflamatuvar havayolu hastalığına bağlı bronş kaynaklı nötrofiller mevcuttur.

BAL'da Kontraendikasyonlar

- Kesin kontraendikasyon yoktur
- Hasta kooperasyonunun olmaması
- $FEV_1 < 1000\text{ml}$
- Orta veya ciddi astım
- Oksijenle düzeltilemeyen hipoksi
- Hiperkapni
- Ciddi kardiyak aritmi
- 6 hafta içerisinde geçirilmiş MI
- Düzeltilmeyen kanama diatezi rölatif kontraendikasyonlardır.

AKCİĞER TRANSPLANTASYONUNDA KULLANILAN SOLUSYONLAR

Terminal dönem akciğer hastalıklarında akciğer transplantasyonu etkin bir tedavi modeli olmaktadır. Ancak vericilerin %10-35'inde ortaya çıkan erken greft disfonksiyonu ciddi bir problem oluşturmaktadır. Bu sendrom tipik olarak transplantasyondan 72 saat sonra ortaya çıkmakta ve nonspesifik alveolar hasar, akciğer ödemi, pulmoner vasküler rezistansın artması ve hipoksemi ile karakterizedir. Patogenezi tam olarak anlaşılamamakla birlikte genellikle beyin ölümü süresinden reperfüzyon zamanına kadar geçen sürede ortaya çıkan akciğer hasarına bağlı multifaktoriyel bir olay olduğu kabul edilmektedir. Bu nedenle İ/R hasarının engellenmesinde akciğerin korunması, organ canlılığının devamı ve erken greft disfonksiyonunun azaltılması çok önemli yer teşkil etmektedir.

Bilindiği üzere akciğer transplantasyonunda donör akciğeri korumak amacıyla birçok solusyonlar kullanılmıştır. Bu solusyonlar intracellüler (Euro-Collins ve Wisconsin Solusyonu) ve ekstrasellüler (LPDS) solusyonlar olarak iki grupta toplanabilir.

Kullanılan Solusyonların içeriği

	E-C	LPDS
Na (mmol/l)	10	138
K (mmol/l)	11	5 6
Cl (mmol/l)	15	142
Mg (mmol/l)	(-)	0.8
SO ₄ (mmol/l)	(-)	0.8
Dekstran (gr/l)	(-)	50
HCO ₃	10	(-)
H ₂ PO ₄	15	0.8
HPO ₄	42.5	(-)
Glukoz (g/L)	35.7	0.91
Osmolarite (mOsm/L)	375	292

TABLO 1 : Kullanılan E-C ve LPDS ‘nın karşılaştırılması

Günümüzde E-C’in modifikasyonu ile hazırlanmış birçok solusyon klinik akciğer transplant programlarında yaygın olarak kullanılmıştır (51). Ancak E-C’in yüksek K⁺ konsantrasyonu, ödem oluşumunu takiben pulmoner vazokonstruksiyona neden olduğuna

inanılır ve E-C'in klinik uygulamasında reperfüzyon hasar oranında artış olduğu saptanmıştır (48).

Daha önce yapılmış bir çalışmada, köpek akciğer transplantasyon modelinde akciğerin korunmasında ekstrasellüler sıvı solusyonlarının, intracellüler sıvı solusyonlarına göre akciğeri daha iyi koruduğu rapor edilmiştir (53,54). Ancak bu çalışmayı takiben yapılan başka bir çalışmada ise birkaç ekstrasellüler sıvı solüsyon incelenmiş ve yüksek sodyum ve kısmen düşük potasyumlu %2 lik düşük molekül ağırlıklı dekstran ve %1'lik glikoz bunlar arasında en iyi solusyonlar olarak değerlendirilmişlerdir.

EP4, Ekstrasellüler fosfatla tamponlanmış solüsyon Tip 4 diye adlandırılır (54). Bu solüsyon ile başarılı akciğer koruması 96 saate köpek akciğer transplant modelinde elde edilmiştir. Bu solüsyonun modifiye formlarından birisi olan ve DPDS olarak isimlendirilen solüsyon Toronto akciğer transplant programı tarafından tanıtılmış ve E-C ile karşılaştırıldığında daha avantajlı olduğu görülmüştür (55). LPDS pek çok akciğer transplant programında günümüzde kullanılmaktadır. EP4 solüsyonunda Japonyada klinik olarak uygulanmaktadır ancak yayınlanmış çok fazla veri yoktur.

Yapılan bir başka çalışmada, verici akciğer greftlerinin korunmasında E-C ve LPDS'nun postoperatif oksijenizasyona etkisi karşılaştırılmış. Çalışmada postoperatif oksijenasyon parametresinin 0 gün , sonra E-C'e göre LPDS grubunda arttığı görülmüştür (56). LPDS grubunda transplantasyondan 12 ve 24 saat sonrasında oksijenasyonun EC'e göre önemli derecede arttığı ve LPDS grubunda EC'e göre mekanik ventilasyon süresinde önemli derecede azalma izlenmiştir.

Biz bu çalışmamızda LPDS kullanmayı tercih ettik.

1 Litre LPDS'nu ; % 5 dekstran 40, 6 mmol K, 0.8 mmol Mg, 0.8 mmol H₂PO₄ ve 5 mmol glukoz içerir.

AKCİĞERİN FLUSH SOLUSYONU İLE SAKLAMA ISISI

Akcığer transplantasyonu programlarında pulmoner arterin flushlanma ısısı 1 ile 4 C° arasında kabul edilir. Akciğerin çıkartılmasını takiben, akciğerler kristaloid solüsyon içerisine daldırılır ve +1C°'de transport edilir. Sundereas ve ark. (1993) de bilateral maymun AC transplantasyonunda, Wang (1993) in vitro tavşan akciğer perfüzyon modelinde daha makul derecede hipotermi (10C°) daha üstün akciğer koruması sağladığını göstermişlerdir (57). Ancak Mayer ve arkadaşlarının (1992) köpek allograft çalışmalarında 4 C° ile 10 C° lik akciğerin saklanması arasında farkın olmadığı görülmüştür (58).

FARMAKOLOJİK AJAN EKLENMESİ

Akciğer transplantasyonu konusunda yapılan çalışmalarda perfüzatın single yada bir başka farmakolojik etken ile etkinliğinin artırılması konusunda çok sayıda çalışma yapılmıştır. Günümüzde kullanılan bu ajanlar sadece perfüzata eklenmekle sınırlı kalmamakta ayrıca, donör girişim öncesi, tansplante edilen akciğerin reperfüzyonu sırasında veya öncesinde uygulaması mümkündür (59).

STEROİDLER

Perfuzatın kendisine katılabilir veya donörün girişim öncesi ve reperfüzyon öncesi alıcının tedavisinde kullanılır. Antienflamatuar ve lökosit stabilize etkilerinden yararlanmak amacı ile kullanılır (60).

PROSTOGLANDİNLER

Akciğer transplantasyonlarında çoğu merkezde flush solusyonu içerisinde kullanılmaktadırlar (61). Pulmoner vazodilatatör, perfuzatın homojen dağılımı, sitoprotektif, immunosüpresan, platelet ve trombüs oluşumunu engelleyen, vasküler permeabilityi azaltarak akciğeri koruyucu etkinliği olan ajanlardır (62).

SOR TEMİZLEYİCİLER

İ/R hasarının temelinde SOR yatmaktadır. Bu toksik ürünlerin artışı akut akciğer hasarına ve akciğer transplantasyonlarında greftin reddine neden olmaktadır. Bu nedenle akciğerin korunmasında serbest radikal temizleyicilerin kullanılması büyük ilgi görmüştür. E-C solusyonundaki dekstroz osmotik etki ile serbest hidroksil radikallerinin temizlenmesini sağlar. Yine serbest oksijen radikal temizleyicileri prezervasyon rejimlerine, perfuzat içerisine reperfüzyon öncesi ve sırasında eklenirler. Bu ajanlar süperoksit dismutaz, katalaz, allopurinol, desferoksamin içerir (63). Bunlar SOR'ne farklı noktada etki ederler.

KALSİYUM KANAL BLOKERLERİ

Yapılan çalışmalarda verapamil'in iskemi sonrası sitozol ve mitokondrialarda masif kalsiyum birikimini önleyerek reperfüzyon sonucu oluşan hasarı önlediği görülmüştür (64).

PLATELET AKTİVE EDEN FAKTÖR ANTAGONİSTLERİ

Akut akciğer injury modelleri göstermiştir ki , akciğer injurisinde platelet aktive eden faktörün rolünün büyük olduğu ve PAF antagonistlerinin akciğer fonksiyonunda önemli düzelme sağladığı gösterilmiştir.

KOPLEMAN AKTİVASYON İNHİBİSYONU

Kompleman sisteminin aktivasyonu kardiopulmoner bypass, erişkin solunum sıkıntısı sendromu ve İ/R akciğer hasarında önemli etkiye sahiptirler. Bu etkenin inhibisyonu akciğerin korunmasında önemli yer teşkil etmektedir.

LÖKOSİT AZALTICILAR

İ/R injurisinde oluşan doku hasarı SOR tarafından etkilenen hücrelerce ortama salınan mediatörler ve bunun sonunda ortaya çıkan mikrovasküler staz ve vazospazm nedeni ile ortaya çıkmaktadır. Deneysel çalışmalarda gösterilmiştir ki, lökosit filtreleri ve lökosit azaltıcı ajanların kullanılması ile İ/R hasarının önlenmesinde daha iyi sonuçlar alınmıştır (65).

MDA

Fagositik hücrelerin uyarılması, fosfolipaz ve protein kinazın aktivasyonu, plazma membranlarında araşidonik asidin salınımına yol açar. Araşidonik asidin siklooksijenaz tarafından katalizlenen oksidasyonu prostaglandinleri, lipooksijenaz tarafından katalizlenen oksidasyonu ise lökotrienleri verir ve bu tepkimeler sırasında serbest radikaller oluşur.

Lipid peroksidasyonu PUFA'dan bir hidrojen atomu uzaklaştırılması ile başlar. Oluşan lipid radikali dayanıksız bir bileşiktir ve bir dizi değişikliğe uğrar. Lipid peroksidasyonu kimyasal bir olaydır ve serbest radikaller tarafından başlatılarak membran yapısındaki poliansature yağ asitlerinin oksidasyonuna neden olur. Bu lipid peroksit radikalleri, membran yapısındaki diğer poliansature yağ asitlerini etkileyerek yeni lipid radikallerinin oluşumuna yol açarken, kendileri de açığa çıkan hidrojen atomlarını alarak lipid hidroperoksidlerine dönüşürler .

Lipid peroksidasyonunun, zarların lipid yapısındaki değişiklikler nedeniyle fonksiyonların bozulması, oluşan serbest radikallerin enzimler ve diğer hücre bileşenlerine etkisi, son ürünler olan aldehitlerin sitotoksik etkileri gibi farklı yollarla hücre hasarına neden oldukları düşünülmektedir.

Lipid peroksidasyonu en çok tartışılan serbest radikal zincir reaksiyonudur. Lipid peroksidasyonu çok toksik bir zincir reaksiyonudur. Kendiliğinden ilerleyen zincir reaksiyonu olması nedeniyle onemlidir . Direkt olarak membran yapısına ve indirekt olarak reaktif aldehitlere diğerk hücre bileşenlerine zarar verir. Dolayısıyla doku hasarına ve pekçok hastalığasebep olur. Lipid radikallerinin hidrofobik yapıda olması yüzünden reaksiyonların oğumembrana bağlı moleküllerle meydana gelir, membran permeabilitesi ve mikroviskozitesi ciddi şekilde etkilenir.

Lipid hidroperoksitleri yıkıldığında oğubiyolojik olarak aktif olan aldehitler oluşurlar. Bu bileşikler, hücre düzeyinde metabolize edilirler veya başlangıçtaki eski alanlarından difüze olup hücrenin diğerk bölümlerine hasarı yayabilirler. Üç ya da daha fazla çift bağ içeren yağ asitlerinin peroksidasyonu, malondialdehid (MDA) oluştururlar, bu da tiyobarbitürik asitle ölçülebilir. MDA, yağ asidi oksidasyonunun spesifik veya kantitatif bir indikatörü değildir, ancak lipid peroksidasyonunun derecesiyle korelasyon gösterir.

Çalışmamızda Lipid Peroksidasyonun bir ürünü olan MDA ‘yı akciğerk dokusunda çalışmayı uygun gördük. İ/R hasarında hücresel düzeyde serbest oksijen radikallerinin etkisi ile ortaya çıkan MDA düzeyine bakarak Melatonin ve/veya N-asetil sisteinin akciğerk korucu etkinliğini değerlendirdik

GEREÇ VE YÖNTEMLER

CERRAHİ PROSEDÜR VE DENEY GRUPLARI

D.Ü.T.F Deney Hayvanları Etik Kurulundan 12/03/ 2008 (Sayı : 18) onay alındı ve Dicle Üniversitesi Tıp Fakültesine (D.Ü.T.F) bağlı DÜSAM bünyesindeki Laboratuvarlarda çalışma gerçekleştirildi. Biokimyasal parametreler D.Ü.T.F Biokimya anabilim dalında, Patoloji prepearatları Patoloji anabilim dalında, İstatistik ile ilgili veriler ise Bioistatistik anabilim dalında değerlendirildi.

Denek olarak DÜSAM bünyesinde yetiştirilmiş ağırlıkları 250-300 mg arası değişen Spregue-Dowley erkek cinsi ratlar kullanıldı. Denekler oda ısısı 18-21 C° olan odalarda tutulmuşlardır. Deney hayvanları cerrahi işleme alınmadan önce Hot Plate cihazı ve rectal ısı probu kullanılarak deneklerin ısı regülasyonu sağlanmaya çalışıldı.

48 adet denek kullanıldı. 8 farklı grup ve her grupta toplam 6 denek olacak şekilde oluşturuldu.

DENEY GRUPLARININ DAĞILIMI

1. Grup: sol akciğerde iskemi
2. Grup: sol akciğerde iskemi + M
3. Grup: sol akciğerde iskemi + NAC
4. Grup: sol akciğerde iskemi + M + NAC
5. Grup: sol akciğerde iskemi + reperfüzyon
6. Grup: sol akciğerde iskemi + reperfüzyon + M
7. Grup: sol akciğerde iskemi + reperfüzyon + NAC
8. Grup: sol akciğerde iskemi + reperfüzyon + M + NAC

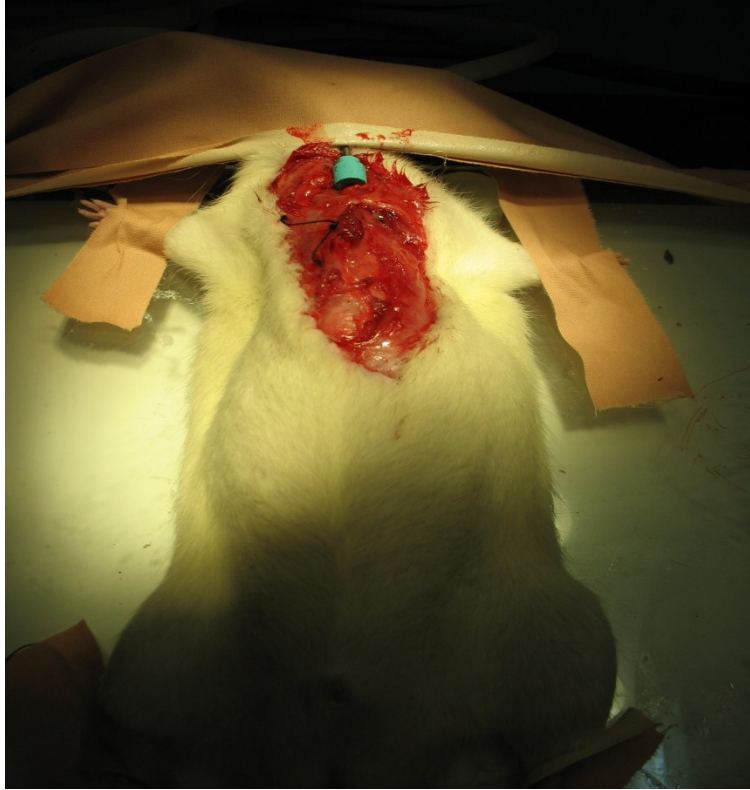
TABLO 2: Deney Gruplarının Dağılımı

Anestezi

Denekler, bir gece önceden aç bırakıldı. Öncelikle Na-Pentobarbütal (Na-Pentotal) 50 mg/kg yaklaşık (0.3 cc) i.p verilerek sedasyonu sağlandı. Anestezi derinliği parmak kısırtma yöntemi ile kontrol edildi. Gerektiğinde 50 mg/kg yaklaşık (0.3 cc) i.p ek anestezi uygulandı.

