

RAT BÖBREĞİNDE İSKEMİ-REPERFÜZYON HASARINA KARŞI ALLOPURİNOL, L-ARGİNİN, L-NAME, DİLTİAZEM VE PREDNİZOLONUN KORUYUCU ETKİLERİ

(DOKTORA TEZİ)

M. Ensari GÜNELİ

TEZ YÖNETİCİSİ

Doç. Dr. Ramazan ÇİÇEK

DİCLE ÜNİVERSİTESİ MERKEZ KÜTÜPHANESİ	
Demirbaş No.	43555
Tasnif No.	615.7045
	GÜN
	1999

2004/1

İÇİNDEKİLER

A- GİRİŞ VE AMAÇ.....	1
B- GENEL BİLGİLER	5
a) İskemi-Reperfüzyon (İR) Hasarı.....	5
b) İskemi-Reperfüzyon (İR) Hasar Mekanizmaları.....	6
c) Serbest Radikaller.....	12
d) L-Arginin.....	18
e) L-NAME.....	23
f) Allopurinol.....	24
g) Diltiazem.....	24
h) Prednizolon.....	26
C- MATERYAL VE METOD.....	30
D- BULGULAR.....	33
E- TARTIŞMA.....	43
F- ÖZET.....	58
G- SUMMARY.....	60
H- KAYNAKLAR.....	62

Doktora öğrenim ve tez çalışmalarım süresince gerekli tüm bilgi ve becerisinininden faydalandığım danışman hocam Doç.Dr.Ramazan ÇİÇEK'e teşekkür ederim. Ayrıca tez çalışmamda biyokimyasal ve histolojik incelemeler için gerekli yardımı sağlayan DoçDr. Naime CANORUÇ'a, Yrd.Doç.Dr. M.Aydın Ketani'ye ve Doç. Dr. Sabri Batun'a teşekkürlerimi sunarım.

GİRİŞ VE AMAÇ

İskemi, bir dokunun ya da organın yeterince kanlanamaması, gerekli besin maddelerinden ve oksijenden yoksun kalmasıdır. Reperfüzyon, iskekiye maruz kalan doku ya da organın yeniden kanlanarak gerekli besin ve oksijeni almasıdır. Normalde hücre, bu gibi patolojik durumlarda yapı ve fonksiyonlarını devam ettirebilmek için değişen duruma adapte olmaktadır. Doku veya hücre bu adaptasyonu sağlayamazsa ciddi doku veya hücre hasarlanması meydana gelir. Bir noktadan sonra şiddetli hasar nedeniyle, geri dönüşümsüz tahribata bağlı olarak hücre ölümü gerçekleşir.

Hücre hasarını moleküler düzeyde açıklamak zor ve karmaşıktır. Zira hücre hasarının oluşmasında tek bir mekanizma yoktur. Hücre hasarına yol açacak bir çok etken vardır. İskekiye bağlı doku hasarlanması hücrede moleküler veya yapısal bir dizi olaylarla gerçekleşir. Bundan dolayı bir çok hastalıkta olduğu gibi iskeki ve reperfüzyonda oluşan hasarın da fizyolojik ve biyokimyasal etkileri selüler veya subselüler düzeyde incelenmelidir.

İskeki; kan akımının bozulması, arter veya venin oklüzyonu sonucu gelişen ve özellikle aerobik oksidatif solunumu etkileyen hipoksik bir durumdur. Hipotansiyon ve hipovolemi ile ilişkili bir çok olayın nedeni de nonoklüzif iskemidir. Kalp ve solunum sisteminin yetersizliğine bağlı olarak gelişen kanın oksijenlenememesi olayı da doku veya organlarda hipoksik hasar oluşturmaktadır. Organ transplantasyonunda da iskeki ve takiben reperfüzyon hasarı meydana gelmektedir. Dolayısıyla bir organ veya dokunun iskemisi çeşitli büyüklüklerde doku hasarı meydana getirmektedir, hatta hücrenin ölümüne neden olmaktadır. İskemide temel olay hücre veya dokunun gerekli oksijeni alamamasıdır. Oksijen hücrenin metabolik olayları ve canlılığını sürdürmesi için hayati öneme sahip bir elementtir. Ancak bazı durumlarda iskekiyi takiben reperfüzyon ile gelişen hücre zedelenmesinde oksijen önemli rol oynamaktadır.

Oksijen zehirlenmesi adı verilen dokularda oksijen konsantrasyonunun artması durumunda, hücre içinde oksijenin suya indirgenmesi sürecinde konsantrasyona bağımlı bir şekilde aşırı miktarda reaktif (serbest) oksijen radikalleri üretilmektedir. Bir çok veri oluşan bu sitotoksik serbest oksijen radikallerinin ve diğer radikallerin bir çok hastalığın (ateroskleroz, alzheimer tipi demans, yaşlanma, kalp hastalıkları,

kanser, diabet ve akut inflamatuvar hastalıklar gibi) direkt etkeni olmasa da etyopatolojisi ve ilerlemesinde önemli rol oynadığını göstermektedir. Organizma oksijenin bu toksik etkilerini önleyecek savunma sisteminlerine sahiptir. Ancak oluşan serbest oksijen radikallerinin üretimindeki artış ve antioksidan savunmanın azalması serbest oksijen radikallerine bağlı patolojik tabloların ortaya çıkmasına neden olmaktadır.

İskeminin oluşması ile dokuda enerji üretiminde kullanılacak oksijen ve besin maddeleri hücreye taşınmadığından hücre içi enerji depolarında hızlı bir tükenme meydana gelir. Hücreye besin maddeleri ve oksijen taşınamamasının hücrede etkilediği ilk selüler eleman mitokondridir. Besin maddeleri ve oksijen yetersizliği mitokondrideki oksidatif fosforilasyonu bozarak ATP oluşumunu azaltır ve durdurur. Dokuya yeteri kadar oksijen ve besin maddeleri taşınmadığından hücrede telafi edilemeyen ATP azalması bir çok sorunun başlamasına neden olur. Hücre enerji kaynaklarını korumak için anaerobik metabolik yolağa kayarak glikojen depolarından ATP oluşumunu artırır. Enerji üretimindeki azalmaya bağlı olarak aktif transport mekanizmaları zaafiyete uğrar; hücre dışına potasyum iyonu kaçarken hücre içine sodyum, klorür ve kalsiyum iyonlarının akümüülasyonu gerçekleşir. ATP depleksiyonuna bağlı olarak hücre içine hızlı bir şekilde masif Ca^{++} girişi, intraselüler depolardan kalsiyum salıverilmesi gerçekleşir. Hücre içinde kalsiyum seviyeleri yükseldiği için, fosfolipaz A_2 aktivasyonu, eksitatör aminoasitlerin salıverilmesi, nöronların hipereksitabilitesi, postreseptör mekanizmaların değişmesi gibi kalsiyum ile aktivasyona uğrayan süreçler aktive olur. Aneorobik glikolizin hızla artması glikojen depolarının azalması ile glukoz yıkımına bağlı laktik asit birikimine neden olur. ATP yıkım ürünlerinin artması ve hücre içinde H^+ ve fosfat birikimi ve bu metabolik artıkların uzaklaştırılamaması, hücre içi pH'ı düşürerek intraselüler asidoz oluşturur. Mitokondri fonksiyonları giderek azalır. İskemik durumun devam etmesi ile hücrede geri dönüşümsüz olaylar gelişir. Bunlar arasında en önemli olanlar şunlardır: mitokondriyal membranın hasarlanması, hücre membranının ve lizozomal membranların zarar görmesi.

İskemik dokudaki değişikliklerin giderilmesi, dokuya oksijen ve besin maddelerinin verilmesi ve metabolizma artıklarının uzaklaştırılması ile mümkün olabilir. Yani iskemik hücre veya dokunun hemen reperfüze edilmesi gerekmektedir.

Ancak iskemi sonrası dokunun yeniden oksijenlenmesi yani reperfüzyonu doku için zararlı bir çok toksik metabolitin oluşmasına, ciddi doku ve hücre hasarına neden olmaktadır.

İskemik aşamada ATP yıkım ürünlerinin artması ile bol miktarda hipoksantin oluşur. Hipoksantin ksantin oksidaz enzimi aracılığı ile ksantine dönüşümü esnasında iskemik dokuya oksijen sunumunun gerçekleşmesi hücrede aşırı miktarda serbest oksijen radikallerinin oluşmasına neden olur. Lizozomal membran yırtılması, hücre içinde kalsiyum iyonunun akümüülasyonu ve özellikle iskemi nedeniyle aktive olmuş PMNL'lerden serbest oksijen radikallerinin ve toksik metabolitlerin salıverilmesi hücre veya dokuda iskemiye bağlı reperfüzyon (İR) hasarını oluşturur. İR ile oluşan hasarın büyük bir kısmından oksijen kaynaklı serbest radikaller sorumlu tutulmaktadır. İR ile oluşan serbest radikaller özellikle hücre membranında lipid peroksidasyona neden olarak reversibl veya irreversibl hasar oluşmasında önemli rol oynarlar. Deneysel çalışmalar, iskemik doku veya hücrenin reperfüzyonu ile gerçekleşen hasarlanmanın, yani reperfüzyon hasarının, iskemide gerçekleşen hasardan daha fazla olduğunu göstermektedir. İskemi sonrası reperfüzyon hasarı sıklıkla soğuk iskemi sonrasında, solid organ transplantasyonunda, şok ve benzeri bir çok durumda gerçekleşmektedir.

İR'nin gerçekleştiği dokudaki hasarın derecesi dokunun anatomik ve fizyolojik özelliklerine de bağlıdır. Beyin ve barsak dokusu İR hasarına oldukça duyarlıdır. Böbrek arterinin oklüzyonu tübül hücrelerinde metabolik düzensizliklere yol açarak iskemik hasara neden olmaktadır. İskemik böbreğin perfüzyonu ile reperfüzyon hasarı gerçekleşmektedir. Deney hayvanlarında yapılan çalışmalarda İR'ye maruz kalan böbrekte otoregülasyon kaybı, renal vasküler direncin artması, renal kan akımının azalması gibi değişiklikler ile akut böbrek yetmezliği oluşmaktadır. Deneysel çalışmalar, böbrekte İR ile gerçekleşen akut böbrek yetmezliğinde serbest oksijen radikallerinin ve diğer toksik metabolitlerin önemli rol oynadığını göstermektedir.

Hayvan deneylerinde, in vivo iskemi ve sonrasında gerçekleştirilen reperfüzyon metodu serbest radikallerin oluşumunu incelemek için yaygın olarak kullanılan bir metottur. Bu tür bir deneysel çalışmada İR veya benzeri patolojik bir olayda etkenin

serbest radikal olup olmadığını anlamak için biyokimyasal incelemeler yapılabilir. Bu amaçla sıklıkla lipid peroksidasyon tayini yapılır.

Bir çok klinik ve deneysel çalışmaya göre, İR ve benzeri patolojik durumlarda meydana gelen serbest oksijen radikalleri ve diğer toksik metabolitlere karşı endojen savunma mekanizmaları dışında, eksojen antioksidanlar ile de korunma sağlanabilmektedir. Ksantin oksidaz inhibitörü olan allopurinol; ksantin oksidaza bağlı serbest radikalın oluşmasını engelleyerek, dimetiltiyoüre (DMTU); oluşmuş radikallerin temizleyerek (free radical scavenger) veya indirgenmiş glutatyon (GSH); endojen antioksidan savunmayı güçlendirerek eksojen antioksidan olarak kullanılabilir. Bu amaçla bir çok madde terapötik veya deneysel amaçla kullanılmakta olup, çok sayıda antioksidan madde ile ilgili deneysel araştırmalar devam etmektedir.