Standart Diseksiyon

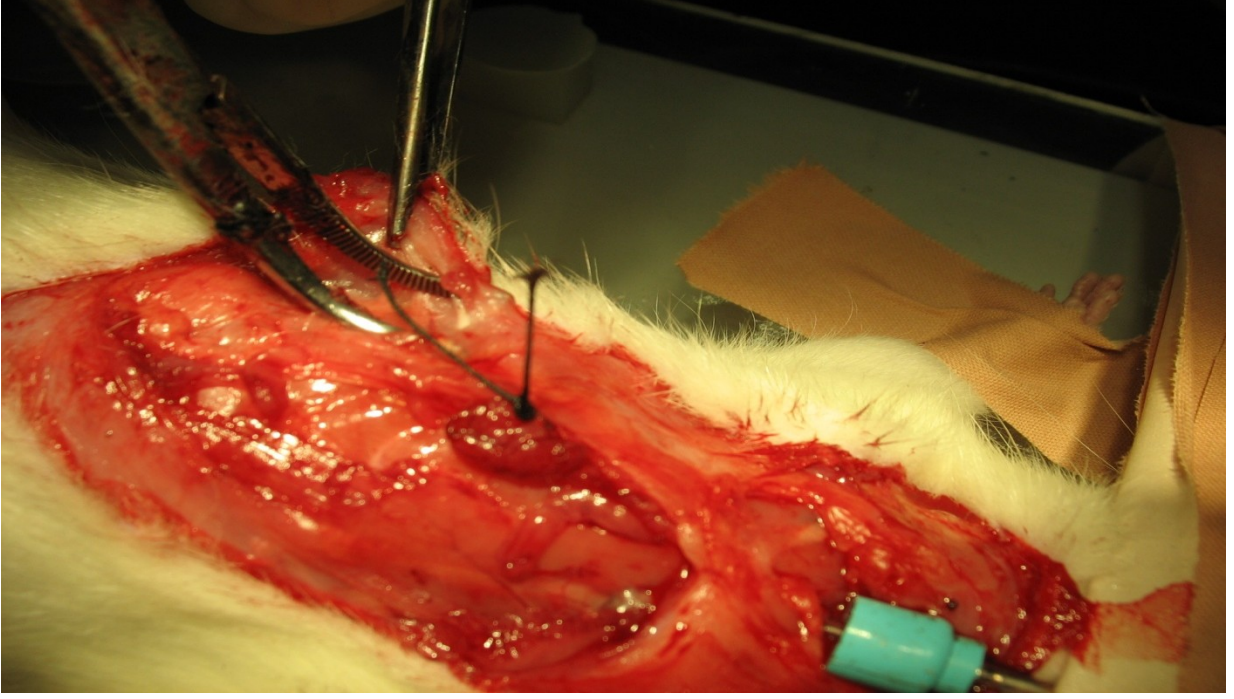
Anestezi altındaki ratlar, prone pozisyonda, dört ekstremitelerinden tespit edildi. Polyvinylpyrrolidon iyod (Polyod,%10'luk solüsyon, Drogasana İlaç Sanayi, Ankara) ile yüzeysel sterilizasyon sağlandı. Servikal bölgeye 2 cm lik collar kesisi yapıldı. Cilt, cilt altı ve boyun strep kaslar geçilerek trakea üzerine ulaşıldı. Trakea künt ve keskin diseksiyon ile dönüldü ve serbestleştirildi. Trakeaya 12 numara bisturi ile 0,5 cm'lik bir insizyon yapıldı ve 5-F trakeostomi kanülü trakeaya yerleştirildi. Ardından Rodent Tipi ventilatöre bağlandı ve akciğerlerin havalandığı görüldü. (tidal volüm; 10ml/Kg, 70/dak, oda havası) Trakeostomi kanülü 2.0 ipek ile tespit edildi. (**Resim 2**)



Resim 2: Ratın tespit edilmesi ve trakeostomi kanülü ile ventilatöre bağlanıp havalandırılması.

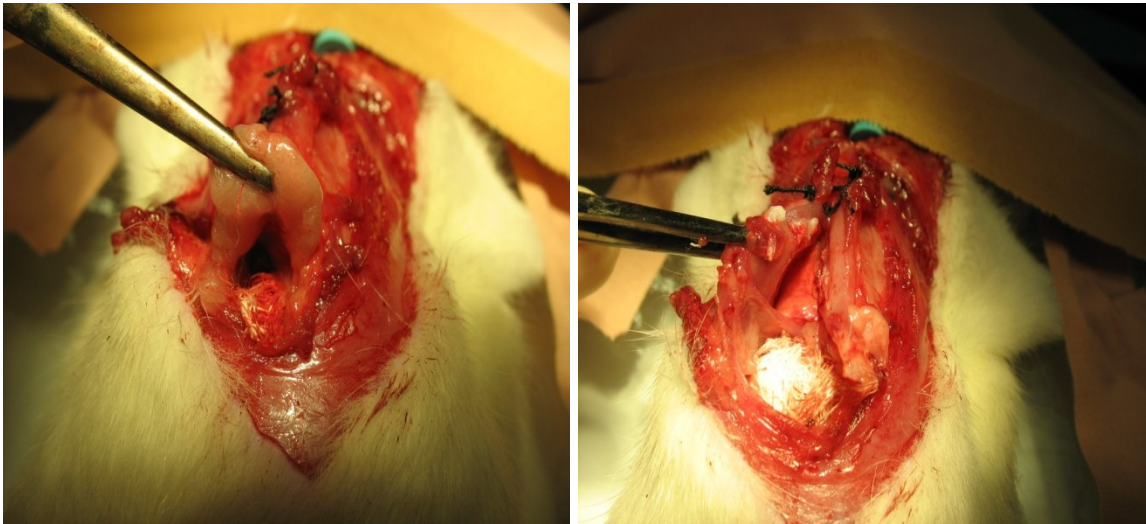
CERRAHİ PROSEDÜR

İnsizyon hattı servikal bölgeden batına doğru ksifoid altına kadar uzatıldı. Sağ ve soldan pectoralis major ve minör kaslar tamamen kanama kontrolü altında serbestleştirildi ve kesildi. (**Resim 3**)



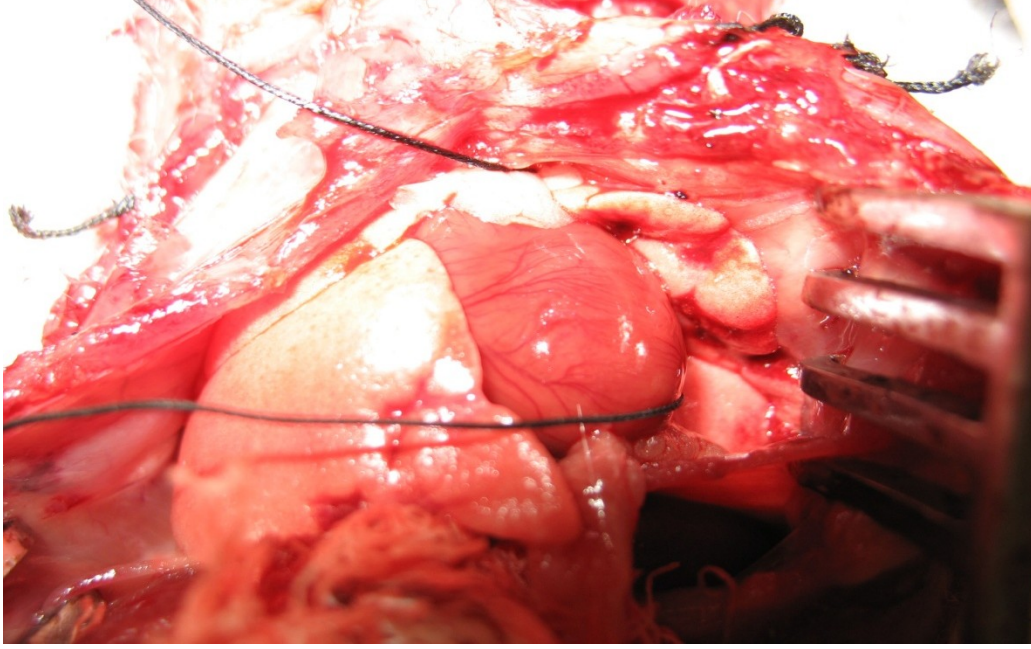
Resim 3: Pectoral kasların sağda ve solda serbestleştirilip - kesilmesi

Xsifoid tamamen serbestleştirilip, total sternotomi yapıldı. **(Resim 4a ve Resim 4b)**
Sternum ekartörü yerleştirildi.



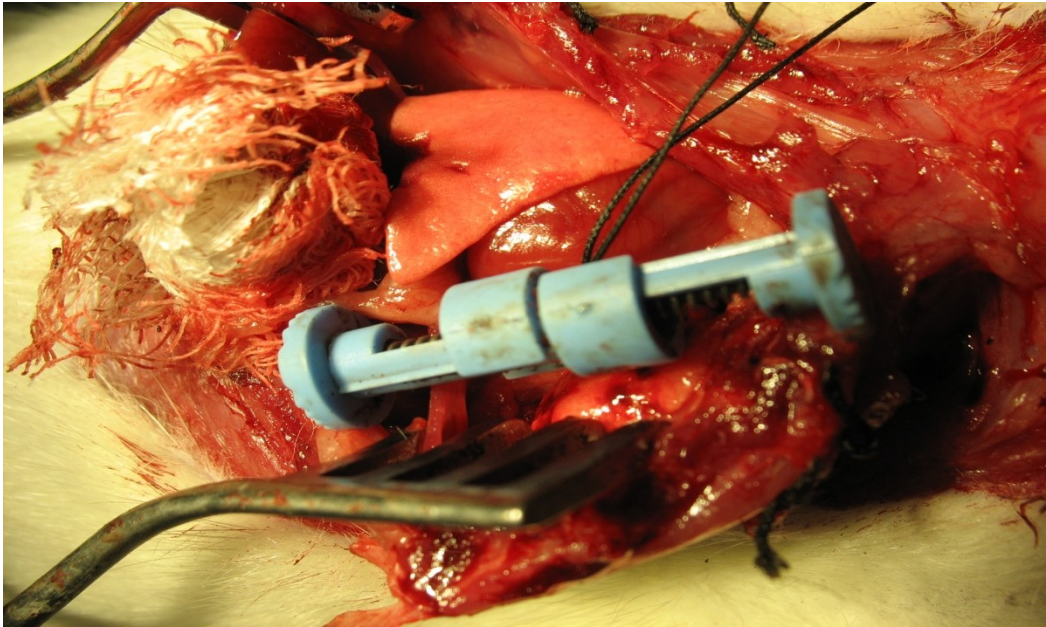
Resim 4a-4b: Sternumun ortaya konması -Sternotomi ile akciğerin ve kalbin ortaya konması

Timus total rezeke edildi. Akciğer sol hilus ortaya konarak sol pulmoner arter 24 G Angiocut ile kanule edildi ve yaklaşık 150 İ.U (500 İU/kg) heparinize edildi. **(Resim 5)**



Resim 5: Sol hilusun dönülmesi

Atravmatik klemp iskemi oluşturmak için sol akciğer hilusuna yerleştirildi. (**Resim 6**)



Resim 6: Sol pulmoner hilusa atavmatik klemp konması

2 saat iskemi ve 2 saat reperfüzyon uygulandı. 3 mg/kg melatonin (5- Metoksitriptamin SİGMA M5250 1gr) ve/veya 150 mg/kg N-asetilsistein (N-asetil L-sistein A7250 500 gr BİLİM) iskemiden 15 dakika önce ve 2 saat iskemide kaldıktan sonra, reperfüzyondan hemen önce LPDS eşliğinde verildi. LPDS 15 dakikada yaklaşık 15-20 cc olacak şekilde verildi.

Deney bitiminde TAOK kapasite ölçümü için kardiak ponksiyon ile yaklaşık 5 cc kadar kan alınarak, kan toplama kabında santrufuj edildi. Plazma ve serum kısmı ayrıldı ve serum kısmı -80 C° de derin dondurucuda bekletildi. Daha sonra Dicle Üniversitesi Tıp Fakültesi Merkez laboratuvarı Biyokimya bölümünde , Abbott Architect C16000 cihazı kullanılarak Erel (66,67) tarafından geliştirilen kitler ile TAOK düzeyleri spektrofotometrik olarak ölçüldü.

Sol ana bronş kesilerek , 1cc serum fizyolojik mai sol ana bronştan 24 G angiocut aracılığı ile verilip BAL yapıldı. Daha sonra yaklaşık 0.4 cc mai aspire edildi. Aspire edilen bronşial sıvı enjektör vasıtası ile Nötrofil bakılmak üzere D.Ü.T.F Patoloji bölümüne verildi.

Ardından sol akciğer üst lop MDA çalışılmak üzere alındı, serum fizyolojik ile yıkandı ve -80 C° derin dondurucuda saklandı. Daha sonra D.Ü.T.F Biyokimya bölümünde Tiobarbuturik asit yöntemi kullanılarak , doku MDA düzeyi çalışıldı.

Sol akciğer alt lopdan alınan 1 gr. ağırlığında doku örnekleri histopatolojik tetkik için %10'luk formol çözeltisi içerisinde D.Ü.T.F Patoloji bölümüne verildi. Parafin bloklar hazırlanıp 5 mikron kalınlıkta kesitler alınarak Hemotoksilen- Eosin ile boyandı. Işık mikroskopu altında 40X büyütmede preparatlar incelendi.

Daha sonra bütün ratlar kalpten yapılan ponksiyon işlemi ile sakrifiye edildi.

DENEY GRUPLARI

1.GRUP (İSKEMİ) : Sol akciğer hilusu görüldü ve atravmatik klemp konduktan sonra. 2 saat iskemide bırakıldı.

2.GRUP (İSKEMİ + MELATONİN) : Sol akciğer hilusu görüldü, iskemiden 15 dakika önce DPDS eşliğinde Melatonin i.p. verildi ve daha sonra hilus 2 saat iskemide bırakıldı.

3.GRUP (İSKEMİ + N-ASETİLSİSTEİN) : Sol akciğer hilusu görüldü, iskemiden 15 dakika önce DPDS eşliğinde N-Asetilsistein i.p. verildi ve daha sonra 2 saat iskemide bırakıldı.

4.GRUP (İSKEMİ + N-ASETİLSİSTEİN + MELATONİN) : Sol akciğer hilusu görüldü, iskemiden 15 dakika önce DPDS eşliğinde Melatonin ve N-asetilsistein i.p. verildi ve daha sonra 2 saat iskemide bırakıldı.

5.GRUP (İSKEMİ + REPERFÜZYON) : Sol akciğer hilusu görüldü, 2 saat iskemide bırakıldı daha sonra 2 saat reperfüzyona bırakıldı.

6.GRUP (İSKEMİ + REPERFÜZYON + MELATONİN) : Sol akciğer hilusu görüldü, 2 saat iskemide bırakıldı daha sonra reperfüzyondan hemen önce DPDS eşliğinde Melatonin i.p verildi ve 2 saat reperfüzyon uygulandı.

7.GRUP (İSKEMİ + REPERFÜZYON + N-ASETİLSİSTEİN) : Sol akciğer hilusu görüldü, 2 saat iskemide bırakıldı daha sonra reperfüzyondan hemen önce DPDS eşliğinde N-asetilsistein i.p. verildi ve 2 saat reperfüzyon uygulandı.

8.GRUP (İSKEMİ + REPERFÜZYON + N-ASETİLSİSTEİN + MELATONİN) : Sol akciğer hilusu görüldü, 2 saat iskemide bırakıldı daha sonra reperfüzyondan hemen önce DPDS eşliğinde Melatonin ve N-asetilsistein i.p. verildi ve 2 saat reperfüzyon uygulandı.

ÖRNEKLERİN HAZIRLANMASI

MDA ÖLÇÜMÜ

Deney sonunda ratlardan akciğer üst lobu alındıktan sonra izotonikli solusyon ile yıkanıp – 80 C°derin dondurucuda daha sonra çalışılmak üzere saklandı. Daha sonra D.Ü.T.F Biyokimya anabilim dalında Tiobarbuturik asit yöntemi kullanılarak MDA analizi yapıldı. Akciğer dokusundan alınan 0.5 gr doku 4.5 ml %5.5 Triklorasetik asit ile homojenize edilip, elde edilen supernatan 100 C° 10 dakika bekletildi, daha sonra + 4 C ° de 30 dakika bekletilip soğutulan örneklerin üzerine 1ml T.B.A (Tiobarbuturik asit) eklenip 532 nm (nanometre) de Spektrofotometrik (Shimadzu, 1800 serisi, Japon) olarak ölçüldü.(nmol/ gr) (68).

TAOK ÖLÇÜMÜ

Alınan kandaki antioksidan kapasite düzeyleri, Erel'in geliştirdiği tam otomatik toplam antioksidan kapasite kiti ile otoanalizörde (Abbott Aeoraset, USA) ölçüldü. Bu metoda göre Fenton reaksiyonu ile oluşan OH⁻ (Hidroksil) iyonu ortho-dianisidin ile renk oluşturmaktadır ve oluşan rengin absorbansı oto analizörde spektrofotometrik olarak ölçülmektedir. Plazma, serum ya da diğer vücut sıvılarındaki antioksidan kapasiteye göre rengin şiddeti azalmakta ve test sonuçları mmol/l olarak hesaplanmaktadır (66,67).

BAL'da NÖTROFİL HÜCRELERİNİN DEĞERLENDİRİLMESİ

Sol akciğer ana bronşuna yaklaşık 1cc serum fizyolojik mai 24 G Anjiocut ile verilip yaklaşık 0.4 cc verilen mai 24 G anjiocut aspire edildi ve alınan örnekler D.Ü.T.F. Patoloji anabilim dalında preparat üzerine yayıldı. BAL incelemesinde %70'lik alkol tespitinden sonra PAP (Papanicolau Stain) boyası kullanıldı. BAL değerlendirmesi 40'lık büyütmede, hücresellüğün en yoğun olduğu birbirinden uzak 2 bölgede 50'şer hücre sayılarak yapıldı. Toplam 100 hücre üzerinden değerlendirme yapıldı. Hangi hücreden (Lenfosit, Makrofaj , PMNL ve Resp. Epitel) kaç tane var ise o yazıldı. 0 (sıfır) hücre yok anlamında kullanıldı. Dejenere olan hücreler değerlendirmeye alınmadı. Nötrofil sayısı % olarak değerlendirmeye alındı.

AKCİĞERİN HİSTOPATOLOJİK DEĞERLENDİRİLMESİ

Deneklerden çıkarılan sol akciğerin 1/3'lük orta kısmı D.Ü.T.F Patoloji A.D da incelemeye alındı. Dokular, %10'luk formolin ile fiksasyonundan sonra elde edilen parafin bloklarından 4 mikronluk kesitler alındı ve H&E ile boyama yapıp incelendi.

Alveoler hemoraji Tablo 3'de görüldüğü gibi Grade 0 , Grade 1 , Grade 2 ve Grade 3 olarak sınıflandırıldı. Morfolojik değerlendirme Higgins ve arkadaşlarının kullandığı alveoler derecelendirilmesine ve Egan ve arkadaşları tarafından kullanılan ışık mikroskobisinde spesmenlerin histolojik incelenmesine dayandırıldı (69,70),

Tablo 3 : Alveolar hemorajinin derecelendirilmesi

Derecelendirme	Işık mikroskobu
Grade 0	Hemoraji yok
Grade 1	Alveol içinde tek tük eritrosit
Grade 2	Alveolleri tamamen doldurmayan eritrosit toplulukları
Grade 3	Alveolleri tamamen dolduran eritrosit toplulukları

Parankimal lezyonlar Tablo 4 'de görüldüğü gibi normal, çok hafif, orta derece ve şiddetli fezyonlar olarak sınıflandırıldı.

Tablo 4 : Parankimal lezyonların derecelendirilmesi

Derece	Patolojik lezyonlar
Normal	Hiçbir lezyon yok
Çok hafif	Fokal inflamasyon
Orta derece	Perivasküler, peribronşial ödem, vasküler konjesyon ve inflamasyon
Şiddetli	İntrapulmoner-intertisiyel ödem ile şiddetli vasküler konjesyon ve tromboz

İSTATİSTİK:

Çalışmada elde edilecek verilerin istatistiksel olarak anlamlı olabilmesi için denek sayısı yüksek tutuldu ve her bir grupta 6 olmak üzere toplam 48 adet rat olarak belirlendi. Tekrarlanan işlem sonucu verilerin netliği, doğruluğu ve güvenilirliği için örnek sayıları bu şekilde belirlenmiştir.

Araştırmada elde edilecek verilerin ortalama ve standart sapmaları hesaplanarak istatistiksel değerlendirme için Kruskal-Wallis testi, varyans analizi ve anlamlılık düzeyleri için Mann-Whitney-U testi uygulandı.

Sonuçlar kendi arasında aşağıda gösterildiği gibi her gruba farklı puan verilerek değerlendirmeye alınmıştır: (**Tablo 5**)

TABLO 5 : Akciğer Alveolar hemoraji değerlerinin ve Parankim hasarının puanlandırılması.

Alveolar hemorajinin puanlandırılması :

Derecelendirme	Işık mikroskobu	PUAN
Grade 0	Hemoraji yok	0
Grade 1	Alveol içinde tek tük eritrosit	1
Grade 2	Alveolleri tamamen doldurmayan eritrosit toplulukları	2
Grade 3	Alveolleri tamamen dolduran eritrosit toplulukları	3

Akciğer parankim lezyonlarının puanlandırılması:

Derece	Patolojik lezyonlar	PUAN
Normal	Hiçbir lezyon yok	0
Çok hafif	Fokal inflamasyon	1
Orta derece	Perivasküler, peribronşial ödem, vasküler konjesyon ve inflamasyon	2
Şiddetli	İntrapulmoner-intertisiyel ödem ile şiddetli vasküler konjesyon ve tromboz	3

BULGULAR

Akciğer İ/R hasarını inceldiğimiz bu deneyde toplam 48 adet Sprague-Downey erkek rat kullanıldı. Deneklerde, gruplar arasında ağırlık ve yaş açısından herhangi bir farklılık mevcut değildi.

Yaklaşık 6 ay süren çalışmada akciğer dokusunda MDA (nmol/gr), kanda TAOK (mmol/lt) düzeyi çalışıldı. (Tablo 6 ve Tablo7) Tüm deneklere BAL yapıldı ve BAL sıvısında Nötrofil (%) oranı bakıldı (Tablo 8). Ayrıca alınan akciğer dokuları Işık Mikroskopu altında değerlendirmeye alındı.

Çalışma sırasında anestezi için Na-Pentotal kullanıldı. Deney esnasında 23 ratda ek anestezi ihtiyacı doğdu.

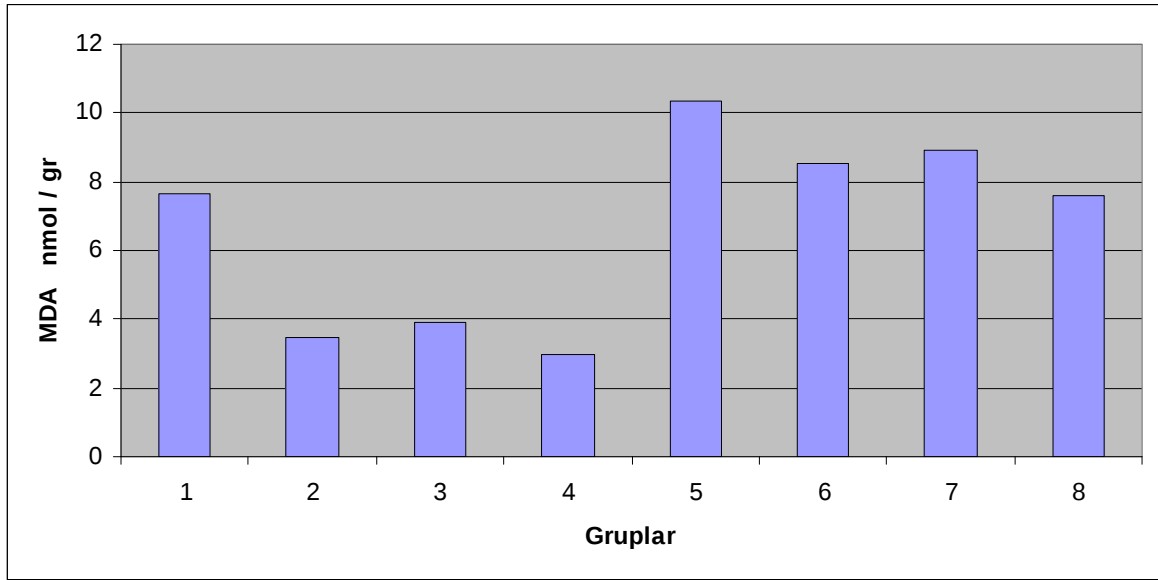
16 adet ratda hafif düzeyde, 9 tanesinde orta düzeyde, 1 tanesi ağır derecede deney sırasında kanamaları oldu. Ancak bütün deneklerde başarılı bir şekilde deney sonlandırıldı.

Gruplarda elde edilen MDA, TAOK düzeyleri, BAL'da Nötrofil yüzde oranları, ortalama (X) ve standart sapma (SD) sonuçları ile beraber aşağıda verilmiştir.

Gruplardan elde edilen MDA değerlerinin ortalama ve standart sapma değerleri aşağıdaki tabloda gösterilmiştir:

TABLO 6 : Gruplarda elde edilen ortalama MDA değerleri ve standart sapmaları

	MDA (nmol / gr)	Standart sapma (X ± 0,5)
Grup 1 (İ)	7,64	0,39057
Grup 2 (İ + M)	3,47	0,51775
Grup 3 (İ + A)	3,89	0,22251
Grup 4 (İ + M + A)	2,97	0,12372
Grup 5 (İ + R)	10,35	1,03102
Grup 6 (İ + R + M)	8,53	0,26934
Grup 7 (İ + R + A)	8,9	0,47196
Grup 8 (İ + R + M + A)	7,6	0,12968



ŞEKİL 4: MDA değerlerinin grafiksel olarak karşılaştırılması

Akciğer İ/R hasarında Melatonin ve/veya NAC'in koruyucu etkinliğini Gruplardaki MDA düzeyine bakarak karşılaştırıldığında :

1. Grup , 8. grup hariç diğerlerinden istatistiksel olarak anlamlı idi . ($p < 0,05$)
2. Grup , 3. ve 4. grup hariç diğerlerinden istatistiksel olarak anlamlı idi.($p < 0,05$)
3. Grup , 2. grup hariç diğerlerinden istatistiksel olarak anlamlı idi. ($p < 0,05$)
4. Grup , 2. grup hariç diğerlerinden istatistiksel olarak anlamlı idi .($p < 0,05$)
5. Grup bütün gruplardan istatistiksel olarak anlamlı idi. ($p < 0,05$)
6. Grup, 7. ve 8. grup hariç diğerlerinden istatistiksel olarak anlamlı idi. ($p < 0,05$)
7. Grup, 6. grup hariç diğerlerinden istatistiksel olarak anlamlı idi. ($p < 0,05$)
8. Grup, 1. hariç diğerlerinden istatistiksel olarak anlamlı idi. ($p < 0,05$)

Gruplar MDA değerleri açısından karşılaştırıldığında sadece iskemi uygulanan 2, 3. ve 4. gruptaki MDA değerleri, İ/R uygulanan 5,6,7 ve 8. gruba göre azalması istatistiksel olarak anlamlı değerlendirildi. ($p < 0,05$)

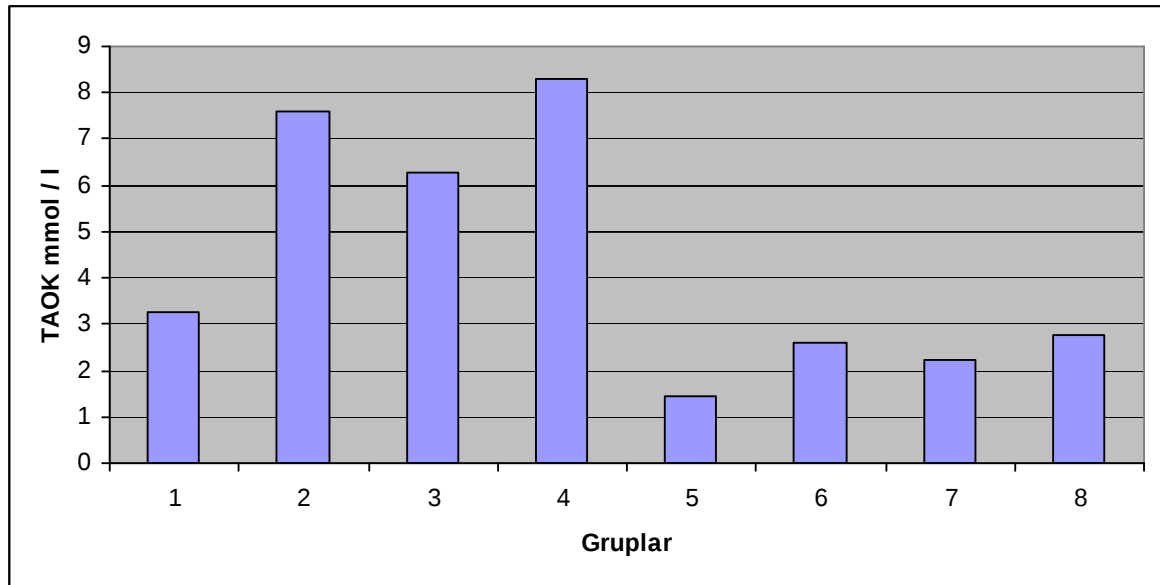
Sadece İ/R uygulanan 5.Grup ile İ/R ile beraber Melatonin ve/veya NAC kullanılan grup 6, 7, 8 Gruplara göre MDA düzeyindeki artış istatistiksel olarak anlamlı bulundu. ($p < 0,05$)

İ/R +Melatonin+NAC uygulanan Grup 8'de, sadece İ/R + Melatonin veya NAC kullanılan Grup 6 ve 7 'ye göre azalma istatistiksel olarak anlamlı bulundu. ($p < 0,05$)

Grupların TAOK değerlerinin ortalama ve standart sapma değerleri aşağıdaki tabloda gösterilmiştir:

TABLO 7 : Gruplarda elde edilen ortalama TAOK değerleri ve standart sapması

	TAOK ortalama değeri (mmol / L)	Standart sapması ($x \pm 0.05$)
Grup 1 (İ)	3,25	1,78
Grup 2 (İ + M)	7,6	3,12
Grup 3 (İ + A)	6,28	2,26
Grup 4 (İ + M + A)	8,3	3,7
Grup 5 (İ + R)	1,43	1,1
Grup 6 (İ + R + M)	2,6	1,37
Grup 7 (İ + R + A)	2,23	1,4
Grup 8 (İ + R + M + A)	2,76	1,3



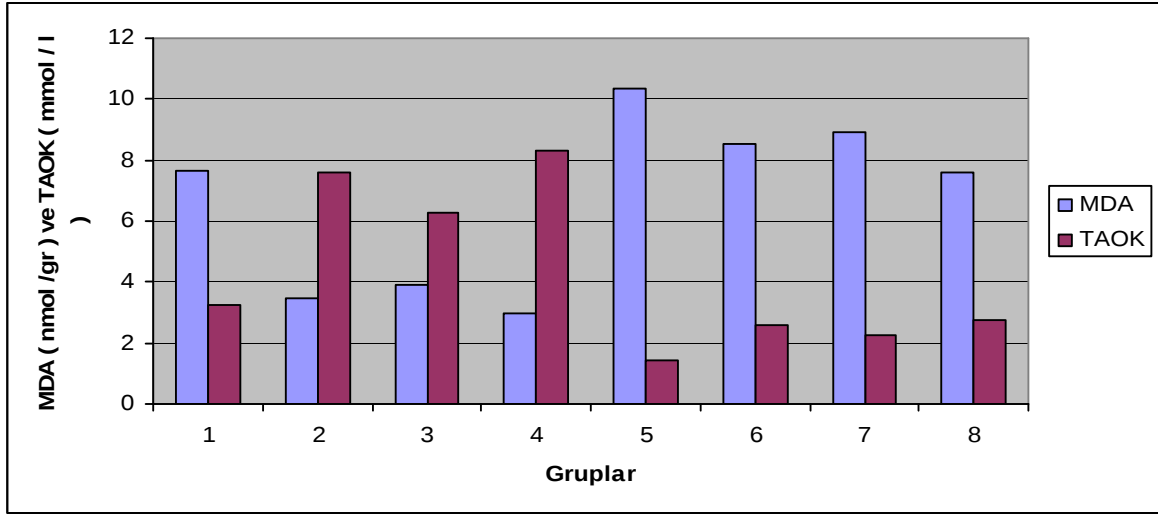
ŞEKİL 5 : TAOK değerlerinin grafiksel olarak karşılaştırılması

Sadece İskemi uygulanan Grup 1 ile İskemi+Melatonin ve/veya NAC kullanılan Grup 2, 3. ve 4 'e göre TAOK düzeyindeki olan azalma istatistiksel olarak anlamlı bulundu. ($p < 0,05$)

İ/R + Melatonin ve/veya NAC uygulanan 5, 6, 7. ve 8. Gruptaki TAOK değerlerinin, sadece iskemi, iskemi + Melatonin ve/veya NAC uygulanan 1, 2, 3, ve 4 Grup'lara göre azalmanın istatistiksel olarak anlamlı olduğu görüldü. ($p < 0,05$)