Biz bu çalışmamızda renal arter oklüzyonuna bağlı akut böbrek yetmezliğine neden olan İR modelini kullandık. Mevcut çalışmalar eksojen olarak kullanılan antioksidan maddelerin böbrekte İR hasarı oluşumunu azalttığını göstermektedir. Biz de bu çalışmada, İR'ye maruz kalan böbrekte oluşan toksik metabolitlerin etkilerini gidermek amacıyla nitrik oksit (NO) donör ve antagonisti, ksantin oksidaz inhibitörü, kalsiyum kanal blokörü maddeler ve glukokortikoid grubu bir ajan kullanarak İR hasar mekanizmasını anlamayı ve kullanılan ilaçların protektif etkilerinin bulunup bulunmadığını incelemeyi amaçladık.

GENEL BİLGİLER

İSKEMİ-REPERFÜZYON (İR) HASARI

Reperfüzyon hasarı, besin ve oksijen eksikliği ile başlayan iskemik hücre hasarını takiben, hücrenin yeniden oksijenlendirilmesi, yani reperfüzyonu ile şiddetlenen ve başlıca serbest oksijen radikallerinin sorumlu tutulduğu bir olaydır. İskemiye takiben reperfüzyon oluşmaz ise ciddi iskemik hasarlanma gerçekleşir, fakat toksik oksijen türevleri görülmez (1). Özellikle klinikte cerrahların fazla karşılaştıkları cerrahi girişimler esnasında sıklıkla İR hasarı meydana gelir. Uzun yıllar cerrahlar femoral arterde gerçekleştirdikleri başarılı bir embolektomiden sonra görülen renal yetmezlik ve ölümün nedenini anlamada zorluk çekmişlerdir (2). Renal arterde ve torakoabdominal aortik hastalıklarda cerrahi müdahaleden sonra postiskemik akut renal yetmezlik sıklıkla meydana gelir. Bu durum yüksek mortalite ile sonuçlanan oldukça komplike bir durumdur (3). Karaciğer transplantasyonu esnasında v. cava inferior klemplendiğinde böbrekte İR hasarı meydana gelmektedir. Hipovolemik şok, koroner arter hastalığı, organ transplantasyonu gibi bir çok klinik durumda da İR hasarı gerçekleşebilmektedir. Bir çok deneysel ve klinik çalışmaya göre organ transplantasyonu, İR hasar mekanizmasının incelenmesi için iyi bir metot oluşturmaktadır. Çünkü organ transplantasyonunda, İR hasarı açıkça gözlenir. Organ vücuttan alındığında iskemik hasar başlar, transplantasyon gerçekleştirilip vasküler anastomozlar tamamlandığında ise organda tekrar kanlanmaya bağlı reperfüzyon hasarı meydana gelir. Ancak organ transplantasyonunda organın vericiden alıcıya nakledilmesine kadar geçen zaman süresince her aşamada farklı mekanizmalar ile hasar şekillenmektedir. Organ transplantasyonunda gerçekleşen İR hasarına immünolojik mekanizmalar da eşlik etmektedir (2,4,5).

İR hasarı sadece dokuda değil aynı zamanda kan damarlarında da yapısal ve fonksiyonel bozukluklar meydana getirmektedir. İR hasarında vasküler endotel çok önemli rol oynamaktadır. Hasarlı endotel bir çok inflamatuvar maddenin salıverilmesini modüle edip serbest oksijen radikalleri üretilebilir. Böbrekte cerrahi müdahale esnasında organı korumak için kısa bir süre renal arterin klemplenmesi

gerekmektedir. Bundan dolayı böbrekte sadece İR hasarı değil, aynı zamanda renal arter duvarında klemplenmeden kaynaklanan zarar da görülebilmektedir (2,6,7).

İR hasarı sadece lokal bir olay değildir, sistemik etkisi ile bir çok organda hasara neden olmaktadır. İR hasarı bir dokuda şekillendiğinde, hasarın oluşmasına aracılık eden mediyatörler vasıtasıyla başka dokularda da hasara neden olmaktadır. Bağırsaklarda İR ile oluşan serbest oksijen radikalleri uzak yerlerdeki organlarda (kalp, akciğer gibi) vasküler hasara neden olabilmektedir (4).

İskemi sırasında bozulan hücre yapı ve fonksiyonları, reperfüzyonun gerçekleşmesiyle oluşan serbest oksijen radikallerine karşı hücreyi daha duyarlı kılmaktadır. Bu nedenle iskemik hasarın süresi ne kadar uzunsa reperfüzyon hasarı da o derece ciddi olmaktadır.

İR hasar mekanizmaları:

İR hasar mekanizması karmaşık olup, hasarın büyük bir kısmından serbest oksijen radikalleri sorumlu tutulmaktadır. Bu hasarın oluşmasından sorumlu olan majör kaynaklar ve İR hasar mekanizmaları aşağıda belirtilmiştir:

1- *Polimorfonükleer lökositler (PMNL)* : İR sırasında oluşan serbest oksijen radikallerinin önemli kaynaklarından biridir. Nötrofiller serbest oksijen radikallerinin salınımı ile lipid peroksidasyona, lökosit kapiller tıkaca, kapiller no-reflow ve ödeme neden olmaktadır. İskemik hasar nötrofillerin aktivasyonuna neden olarak nötrofillerin migrasyonuna ve vasküler duvarı geçerek iskemik alanda akümülyasyonuna neden olur. Aktive nötrofiller sitotoksik oksijen metabolitlerinin oluşumuna ve zararlı proteolitik enzimlerin (elestaz, kollajenaz, jelatinaz gibi) salınımına neden olmaktadır (8). İskemik dokunun reperfüzyonu dokudaki nötrofil akümülyasyonunda önemli bir artışa neden olur (9). Sıçan, köpek, domuz, tavşan ve fare gibi deney hayvanlarının çeşitli organlarında yapılan deneysel çalışmalarda, iskemik organların reperfüzyonu ile kan akımının düzelmesine rağmen iskemi süresince iskemik alana infiltre olmuş aktive nötrofillerin serbest oksijen radikalleri salarak İR hasarı oluşturduğu ve bu hasarda bir çok radikal süpürücü veya antioksidan ilaçların hasarı önleyici rol oynadıkları gösterilmiştir (8,10,11,12).

Nötrofil hücre membranında bulunan NADPH-oksidadaz enzimi, serbest oksijen radikallerinin oluşmasında önemli bir role sahiptir (13). İR ile nötrofillerden miyeloperoksidaz enziminin (MPO) aktivitesi sonucu daha güçlü sitotoksik radikaller de (HOCl gibi) oluşur. İR'ye uğrayan dokudaki MPO aktivitesinin ölçümü miyeloid orijinli nötrofillerin, eozinofillerin ve monositlerin İR hasarındaki rollerini göstermektedir (14,15).

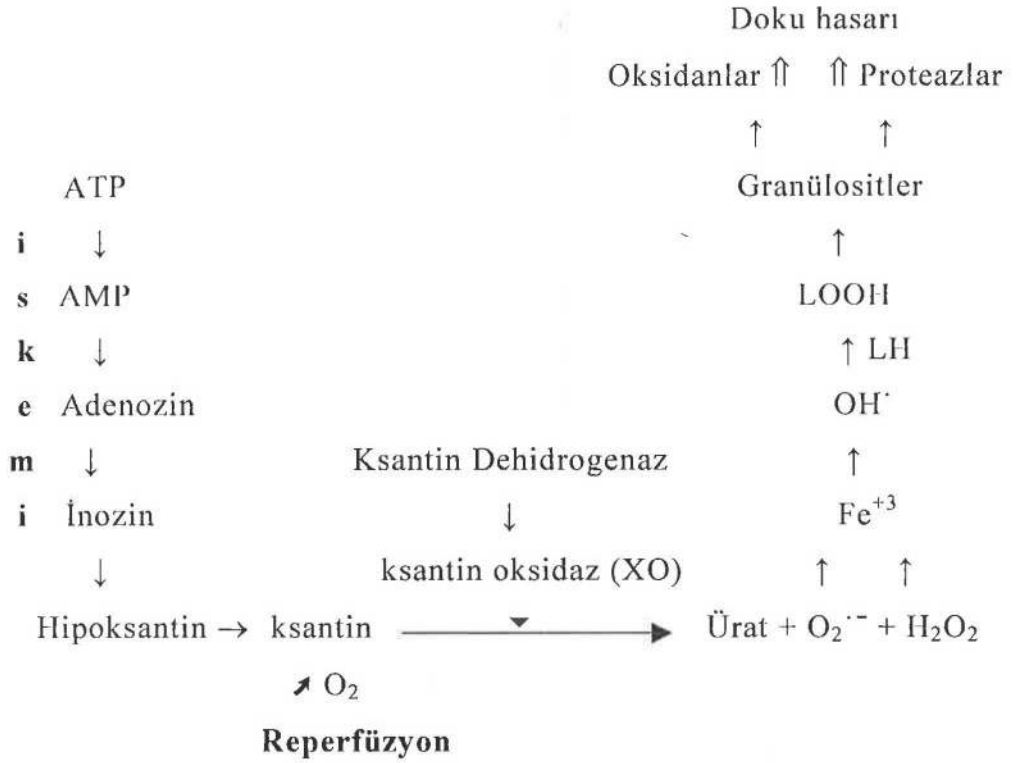
Nötrofillerin hem sistemik hem de lokal etkileri ile İR hasarının oluşmasında rol oynadıkları ve dolaşımdaki nötrofillerin azalması ile doku hasarının azaldığı, önlendiği görülmüştür (8). İskemi-reperfüzyonun böbrekte neden olduğu akut böbrek yetmezliğinde (ARF) nötrofillerin hasarı daha şiddetlendirdiğine dair çalışmalar mevcuttur (16,17). Ancak nötrofillerin İR hasar mekanizmasındaki rolü tam olarak bilinmemektedir (18).

İR'nin neden olduğu nötrofil uyarı ve aktivasyon sisteminin mekanizması tam olarak bilinmemektedir. Nötrofillerin iskemik hasar oluştuktan sonra mı dokuya infiltre oldukları, yoksa İR'nin oluşmasından mı sorumlu olduğunu anlamak için yapılan çalışmalardan elde edilen sonuçların çoğu İR'ye maruz kalan organ yada dokularda nötrofillerin aktive olduğunu ve aktive nötrofillerin serbest oksijen radikalleri ile eikozanoidler, sitokinler (TNF- α , İL-1, İL-6 ve monosit spesifik sitokinler gibi) ve proteolitik enzimler dahil bir çok sitotoksik metaboliti salarak doku veya organda hasara neden olduğunu göstermiştir (12). Nötropeni ve antilökosit adezyon monoklonal antikörlerinin İR hasarını azaltmaları ya da önlemleri beyaz kan hücrelerinin İR hasarının oluşmasında önemli rol oynadıklarını göstermektedir (4). Yani nötrofillerin İR hasarına neden olduğunu göstermektedir (11,19,20). Nötrofil deplesyonu yapılmış ratlarda yürütülen bir çalışma nötropenin İR hasarlı böbreklerde akut böbrek yetmezliğinin gelişmesini engelleyemediğini göstermiş, bu durum tek başına nötrofillerin İR hasarından sorumlu olamayacakları fikrini vermiştir. Daha da ötesi nötropenik hastalarda da akut böbrek yetmezliği gelişebilmektedir (21). Karaciğerde yapılan bir çalışmada İR hasarının akut fazında oksidan stresin, subakut fazında ise nötrofillerin etkili olduğu gösterilmiştir (22). İR ile lökositlerin vasküler endotele adezyonu vasküler permeabilite artışına ve tromboz oluşumuna neden olur. Nötrofillerin aktive olmadan önce endotelial hücrelere yapışması (adezyon) gerekmektedir. Adezyon vasküler endotel hasarında

önemli bir basamaktır. Nötrofiller ile endotelial hücrelerin etkileşmesi hem nötrofil membranında hem de endotelial hücre membranı üzerindeki adezyon molekülleri (sırasıyla integrinler ve selektinler) aracılığıyla olmaktadır. Hücre adezyon molekülleri inflamasyon ve renal allografta verilen cevap gibi İR'de de önemli bir role sahiptirler. Bunlar antijeni sunma, allografta lökositlerin ekstrasvazasyonu, ekstrasellüler matrikse lökositlerin göçü ve hedef hücre ile efektör hücre arasındaki etkileşimler gibi olaylarda önemli rol oynamaktadırlar. Bu moleküller sitokinler tarafından düzenlenmekte olup İR hasarının oluşumunda sitokinlerin de önemli rol oynadığını göstermektedir. Endotel hücrelerdeki adezyon molekülleri intrasellüler adezyon moleküllü-1 (ICAM-1) ve selektinleri (P-selektin ve E-selektin) içermektedir. İR hasarında önemli rol oynayan bu adezyon moleküllerinin bloke edilmesi hasarın azalmasına neden olur (12,23,24).