İ/R +Melatonin+NAC uygulanan Grup 8'deki, sadece İ/R + Melatonin veya NAC kullanılan Grup 6 ve 7'ye göre TAOK düzeyindeki artış istatistiksel olarak anlamlı bulundu. ($p < 0,05$)

MDA ve TAOK değerlerinin kendi arasındaki ilişkisi aşağıdaki grafikte ele alınmıştır:



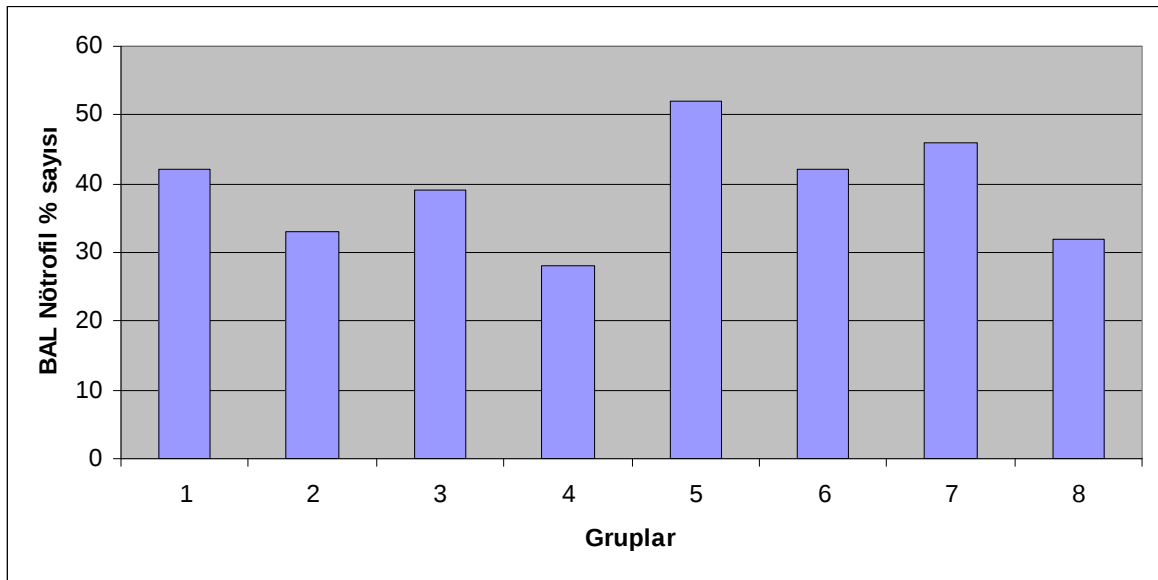
Şekil 6: MDA ve TAOK değerlerinin grafiksel karşılaştırılması.

İ/R uygulanan 5, 6, 7. ve 8. Grupdaki MDA artışının tam tersi TAOK düzeylerindeki azalma istatistiksel olarak anlamlı bulundu. ($p < 0,05$) MDA ve TAOK değerlerinin karşılaştırılmasında görüldüğü gibi MDA ile TAOK arasında ters bir orantı mevcut. MDA arttığı durumlarda TAOK değerleri azalmakta, tam tersi MDA değerleri azaldığında TAOK değerleri artmaktadır.

Grupların BAL değerlerinin ortalama ve standart sapma değerleri aşağıdaki tablo 8'de gösterilmiştir.

TABLO 8 : Gruplardaki BAL Nötrofil (%) oranlarının ortalama ve standart sapma değerleri

	BAL 'da Nötrofil (%)	Standart sapma ($X \pm 0,5$)
Grup 1 (İ)	42	2,60768
Grup 2 (İ + M)	33	3,20026
Grup 3 (İ + A)	39	2,15445
Grup 4 (İ + M + A)	28	1,85517
Grup 5 (İ + R)	52	2,94392
Grup 6 (İ + R + M)	42	4,27395
Grup 7 (İ + R + A)	46	3,26599
Grup 8 (İ + R + M + A)	32	3,12517



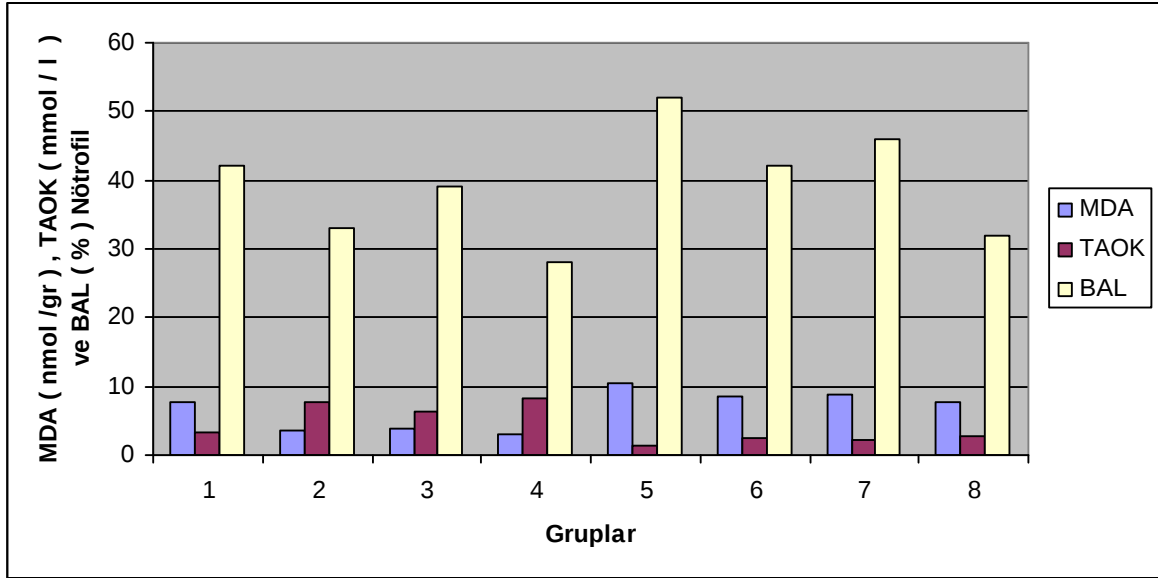
ŞEKİL 7 : Grupların BAL (%) Nötrofil değerlerinin grafiksel olarak karşılaştırılması aşağıda verilmiştir

Sadece İskemi yapılan Grup 1'deki BAL'da Nötrofil oranı, İ/R + Melatonin ve/veya NAC kullanılan 2, 3. ve 4. Grup 'tan istatistiki olarak yüksek bulundu. ($p < 0,05$)

Hiç farmakolojik ajan kullanılmayan 1. ve 5. Gruptaki Nötrofil hücre sayısı diğer gruplara istatistiki olarak daha fazla olduğu görüldü.

İ/R +Melatonin ve/veya NAC kullanılan 6, 7, 8. Gruplar değerlendirildiğinde , 8. Gruptaki Nötrofil oranı diğer gruplara göre istatikselsel olarak düşük izlendi.

Gruplardaki MDA,TAOK ve BAL’da Nötrofil (%) oranları aşağıdaki grafikte değerlendirilmiştir :



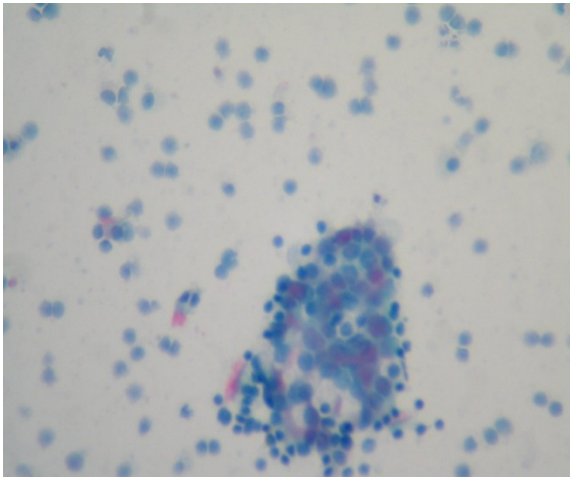
ŞEKİL 8 : MDA,TAOK ve Nötrofil (%) oranlarının grafiksel karşılaştırılması

Yukarıdaki grafide görüldüğü gibi 4. ve 8. Grupta Nötrofil sayıları istatistiksel olarak düşük görüldü. ($p < 0,05$)

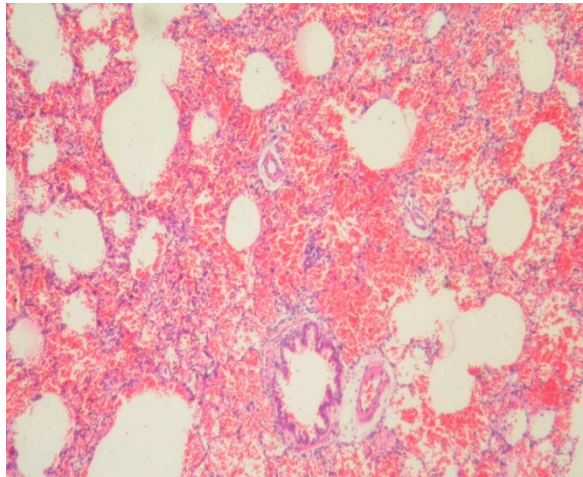
Grup 1 ve Grup 5’de BAL’da Nötrofil sayıları istatistiksel olarak yüksek olup bu gruplarda aynı zamanda MDA düzeyleri istatistiksel olarakda yüksek değerlendirildi. Tam tersine TAOK değerleri düşük bulundu. ($p < 0,05$)

İ/R + Melatonin +NAC uygulanan 8. Gruptaki BAL nötrofil sayısı, 5, 6. ve 7. gruba göre düşük olduğu görüldü ve istatistiksel olarak anlamlı değerlendirildi. ($p < 0,05$)

BAL sıvısında Nötrofil hücreleri aşağıdaki **Resim : 7a-7b** ‘ de gösterilmiştir.



Resim 7a : BAL sıvısında Nötrofil hücreleri izlenmekte



Resim 7b : BAL sıvısında Nötrofil hücreleri izlenmekte

HİSTOPATOLOJİK BULGULAR:

Morfolojik değerlendirme Higgins ve arkadaşlarının kullandığı alveoler derecelendirilmesine ve Egan ve arkadaşları tarafından kullanılan ışık mikroskopisinde spesmenlerin histolojik incelenmesine dayandırıldı. (69,70)

Işık mikroskopisinde bakıldığında :

Grup 1 (iskemi) ; 6 adet ratın akciğer dokusu incelendiğinde hepsinin ŞİDDETLİ (İntraalveoler ve intertisyel ödem, belirgin vasküler konjesyon, tromboz) (**resim 9-b**) olarak değerlendirildi.

Grup 2 (iskemi + melatonin) ; 6 adet rat akciğer dokusu incelendiğinde 4 tanesi NORMAL (Hiçbir lezyon yok) (**resim 8-a**), 2 tanesi HAFİF (Peribronşial ödem, fokal enflamasyon) (**resim 8-b**) olarak değerlendirildi.

Grup 3 (iskemi + NAC) ; 6 adet rat akciğer dokusu incelendiğinde 2 tanesi NORMAL (Hiçbir lezyon yok) (**resim 8-a**), 4 tanesi HAFİF (Peribronşial ödem, fokal enflamasyon) (**resim 8-b**) olarak değerlendirildi.

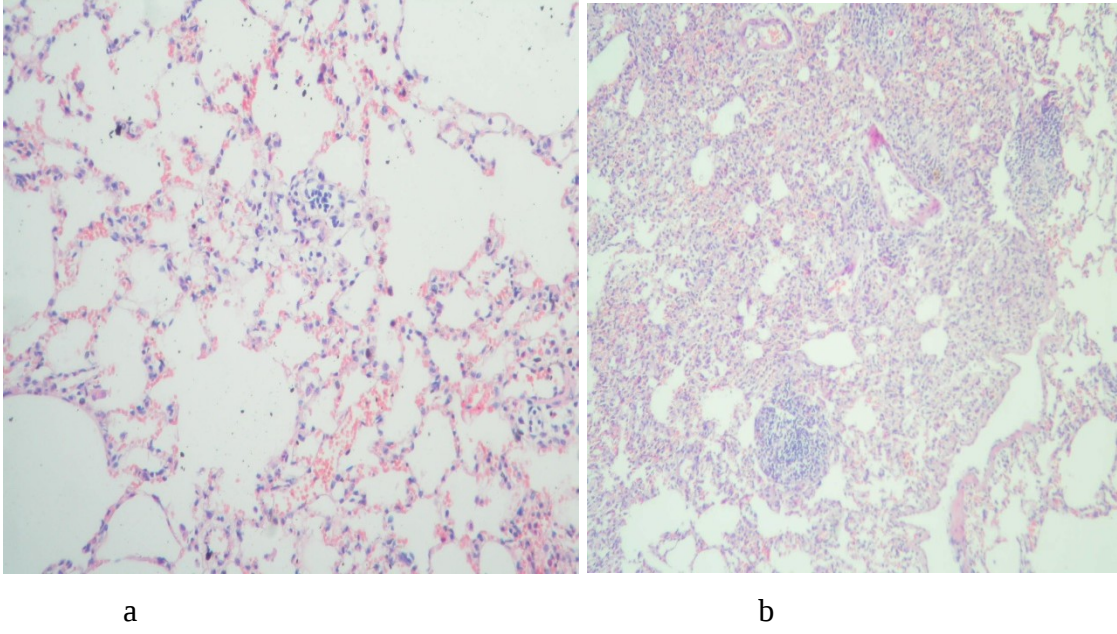
Grup 4 (iskemi+melatonin +NAC) ; 6 adet rat akciğer dokusu incelendiğinde 5 tanesi NORMAL (Hiçbir lezyon yok) (**resim 8-a**), 1 tanesi HAFİF (Peribronşial ödem, fokal enflamasyon) (**resim 8-b**) olarak değerlendirildi.

Grup 5 (iskemi + reperfüzyon) ; 6 adet rat akciğer dokusu incelendiğinde 6 tanesi ŞİDDETLİ (İntraalveoler ve intertisyel ödem, belirgin vasküler konjesyon, tromboz) (**resim9 –b**) olarak değerlendirildi.

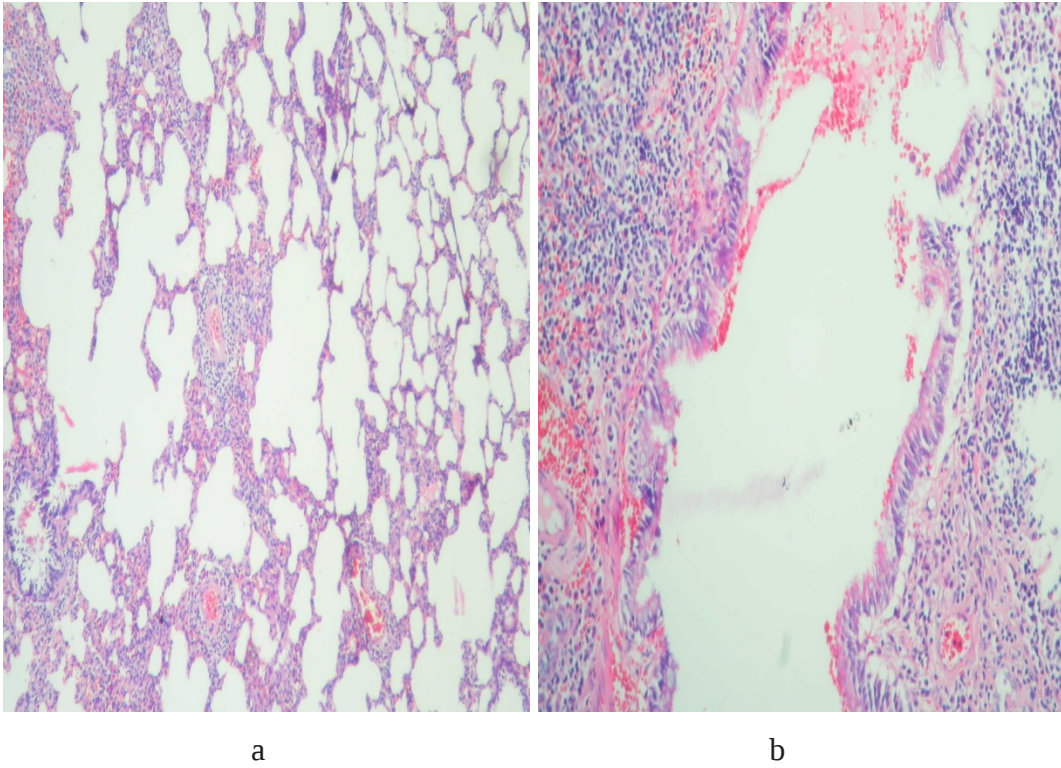
Grup 6 (iskemi+reperfüzyon+melatonin) ; 6 adet rat akciğer dokusu incelendiğinde 2 tanesi HAFİF (Peribronşial ödem, fokal enflamasyon) (**resim 8-b**) , 4 tanesi ORTA (alveolar ödem, folikül oluşturacak şekilde ödem, vasküler konjesyon) (**resim 9 –a**) olarak değerlendirildi.