Reperfüzyon hasarında son çalışmalar özellikle aktive nötrofillerden salgılanan proteolitik enzimler olan elestaz, katepsin G ve diğer proteazlar üzerinde yoğunlaşmaktadır. Bunlar İR esnasında dokudaki parenkimal ve endotelial hücrelere zarar vermektedir (25). Proteaz inhibitörü olan aprotinin ve benzer sentetik proteaz inhibitörleri, İR'de nötrofillerden salgılanan proteolitik enzimleri inhibe ederek koruyucu etki gösterirler (26,27).

2- *Ksantin oksidaz (XO)* : İR hasar mekanizmalardan biri de ksantin oksidaza bağlı olarak serbest oksijen radikallerinin oluşmasıdır (şekil-1). Ksantin oksidaz kaynaklı serbest oksijen radikallerinin neden olduğu İR hasarı ilk defa Granger ve arkadaşları tarafından gösterilmiştir. Granger ve arkadaşları yaptıkları bir çok çalışmada süperoksit dismutaz (SOD) ve katalaz (CAT) gibi serbest oksijen radikallerini temizleyen enzimleri veya ksantin oksidaz enzim inhibitörü bir ilaç olan allopurinolü kullanarak İR hasarının azaldığını göstermişlerdir (28,29,30). İskemi süresince ATP'nin hipoksantine dönüşmesi ve oluşan ürünlerin uzaklaştırılamaması nedeniyle intrasellüler alanda hipoksantin birikimi görülür. Kalsiyumun hücre içinde akümüasyonu ve kalsiyumla aktivasyonuna bağlı olarak proteazların ksantin dehidrojenazı ksantin oksidaza (XO) dönüştürmeleri gözlenir. Reperfüzyon ile XO enzimi NAD^+ yerine oksijeni elektron alıcısı olarak kullanarak reaktif oksijen radikallerinin oluşmasına bağlı doku hasarı oluşturur (30).



Sekil (1): Ksantin oksidaz aracılığı ile oluşan serbest oksijen radikallerinin İR hasarındaki rolünün şematik olarak gösterilişi. (LH:lipid, LOOH: lipid hidroperoksit)

İR uygulanmış böbrekte epiteliyal hücrelerin postiskemik hasarından sorumlu olan serbest oksijen radikallerinin asıl kaynağının ksantin oksidaz sistemi olduğuna dair çalışmalar mevcuttur (31). Demir iyonlarının katalizörlüğü ile oluşan serbest oksijen radikalleri de ciddi hasarlanmalara neden olur (32).

3- Diğer mekanizmalar: İR hasarına nötrofiller ve ksantin oksidaz sistemi dışında, kalsiyum iyonları (33), lizozomal membranların yırtılması sonucu açığa çıkan lizozomal enzimler, araşidonik asit metabolitleri (34), nitrik oksit (35), endotelinler (36), PAF (37), kompleman aktivasyonu (38), sitokinler (20), adezyon molekülleri (12), bakteriler (4,39), katekolaminlerin oksidasyonu (40), glutamat artışı (41) gibi bir çok faktörün katkıda bulunduğu düşünülmektedir (4). İL-1'in de akut inflamatuvar cevapta önemli bir role sahip olduğu ve böbrekte İR hasarının oluşmasında da rol aldığı gösterilmiştir (42).

Vasküler endotelial hücreler de İR hasarında önemli rol oynar. İR sonucu damar tonusunun düzenlenmesinde nitrik oksit (NO) ve endotelin-1 (ET-1) birbirlerini modüle ederler. Hasarlı endotel serbest oksijen radikali üretebilir ve bir çok maddenin salıverilmesine neden olabilir. Hipoksi böbrekte de iç medüller toplayıcı kanallardan ET-1 salıverilmesini artırarak İR'yi modüle etmektedir (36,43).

Hücre membranının oksidatif stresten zarar görmesi hücre içi ve hücre dışı iyon homeostazının bozulmasına neden olur. İR ile hücre membranının hasar görmesi hücre için gerekli proteinlerin, temel koenzimlerin, RNA moleküllerinin aşırı geçirgen zardan geçerek hücre dışına çıkmasına neden olur. Hücreler, hücre içi yüksek enerjili fosfatların yapımında kullanılacak ve ATP'nin yeniden sentezi için gerekli olan metabolitlerini de kaybeder. Ca-ATPaz ve kalmodülin oksidatif strese çok duyarlıdır, oksidatif stres bu faktörlerin inhibisyonlarına neden olur. Bu nedenle İR hücre içinde yoğun kalsiyum akümülyasyonuna neden olur (33). Ayrıca intrasellüler iyonize kalsiyum artışı kalsiyuma duyarlı proteazları aktive ederek ATP depleksiyonuna neden olur. ATP depleksiyonu hücrede kromatin yoğunlaşması, DNA zincir kırılması gibi nükleer değişikliklere, dolayısıyla sitotoksik hücre hasarına ve hücre ölümüne neden olur. Trombositlerde sitozolik Ca^{+2} artışı, tromboksan A_2 (TXA₂) artışına bağlı olarak trombosit agregasyonuna neden olur (44,45). İskemik miyokardın reperfüzyonu miyokard hücrelerinde serbest oksijen radikallerinin ve Ca^{++} 'un düzeylerini artırarak apoptozise neden olmaktadır (46).

Solid organ transplantasyonlarında soğuk bir iskemiden sonra reperfüzyon gerçekleşmektedir. Organ transplantasyonunda organın vericiden alındıktan sonra kısa bir süre için uygun koşullarda muhafaza edilmesi gerekmektedir. Böbrek transplantasyonunda allopurinol, SOD gibi radikal süpürücüler, glisin (47), kalsiyum antagonistleri, plazma hacmini genişletici kolloidal solüsyonlar ve/veya elektrolit dengeyi düzenleyen solüsyonlar, veya BTO1 (48), euro-collins gibi özel hazırlanmış solüsyonlar (7), muhtemelen böbrek mikrosirkülasyonu düzenleyerek ve serbest radikallerin toksik etkilerini gidererek reperfüzyon hasarına karşı proteksiyon sağlarlar (4). Prostatiklinin deneysel karaciğer transplantasyonunda hepatositlerin glikojen içeriğini koruyarak İR hasarına karşı protektif etki gösterdiği saptanmıştır (2).

Deneyisel çalışmalar önkoşullama ile doku veya organda İR hasarına karşı koruyucu etki sağlandığını göstermektedir. Kısa sürelerle İR'ye tabi tutulmuş organ veya dokuların sonradan oluşacak İR hasarına karşı direncinin artmasına iskemik önkoşullama (preconditioning) denir. Önkoşullamanın protektif etki mekanizmaları tam olarak açıklığa kavuşmamış olmakla birlikte, önkoşullamaya maruz kalan doku veya organda metabolik ürünlerin değişmesine, yararlı mediyatörlerin sentezinin artmasına veya zararlı maddelerin birikiminin azalmasına bağlı olarak koruma sağlandığı kabul edilmektedir. Isı şoku da (heat shock) hücre veya dokuda önkoşullama oluşturup İR riski altındaki alanı küçülterek protektif etki yapar (49,50).

Apoptozis (programlanmış hücre ölümü) genetik olarak kontrol edilen ve bir çok zararlı etkene bağlı olarak gelişen ve sonuçta hücrenin ölümü ile neticelenen bir intihar mekanizmasıdır. İR ile oluşan toksik oksijen radikalleri ve Ca^{++} 'un artışı hücrelerde apoptozis ile ilgili mekanizmaların aktive olmasına yol açabilir. İR hasarı böbrek ve miyokard hücrelerinde apoptozise neden olmaktadır (TNF ile ilişkili) (46,51,52). Miyokardda İR hasarına bağlı olarak miyokard hücrelerinin kaybı meydana gelir. İR'ye bağlı miyokard infarktüsü ve kalp yetmezliğinin şekillenmesi de apoptozisi göstermektedir (53).

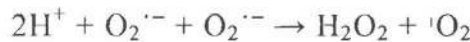
Glutamat santral sinir sisteminde (SSS) eksitatör bir nörotransmitterdir. SSS iskemisi esnasında glutamatın re-uptake'i ve depolanması bozularak sinaptik aralıktaki glutamat konsantrasyonu yüksek seviyelere çıkar. Glutamat başlıca NMDA reseptörleri üzerinden, kalsiyumla ilişkili bir şekilde nitrik oksit sentaz'ı (NOS) aktive ederek nöronal hasar oluşturur. Aşırı miktarlardaki glutamat NMDA reseptörlerinin aşırı aktivasyonuna, intraselüler kalsiyum seviyelerinin yükselmesine, dolayısıyla NOS'un aşırı şekilde aktive edilmesine neden olur. NO üretimi artar. NO artışı serbest oksijen radikallerinin de katkısıyla nöronal hasara neden olur. Adenozin SSS'de inhibitör bir nörotransmitter olarak işlev görür. Çeşitli in vivo ve in vitro çalışmalar adenozinin inhibitör etki göstererek, glutamat-NMDA reseptörlerinin aşırı aktivasyonuna bağlı nöronal hasarı azalttığını (nöroprotektif etki) göstermiştir (41).

SERBEST RADİKALLER:

1780'li yıllardan beri aşırı oksijenin doku hasarına neden olduğu bilinmektedir (54). Ancak serbest oksijen radikalleri araştırmacıların dikkatini son yıllarda çekmiştir. Canlıların büyük bir kısmı yaşamlarının devamı için moleküler oksijene gereksinim duyarlar. Moleküler oksijen canlı organizmada tek başına toksik etkili değildir. Ancak hücrede metabolize edilirken tam olmayan indirgenme sonucu toksik etkili reaktif oksijen ürünlerine dönüşebilmektedir. Oksijenin hücrede metabolize edilişi hücre içi enerji üretimini sağlar. Fakat bu süreçte oksijenin % 1-3 kadarı suya dönüşemez ve serbest radikaller oluşur (55). Öte yandan serbest oksijen radikalleri insan vücudunda çok az miktarlarda üretilip immün sistemde önemli fonksiyonlara sahiptir. Patojen mikroorganizmalar üzerine direkt etkileri ile ve proteolitik enzimleri aktive ederek indirekt etkileri ile patojenleri etkisiz hale getirmeleri organizma için yararlı etkilere de sahip olduklarını göstermektedir. Çeşitli farklı yapıdaki kimyasal maddeler de biyolojik sistemlerde oksido-redüksiyon döngüsüne girip serbest radikaller oluşturabilirler. Canlı organizmada immünolojik savunma amacıyla kullanılan serbest oksijen radikallerinin üretiminde başlangıç noktası membranda bulunan NADPH-oksidadın aktivasyonudur. Bu enzimin etkisiyle endojen kaynaklı moleküler oksijenin indirgenmesi ve süperoksit radikali (O_2^-) oluşumu görülür.



Süperoksit radikali, indirgenme reaksiyonlarına girerek başka radikallerin oluşumuna neden olur. Süperoksit radikali bir dismutasyon reaksiyonu ile hidrojen peroksit (H_2O_2) ve singlet oksijen oluşturur (56).



Süperoksit dismutaz (SOD) enzimi bu reaksiyonu katalizleyerek süperoksit radikalini ortamdan uzaklaştırmaya çalışır. Ortamda fazla miktarda hidrojen peroksit (H_2O_2) oluştuğunda, hidrojen peroksit (H_2O_2) indirgenmiş demir (Fe^{++}) ile reaksiyona

(fenton reaksiyonu) girerek güçlü toksik etkili hidroksil radikalini meydana getirir. Hidroksil radikali oldukça kararsız olup kısa yarı ömürlüdür (6-10 sn) (56).



Serbest radikaller, dış yörüngelerinde bir veya daha fazla çiftlenmemiş elektron içeren ve bu yörüngelerindeki çiftlenmemiş elektron veya elektronları çiftleştirmek için diğer moleküller ile oksido-redüksiyon tipi reaksiyonlara girme eğilimi gösteren oldukça reaktif atom veya moleküllerdir. Kimyasal olarak aktif olup oldukça kısa yarı ömürlüdürler. “Reaktif oksijen türevleri” terimi reaktif oksijen içeren tüm molekülleri kapsamaktadır (57). Süperoksit ($\text{O}_2^{\cdot -}$) ve hidroksil radikalleri ($\text{OH}^{\cdot}$) çift olmayan birer elektron içerir. Ancak hidrojen peroksit çift olmayan elektron taşımaz, radikal özelliğe sahip değildir (56), hücre membranından kolayca difüze olabilmeye yeteneğinden dolayı hasar oluşturunca potansiyeli yüksektir. Bu moleküller demir iyonunun katalizörlüğü altında fenton reaksiyonuna girerek serbest radikaller oluştururlar. Demir bağlayan proteinler ile demir şelatörlerinin İR hasarını önlenmesi demir iyonlarının bu rolünü göstermektedir (58). Bunun gibi hipokloröz asit de serbest elektronları bulunmadığı halde bazı maddelerle (süperoksit radikali ve hidrojen peroksit) girdiği reaksiyonlarda benzer şekilde davranırlar.

Serbest radikaller yada serbest oksijen radikalleri bir dizi reaksiyon sonucu doku hasarıyla karakterize hücre ölümüne neden olabilecek oldukça reaktif moleküllerdir. Organizmada radikallerin oluşturduğu hasarın etkisi, tamir mekanizmalarına rağmen, yaşam boyu devam edebilmektedir.

Serbest oksijen radikallerin üretimindeki artış ve buna ek olarak antioksidan sistemin yetersizliği oksidatif stres olarak bilinir. İR sendromu veya akut inflamasyon gibi patolojik durumlarda kısa süreli bir oksidatif stres görülür. Kronik oksidatif stres ise genellikle çevre kirleticiler, ilaçlar, sigara, ozon, radyasyon gibi serbest radikal oluşturan faktörlere uzun süre maruziyet sonucu oluşur. Bu tür bir maruziyet mutajenik ve karsinojenik değişikliklere yol açar. Serbest radikaller; kardiyovasküler hastalıklar, inflamatuvar hastalıklar, oto-immün hastalıklar, solunum sistemi hastalıkları (ARDS, KOAH, astım ve interstisyel pulmoner fibrozis), kanser, parkinson hastalığı, yaşlanma gibi bir çok hastalığın etiyopatolojisinde de yer

almaktadır (59,60). Ancak yarı ömürlerinin kısıllığı, düşük konsantrasyonları ve yüksek reaktiviteleri nedeniyle bir hastalığın etiyolojisinde serbest oksijen radikallerinin etkisini direkt olarak göstermek genellikle zordur.

Serbest oksijen radikallerinin kaynakları:

Moleküler oksijen yüksek konsantrasyonlarda bütün canlılar için toksik olup, konsantrasyonu artınca çoğu hücrede aerobik biyotransformasyon ile reaktif oksijen metabolitleri oluşturmaktadır. Bu radikaller şu şekilde oluşur:

a) Mitokondride oksidatif fosforilasyonla ATP oluşurken, moleküler oksijenin suya indirgenmesi esnasında ara ürün olarak süperoksit radikali (O_2^-), hidrojen peroksit (H_2O_2) ve hidroksil radikalleri ($OH^\cdot$) oluşur (61).

b) Özellikle iskemiye takiben ATP'nin yıkımı ile hipoksantinden ürat oluşurken ksantin oksidaz enziminin etkisiyle süperoksit radikalleri meydana gelir (şekil-1). Ksantin oksidaz, İR ve diğer doku hasarlarında anahtar rolü oynamaktadır. Bundan başka glukoz oksidaz, NADPH-oksidad, aldehit oksidaz ve flavin dehidrojenaz gibi enzim sistemlerinin de serbest radikalleri oluşturduğu bilinmektedir (30,59).

c) Oksijen radikali kaynaklarından biri de hücre membranında bulunan araşidonik asittir. Bu yolla peroksi bileşikler ve hidroksil radikalleri meydana gelmektedir (56,62).

d) Demir ile katalizlenen reaksiyonlar (fenton reaksiyonu, Haber-Weiss reaksiyonu) toksik etkili radikallerin oluşumuna neden olmaktadır (58).

e) Solunum patlaması veya oksidatif patlama (respiratory burst): Nötrofiller, monositler, makrofajlar ve eozinofiller çeşitli etkenler ile uyarıldıklarında, NADPH oksidazı aktive ederek aşırı oksijen tüketimine bağlı olarak süperoksit radikali, hidrojen peroksit, hidroksil radikali ve hipokloröz asit ($HOCl$) gibi toksik oksijen radikalleri meydana getirirler. Bu olaya solunum patlaması adı verilmektedir. İnflamasyon veya doku hasarları da oksidatif patlamaya neden olmaktadır. Nötrofil hücre membranındaki NADPH bağımlı oksidaz sistemi, süperoksit radikali oluşturan önemli bir kaynaktır. Bakteri, mitojen, opsonize partiküller, immün kompleksler, kompleman ($C5a$), araşidonik asit metabolitleri gibi etkenler bu enzimi aktive ederek serbest oksijen radikallerinin üretimini uyarırlar. Nötrofillerin primer granüllerinde

bol miktarda bulunan miyeloperoksidaz enzimi hidrojen peroksit ve klor iyonlarından hipokloröz asit oluşumunu katalizler (56,57).

f) Eksojen kaynaklar : Bir çok eksojen faktör, biyolojik sistemde serbest radikal oluşmasına neden olur. X-ışını, gama ışını gibi iyonizan radyasyona maruz kalan hücrelerde su molekülünde direkt homolitik yarıma ile hidroksil radikali ($\text{OH}^\cdot$) oluşur. İlaçların, kimyasal maddelerin ya da pestisidlerin detoksifikasyonu esnasında (sitokrom p450 mikrozomal enzim sisteminde süperoksit anyonlarının oluşumu) serbest oksijen radikalleri oluşur. Sigara dumanı, kirli hava gibi faktörler serbest oksijen radikalleri taşırlar ve oluşumuna neden olurlar (55,56,57,59).

Serbest radikallerin hedef aldığı hücresel komponentler:

Serbest radikaller saldırgan özelliğe sahip olduklarından hücre komponentlerini doğrudan oksitleme yeteneklerine sahiptirler. Serbest radikaller hücrenin her hangi bir bölümünü etkileyebilirler. Etkiledikleri yerlerde yeni serbest radikallerin ortaya çıkması ile sonuçlanan bir dizi reaksiyon zincirini uyarırlar. Ancak membran lipidleri, proteinler, DNA zinciri ve karbonhidratlar serbest radikal saldırısına en fazla uğrayan moleküllerdir. Serbest radikaller ATP sentetaz aktivitesini azaltarak ve mitokondrilerdeki oksidatif fosforilasyonu engelleyerek hücrede enerji için gerekli olan ATP seviyelerini düşürürler. Serbest radikaller proteazlar ile proteaz inhibitörleri arasındaki dengenin bozulmasına neden olarak kollajen ve proteoglikan gibi bağ dokusu elemanlarında hasara neden olabilirler (40,55,56,57,59,63).

Serbest radikallerin oluşturduğu hasarın biyokimyasal mekanizmaları:

a) *Lipid peroksidasyon* : Hücre hasarında bilinen en önemli olaylardan biri membran fosfolipidlerinin ve özellikle poliansatüre yağ asitlerinin serbest radikaller tarafından peroksidasyona uğraması ve membran bütünlüğünün bozulmasıdır. Serbest oksijen radikalleri reaktif bileşikler olduklarından karşılaştıkları ilk hücresel eleman ile reaksiyona girme eğilimi gösterirler. Genellikle bu yapı hücre membranının lipid komponentidir. Membran lipidleri ile reaksiyona giren serbest oksijen radikalleri membranın bütünlüğünü ve yapısını değiştirerek membranda geçirgenlik artışından

hücre ölümüne kadar uzanan bir dizi olaya neden olurlar (55,56,57,59,64). Hiperglisemi esnasında üretilen serbest radikaller poliansatüre yağ asitlerinin bol bulunduğu retinada hasara neden olabilmektedir (65).

Deri çok miktarda poliansature yağ asidi içermesi, sıklıkla ultraviyole ışınları ve oksijen ile temas etmesi nedeniyle serbest radikallerin kolayca toksik etki gösterebilecekleri bir organ durumundadır. Bu nedenle serbest oksijen radikalleri bazı dermatolojik hastalıkların patogenezinin direkt olarak sorumlu tutulmaktadır (66).