Grup 7 (iskemi+reperfüzyon+NAC) ; 6 adet rat akciğer dokusu incelendiğinde 1 tanesi HAFİF (Peribronşial ödem, fokal enflamasyon) (**resim 8-b**) , 5 tanesi ORTA (alveolar ödem, folikül oluşturacak şekilde ödem, vasküler konjesyon) (**resim9-a**) olarak değerlendirildi.

Grup 8 (iskemi+reperfüzyon +melatonin+ NAC) ; 6 adet rat akciğer dokusu incelendiğinde 2 tanesi HAFİF (Peribronşial ödem, fokal enflamasyon) (**resim8-b**) , 4 tanesi ORTA (alveolar ödem, folikül oluşturacak şekilde ödem, vasküler konjesyon) (**resim9-a**) olarak değerlendirildi.



Resim 8-a ve 8-b: Normal Akciğer dokusu ve Hafif fokal İnflamasyon.



Resim 9-a : Orta Derece Perivasküler, Peribronşial Konjesyon ve İnflamasyon

Resim 9-b : Şiddetli İntrapulmoner –İnterstisyel Ödem ile Şiddetli Vasküler Konjesyon ve Tromboz

Alveolar hemoraji yönünden Gruplar incelendiğinde :

Grup 1 (iskemi) 6 adet ratın akciğer dokusu incelendiğinde hepsinin GRADE 3 (Alveolleri tamamen dolduran eritrosit toplulukları) (**Resim 13**) olarak değerlendirildi.

Grup 2 (iskemi + melatonin) 6 adet rat akciğer dokusu incelendiğinde 1 tanesi GRADE 0 (Hemoraji yok) (**Resim 10**), 5 tanesi GRADE 1 (Birkaç alveol lümeninde az sayıda eritrosit) (**Resim 11**) olarak değerlendirildi.

Grup 3 (iskemi + NAC) 6 adet rat akciğer dokusu incelendiğinde 1 tanesi GRADE 0 (Hemoraji yok) (**Resim 10**), 4 tanesi GRADE 1 (Birkaç alveol lümeninde az sayıda eritrosit) (**Resim 11**) ve 1 tanesi GRADE 2 (Odaksal tarzda alveol lümenlerinde, küme oluşturan eritrosit toplulukları) (**Resim 12**) olarak değerlendirildi..

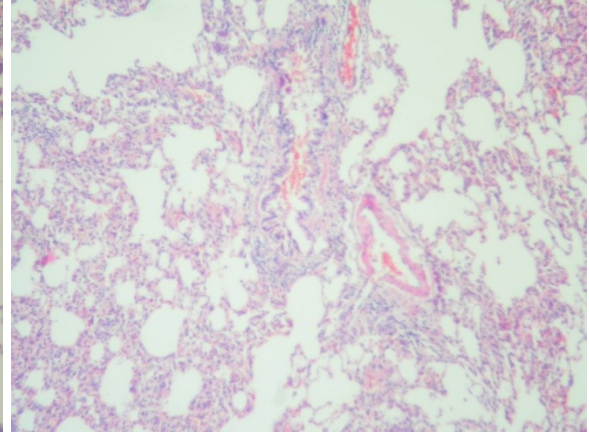
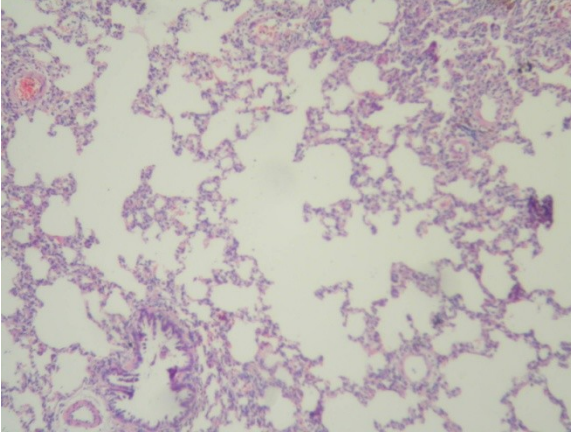
Grup 4 (iskemi+melatonin +NAC) 6 adet rat akciğer dokusu incelendiğinde 2 tanesi GRADE 0 (Hemoraji yok) (**Resim 10**), 4 tanesi GRADE 1 (Birkaç alveol lümeninde az sayıda eritrosit) (**Resim 11**) olarak değerlendirildi.

Grup 5 (iskemi + reperfüzyon) 6 adet rat akciğer dokusu incelendiğinde 6 tanesinin hepsinin GRADE 3 (Alveollerin çoğunun lümenini tamamen eritrositlerin doldurması) (**Resim 13**) olarak değerlendirildi.

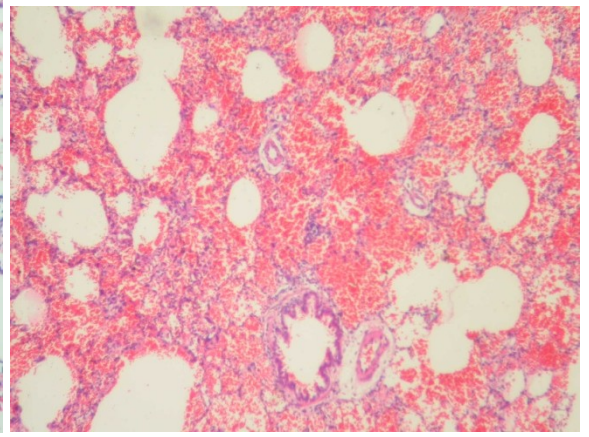
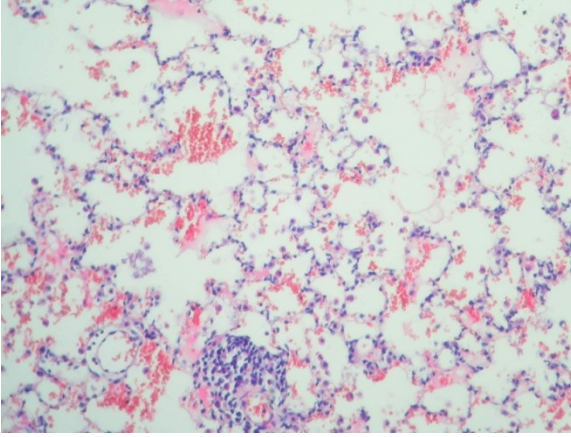
Grup 6 (iskemi+reperfüzyon+melatonin) 6 adet rat akciğer dokusu incelendiğinde 5 tanesi GRADE 2 (Odaksal tarzda alveol lümenlerinde, küme oluşturan eritrosit toplulukları) (**Resim 12**) ve 1 tanesi GRADE 3 (Alveollerin çoğunun lümenini tamamen eritrositlerin doldurması) (**Resim 13**) olarak değerlendirildi.

Grup 7 (iskemi+reperfüzyon+NAC) 6 adet rat akciğer dokusu incelendiğinde 4 tanesi GRADE 2 (Odaksal tarzda alveol lümenlerinde, küme oluşturan eritrosit toplulukları) (**Resim 12**) ve 2 tanesi GRADE 3 (Alveollerin çoğunun lümenini tamamen eritrositlerin doldurması) (**Resim 13**) olarak değerlendirildi.

Grup 8 (iskemi+reperfüzyon +melatonin+ NAC) 6 adet rat akciğer dokusu incelendiğinde 5 tanesi GRADE 2 (Odaksal tarzda alveol lümenlerinde, küme oluşturan eritrosit toplulukları) (**Resim 12**) ve 1 tanesi GRADE 3 (Alveollerin çoğunun lümenini tamamen eritrositlerin doldurması) olarak (**Resim 13**) değerlendirildi..



RESİM 10 : Alveolar hemoraji (GRADE 0) **RESİM 11:** Alveolar hemoraji (GRADE 1)



RESİM 12:. Alveolar Hemoraji (GRADE 2) **RESİM 13 :**Alveolar Hemoraji (GRADE 3)

TARTIŞMA

Akciğer transplantasyonu , terminal dönem akciğer hastalığı olan kişilerde en uygun tedavi metodu olarak kabul edilmeye başlanmıştır. Bununla beraber, greft disfonksiyonu erken morbidite ve mortalitede en önemli rolü oynamaktadır. Greft disfonksiyonuna yol açan nedenlerin başında özellikle erken dönemde gelişen İ/R hasarının yol açtığı patolojik değişiklikler gelmektedir. İskemik dokuda kan akımı yeniden restore edildiğinde reperfüzyona bağlı olarak o bölgede inflamatuvar hücrelerin yerleşmesi, pulmoner hipertansiyon, hipoksemi ve nonkardiyojenik pulmoner ödem ile karakterize pulmoner disfonksiyon geliştiği bildirilmiştir.

İ/R hasarının oluşumunu tam olarak açıklayan bir mekanizma olmamakla beraber hipoksinin, doku makrofajlarının, proinflamatuvar sitokinlerin salınımına yol açtığı savunulan mekanizmalardan bir tanesidir (71,72,73).

Başta nötrofiller olmak, üzere tüm PMNL, makrofajlar, PLT, kompleman ile bunların salgılamış olduğu mediatörler vasıtası ile İ/R olaylar zinciri başlamaktadır. Sitokinler, başta nötrofiller olmak üzere tüm polimorfonükleer hücrelerin endotelial hücrelere yapışmasına aracılık eder. Lipid peroksidasyonu sonucu SOR ortama salınır. Salgılanan serbest oksijen radikalleri tarafından vasküler hücre hasarı meydana gelir. İ/R ile oluşan hasarın büyük kısmından serbest oksijen radikalleri sorumlu tutulmaktadır.

Son yıllarda serbest radikallerin yaptığı hasarı engellemek üzere antioksidan ajanların kullanılması yoluna gidilmiştir. Birçok çalışma yapılmış ve halen yapılmaktadır.

Bu antioksidanlar arasında Melatonin ve NAC de olduğu bilinmektedir. Biz bu çalışmada Melatonin ve NAC'ın akciğer İ/R hasarındaki koruyucu etkisini ele aldık. Akciğeri koruyucu solusyon olarak ise LPDS kullandık.

Melatonin pineal bezden salınan antioksidan ve antienflamatuvar etkiside olduğu bilinen bir hormondur. Endojen olduğu gibi eksojen de etkinliği olan bir farmakolojik ajandır. Melatoninin direkt serbest radikalleri temizlediği, süperoksit dismutaz, glutatyon peroksidaz, glutatyon redüktaz gibi enzimlerin etkinliğini artırdığı yapılan çalışmalarda gösterilmiştir. Melatonin lipofilik özelliği sayesinde tüm dokulara kolayca diffüze olabilen, tüm vucut kompartmanlarına dağılılabilen özelliği mevcuttur. Etkinliği kısa sürede ortaya çıkar. Ayrıca yüksek dozlarda bile toksik bir yan etkisinin görülmemesi melatoninin bir diğer önemli özelliği olmuştur.

NAC ise bir tiol bileşiği olup serbest radikalleri hem nonenzimatik olarak hemde konjugasyon ve redüksiyon mekanizmaları ile ortadan kaldırdıkları daha önceden yapılan çalışmalarda gösterilmiştir.

Hücrelere hızlı penetre olabilen bileşiklerdir ve serbest radikallere bağlı akciğer hasarının başlangıç aşamasında hücreye hızlı penetre olarak serbest radikal temizleyici fonksiyon gösterirler. Yapılan çalışmalarda NAC serbest radikallere karşı normalde varolan endojen koruyucu mekanizmayı da artırdıkları gösterilmiştir (74).

Lipid peroksidasyonunun son ürünleri aldehitler, hidrokarbonlar ve malonildialdehittir (MDA). SOR çok kısa ömürlü olmaları nedeniyle serumda gösterilmeleri oldukça zordur. Bundan dolayı SOR'nin serumdaki etkinliğini göstermek için, lipid peroksidasyonu sonucu ortaya çıkan MDA'nın serumdaki düzeyinin ölçülmesi ile değerlendirmeye çalıştık.

De La Lastra ve ark. yaptığı çalışmada, 40 adet Wistor-albino cinsi ratları 4 gruba ayırmış ve 1.Grup (kontrol grubu), 2.grup (İ/R), 3. grup (İ/R+melatonin) (10 mg/kg), 4. grup (İ/R+melatonin) (20 mg/kg) 30 dakikalık iskemi süresinden sonra melatonin reperfüzyonu başlatılmış ve reperüzyon işlemi 2 saat sürmüş (75). Grup MDA değerleri 2. grup ile karşılaştırıldığı zaman 3. ve 4. Grup'de istatistik olarak anlamlı derecede düşük bulunmuş ($p < 0,05$). Grup 4'teki MDA seviyeleri grup 1'den önemli derecede farklılık göstermemiş ($p > 0,05$). Yukardaki çalışmada De La ve ark. Melatoninin Akciğer İ/R hasarında koruyucu etkisi olduğunu ve bu etkisinin doza bağımlı olarak arttığı sonucuna varmışlar.

Seo MY ve ark. 30 adet wistar-albino ratları 3 gruba ayırmış. 1.grup (kontrol grubu), 2. grup (İ/R), 3. grup ise (İ/R + melatonin) (10 mg/kg). 1 saat sol akciğer iskemide bırakıldıktan sonra 2 saat reperfüzyona bırakılmış (76). Doku MDA sonuçları; 1.grupta (kontrol) 4,63 nmol / gr-doku, 2.grupta (İ/R) grubunda 6,36 nmol / gr-doku , 3.grupta (İ/R+melatonin) 5,28 nmol / gr-doku olarak tespit edilmiş. Melatonin grubundaki MDA değerlerinin düşüşü istatistiksel olarak ($p < 0,05$) anlamlı bulunmuş.

Karabulut ve ark. 40 adet wistor-albino cinsi ratlarda yaptığı çalışmada, akciğer İ/R hasarında melatonin ile kontrol grubu MDA'sı karşılaştırılmış (77). Bu çalışmada 45'er dakika akciğerin hilusu klempili kaldıktan sonra klempiler açılıp aynı anda reperfüzyon başlangıcında itibaren 10mg/kg melatonin ile reperfüze edilmiş. Kontrol grubu MDA'sı 50,12 nmol/gr-doku iken melatonin grubunda 42,87 nmol / gr-doku olarak tespit edilmiş ve MDA'nın melatonin grubunda düşük olması istatistiksel olarak anlamlı olduğu saptanmış ($p < 0,05$).

Yukardaki çalışmalarla uyumlu olarak bizde çalışmamızda Grup 6 (İ/R+Melatonin) (MDA = 8,53) uyguladığımız deneklerde MDA düzeylerini, sadece (İ/R) uygulanan Grup 5 (10, 35) oranla anlamlı olarak düşük saptadık ($p<0,05$). Sadece (İskemi) uygulanan Grup 1 ile (İ+ Melatonin) uygulanan grup 2 ile karşılaştırıldığında, (İ + Melatonin) uyguladığımız Grup 2'nin (3,47) sadece (İskemi) uygulanan Grup 1'e (7,64) oranla MDA düzeylerini anlamlı olarak düşük saptadık ($p< 0,05$). Daha önceki çalışmalarda olduğu gibi reperfüzyon grupları esas alındığında Melatoninin İ/R hasarında MDA değerlerini düşürdüğü ve akciğer İ/R hasarında koruyucu etkisinin olduğu değerlendirildi.

İnci ve ark. tarafından yapılan bir çalışmada, akciğer transplantasyonu sonrası İ/R hasarında melatoninin koruyucu etkisi araştırılmış ve tek akciğer transplantasyonu yapılan ratlarda 18 saat soğuk iskemi (+4 °C) sonrası iki deneysel grup (n=10) oluşturulmuştur (78). Grup 1 denekleri (iskemik kontrol grubu), Grup 2'de ise donör ve alıcı deneklere İ/R öncesi (10 mg/kg Melatonin) 10 dk verilmiştir. 2 saat sonra reperfüzyona bırakılmış ve oksijenasyon, plazma lipid peroksidasyon ve myeloperoksidasyon aktivasyonu değerlendirilmiş. Sonuçta melatonin uygulanan grupta oksijenasyonun önemli derecede yüksek olduğu, lipid peroksidasyonu ve myeloperoksidaz aktivitelerinin azalmış olduğu görülmüş ve uzamış iskemi sonrası reperfüzyon olan akciğerlerde ekzojen olarak uygulanan melatoninin akciğerleri İ/R hasarından etkin olarak korudukları bulunmuştur.

Görüldüğü gibi Melatonin uygulanan gruplarda İ/R sonrası akciğer hasarı azalmakta, oksijenizasyon artmakta, MDA düzeyi azalmakta ve bu model akciğer transplantasyonu yapılan birimlerde melatoninin rahatlıkla çalışılabileceğini göstermektedir.

Bizim yaptığımız çalışmada, reperfüzyon grupları esas alındığında melatoninin uygulanan gruplarda MDA değerleri diğer gruplara göre düşük olarak değerlendirildi ve istatistiksel olarak anlamlı idi ($p< 0,05$). İ/R +Melatonin + NAC'in kombine uygulandığı 8. Grup daki MDA değerleri , tek başına İ/R + Melatonin ve İ/R + NAC uygulanan 6. ve 7. Gruplara göre daha fazla idi ve anlamlı kabul edildi. ($p< 0,05$)

Melatonin ve NAC kullanılan gruplarda MDA değerleri daha düşük bulunmuş olup, kombine olarak kullanıldığında bu iki ajanın sinerjist etkileşime girdiği görülüyor. Akciğer transplantasyon çalışmalarında başarılı bir şekilde kullanılan Melatonin ve NAC 'in yaptığımız çalışmalarda kombine olarak kullanılabildiğini değerlendirdik.

Serbest radikallere karşı insan vücudu birçok savunma sistemi geliştirmiştir. Genelde oksidan-antioksidanlar bir denge durumundadırlar. Antioksidan savunma sisteminde herhangi bir yetmezlik dengenin oksidanlar lehine kaymasına neden olmaktadır. Birçok hastalığın fizyopatolojisinde rol oynadığı gösterilmiş olan SOR gittikçe önem kazanmaktadırlar. Bu durumda enzimatik ve enzimatik olmayan antioksidan mekanizmalar devreye girer. TAOK'ye en büyük katkı plazmada bulunan antioksidan moleküllerden gelmektedir. Organizmada oksidatif hasara karşı çok sayıda anti-oksidan olabilecek moleküller mevcuttur. Bu moleküller endojen olabileceği gibi eksojende olabilir. Bu anti-oksidan moleküller vucutta oluşabilecek serbest radikallerin verebilecekleri hasarı engellemeye, en aza indirmeye çalışırlar. Bu çalışmamızda biz Melatonin ve/veya NAC 'in akciğer İ/R hasarındaki koruyucu etkinliğini göstermek için parametrelerden biri olan TAOK de kullandık.

Bilindiği gibi Glutadyon Peroksidaz, Süperoksit Dismutaz, Katalaz, Vitamin A, E, C ve diğer birçok anti-oksidan moleküller plazmada ayrı ayrı gösterilebilir. Ancak yarı ömürleri çok kısa olduğu için biz bu deneyde TAOK olarak değerlendirmeyi uygun gördük. Ayrıca Total anti-oksidan durumun ölçümü, antioksidanların tek tek ölçümünden daha değerli bilgiler verir, bu nedenle serum Anti-oksidan durumunun saptanmasında, bireysel Anti-oksidanlardan ziyade bunların toplam Anti-oksidan değerini veren TAOK ölçümü yaygınlaşmaktadır. Ölçümde EREL tarafından geliştirilen Total oksidan seviye metodu kullanıldı.

Selim ve ark. yaptığı çalışmada kronik hipokside Enalapril ve Nifedipinin akciğer ve myokard doku hasarı üzerindeki etkisi araştırılmış (79). Doku hasarının göstergeleri olarak dienkonjugatlar ve MDA düzeyleri, koruyucu mekanizma olarak redükte glutadyon ve total antioksidan aktivite düzeyleri gösterge olarak alınmış. Çalışma kapsamında 20 adet Sprague-Downey cinsi ratlar kullanılmış. Toplam 4 farklı grup ve her grupta 5 adet denek alınmış.

1.Grup Sham grubu (anestezi sonrası sakrifiye edilmiş ve akciğer ve kalp dokusu alınmış) , 2. Grup da (21 gün hipokside bırakılmış ve sakrifiye edilmiş) , 3.Grup (hipoksik ortamda deneklere enalapril verilmiş ve sakrifiye edilmiş) , 4.Grup ise (hipoksik ortamda Nifedipin verilmiş ve sakrifiye edilmiş). Kalp ve akciğer dienkonjugatları, MDA ve TAOK düzeyleri kontrol grubunda diğer gruplara oranla farklı bulunmuş. MDA değerleri (mmol / gr) ; (Grup 2; (91), Grup 3; (57), Grup 4; (68) , TAOK değerleri Grup 2 (4,5), Grup 3; (5), Grup 4 ; (5) olarak bulunmuş. Sonuç olarak kronik hipoksinin myokard antiokidan rezerv kapasitesini azalttığı ve akciğer hasarına yol

açtığı, Enalapril ve Nifedipinin ise kronik hipoksiye bağlı olarak gelişen doku hasarında koruyucu etkisi olduğu görülmüş. Burada kronik hipoksida serumdaki oranı azalan TAOK düzeyi, Enalapril ve Nifedipin ile birlikte artmaktadır.

Göksel ve ark. yaptığı çalışmada Melatonin, böbreğin İ/R hasarındaki etkisini göstermek idi (80). Bu çalışmada ratlarda renal pedikül 45 dk iskemiye takiben 1, 2, 6, 28, 48 saat ve 1 hafta süre reperfüzyona bırakılmış. Melatonin 2 farklı şekilde ratlara uygulanmış. İskeminin 15.nci dakikası ve reperfüzyonun hemen öncesinde verilmiş. Çalışmada renal histoloji, renal MDA ve Glutadyon düzeyi bakılmış. Melatoninin oksidatif cevabı azalttığı, mikroskopik hasarı önlediği görülmüş. Burada organizma iskemi altında iken, serbest oksijen radikallerine bağlı gelişen hasarı engellemek için, Enalapril, Nifedipin, Melatonin ve NAC gibi antioksidanlar kullanılmaktadır. Bu çalışmalarda gösterildiği gibi, kullanılan antioksidan maddeler Akciğer İ/R hasarını azaltmakta olup, TAOK düzeylerini de artırmaktadır.

Yaptığımız deneysel çalışmada, İ/R uygulanan Grup 5 de TAOK düzeyi düşmekte ancak Melatonin ve/veya NAC kullanılan Grup 6, 7. ve 8 Grupda TAOK düzeyi artmaktadır. Ayrıca 8. Grupda uygulanan Melatonin + NAC kombine kullanıldığında birbirinin etkisini artırmakta ve sinerjist etki göstermektedir ve Grup 6 ve 7'e göre TAOK değerlerindeki artışın istatistiksel olarak anlamlı olduğu gözlemlenmiştir. Ayrıca histopatolojik olarak baktığımızda 8. gruptaki parankim hasarlarının 6. ve 7. gruptan daha az olduğu görülmektedir. Parankim hasarındaki bulgular, biokimyasal olarakda MDA ve TAOK değerlerimizi desteklemektedir.

Sadece iskemi yapılan Grup 1, 2, 3 ve 4 ile İ/R yapılan 5, 6, 7 ve 8 Gruplar karşılaştırıldığında reperfüzyon yapılan gruplardaki hasarın büyük olduğu, ayrıca parankim hasarı değerlendirildiğinde reperfüzyon yapılan gruplarda parankim hasarı iskemi yapılan gruplara göre daha fazla olarak görüldü. Daha önceki yapılan çalışmalar gösterdiği gibi, reperfüzyon aşamasında ortama salınan SOR, sitokinler ve PMNL gibi birçok faktörden dolayı bu hasar artmaktadır. Bizim yaptığımız çalışmanın sonuçlarında bu görüşü desteklemektedir.

Topal ve ark. hiperbarik oksijen (HBO) pek çok hastalıkta yaygın olarak kullanıldığını belirtmişlerdir (81). Yaptıkları çalışmada yeni keşfedilen antioksidan olan melatoninin protektif etkisinden yararlanması amaçlanmıştır. 60 adet erkek ratları 5 gruba ayırmışlardır. Kontrol grubu, gün boyu HBO (120 dk) , gün boyu HBO + melatonin (10 mg/kg), gece boyu HBO ve gece boyu HBO (ışık altında) olmak üzere 5 farklı grup oluşturulmuş. MDA düzeyleri , gün boyunca ve gece boyunca (ışık altında) yüksek

bulunmuş. Gün boyunca HBO + Melatonin uygulanan ve geceboyu HBO uygulanan gruplardaki MDA düzeyleri, kontrol grubuna göre anlamlı fark gözlenmemiş. Burada HBO organizmada oksidatif strese neden olmuştur ve Melatonin MDA düzeylerini düşürmüştür. Üstelik endojen melatoninin ise eksojen melatoninden daha etkili bir antioksidan olduğu bulunmuştur.

Yapılan çalışmalar incelendiğinde endojen ve eksojen kullanılan Melatonin hormonunun, organ transplantasyonlarında rahatlıkla kullanıldığı görülmüyor. Bizim çalışmamızda melatonin hormonunun temininde, hazırlanmasında ve uygulanmasında zorluk çekmedik. Ayrıca deney sonrası akciğer dokusunda MDA ve serum TAOK düzeylerini rahatlıkla değerlendirdik.

Sener ve ark, yaptığı çalışmada Melatonin ve NAC'in hepatik iskemi reperfüzyon hasarındaki etkisi araştırılmış (82). 5 Farklı grup oluşturulmuş ; 1.Grup (kontrol grubu), 2.Grup (İ/R) grubu, 3.Grup (İ/R + Melatonin), 4.Grup (İ/R + NAC) ve son Grup (İ/R + Melatonin + NAC) olarak belirlenmiş. Bu çalışmada 45 dk iskemi, 60 dk reperfüzyon izlemiştir. İlaçlar tek başına yada kombine olarak iskeminin 15. dakikasında ve reperfüzyondan hemen önce verilmiştir. Lipid peroksidasyon ürünü olan MDA, antioksidan ajanlardan Glutadyon düzeyine bakılmış.

İ/R'da Melatonin ve NAC kombine kullanıldığında Glutadyon düzeyi yükselmiş, tek başına Melatonin veya NAC kullanıldığında bu yükselme sınırlı kalmıştır. MDA ve Miyeloperoksidaz (MPO) aktivitesi İ/R grubunda artmış, Melatonin ve NAC ayrı ayrı verildiğinde bu artış azalmaya dönmüştür. Kombine uygulandığında MDA ve MPO değerleri eski seviyeleri düzeyine gerilemiştir. Sonuç olarak Melatonin ve NAC, İ/R hasarını engelleyen faydalı birer ajanlardır. Sinerjistik etkisinden dolayı kombine verildiğinde daha fazla koruyucu etkinlik ortaya çıkar .

İnci ve ark. yaptığı çalışma gösterilmiştir ki, PG, free oksijen süpürücüleri (Süperoksit Dismutaz, Katalaz, Allopurinol, PAF, Melatonin, NAC, Kaptopril)'nin akciğeri İ/R hasarından koruyan moleküller olduğunu göstermişlerdir (83). NAC, antioksidan etkinliği olan Glutadyon prekürsörüdür. Yaptıkları çalışmada 18 saatlik soğuk akciğer transplantasyonunu takiben verilen NAC, rat akciğer modelinde İ/R hasarını azalttığını göstermişlerdir. Bu çalışmada görülmüştür ki, NAC kullanılan ratlarda oksijenizasyon, reperfüzyondan 2 saat sonra NAC kullanmayan gruplara göre daha yüksek bulunmuştur. Lipid peroksidasyon anlamlı olarak sadece iskemi yapılan grupta NAC kullanan gruba göre yüksek bulunmuştur. Bu çalışma göstermiştir ki uzamış iskemi sonrası reperfüzyonlarda NAC akciğeri koruyucu etkisi mevcuttur

Erhan ve ark yaptığı çalışmada rastgele 2 eşit gruba (kontrol) ve (NAC) ayrılan 12 adet köpekde, 2 saatlik iskemi sonrası reperfüzyonun başlamasından önce kontrol grubuna salin, NAC grubuna iskemiden 30 dakika önce 60 mg/kg NAC verilmiş (84). Ardından 2 saatlik süre ile 40 C° E-C ile yıkandıktan sonra ortotopik tek akciğer ototransplantasyonu yapılmış. Sonuçta sol pulmoner arter basıncı, sol pulmoner vasküler rezistans, kalp debisi, süperoksit dismutaz değerleri NAC grubunda, kontrol grubuna göre anlamlı düzeyde farklı bulunmuş ($p<0,05$). NAC kullanımının akciğer ototransplantasyon uygulanan köpeklerde İ/R hasarı üzerine yararlı etkileri olduğu görülmüş

Yukarıda yapılan her iki çalışmada NAC hormonu antioksidan özellikte olup, İ/R hasarlarında güvenlikle kullanılabilir. Melatonin ve NAC ajanlarının kombine kullanıldığında birbirinin etkinliğini artırdığı ve sinerjist etki gösterdiği görülmüştür.

Bizim yaptığımız çalışmada NAC ‘ni tek başına ve Melatonin hormonu ile beraber kombine olarak kullandık. Yaptığımız çalışmada tek başına kullanılan Melatonin ile tek başına verilen NAC ajanlarının İ/ R hasarında Akciğeri koruduğu ve MDA düzeylerini azaltıp, TAOK değerlerini artırdığı görülmüştür (Grup 6 ve Grup 7).

Ancak Melatonin ve NAC kombine kullanıldığı Grup 8’da sinerjist etki göstermekte ve MDA düzeylerini azaltıp TAOK değerlerini dahada artırmaktadır. Daha önce yapılmış olan çalışmalar bizim deneyimizdede çıkan sonuçları desteklemektedir. Melatonin ve NAC beraber her zaman kullanılabilir .

BAL, akciğerin distal hava boşluklarındaki proteinler, hücresel elemanlar ve hücresel ürünlerin analizine olanak sağlayan bir yöntemdir. Aynı zamanda çeşitli akciğer hastalıklarında alt solunum yollarındaki epitel yüzeylerine ait inflamatuvar ve immün sistemi temsil eden hücre ve diğer sistem elemanlarının incelenmesinde kullanılan bir tanı yöntemidir. BAL ile akciğerlerin epiteliyal yüzeyinden çözünebilir proteinler, hücreler, lipidler ve diğer biyokimyasal elemanlar alınabilmektedir

BAL, rutin FOB uygulaması esnasında terminal havayolları ve alveol içerisindeki sıvı ve hücrelerin elde edilmesi için bronşiyal segment veya subsegment içine lavaj sıvısının verilip, geri alınması ile yapılmaktadır. Lavaj sıvısının değerlendirilmesi sonucunda tanısal, prognostik ve terapötik amaçlarla BAL sıvısının sellüler ve çözünebilir komponentlerinin konsantrasyon ve fonksiyonları hakkında fikir sahibi olunabilmektedir.

İnci ve ark yaptığı çalışmada rat akciğerleri 4 C° 18 saatlik iskemi sonrası reperfüzyon yapılmış (85). İki farklı rat grubu ($n=10$) kullanılmış. 1.Gruba sadece iskemi (kontrol) , 2.gruba iskemi sonrası reperfüzyondan 10 dakika önce intraperitoneal Melatonin verilmiş. Reperfüzyondan 2 saat sonra oksijenizasyon, plazma ve BAL nitrit

seviyeleri ölçülmüş. Sonuçta BAL'da nitrit seviyelerinin Grup 2'de (melatonin) , Grup 1'den daha az olduğu görülmüş.

Peter ve ark. yaptığı çalışmada A2a agonistlerinin (ATL-146e), Akciğer reperfüzyon hasarını önlediklerini göstermişlerdir (86). Yapılan çalışmada Sprague-Downey cinsi ratlarda 90 dakika sol Akciğer hilusuna klemp uygulanmış, klemp sonrası 4 saat reperfüzyon yapılmış. Grup 1 (n=13) i.v ATL-146e reperfüzyondan 10 dakika önce verilmiş. Grup 2 (n=16) saline infuzyon uygulanmış. Grup 3 (sham grubu, n=14) 'de iskemi olmadan Grup 2'nin aynı protokolü uygulanmış. Akciğerin histolojik analiz sonucunda İ/R grubunda BAL'da yüksek Nötrofil oranı, ATL-146e kullanılan gruptan çok daha yüksek olduğu görülmüş.

Yukardaki örneklerde görüldüğü gibi BAL sıvıları akciğerin değerlendirilmesinde bizlere yol göstermektedir. Yapılan çalışmalarda BAL sıvısında PMNL sayımı ile İ/R hasarında kullanılan farmakolojik ajanların etkinliği değerlendirilebilmektedir. Bizim yaptığımız çalışmada Melatonin ve/veya N-asetilsistein kullanımı ile antioksidan ve antienflamasyon etkilerinden dolayı BAL hücre sayısında azalma tespit edilmiştir. Hiç ilaç kullanılmayan 1. ve 5. gruptaki hücre sayısında dolayısı ile enflamasyonda artış mevcuttur. Ayrıca histopatolojik olarak da incelendiğinde 1. ve 5. grupta en fazla hasar olduğu görülmüştür. Bunla beraber hücre harabiyeti arttığı durumlarda daha önce belirttiğimiz gibi MDA değerleri artmakta tam tersi olarak TAOK değerleri ise azalmaktadır .