Lipid peroksidasyonun şiddeti; peroksidasyon sonucu oluşan malondialdehitin (MDA) miktarının saptanması ile tayin edilir.

b) Proteinlerin oksidasyonu: Serbest oksijen radikalleri özellikle yapısında kolayca okside olabilen sülfhidril grubu bulunan proteinler üzerine zararlı etki gösterirler. Bu nedenle bir çok enzim ve taşıyıcı protein üzerine zararlı etki oluşturabilirler. Ca^{++} -ATPaz ve Na^{+} - K^{+} ATPaz gibi enzimlerin inaktivasyonuna neden olarak hücre içi ve dışı iyon konsantrasyonlarının bozulmasına neden olurlar. Kreatin kinaz, laktat dehidrogenaz, pürivat kinaz, alkol dehidrogenaz, glutamin sentetaz gibi enzimlere etki ederek aktivite kaybına ve metabolik bozukluklara neden olurlar. Serbest radikaller direkt saldırı ile lizozomal proteazların serbestleşmesine ve matriks proteinlerinin parçalanmasına yol açarak, kronik inflamasyona neden olurlar (55,56,57,59,64).

c) DNA oksidasyonu: Özellikle hidroksil radikali ($OH^{\cdot}$) başta olmak üzere serbest radikaller nükleik asit bazlarının modifikasyonuna ve DNA zincirinin kırılmasına neden olarak hücre ölümüne kadar giden (kanser, hücre yaşlanması) bir dizi olayları başlatabilirler (59).

d) Karbonhidrat oksidasyonu: Diyabet, romatizmal hastalıklar, kanser ve sigara içimi ile birlikte olan kronik hastalıkların patogenezinde monosakkaritlerin oksidasyonu ile meydana gelen oksialdehitlerin rol oynadığı düşünülmektedir. Serbest radikallerin proteinlerin çapraz bağlanmasına neden olarak diyabetik katarakt gelişmesine yol açtığı gösterilmiştir (64,65)

Serbest radikallerin temizlenmesi:

Organizma serbest oksijen radikallerini ve benzeri maddeleri temizleme yani metabolize etme yeteneğine sahiptir. Bunu endojen ve eksojen savunma sistemleri aracılığıyla yapabilmektedir:

Endojen savunma mekanizmaları:

Normalde hücre serbest radikal üretimini en az seviyede tutmaya çalışır. Örneğin demir iyonlarının serbest radikallerle reaksiyona girmesine izin verilmez. Demir iyonlarının çoğu ferritin veya transferrin gibi proteinler ile bağlandığı için inaktif bir şekilde bulunur. Endojen savunma sistemleri enzimatik ve enzimatik olmayan (non-enzimatik) savunma sistemleri olarak iki kısımda incelenmektedir (55,56,57).

a) Enzimatik savunma sistemleri :

- 1) Mitokondriyal sitokrom oksidaz sistemi, hücrede kullanılan oksijenin çoğunu tüketerek moleküller oksijen sisteminin %95-99'unu herhangi bir toksik oksijen radikalinin oluşumundan korumaktadır.
- 2) Süperoksit dismutaz (SOD), mitokondri ve sitoplazmada bulunan, süperoksit radikalinin hidrojen peroksit ve moleküller oksijene dismutasyonunu katalizleyerek hücreyi koruyan bir metalloprotein enzimdir.
- 3) Katalaz (CAT), hidrojen peroksitin su ve oksijene yıkılmasını sağlayarak toksik hidroksil radikalinin oluşumunu engelleyen lizozomal bir kan proteindir.
- 4) Glutasyon peroksidaz (GSH-Px), sitoplazmada bulunan ve hidrojen peroksidin su ve glutasyon okside dönüşümünü katalizleyen bir enzimdir.

b) Enzimatik olmayan (non enzimatik) savunma sistemi :

Alfa-tokoferol (Vit E), β -karoten, askorbik asit (VitC), ürat, sistein, serüloplazmin, transferrin, albümin gibi.

Eksojen savunma mekanizmaları

Eksojen olarak kullanılan antioksidan maddeler serbest radikallerin salınımını engelleyerek, oluşmuş radikalleri temizleyerek veya endojen antioksidan savunmayı güçlendirerek etki ederler. Bu amaçla pek çok madde kullanılmakta olup yeni

maddeler üzerinde de bir çok deneysel çalışmalar yapılmaktadır. Allopurinol, adenozin, kalsiyum kanal blokörleri, non steroid antiinflamatuar ilaçlar (nimesulid gibi), N-asetil sistein, mannitol, DMTU gibi bir çok madde eksojen antioksidandır (56,64).

Ayrıca bakır, çinko, magnezyum ve selenyum gibi elementler serbest radikallerin oluşturduğu doku hasarına karşı koruyucu enzimlerin yapılarında görev almaktadırlar (59).

Ağrı ve ödem oluşumunda prostaglandinler ve diğer mediyatörler gibi serbest oksijen radikalleri de önemli rol oynamaktadır. Son zamanlarda inflamatuvar hastalıklarda serbest oksijen radikallerin önemli bir role sahip oldukları anlaşılmıştır (64). İnflamasyon oluşurken hücre zarındaki fosfolipidlerden prostaglandinlerin ve lökotrienlerin sentezi sırasında serbest oksijen radikalleri de meydana gelmektedir. İnflamatuvar bir hastalık olan romatoid artrit etiyopatolojisinde serbest radikallere bağlı lipid peroksidasyon sonucu oluşan bir hasar bulunduğunu gösteren çalışmalar mevcuttur (67). Günümüzde inflamatuvar hastalıkların tedavisinde serbest oksijen radikallerinin oluşumunun önlenmesi ve antiinflamatuar ilaçlarla tedavi önemli bir yaklaşım oluşturmaktadır.

ÇALIŞMAMIZDA KULLANILAN MADDELER HAKKINDA GENEL BİLGİLER

L-arginin: L-arginin vücutta nitrik oksit sentaz enzimi tarafından nitrik okside dönüştürülen bir nitrik oksit (NO) prekürsörüdür.

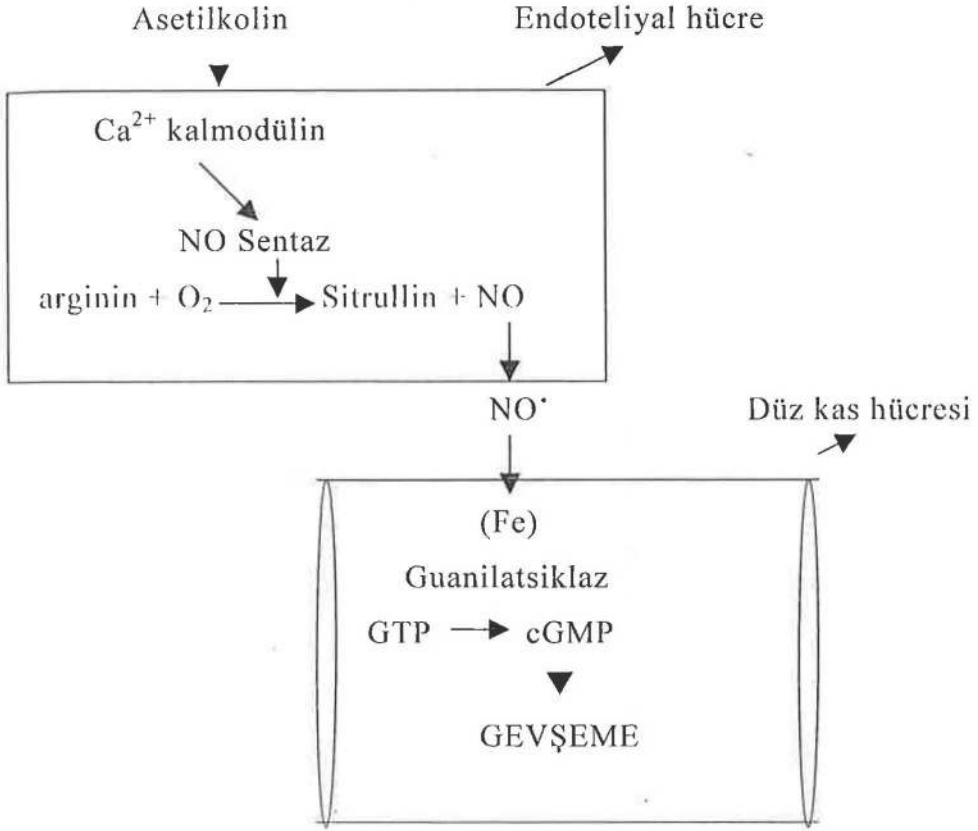
EDRF (endotel kaynaklı gevşetici faktör) olarak adlandırılan nitrik oksidin biyolojik fonksiyonu, ilk olarak 1980'de Furchgot ve Zawadzki adlı araştırmacılar tarafından tavşan aortasında gösterilmiştir (68). Daha sonra insan ve deney hayvanlarında gerçekleştirilen bir çok çalışmada, çeşitli uyaranlarla endoteli intakt damarlarda vazodilatasyonun olduğu ancak endoteli sıyrılmış damarlarda vazodilatasyonun oluşmadığı saptanmıştır. Daha sonra damar endotelinden salınan bu madde veya maddelerden birinin NO olabileceği tespit edilmiştir. EDRF'nin kimyasal yapısının nitrik oksit (NO) yada ona çok benzeyen bir madde olduğunu gösteren bir çok deneysel kanıt vardır. Nitrik oksit sadece endotel hücrelerinde değil aynı zamanda beyindeki nöronlarda, nötrofillerde, böbrek tübülus epitel hücrelerinde,

adrenal medulla hücrelerinde, mast hücrelerinde ve non-adrenerjik non-kolinerjik (NANK) otonomik sinirlerin uçlarında sentez edilmektedirler (69,70,71).

Nitrik oksit, bir atom azot ve bir atom oksijenden oluşmuş küçük bir moleküldür. Nitrik oksit kimyasal yapısında çiftlenmemiş bir elektronu olan yüksüz ve son derece lipofil bir moleküldür. Bu özellikleri nitrik oksidin hücre membranını kolayca aşmasına neden olur. Çiftlenmemiş elektron taşıması nedeniyle reaktif bir radikal özelliğine sahip olan bu bileşiğin yarılanma ömrü 2-30 sn arası değişmektedir (69,71).

Asetilkolin, histamin, serotonin, vazopressin, bradikinin, prostasiklin, VIP, P maddesi, kalsitonin geni ile ilişkili peptid, insülin, klonidin ve katekolaminler gibi kimyasal etkenler NO salınımına neden olmaktadır (70). İlaç olarak kullanılan nitrogliserin, sodyum nitroprussiyat ve diğer nitratlar vücutta kendi moleküllerinden NO salıverirler (72).

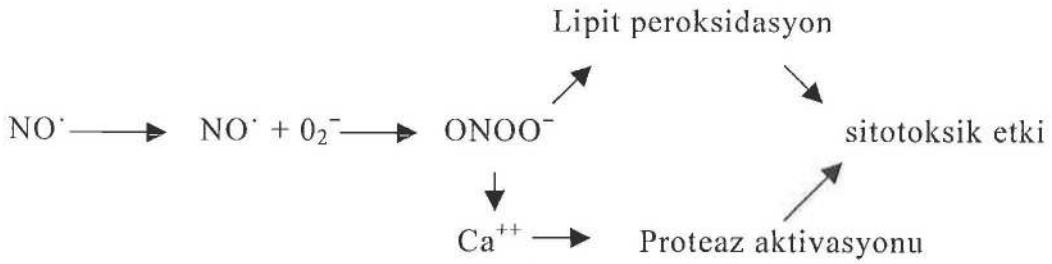
Nitrik oksidin sentez edilmesi ve etki mekanizması şekil (2)'de görülmektedir (69). Nitrik oksit, sitozolik bir enzim olan nitrik oksit sentaz (NOS) aracılığıyla L-arginin ve oksijenin reaksiyonu sonucu sentezlenir (73). Bu reaksiyon sonunda nitrik oksit ve sitrullin oluşmaktadır. Nitrik oksit lipofilik bir madde olduğundan düz kas hücresine kolayca girer ve hücrede sitozolik guanilat siklazı hem demirine bağlanarak aktive eder. Aktive guanilat siklaz, guanozin trifosfattan (GTP) siklik guanozin monofosfat (cGMP) oluşumunu artırarak düz kasta gevşemeye neden olur. Nörotransmitterler ve hormonlar gibi bir çok endojen faktör etkilerini membrandaki spesifik reseptörleri aracılığı ile gösterdiği halde, nitrik oksit hedef hücre içine difüze olarak spesifik bazı moleküller ile etkileşir ve kendine özgü etkilerini oluşturur. Nitrik oksit hücre içinde hem grubu veya demir-sülfür kompleksi içeren proteinlere afinite gösterir. Bu proteinler atipik bir nörotransmitter olan NO için atipik birer reseptör olarak kabul edilir. Nitrik oksit venlere nazaran arterlerde daha yüksek oranlarda üretilmektedir (69,70,71).



Sekil (2): Asetilkolinin etkisiyle salıverilen endotel kaynaklı NO'nun vasküler düz kasta oluşturduğu gevşeme yanıtı.

Nitrik oksit sentaz (NOS) bir flavoproteindir. NADPH ve O_2 'ye bağımlı oksijenasyonu katalize eder. Bu enzimin kofaktörleri FAD, FMN, NADPH, tetrahidrobiopterin, hem ve kalmodülindir. NOS'un bir çok izoformları izole edilmiş olup genel olarak iki kategoriye ayrılmışlardır. Bunlardan endotelde bulunan eNOS ve beyinde bulunan bNOS, kalsiyum ve kalmodüline bağımlı yapısal (constitutive) cNOS izoformlarıdır. cNOS intraselüler kalsiyum seviyelerindeki artışla aktive olur. Makrofajlarda ve hepatositlerde bulunan, sitokinler ve endotoksinler tarafından uyarılan NOS indüklenebilir (inducible) iNOS izoformudur. iNOS kalsiyum ve kalmodüline bağımlı değildir. Endoteldeki cNOS ile oluşan NO çabuk ve oldukça düşük düzeyde salıverilir (69). Oysaki iNOS tarafından oluşturulan nitrik oksit (NO) oldukça yüksek miktarlarda ve yavaş salıverilmektedir (74). iNOS ekspresyonu

endotoksin (LPS), TNF- α , İL-1 β ve interferon- δ gibi uyaranlar tarafından aktive edilir. Glukokortikoidler, TGF- β , İL-4 ve İL-10 tarafından ise inhibe edilir. Yüksek miktarlarda oluşan nitrik oksit (NO) süperoksit radikalleri ($O_2^{\cdot-}$) ile birleşerek peroksinitrit oluşumuna neden olur. Bu dönüşüm özellikle makrofajlarda, PMNL, mezengiyal hücreler ve endotel hücrelerinde görülür. Oluşan bu toksik radikal hem enfeksiyon etkenini hem de normal vücut hücrelerinde ATP oluşumu ve DNA sentezi gibi fonksiyonları inhibe ederek non-spesifik toksik etki gösterir (şekil-3). Hedef hücrede oluşan toksik etkiler tamamen aydınlatılamamış olup toksisiteyle sonuçlanan bir çok yolağın bulunduğu varsayılmaktadır. Nitrik oksit (NO) bu toksik etkisi ile virüsler, bakteriler, mantarlar, tümör hücreleri ve mikroorganizmaların gelişmesini engelleyerek etkisini gösterir. Nitekim çeşitli enfeksiyonlarda nitrik oksit metabolitleri olan nitrit ve nitratların idrardaki itrahının artmış olduğu gözlenir. Bu nedenle NO üretimi kontrol altında olmalıdır. Zira fazla miktarlardaki üretiminin konakçıya zarar vereceği, düşük düzeylerinin ise immün sistem yetersizliğine yol açabileceğine dair görüşler vardır (69,70,71).



Şekil (3): NO'nun süperoksit anyonu ile etkileşerek peroksinitrit aracılığı ile sitotoksik etki oluşturmaları.

Ciddi bakteriyel enfeksiyonlarda bakteri duvarından salınan lipopolisakkaritler makrofajlar, hepatositler ve endotel hücreleri gibi bir çok hücrede NO üretiminde artışa neden olarak arteriyel düz kaslarda dilatasyon ve hipotansiyona bağlı olarak septik şoka neden olabilmektedir (72,73).

İnflamasyonda TNF, İL-1 gibi sitokinlerdeki artışa paralel olarak NO ve serbest radikallerin üretiminde de artış meydana gelir (75).

Nitrik oksit kardiyovasküler sistemde önemli bir role sahiptir. Vasküler endotel normal koşullarda sürekli olarak düşük miktarlarda NO salıverir. NO vasküler düz

kas üzerindeki direkt etkisi ile vazodilatasyon yapar ve vasküler rezistansı düşürerek etkisini gösterir. NO fizyolojik olarak beyin, kalp, akciğer, GİS ve böbrek gibi dokularda kan dolaşımını düzenler. Plazma yarılama ömrü çok düşük olduğundan, yeterince üretilmediğinde damarlarda kontraksiyona eğilim artar. NO eksikliğinin deney hayvanlarında hipertansiyon, ateroskleroz ve diyabet gibi hastalıkların patojenezine katkıda bulunduğunu gösteren kanıtlar vardır. NO fibroblastlar ve hücre kültürü ortamındaki vasküler düz kas hücrelerinde mitozu inhibe ederek antiproliferatif etki gösterir (69,70,71).

İnsanlarda normal koroner damar yatağına uygulanan asetilkolin vazodilatasyon oluşturduğu halde aterosklerotik damar yatağında vazokonstriksiyon oluşturur. Bu durum aterosklerotik damarda endotel disfonksiyonunun geliştiğini gösterir. Esansiyel hipertansiyonlu hastalarda endotel normal olmadığından asetilkolinin vazodilatör etkisi görülmez. Buna karşın intravenöz sodyum nitroprussiyat enjeksiyonu, nitrik oksit aracılığı ile, hem sağlıklı hem de hipertansif kişilerde eşit bir vazodilatasyona neden olur. Bu durum hipertansiyonlu şahıslarda vasküler düz kasın normal olduğunu göstermektedir (76).

İR hasar mekanizmasında da NO önemli rol oynamaktadır. İR hasarı dahil bir çok hastalıkta NO'nun aşırı üretimi sitotoksik metabolitlerin oluşumu ile hücre hasarına neden olmaktadır (77). İR'ye maruz kalan dokuda vasküler NO düzeyinin artışı vazodilatasyona neden olur. NO trombosit veya nötrofil adezyonunu önleyerek, vazodilatasyon yaparak reperfüzyonu sağlamaya çalışır (78,79). Ancak aşırı miktarlardaki NO süperoksit radikali ile reaksiyona girerek peroksinitrit aracılığı ile toksik etkiler de yapabilmektedir. Peroksinitrit hidroksil ve nitrojen dioksit radikallerine dönüşerek sitotoksik etkisini gerçekleştirir. Reperfüzyon esnasında oluşan serbest oksijen radikalleri ve NO reaktif özelliklere sahip olduklarından reperfüzyon hasarına neden olmaktadır (80,81).

Bazı araştırmacılar İR'de NO seviyelerinin arttığını bildirdiği halde, bazıları NO seviyelerinin düştüğünü bildirmişlerdir (69). NO üretimindeki azalma nötrofillerin iskemik alana adezyonunu ve göçünü provoke ederek reperfüzyon hasarını artırmaktadır. NOS inhibisyonu ile NO üretimindeki azalmanın doku perfüzyonunu azaltarak İR hasarını şiddetlendirdiği belirtilmiştir (82). Buna karşın NO üretiminde aşırı bir artış oluştuğunda, oluşan NO süperoksit radikali ile reaksiyona girer. Bu

reaksiyon sonucunda peroksinitrit anyonu oluşur. Peroksinitrit oluşumuna neden olduğu radikaller aracılığı ile İR hasarında önemli bir rol oynar (77).

Bir çok çalışmada NO donörlerinin İR fenomeninde mikrosirkülasyonu koruduğu gösterilmiştir (83,84). NO normal böbrekte glomerüller ve diğer bazı hücrelerde üretilip renal hemodinamiği ve tübüler fonksiyonları düzenleyici özelliğe sahiptir. Mevcut çalışmalar NO'nun bazal seviyelerde böbrek fonksiyonlarını koruduğunu ve normal böbreklerde NO'nun indüklenmesi ile renal kan akımı, glomeruler filtrasyon ve idrar akışının arttığını göstermektedir. Ayrıca İR'ye maruz kalan böbrekte, L-arginin ön tedavisinin İR hasarına karşı koruyucu etkilerinin bulunduğu belirtilmiştir (85,86,87,88).

Yüksek konsantrasyonlardaki nitrik oksit, süperoksit radikali varlığında peroksinitrit oluşumunda artışa neden olarak sitotoksik etki oluştururken, fizyolojik konsantrasyonların altındaki NO ise doku perfüzyonunda azalmaya neden olmaktadır. Bu nedenle NO'nun İR hasarındaki rolünün karmaşık olduğu anlaşılmaktadır.

Vasküler sistemde NO salınımı kan basıncının düzenlenmesine katkıda bulunur. Deney hayvanlarında yapılan çalışmalarda bir NOS inhibitörü olan L-NMMA NO'nun sentezini inhibe ederek kan basıncının yükselmesine neden olmuş, bu olay L-arginin verilerek tersine çevrilmiştir. Ayrıca insanlarda L-argininin intravenöz infüzyonunun hipotansiyon yaptığı bulunmuştur (69).

NO pıhtılaşma elemanları üzerine direk etki yaparak pıhtılaşmayı azaltırlar. NO trombositlerin agregasyon ve adezyonunu inhibe eder (78). Vasküler kan akımındaki sürtünme stresinin (shear stress) artması ve kan basıncının yükselmesi endotelden hem NO hem de prostasiklin salıverilmesine neden olur. Bu iki madde sinerjik bir etkileşme göstererek trombüs oluşumunu engeller. Prostrasiklin ve NO eşik altı konsantrasyonlarda verildiklerinde birbirlerinin antiagregant etkilerini potansiyalize ederler (70).

L-NAME (Nω-nitro-L-arginine Metil Ester): Nitrik oksit oluşumunda etkili nitrik oksit sentaz enzimini selektif olarak inhibe eder. Nitrik oksitin organizma üzerindeki faydalı ve zararlı etkilerini tersine çevirir. Genellikle yüksek konsantrasyonlarda (milimolar) NO'nun patolojik ve fizyolojik etkilerini aydınlatmak için deneysel amaçla kullanılmaktadır. Ancak son zamanlarda yüksek konsantrasyonlardaki

L-NAME'nin serbest radikal temizleyicisi olduğunu gösteren çalışmalar yapılmıştır (89,90).

Allopurinol: Allopurinol ilk olarak antineoplastik ilaç olarak merkaptopürin kullanan hastalarda ksantin oksidaz enzimi tarafından merkaptopürinin inaktivasyonunu geciktirmek ve etkisini artırmak amacıyla kullanılmış pirazolopirimidin türevi bir ilaçtır. Hem allopurinol hem de metaboliti olan alloksantin (oksipurinol) ksantin oksidaz enzimini inhibe eden maddeleridir. Ürik asit oluşumunu son basamakta inhibe ederek gut hastalığının tedavisinde kullanılır (91). İskemi esnasında intraselüler ATP yıkıma uğrayarak sırasıyla; AMP, adenosin, inozin ve hipoksantini meydana getirir. Hipoksantin NAD'a bağımlı ksantin dehidrojenaz enzimi aracılığıyla; ksantin, NADH ve hidrojen iyonuna dönüşür. İskemi ile dokuda artan kalsiyum konsantrasyonu ksantin dehidrojenazın ksantin oksidaz formuna dönüşümünü artırır. Ksantin oksidaz ksantini ürik aside metabolize eder ve bu sırada serbest oksijen radikallerinin oluşmasına neden olur. Ksantin ve ksantin oksidaz içeriği artmış iskemik dokunun reperfüzyonu ile dokuya oksijen sunumunun artması ksantin oksidaza bağlı serbest oksijen radikallerinin oluşumunun artmasına neden olur (28,29,30,31). Allopurinol ksantin oksidazı inhibe ederek İR'de ksantin oksidaz enzimi aracılığıyla serbest oksijen radikallerinin oluşmasını engeller. Dolayısıyla böbrek ve diğer dokulardaki İR'ye bağlı kapiller permeabilite artışı ve doku hasarı gibi patolojik olayların gelişmesini önler (92,93,94,95).