Yaptığımız deneyde hem iskemi uygulanan gruplarda, hemde İ/R uygulanan gruplarda görülmüştür ki, Melatonin ve/veya NAC kullanılığı zaman BAL sıvısında Nötrofil hücre sayısı azalmaktadır. Bu azalma istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur ($p < 0,05$).

İ/R uygulanan gruplarda reperfüzyon aşamasında ortama salınan sitokinler daha fazla olduğu için, iskemi uygulanan gruplara göre Akciğerlerdeki hasar daha fazla olmakta ve BAL sıvısında Nötrofil sayıları yüksek bulunmuştur. Ancak sadece İ/R uygulanan gruplar kendi arasında incelendiğinde Grup 8 (İ/R + Melatonin + NAC kullanılan) de hasarın daha da az olduğu ve buna bağlı olarak Nötrofil sayısında azalma olduğu gözlenmiştir. Grup 8 'deki Nötrofil sayısının Grup 6 ve 7 'e göre daha az olduğu istatistiksel olarak bulundu ($p < 0,05$). Melatonin ve N-asetilsisteinin kombine kullanıldığı 4. ve 8. gruplarda görüldüğü gibi bu iki ilaç birbirinin etkisini artırmıştır. Dolayısıyla ortamdaki Nötrofil yüzdesi düşük bulunmuştur.

Akciğer Transplantasyonlarında, koruma solusyonlarının tipi ne olursa olsun Akciğerin başarılı bir şekilde uzun dönemli korunması için, en önemli nokta bu

solusyonların Akciğerin tüm hücrelerine ulaşmasına bağlıdır. Akciğerin atalektazik bölümlerinin tam perfüze olmadığı yapılan çalışmalarda gözlenmiştir (87). Bu nedenle perfüzata başlanmadan önce Akciğerin tümünün inspeksiyonu çok önemlidir, eğer atalektazi varsa ventilasyon atalektazi kaybolana kadar artırılmalıdır (88). Perfüzyon sırasında topikal soğutmanın faydalı olmadığı hatta atalektazi olduğu durumda zararlı bile olabileceği bildirilmiştir.

Son yıllarda Akciğer transplantasyonlarında , İ/R hasarından korunmak amacıyla koruyucu farmakolojik solusyonlar, farmakolojik ilaçların kullanılması yoluna gidilmiştir. Yapılan çalışmalarda birçok farklı solusyonlar kullanılmıştır. Bunlardan bazıları E-C, LPDS, W-S gibi birçok solusyonlar sayılabilir.

Strüber ve ark. küçük domuzlarda yaptığı çalışmada, sol akciğer transplante edilmiş ve 6 adet domuza E-C solusyonu koruma solusyonu olarak kullanılmış, 6 adet domuza ise LPDS solusyonu kullanılmış. Çalışmada LPDS solusyonunun akciğer iskemi-reperfüzyon hasarındaki sürfaktan fonksiyonlarını korumadaki etkinliğini değerlendirilmiş. Çalışmada 90 dakikalık iskemi sonrası reperfüzyon uygulanmış ve sonuç olarak LPDS'nin E-C solusyonuna göre Akciğer sürfaktan fonksiyonlarını ve metabolizmasını koruduğu ve böylece akciğerde reperfüzyon hasarını azalttığı sonucuna varılmış(89).

Yine Strüber ve ark. yaptığı bir başka çalışmada LPDS'nun akciğer transplantasyonunda erken greft yetmezliğine bağlı mortalite ve morbitideyi E-C solusyonuna göre azalttığı gözlenmiştir (90). Bu çalışmanın sonuçlarında LPDS kullanılan akciğerlerde, komplansta önemli düzeyde iyileşme ($p < 0,05$), mekanik ventilatöre bağlı kalma süresinde E-C solusyonunda 321 saat iken LPDS 'da 189 saat olarak bulunmuştur. Yoğun bakımda kalma süresi E-C grubu kullanılan hastalarda 17 gün, LPDS grubunda ise 10 gün olarak ($p=0,012$) olarak bulunmuştur. Çalışmalarda da görüldüğü gibi LPDS 'nun Akciğer İ/R hasarında akciğer fonksiyonlarını daha iyi koruduğu, erken greft yetmezliğini önlediği ve postoperatif ventilatöre bağlı kalma süresini azalttığı görülmüştür. Bizde çalışmamızda LPDS kullanmayı tercih ettik.

Kelly ve ark. Sprague-Downey cinsi ratlarda yaptığı çalışmada pulmoner arter düz kas hücrelerinde Patch klemp tekniği ile sellüler membran potansiyeli bakılmış (91). Deneyde LPDS, E-C ve W-S sonrası reaktif oksijen ürünlerine bakılmış. Pulmoner arterden LPDS, E-C, LPEC ve W-S verilmiş. Sonuçta W-S ve E-C verildiğinde membran potansiyeli değişmekte, LPDS verildiğinde ise membran potansiyelinin değişmediği görülmüştür. LPDS 'nun serbest reaktif oksijen üretimini inhibe ettiği ve böylece primer akciğer transplantasyonuna bağlı organ yetmezliğini önlediği görülmüştür.

Fumio ve ark. evcil domuzlarda sol ortotopik akciğer transplantasyonu yapmışlar. 6 adet domuza E-C solusyonu, 6 tanesine ise LPDS verilmiş (92). 6 adet domuza ise sham torakotomi yapılmış. İ/R yapılan domuz akciğer transplant modelinde donör akciğerleri 4 C°'de 18 saatlik iskemide bırakılmış ve daha sonra 6 saatlik reperfüzyon işlemine tabi tutulmuş. Lipid peroksidasyonu ve BAL sıvısında Tiobarbutürik asit materyali bakılarak değerlendirilmiş. 18 saat sonra BAL sıvısında Tiobarbutürik asit miktarının, LPDS verilen grupta daha az olduğu, yağ/kuru ağırlık oranında E-C grubunda daha yüksek olduğu görülmüştür. LPDS 'nin akciğeri E-C solusyonuna göre daha iyi koruduğu sonucuna varılmış ($p < 0,05$).

Yukarıda birçok çalışmada görüldüğü gibi, Akciğer transplantasyon modellerinde bir çok flush solusyonu kullanılmış ancak LPDS 'nun daha iyi olduğu, akciğer fonksiyonlarını, akciğer vasküler rezistansı daha iyi koruduğu, postoperatif oksijenizasyonun ve Mekanik ventilatöre bağlanma süresinin daha az olduğu yapılan çalışmalarda gösterilmiş.

Bizde yaptığımız bu çalışmada kendi tercihimizi LPDS yönünde kullandık. İ/R uyguladığımız gruplar incelendiğinde, sonuçların yüzgüldürücü olmasında hiç kuşku yokki kullandığımız koruyucu farmakolojik solusyonların önemi çok büyüktür. Hem biyokimyasal olarak hemde histopatolojik olarak da bizim deneyimize de pozitif yönde katkıda bulunmuşlardır.

De La Lastra CA ve ark. 40 adet ratda yaptığı benzer çalışmada İ/R grubu histopatolojik sonuçlarında ; 3 tanesinde (grade 1), 3 tanesinde (grade 2), 4 tanesinde (grade 3), melatonin grubunda ise 4 tanesi (grade 0), 5 tane (grade 1), 1 tane (grade 2) hemoraji tespit edilmiş. Alveolar ödem İ/R grubunda (+++) iken, melatonin grubunda (+) idi.

Nurettin ve ark. yaptığı çalışmada, 24 adet Sprague-Dawley cinsi rat kullanılmış ve antioksidan ve glutadyonun öncüsü olan NAC'in İ/R hasarında böbreklerdeki etkisi araştırılmıştır (93). 1. grup (kontrol), 2. grup (İ/R), 3. grup (İ/R+ NAC) olmak üzere 3 farklı eşit sayıda denek kullanılmış. 60 dakika iskemi ve 24 saat reperfüzyon uygulanmış. İskemiden 30 dakika önce (İ/R) grubuna (serum fizyolojik) , (İ/R+NAC) grubuna 300 mg/kg (NAC) i.p verilmiş. Böbrek dokusunda süperoksid dismutaz, katalaz, glutadyon peroksidaz gibi enzim düzeyleri, MDA ile plazma MDA düzeyleri değerlendirilmiş ve sonuçta İ/R grubunda enzim düzeylerinin azaldığı, hem böbrekte hem plazmada MDA değerlerinin arttığı görülmüş. NAC uygulanan grupta ise böbrek ve plazma MDA düzeylerinde azalma, böbreklerin histopatolojik incelenmesinde nekrozda azalma izlenmiş.

Bizim yaptığımız çalışmanın histopatolojik değerlendirmesinde ;

1.Grup ve 5.Grup’da farmakolojik ajan kullanılmamış ve beklediğimiz gibi hasar daha fazla olmuştur, MDA değerleri yüksek bulunmuş ve tam tersine TAOK değerleri ise düşük bulunmuştur.

2. Grup ile 3. Grup karşılaştırıldığında, Akciğerdeki hasarının birbirine yakın olduğu gözükmemektedir. 4.Grup da ise Melatonin ve NAC beraber kullanıldığında birbirlerinin etkisini artırdığı görülmüştür.

Sadece İ/ R yapılan Gruplara bakıldığında, reperfüzyon aşamasında ortama salınan SOR çokluğundan dolayı Akciğer hasarının iskemi yapılan gruplara göre daha fazla olduğu görülmektedir ($p < 0,05$).

Grup 8 ‘de ise Melatonin ve NAC kombine kullanıldığından, 6. ve 7. Gruplara göre Akciğerdeki hasarın ise daha az olduğu gözlemlenmiştir ve bu fark istatistiksel olarak anlamlı görülmüştür ($p < 0,05$).

Alveolar hemoraji yönünden bakıldığında ;

1. ve 5.gruplarda hemoraji artışı mevcut ve (GRADE 3) idi. 2. ve 3. ve 4. gruplarda minimal düzeyde hemoraji mevcuttu.

İ/R yapılan gruplara bakıldığında , 6.grup (5 tanesi GRADE 2 ve 1 tanesi GRADE 3) ve 7. grup (4 tanesi GRADE 2, 2 tanesi GRADE 3) olarak değerlendirildi. 8. grupta (5 tanesi GRADE 2 , bir tanesi GRADE 3) olarak .

Yukardaki sonuçlara bakıldığında reperfüzyon aşamasında ortama salınan SOR etkisi nedeni ile dokulardaki hasarın iskemi yapılan gruplara göre daha fazla olduğu görülmektedir. Burada reperfüzyonda ortaya çıkan serbest oksijen radikallerinin önemi büyüktür. SOR reperfüzyon aşamasında ortama daha fazla salınıp etkileri daha fazla olmaktadır. İ/R gruplarında Melatonin ve NAC kombine kullanıldığında sinerjist etki gösterdiği ve Akciğer İ/R hasarının azalttığı görüldü ve istatistiksel olarak anlamlı bulundu ($p < 0,05$). Ayrıca bu hasarın azaltılmasında kullanılan LPDS solusyonunun öneminde unutmamak gerekir.

SONUÇ

Akciğer transplantasyonu konusunda ilk deneysel çalışmaların yapılmaya başlanmasından bu yana büyük gelişmeler olmuştur. Son dönemlerde bu çalışmaların büyük kısmı donör akciğerin korunması, postoperatif kardiyak ve pulmoner fonksiyonları destekleyecek farmakolojik ajanların bulunması üzerine yoğunlaşmaya başlamıştır.

Bizde yaptığımız bu çalışmada Melatonin ve/veya NAC akciğer İ/R hasarındaki etkisini değerlendirmek istedik. Koruyucu solusyon olarak LPDS kullandığımız çalışmada, doku MDA düzeylerinin Melatonin ve/veya NAC kullandığımız ratlarda çok fazla artmadığı, dolayısı ile akciğeri iskemi ve reperfüzyon hasarından koruyabileceği sonucuna vardık. Ayrıca İ/R hasarında en fazla hasarın oluşan serbest oksijen radikallerine bağlı olarak reperfüzyon aşamasında olduğu görüldü.

Serum TAOK düzeylerine de baktığımızda Melatonin ve/veya NAC kullanılan vakalarda serum TAOK seviyenin diğer gruplara göre düşmediği hatta dahada arttığı görüldü. Serum TAOK seviyesi deneyde kullandığımız bir parametre olup, Akciğer İ/R hasarında TAOK düzeyine bakılarak kullanılan farmakolojik ajanın etkinliğinin çok rahatlıkla değerlendirebildiğimizi ortaya koyduk.

Akciğerin ışık mikroskopu altında immünohistokimyasal olarak değerlendirilmesinde görülmüştür ki, Melatonin ve/veya NAC kullanılan gruplarda hücre hasarının azaldığı, enflamasyona aracılık eden bazı sitokinlerin düştüğü ve PMNL ve buna bağlı olarak inflamatuvar yanıtın az olduğu izlendi. Daha önceki yapılmış olan çalışmalarda olduğu gibi BAL sıvısında Melatonin ve/veya NAC kullanılan gruplarda nötrofil hakimiyetinin fazla olmadığı, hücre sayısının düşme eğiliminde olduğu görüldü. Bununda İ/R hasarında akciğeri koruyucu önemli bir etken olduğu sonucuna vardık.

Akciğeri koruyucu olarak kullandığımız LPDS'nun, deney sonuçlarına pozitif katkıda bulunduğu, bu solusyonun hem kolay elde edilebilen, hemde rahatlıkla kullanılabilen solusyon olduğu görüldü. Akciğer transplantasyonlarında çok rahatlıkla kullanılan bu solusyonun ileriki yıllardada popüleritesi olacağına inanıyoruz.

Tüm bu elde ettiğimiz veriler ışığında Melatonin ve/veya NAC akciğeri İ/R hasarından koruduğu sonucuna vardık. Akciğer transplantasyonunda LPDS çok rahatlıkla kullanılabilen solusyon olduğu, bu iki farmakolojik ajanın soğuk iskemi altında LPDS eşliğinde rahatça kullanılabileceğini gördük.

KAYNAKLAR

1. Patterson GA, Cooper JC, eds. Lung Transplantation. Chest Surgery Clinics of North America. Philadelphia: Saunders, 1993 ; 3 ; 14-21.
2. Siegelman S, Sinha SBP, Veith FJ. Pulmonary reimplantation response. Ann Surg 1973 ; 177 ; 30-6.
3. Welbourn CRB, Goldman G, Paterson IS, Valeri CR, Sphero D, Hechtman HB. Pathophysiology of ischemia reperfusion injury role of the neutrophil. Br J Surg 1991;78 ; 651-5
4. Mathias MA, Tribble CG, Dietz JV. et al. Aprotinin improves pulmonary function during reperfusion in an isolated lung model. Ann Thorac Surg 2000 ; 70 ; 1671-4
5. Kuwaki K, Komatsu K, Abe T. Improvement of ischaemia-reperfusion injury by lazaroide U74389G in rat lung transplantation model. Scand Cardiovasc J 2000 ; 34; 209-12
6. İnci İ, Weder W, Rousson V, Boehler A. Trimetazidine protects the energy status after ischemia and reduces reperfusion injury in a rat single-lung transplant model. J Thorac Cardiovasc Surg 2001;122 ; 1155-61
7. Otamiri T. Oxygen radicals, lipid peroxidation and neutrophil infiltration after small-intestinal ischemia and reperfusion. Surgery;1989 ;105 ; 593-7
8. Ar'Rajab A, Dawidson I, Fabia R. Reperfusion injury. Department of Surgery Texas New Horizons 1996 ; 4 ; 224-34
9. Yogesh T. Effect of N-acetylcysteine on myocardial infarct size following ischemia-reperfusion in dogs. Indian J Physiol Pharmacol 1998 ; 42 ; 50-6
10. Vecchiorelli A, Dotterini M, Pietrella D. COPD in patient N-acetylcystine with macrophage activation. Chest 1994 ; 105 ; 806-11
11. Devrim E.A. Akut Karbonmonoksit Zehirlenmesine Maruz Kalan Sıçanlarda Normobarik ,Hiperbarik Oksijen ve N-Asetilsistein Tedavilerinin Akciğer ve Beyin Dokularına Histopatolojik Etkisi , Uzmanlık Tezi , Süreyyapaşa Göğüs ve Kalp Damar Hastalıkları Eğitim ve Araştırma Hastanesi , 2006 ; sayfa 27
12. Grace PA. Ischaemia-reperfusion injury. Brit Surg 1994 ; 81 ; 637-47
13. Jianping S. Ischemia-reperfusion and no-reflow phenomenon. In: Svensson LG, Crawford ES, eds. Cardiovascular and Vascular Disease of The Aorta. Philadelphia: W.B. Saunders Company, 1997 ; 194-218.