Diltiazem: Ca^{++} kas kontraksiyonu, hormon sekresyonu, glikojen metabolizması ve hücre bölünmesi gibi bir çok fonksiyonun düzenlenmesinde önemli fizyolojik role sahip bir iyonudur. Normal fizyolojik koşullarda hücre içi kalsiyum konsantrasyonu sitozolde yaklaşık 10^{-6} - 10^{-7} mol/L olup bu konsantrasyon ekstrasellüler kalsiyum konsantrasyonunun 1/10,000'i kadardır. Bu düşük intraselüler kalsiyum seviyeleri kalsiyum transportu yapan Ca^{++}/Mg^{++} -ATPaz (membranal Ca^{++} pompası) sistemi ile sağlanmaktadır. Kalsiyum transport sistemi hücre içindeki kalsiyumu hücre dışına çıkararak hücre içinde aşırı kalsiyum birikimine bağlı olarak oluşacak toksik etkilerden hücreyi korur. Ancak membran transport sistemini bozarak membran

permeabilitesini artıran hormonlar, ilaçlar, İR gibi faktörler ekstrasellüler kalsiyumun hücre içine influksunda artışa neden olarak sitotoksite oluşturlar.

Kalsiyum iyonu esas olarak membrandaki voltaja bağımlı kalsiyum kanallarının aktivasyonu ile hücre içine pasif bir şekilde girer. İskemik hücrede oksidatif fosforilasyonun bozulmasına bağlı enerji depolarının ve ATP seviyelerinin azalması, intraselüler kalsiyum seviyelerinin artışına neden olarak hücrede fonksiyonel ve yapısal değişikliklere (nekroz) yol açar. Reperfüzyonun gerçekleşmesi ile oksijen paradoksuna neden olan serbest oksijen radikalleri de Ca^{++} artışına neden olarak iskemik zedelenmenin artmasına ve lipid peroksidasyona yol açar (96).

Klinikte antianginal, antiaritmik, periferik vazodilatör ve antihipertansif olarak kullanılan benzotiazepin türevi bir kalsiyum kanal blokörü olan diltiazem, voltaja bağımlı kalsiyum kanallarından L-tipi kanallarda kendine özgü reseptör noktalarına bağlanarak kanalın açılmasını ve Ca^{++} geçişini engeller. Ayrıca diltiazem serbest oksijen radikallerini de temizleyerek antioksidan etki oluşturur. Dolayısıyla diltiazemin serbest oksijen radikallerine ve kalsiyuma bağlı olarak gelişen İR hasarını azaltarak hücreyi koruyabileceği düşünülmektedir (97,98,99,100).

Diltiazemin miyokardiyal İR'de bozulan mekanik fonksiyonları düzelttiği ve yüksek enerjili fosfat seviyelerini koruduğu gözlenmiştir (101). Kalsiyum kanal blokörlerinin beyindeki serbest radikal hasarlarına karşı koruyucu etkileri; antioksidan aktivitelere, lipid peroksidasyonu önleme yeteneklerine ve kimyasal yapılarına bağlı olarak değiştiği iddia edilmektedir. Ancak iddia edilen çalışmalardan birinde diltiazemin beynin bazı bölgelerinden alınan mikrozomal membranlardaki serbest oksijen radikallerine bağlı lipid peroksidasyonu 500 mikromolar gibi yüksek konsantrasyonlarda dahi etkilemediğini gösteren çalışmalar da mevcuttur (102).

Kalsiyum kanal blokörleri renal koruyucu etkiye de sahiptirler. Renal vazokonstriktörlerin etkisini azaltarak böbrek hemodinamiğini koruyucu bir etki gösterirler. Ayrıca toksik oksijen metabolitlerini inhibe ederler ve intrasellüler kalsiyum seviyelerini düşürürler. Bu özellikleri nedeniyle İR ve radyokontrast maddeler, aminoglikozit antibiyotikler, siklosporin A, sisplatin gibi nefrotoksik etkili bazı ajanların etkilerine karşı koruma sağlayabilirler. Son zamanlarda yapılan çalışmalar böbrek transplantasyonundan sonra oluşacak postiskemik akut böbrek yetmezliğinde, GFR'deki azalmayı kalsiyum kanal blokörlerinin önleyici etkileri şu

şekilde açıklanmaktadır: kan basıncını düşürerek, böbrek metabolik aktivitesindeki azalmayı düzelterek, böbrek dokusunda kalsiyum birikimini azaltarak ve serbest radikal oluşumunu azaltarak (3,103). Kalsiyum kanal blokörleri iskemiye takiben oluşacak nöronal hasara karşı da koruyucu etkiye sahiptirler (104).

Kalsiyum kanal blokörleri Ca^{++} 'un etkisiyle trombositlerin aktivasyonuna ve trombositlerden TXA_2 salıverilmesine engel olup trombosit agregasyonunu önleyerek antitrombotik etki gösterebilirler. Bu özelliklerinin anti-iskemik etkilerine katkıda bulunması olasıdır (104). Dency hayvanlarında yapılan çalışmalar kalsiyum kanal blokörlerinin antiaterojenik etkilerinin de bulunduğunu göstermiştir (105).

Prednizolon: Prednizolon adrenal korteksten salgılanan kortizole yapı olarak benzeyen steroid yapılı sentetik bir kortikosteroid türevidir. Prednizolon ve benzeri kortikosteroid ilaçlar glukoz metabolizması üzerine olan karakteristik etkilerinden dolayı glukokortikoidler adını almaktadır. İnsanlarda hidrokortizon (kortizol) temel glukokortikoiddir. Bugün tıpta yaygın olarak kullanılan kortikosteroidler sentetik kaynaklı olanlardır.

Kortikosteroidler antiinflamatuvar, antialerjik ve immünosupresif etkilerinden dolayı sıklıkla kullanılmakta olup, güçlü terapötik etki ve ciddi yan tesirleri olan ilaçlardır.

Kortikosteroid hormonlar ve ilaçlar, hedef hücrelerde hücre membranını aşarak sitoplazma ve çekirdek içinde kendilerine özgü reseptör proteini ile birleşirler. Bu hormon veya ilaçların reseptörlerini aktive etmelerinden sonra gen transkripsiyonunun modülasyonuna bağlı olarak hücre düzeyinde genomik etkileri ortaya çıkar. Bu etkiler transkripsiyon ile mRNA yapılması ve onun ribozomlarda çevirisi gibi basamaklardan geçmeyi gerektirdiğinden genellikle en az birkaç saatlik, bazen 15-30 dakikalık gecikmeden sonra gözlenir.

Glukokortikoidlerin majör kullanım alanlarından biri inflamatuvar hastalıklardır. Bu ilaçlar suprafizyolojik dozlarda inflamasyon/immün cevap komponentleri üzerine etkileri ile akut inflamasyon olayını inhibe ederler. İnflamasyon olayı, hangi etkene bağlı olursa olsun, glukokortikoidler tarafından inhibe edilir (106).

İskemik dokunun perfüzyonu dokuda akut inflamatuvar reaksiyonlara benzer bir dizi kompleks vasküler ve selüler olaylara neden olur. İskemik hasarı takiben

reperfüzyonun gerçekleşmesi iskemik dokuda inflamatuvar olayların başlamasına ve doku hasarı şiddetinde artışa neden olur. İR'ye maruz kalan dokuda inflamatuvar mediyatörlerin üretiminde artış, postkapiler venüllere lökositlerin adezyonu ve migrasyonunda artış ve ekstrasvasküler kompartmana protein sızması gözlenir (107).

İskemiye maruz kalan dokuda lökotrien B₄ üretiminin artması ve C5a gibi kompleman sistemi komponentlerinin aktive olması nötrofillerin aktive olmalarına neden olmaktadır. İskemik dokunun reperfüzyonu nötrofillerin iskemik alana influksunu hızlandırarak, bu hücrelerden süperoksit ve hidrojen peroksit gibi reaktif oksijen radikallerinin ve nihayetinde hidroksil radikali ve hipokloröz asit gibi toksik ürünlerin oluşumuna neden olur (28,108,109).

Kortikosteroidler yüksek dozda verildiklerinde serbest radikal temizleyicisi olarak rol oynayabilirler, bu nedenle serbest oksijen radikallerinin oluşturduğu lipid peroksidasyonunu ve doku hasarını önleyebilirler (110).

Glukokortikoidler; kapiler dilatasyon, damar çeperine fibrin çökmesi, serodiapedez ve lokal ödem, lökositlerin inflamasyon alanına migrasyonu ve fagositik etkinliklerinin artması gibi inflamasyonun erken histolojik belirtilerini ve geç histolojik belirtilerini inhibe ederler. Glukokortikoidler suprafizyolojik dozlarda kronik inflamasyona karşı akut inflamasyona karşı gösterdiklerinden daha fazla etkinlik gösterirler.

İR hasarına bağlı olarak mikrosirkülasyonda görülen değişiklikler üzerine glukokortikoidler; lökosit akümülyasyonunu önleyerek, vasküler permeabilitedeki artışı azaltarak, sitokinler ve diğer mediyatörlerin etkilerini inhibe ederek, inflamasyonda rol oynayan enzim sistemlerini modüle ederek etki göstermektedir. Bugün geçerli olan görüşe göre glukokortikoidler sitoplazmik reseptörler aracılığı ile regülatör proteinleri şifreleyen bazı genlerin transkripsiyonunu kontrol ederek etkimektedir. Ancak etki mekanizmaları tamamen anlaşılamamıştır. Muhtemel mekanizmalar arasında nötrofil ve endotel fonksiyonunun modülasyonu, araşidonik asit ürünlerinin oluşumunun inhibisyonu, serbest radikallerin temizlenmesi ve hücre membranının stabilize edilmesine bağlı olarak biyolojik membranların lipid peroksidasyonunun azaltılması bulunmaktadır (111).

Akut iltihap oluşmasında iltihap alanında salgılanan kemotaktik faktörlerin etkisi ile nötrofil lökositlerin, monosit ve makrofajların, iltihap alanına migrasyonu

önemli rol oynar. İltihap olayı esnasında aktive edilen nötrofil lökositlerin ve diğer hücrelerin kandan dokuya geçmesi için önce postkapiler venüllerin çeperine yapışması gerekmektedir. Bunun için lökosit yüzeyindeki bağlayıcı integrin moleküllerinin ve endotel hücre yüzeyindeki endoteliyal lökosit adezyon molekülü-1 (ELAM-1) ve intraselüler adezyon molekülü-1 (ICAM-1) gibi moleküllerin up-regulation'u gereklidir. İR hasarında da bu mekanizma önemli rol oynayıp İR hasarıyla oluşan mikrovasküler disfonksiyondan lökosit-endoteliyal hücre etkileşimin sorumlu olduğuna dair bir çok kanıt mevcuttur. Glukokortikoidler bu moleküllerin modülasyonunda önemli rol oynamaktadır (12,23,24,107).

Glukokortikoidler membrana kakılmış fosfolipaz A₂ enziminin inhibisyonuna neden olarak endoteliyal hücrelerden, fibroblastlardan, makrofaj ve monositlerden araşidonik asit metabolitlerin (prostaglandinler ve lökotrienler) oluşumunu ve dolayısıyla salıverilmelerini engellerler (112). Fosfolipaz A₂'nin inhibisyonu İR'ye maruz kalan dokuya nötrofillerin infiltrasyonunun azalmasına yol açabilir. Glukokortikoidlerin bu etkileri sonucu iltihap hücrelerinin damar dışına migrasyonu engellenir, endoteliyal hücrelerde, makrofaj ve monositlerde akut faz reaktantlarının sentezi, İL-1, İL-6 ve TNF- α gibi sitokinlerin üretimi ve salıverilmesi bloke edilir. Bazofillerde histamin ve LTC₄ salıverilmesi inhibe edilir. Lenfositlerde İL-1, İL-2, İL-3, İL-6, TNF- α , GM-CSF ve gama interferon oluşumu inhibe edilir. TNF- α ve İL-1 proinflamatuvar maddelerdir. İL-1; prostaglandin ve lökotrienlerin sentezini, karaciğerde akut faz reaktantlarının sentezini, nitrik oksit (NO) sentezini, kolajenaz sentezini, fibroblast ve lenfositlerin proliferasyonunu stimule eder. Glukokortikoid ilaçlar adı geçen hücrelerde TNF- α ve İL-1 genlerinin ekspresyonunu dolayısıyla yukarıda anılan maddelerin sentezini güçlü bir şekilde inhibe ederler. TNF- α ve İL-1 gibi faktörlerin de İR hasarı oluşmasında önemli rol oynadıkları belirlenmiştir (42).