14. Aydınтуğ S, Akata O. İskemi reperfüzyon injurisi:Türkiye klinikleri tıp bilimleri dergisi 1990 ; 10 ; 228-232
15. Göksel S, Osman T, Özer Ş, Ayhan K, Serap A Melatonin and N-acetylcysteine have beneficial effects during hepatic ischemia and reperfusion. Life sciences 2003; 72 ; 2707-12
16. Maxwell SRJ, Lip GYH. Reperfusion injury: a review of the pathophysiology, clinical manifestations and therapeutic options. Int J Cardiol 1997; 58 ; 95-117
17. Dreyer WJ, Michael LH, West MS, Smith CW, Rothlein R, Rossen RD, et al. Neutrophil accumulation in ischemic canine myocardium. Insights into time course, distribution, and mechanism of localization during early reperfusion. Circulation 1991; 84; 400-411
18. Hansen PR. Role of neutophils in myocardial ischemia and reperfusion. Circulation 1995 ; 91 ; 1872-1885
19. Esme H. Tavşan Akciğerinde İn Sutu Normotermik İskemi Modelinde Düşük Potasyum Dekstran'a Aprotinin Eklenmesiyle Akciğer İskemi Reperfüzyon İnjurisinin Azaltılması, Uzmanlık Tezi , D.Ü.T.F , 2002 ; 12-13
20. Moens AL, Claeys MJ, Timmermans JP, Vrints CJ. Myocardia ischemia/reperfusion-injury, a clinical view on a complex pathophysiological process. Int J Cardiol 2005 ; 100 ; 179-190
21. Park JL, Lucchesi BR. Mechanisms of myocardial reperfusion injury. Ann Thorac Surg 1999 ; 68 ; 1905-1912
22. Kumar V, Cotran R, Robbins S.L. Temel Patoloji , Çevikbaş U, 6.cı Baskı , İstanbul, Nobel Tıp Kitabevleri, 2000 Temel Patoloji 2000 ; 6. Edisyon ; sayfa: 9
23. Arendt J, Skene DJ, Middleton B, et al. Efficacy of melatonin treatment in jet lag, shift work and blindness. J Biol Rhythms 1997 ; 12 ; 604-17
24. Turgut M, Ozkaya B. Pineal bölge tümörleri ve cerrahi yaklaşım şekilleri. Arşiv; 2000 ; 10 ;100.
25. Stehle JH, Foulkes NS, Molina CA. Adrenerjik signals direct rhythmic expression of the transcriptional repressor CREM in the pineal gland. Nature, 1993 ; 363 ; 314.
26. Pieri C, Marra M, Marcheselli F, et al. Melatonin Peroxyl radical scanenger more effective than vitamin E. Life Sci 1994;55 ; 271-275
27. Pabtos Mİ, Agapto MT, Gutierrez R, et al; Melatonin stimulates the aktrvrty of the detoxifying enzyme glutathione peroxidase in several tissues of chicks. J Pineal Res 1996 ; 19 ; 111-5

28. Refter RJ, Leppaluoto J, Melatonin as a hormone and an antioxdatif; implications for organisms at high lattitudes. İn J Circumpolar Heafth 1997;56 ; 4-11
29. Kelly GS. Clinical application of N-acetylcysteine. Altern Med Rev 1998 ;3 ; 114-127
30. İsmet Dökmeci Farmakoloji. Nobel Tıp Kitapevi 1992 Antitusif, ekspektoran ve mukolitik ilaçlar Sayfa 317.
31. N.Aydogdu, K.Kaymak, Ö.Yalçın. Sıçanlarda Böbrek iskemi/Reperfüzyon Hasarında N-Asetilsisteinin Etkileri. Fırat Tıp Dergisi 2005 ; 10 ; 151–155.
32. Tossios P, Bloch W, Huebner A, Raji MR, Dodos F, Klass O. N-acetylcysteine prevents reactive oxygen species–mediated myocardial stress in patients undergoing cardiac surgery: results of a randomized, double-blind, placebo-controlled clinical trial. J Thorac Cardiovasc Surg. 2003 ; 126 ; 1513-20
33. Halifeoğlu İ, Karataş F, Çolak R, Canatan H, Telo S. Tip 2 diyabetik hastalarda tedavi öncesi ve tedavi sonrası oksidan ve antioksidan durum. Fırat Tıp Derg 2005 ; 10 ; 117–122
34. Mercan U. Toksikolojide serbest radikallerin önemi. YYU Vet Fak Derg 2004 ;15 ; 91–96
35. Uysal M. Serbest radikaller, lipid peroksitleri ve organizmada prooksidanantioksidan dengeyi etkileyen koşullar. Klinik Gelişim 1998; 11; 336–341
36. Yalçın AS. Antioksidanlar. Klinik Gelişim 1998 ; 11 ; 342-346
37. Sun Y, Oberley WL, Li Y. A Simple Method for Clinical Assay of Superoxide Dismutase. Clin Chem 1988 ; 34 ; 497–500.
38. Smith EL, Hill RL, Lehmal R et all. Principle of Biochemistry. 7th Edition, Mc Graw- Hill, USA 1983 ; 382–383.
39. Murray RK, Granner DK, Mayes PA, Rodwee VW. Harpers Biochemistry. 2th Edition, Typo Pres, 1991.
40. Ansari KA, Bigelow D, Kaplan E. Glutathione peroxidase activity in surgical and autopsied human brains. Neurochem Res 1985 ; 10 ; 703–711
41. Prohaska JR, Ganther HE. Selenium and glutathione peroxidase in developing rat brain. J Neurochem 1976 ; 27 ; 1379–1389
42. Contariu D, Evans S, Lahat E, Theitler J, Bistritzer T, Zaidman LJ. Inhibition of human red blood cell glutathione reductase by valproik acid. Biochem Pharmacol 1992 ; 43 ; 425–429.

43. Shan X, Aw TY, Jones DP. Glutathione dependent protection against oxidative injury. *Pharmac Ther* 1990 ; 47 ; 61–71
44. Anderson ME, Meister A. Glutathione Monoesters. *Anal Biochem* 1989 ; 183 ; 16– 20.
45. Meister A. Glutathione, ascorbate and cellular protection. *Cancer Res* 1994 ; 54 ; 1969–1975.
46. Reynolds HY, Newball HH. Analysis of proteins and respiratory cells obtained from human lungs by bronchial lavage. *J Lab Clin Med* 1974 ; 84 ; 559–573
47. Klech H, Hutter C, Costabel U, eds. Clinical guidelines and indications for bronchoalveolar lavage (BAL). Report of the European Society of Pneumology Task Group on BAL. *Eur Respir Rev* 1992 ; 2 ; 47–127
48. Reynolds HY. Use of bronchoalveolar lavage in humans – past necessity and future imperative. *Lung* 2000 ; 178 ; 271–293.
49. Seven A, Candan G. Antioksidan savunma sistemleri. *Cerrahpaşa Tıp Derg* 1996 ; 27 ; 41–50.
50. Battino M, Ferreiro MS, Gallardo I, Newman HN, Bullon P. The antioxidant capacity of saliva. *J Clin Periodontol* 2002 ; 29 ; 189–194.
51. Hopkinson DN, Bhabra MS, Hooper TL. Pulmonary graft preservation a worldwide survey of current clinical practice. *J Heart Lung Transplant* 1998 ; 17 ; 525-31
52. Keenan RJ, Griffith BP, Kormos RL. Increased perioperative lung preservation injury with lung procurement by Euro-Collins solution flush. *J Heart Lung Transplant* 1991 ; 10 ; 650-5
53. Kondo T, Fujimori S, Yumauchi A. et al. Successful preservation of canine lung for 24 hours by simple cooling method. *Ishoku* 1984 ; 19 ; 259-9
54. Handa M, Fujimori S, Kondo T, Ichinose T. A study of preservation solution for 48 and 96 hour simple hypothermic storage of canine lung transplants. *J Exp. Med* 1989 ; 159 ; 205-14
55. Yamazaki F, Yokomise H, Keshavjee SH. et al. The superiority of an extracellular fluid solution over Euro-Collins solution for pulmonary preservation. *Transplantation* 1990 ; 49 ; 690-4
56. Aziz TM, Pillary TM, Corris PA. et al. Perfadex for clinical lung procurement is it an advance. *Ann Thorac Surg* 2003 ; 75 ; 990-5

57. Sundaresan S, Lima O, Date H. et al. Lung preservation with low potassium dextran flush in a primate bilateral transplant model. *Ann Thorac Surg* 1993;56 ; 1129-35
58. Mayer E, Reliable eighteen-hour preservation at 4 C° and 10 C ° by pulmonary artery flush after high dose PG E1 administration. *J Thorac Cardiovas Surg* 1992 ; 103 ; 1136-1142
59. Kirg AJB, Colquhoun IW, Dark HJ. et al. Lung preservation ; A review of current practice and future directions. *Ann Thorac Surgery* 1993 ; 56 ; 990-1000
60. Hall TS, Borkon AM, Gurtner GC. et al. Improved static lung preservation with corticosteroids and hypothermia. *J Heart Transplant* 1988 ; 7 ; 348-52
61. Hooper TL, Thomas DS, Jones MT. et al. Amelioration of lung ischemic injury with prostacyclin. *Transplantation* 1990 ; 49 ; 1031-5
62. Fantone DC, Marasco WA, Elgas LJ. et al. Stimulus specificity of prostoglandin inhibition of rabbit polymorphonuclear leucocyte enzyme release and superoxide anion production. *Am J Pathol* 1984 ; 115 ; 9-16
63. Bonser RS, Fragomeni RS, Edwards BJ. et al. Allopurinol and deferoxasamin improve canine lung preservation. *Transplant Proc* 1990 ; 22 ; 557-8
64. Hachida M, Morton DL. The protection of ischemic lung with verapamil and hidralazine. *J Thorac Cardiovas Surgery* 1988 ; 95 ; 178-83
65. Breda MA, Hall TS, Stuart RS. et al. Twenty-four hour lung preservation by hypothermia and leukocyte depletion. *Heart Transplant* 1985 ; 3 ; 325-9
66. Erel O. A novel automated direct measurement method for total antioxidant capacity using a new generation, more stable ABTS radical cation. *Clin Biochem* 2004 ; 37 ; 277-85.
67. Erel O. A novel automated method to measure total antioxidant response against potent free radical reactions. *Clin Biochem* 2004 ; 37 ; 112-9.
68. Ohkawa H, Ohisni N, Yagi K. Assay for lipid peroxides in animal tissues by thiobarbituric acid reaction. *Anal Biochem* 95 ; 2 ; 351-358
69. Egan TM, Lambert CJ, Reddick R, et al. A strategy to increase the donor pool use of cadaver lungs for transplantation. *Ann Thorac Surg* 1991 ; 52 ; 1113-21
70. Higgins RSD, Letsou GV, Sanchez JA, et al. Improved ultrastructural lung preservation with prostoglandin E1 as donor pretreatment in a primate model of heart-lung transplantation. *J Thorac Cardiovasc Surg* 1993 ;105 ; 956-71

71. Chiang CH, Hsu k, Yan HC, Harn HJ, Chang DM. PGE 1,Dexamethasone, U-74389, or Bt2-C amp as an additive to promote protection by UW solution in I/R injury. *J Appl Physiol* 1997 ; 83 ; 583-590
72. Tracey K, S Lawry, F. And Cerami A. Cachectin / TNF in septic adult respiratory distress syndrome. *Am Rev Resp Dis* 1998 ; 138 ; 1377-1379.
73. Gatty MG, Guice KS, Oldham KT, Remick DG and Kunkel S. Evidence for tumor necrosis factor-induced pulmonary microvascular injury after intestinal ischemia-reperfusion injury. *Ann Surg* 1989 ; 212 ; 694-700
74. Tarbell NJ, Rosenblatt M, Arnato DA, Hellman S. The effect of N-acetylcysteine inhalation on the tolerance to thoracic radiation in mice. *Radiotherapy and oncology* 1986 ;77-80
75. De La Lastra CA, Cabeza J, Motilva MJ. Melatonin Protects against lung Ischemia reperfusion injury in rats. *J Pineal Res* 1997 ; 23 ; 47-52
76. Seo MY, Lee SM. Protective of low dose of melatonin on lung function in hepatic I/R in rats. *Journal of Pineal Research* 2002 ; 36 ; 72-7
77. Karabulut R, Sönmez K, Sancak B, Demiroğulları B. The effects of melatonin on lung ischemia reperfusion injury. *Gazi Üniversitesi Medical Faculty Pediatric Surgery and Biochemistry Departments, Ankara, Turkey* 2002 ; 23 ; 115-8
78. Inci I, Inci D, Dutly A, Boehler A, Weder W. Melatonin attenuates posttransplant lung ischemia-reperfusion injury. *Ann Thorac Surg* 2002 ; 73 ; 220-225
79. Selim İ, Koray A, Ümit Z. The Effect of Enalapril and Nifedipine on Myocardium and Lung in Chronic Hypoxemia *Türk Kardiyoloji Derneği* 2002 ; 30 ; 229-232
80. Göksel S. Özer A, Serap A. The protective effect of melatonin on renal ischemia-reperfusion injury in the rat. *Journal of pineal research* 2002 ;32 ; 120-126
81. Topal T, Oter S, Korkmaz A et all. Exogenously administered and endogenously produced melatonin reduce hyperbaric oxygen-induced oxidative stres in rat lung. *Life Sciences* 2004 ;75 ; 461-467.
82. Sener G, Tosun O, Sehirli AO, Kacmaz A. Melatonin and N-acetylcysteine have beneficial effects during hepatic ischemia and reperfusion. *Life Sci.* 2003 ; 72 ; 2707-18
83. İlhan İ, A. Dutly, V. Rousson, A. Boehler, and W. Weder. Trimetazidine protects the energy status after ischemia and reduces reperfusion injury in a rat single lung transplant model *J Thorac Cardiova Surg* 2001 ; 122 ; 1155-1161

84. Erhan A. Necip İ. Deneysel Akciğer Ototransplantasyonu Sonrası Reperfüzyon Hasar Modelinde N-Asetilsisteinin Etkileri. 2004 ; 12 ; 98-105
85. İlhan İ, Demet İ, André D, Weder W. Melatonin attenuates posttransplant lung ischemia-reperfusion injury. The Ann of Thor Surg 2002 ; 73 ; 220-225
86. Peter I, Ellman M.D , Brett T, Reece M.D , Marianna G, Law M.D , Leo M , Gazoni M.D. Adenosine A_{2A} Activation Attenuates Nontransplantation Lung Reperfusion Injury. Journal of Surgical Research 2008 ; 149 ; 3-8
87. İnci İ, Özçelik C, Yaldiz M. Kadavra Akciğerinin Korunması : LPDS içerisinde perfüze verilen Verapamil ve Diltiazemin koruma üzerine etkinliğinin karşılaştırılması Solunum Hastalıkları. 1997 ; 8 ; 287-298
88. Kimbland PO, Sjöberg T, Massa G, et al High Potassium content in organ preservation solutions cause strong pulmonary vasoconstriction. Ann Thor Surg 1991 ; 52 ; 523-8
89. Struber M, Fraund S, Kim P. Low-potassium dextran solution ameliorates reperfusion injury of the lung and protects surfactant function. J Thor Card Sur 2000 ; 120 ; 566-572
90. Struber M. Wilhelmi M. Harringer W. Flush perfusion with low potassium dextran solution improves early graft function in clinical lung transplantation. Eur J Cardiothor Surg 2001 ; 19 ; 190-4
91. Kelly RF, Murar J, Nelson DP, Hong F. Low potassium dextran lung preservation solution reduces reactive oxygen species production. Ann Thor Surg 2003 ; 75 ; 1705 -1710
92. Fumio S, Hans H, Christian M, Hendrik D. Reduced Lipid Peroxidation and Ischemia-Reperfusion Injury after Lung Transplantation Using Low-Potassium Dextran Solution for Lung Preservation. Am J Resp Crit Care 1997; 156; 1073-1081
93. Nurettin A, Kadir K, Ömer Y, Sıçanlarda Böbrek İskemi/Reperfüzyon Hasarında Nasetilsisteinin Etkileri. Fırat Tıp Dergisi 2005 ; 10; 151-155

ÖZGEÇMİŞ

Adı ve Soyadı : Atilla Durkan

Doğum Yeri : Ankara

Doğum Tarihi : 26 /6 / 1973

Baba Adı : Necati

Anne Adı : Hatice

İlk öğretim : Ankara Demirlibahçe ilkokulu ve Orta okulu

Lise : Ankara Yenimahalle E.M.L (1986-1988)

Üniversite : Ankara Üniversitesi Tıp Fakültesi (1992-1999)

Yüksek Lisans : D.Ü.T.F Göğüs Cerrahisi A. D (2003- 2009)