Nötrofil lökositler, eozinofil lökositler, monositler, trombositler ve diğer hücreler tarafından salıverilen ve önemli bir inflamasyon mediyatörü olan PAF'ın (trombosit aktive edici faktör) da sentezi ve salıverilmesi glukokortikoidler tarafından inhibe edilir.

Glukokortikoidler; bakteriyel endotoksinler tarafından makrofajlar ve damar düz kas hücrelerinden sitotoksik miktarda NO salıverilmesine dolayısıyla iltihap

oluşumuna neden olan iNOS'un indüklenmesini inhibe ederek aşırı miktarlarda NO salıverilmesini önlerler (113).

MATERYAL VE METOD

Çalışmamızda Dicle Üniversitesi Sağlık Bilimleri Uygulama ve Araştırma Merkezinden (DÜSAM) alınan 49 adet erişkin, erkek Sprague-Dawley rat (200-300g) kullanıldı.

Deney süresince anestezi madde olarak ketamin (ketalar®) ve ksilazin (Rompun®) kombinasyonu kullanıldı, gerektiğinde ilave dozlar ile anestezi sürdürüldü. Anestelize edilen ratların karın boşlukları longitudinal abdominal insizyon ile açılarak sağ ve sol böbreklere ulaşıldı. Sağ böbrek; iskemi-reperfüzyona maruz kalacak sol böbreğin kontrolü olarak, total nefrektomi ile alındı. Alınan böbreğin ağırlığı tartılarak -15 °C'de muhafaza edildi. Sol böbreğin arter ve veni disseke edildi. Belirgin hale getirilen sol böbrek arteri atravmatik plastik damar klemp ile oklüze edildi. Abdominal insizyon ipek iplik (2.0) ile kapatılarak, sol böbrek 1 saat süresince iskemiye maruz bırakıldı. Bir saatlik iskemi sonunda karın boşluğu tekrar açılarak sol böbrek arterini oklüze eden klemp alındı. Karın boşluğu tekrar kapatılarak iskemiye uğrayan böbrekte 4 saatlik reperfüzyon oluşturuldu. Deney süresince ratların vücut ısıları normal sınırlarda tutulmaya çalışıldı. Deney sonunda sol böbrek alındıktan sonra intrakardiyak kan alınarak ratlar sakrifiye edildi ve sol böbreklerin ağırlıkları saptandı. Deney süresince hayvan hakları ile ilgili olarak NIH tarafından belirlenen kriterlere özenle uyuldu.

Deneyde kullanılan ilaçlar:

- 1- Allopurinol* (i.v enjeksiyon, 50 mg/kg) (Sigma Chemical Co.)
- 2- L-arginine (i.v enjeksiyon, 300 mg/kg) (Sigma Chemical Co.)
- 3- N-omega-Nitro-L-Arginine Methyl Ester Hydrochloride (L-NAME)
(i.venjeksiyon, 10 mg/kg) (Sigma Chemical Co.)
- 4- Diltiazem Hydrochloride (i.v enjeksiyon, 5 mg/kg) (Sigma Chemical Co.)
- 5- Prednizolon** (i.m enjeksiyon, 5 mg/kg/gün,3 kez) (Fako)
- 6- Ketamine (i.m enjeksiyon, 90 mg/kg) (Ketalar, Parke Davis)
- 7- Xylazine (i.m enjeksiyon, 3 mg/kg) (Rompun, Bayer)

- * 100 mg Allopurinol 30 mg NaOH ile birlikte 5 ml izotonik NaCl solüsyonu içinde çözülerek gereken miktar i.v olarak uygulandı.
- ** Prednizolon %35'lik (v/v) alkolde çözülerek i.m uygulandı

Biyokimyasal ve histolojik tetkikler için her grupta değişik sayıda rat bulunan 6 grup oluşturuldu.

Gruplar:

- 1- Kontrol grubu (iskemi-reperfüzyon) (n=14)
- 2- Allopurinol + iskemi-reperfüzyon grubu (n=6)
- 3- L-arginin + iskemi-reperfüzyon grubu (n=9)
- 4- L-NAME + iskemi-reperfüzyon grubu (n=6)
- 5- Diltiazem + iskemi-reperfüzyon grubu (n=8)
- 6- Prednizolon + iskemi-reperfüzyon grubu (n=6)

İlaçlar, prednizolon grubu dışında, iskemiden 1 saat önce penil venden intravenöz olarak enjekte edildi. Prednizolon grubunda ilaç uygulamasına deneyden 2 gün önce başlandı, son enjeksiyon deney sabahı uygulandı.

Deney günü tüm gruptaki hayvanlara 1 saat iskemi + 4 saat reperfüzyon uygulandıktan sonra, histolojik incelemeler için sağ böbrek ve İR uygulanmış sol böbrek alınarak -15 °C'de muhafaza edildi. Biyokimyasal tetkikler için intrakardiyak olarak 3-5 ml kan alındı.

Biyokimyasal incelemeler için, elde edilen kan 3500 devir/dk hızında santrifüj edilerek Beckman CX-3 (Synchron Clinical system, made in USA) ile serum kreatininin (SCr) ve üre düzeyleri ölçüldü. Lipid peroksidasyon değerlendirmeleri için tüm gruptaki sağ (kontrol) ve sol (İR uygulanmış) böbrek dokularında tiyobarbitürik asit yöntemi (114) ile malondialdehid (MDA) tayini yapıldı. Bunun için 0.5 g doku örnekleri plastik tüplere kondu. Üzerine 4.5 ml %5.5'lik triklorasetik asit (Sigma Chemical Co.) ilave edilerek soğuk ortamda homojenize edildi (Ultra-Turraks T25, 20000 devir/dk). Homojenat santrifüj (Heraus Labofuge 200, 4000 devir/dk) edilerek süpernatant elde edildi. Süpernatanttan 1 ml alınarak üzerine 1 ml %0.67'lik tiyobarbitürik asit (Sigma Chemical Co.) ilave edildi. Bu karışım reaksiyon oluşması için 100 °C'de 10 dakika bekletildi. Süre sonunda karışım

soğutularak, oluşan pembe rengin absorbanısı 532 nm'de spektrofotometre (Unicam 8625 UV/VIS Spectrometer) ile okundu. Malondialdehitin molar ekstinksiyon katsayısından yararlanılarak sonuçlar nmol/g doku olarak hesaplandı.

Histolojik incelemeler için, deney sonunda elde edilen sol böbreklere ait doku örneklerinin %10'luk nötral formalin solusyonu içinde fiksasyonu sağlandı. Bilinen histolojik yöntemlerle takip edilen doku örneklerinden parafin blokları elde edildi. Parafin bloklarından Leicca kızaklı mikrotom yardımıyla 4-5 mikrometre (μm) kalınlığında parafin kesitleri elde edildi. Parafin kesitleri Hematoksilen-Eosin, Hematoksilen-Van-Giesson boyası ile boyanarak (115) ışık mikroskobu altında değerlendirildi. Böbreklerin histolojik değerlendirme skorları şu şekilde yapıldı:

Grade-1 ; Kortikal bölgedeki hücrelerde proliferasyon ve kısmi nekroz alanları, tübülus epitelinde deskuamasyon.

Grade-2 ; Glomerül etrafındaki proksimal tübüluslerde nekroz alanları, distal tübülus epitelinde deskuamasyon ve toplayıcı tübüluslerde yaygın olmayan dilatasyon.

Grade-3 ; Korteksin iç bölgesine yayılmış proksimal tübüluslerde sınırlı nekroz, bowman mesafesindeki daralmanın sınırlı olması, kısmen fokal hemoraji alanları ve toplayıcı tübüluslerde dilatasyon.

Grade-4 ; Proksimal tübüluslerde yaygın nekroz (tübülus epitel hücrelerinin silindiği), kortekste fokal hemoraji alanları, bowman mesafesinde daralma, kortekste yer alan damarlarda perivasküler lenfosit infiltrasyonu ve medullada yer alan toplayıcı tübüluslerde dilatasyon.

Her bir grupta lezyonun derecesine göre Grade 1– 4 arasında skorumlama yapıldı.

Biyokimyasal tetkikler sonucu elde edilen veriler student's t testi ve ANOVA testleri ile istatistiksel olarak değerlendirildi. $p \leq 0.05$ ise gruplar arasındaki farkın istatistiksel olarak önemli olduğuna karar verildi.

BULGULAR

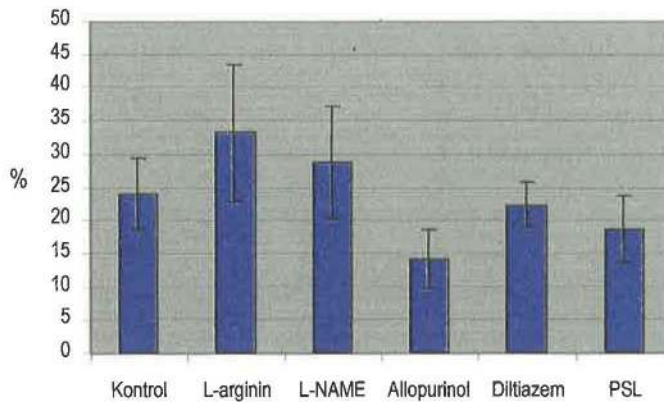
Yaş böbrek Ağırlık Artış Oranı:

İskemi ve reperfüzyon uygulanması kontrol grubunda ve farmakolojik ajan uygulanmış tüm deneysel gruplarda böbrek ağırlık artışına neden olmuştur ($p<0.05$). Ancak tek yönlü varyans analizi (ANOVA) ile test edildiğinde gruplar arasında böbrek ağırlık artış oranları açısından istatistiksel bir fark görülememiştir ($p>0.05$). Her gruptaki İR'ye uğrayan böbreklerin yaş ağırlık artış oranları tablo (A) ve grafik (1)'de gösterilmektedir.

Tablo (A): Kontrol grubu ve ilaç ön tedavisi uygulanmış gruplarda İR'ye maruz kalan böbreklerin İR uygulanmamış böbreklere göre yaş ağırlık artış oranları:

Kontrol	L-arginin	L-NAME	Allopurinol	Diltiazem	PSL*
% 24±5.4	%33.1±10.4	%28.6 ±8.6	%14±4.5	%22.3±3.5	%18.5±5.1

* prednizolon (PSL)



Grafik (1) : İR'ye maruz kalan rat böbreğinde değişik farmakolojik ajanların yaş böbrek ağırlığı artışı üzerine etkileri.

Böbrek Fonksiyon Test Sonuçları:

Ratlar için normal plazma üre seviyeleri 11-62 mg/dl (31 mg/dl) değerleri arasında olduğundan İR uygulanan tüm gruplarda plazma üre seviyeleri artış göstermiş ve gruplar arasında üre seviyeleri açısından istatistiksel olarak anlamlı farklar bulunmuştur ($p<0.05$). İlaç ön tedavisi ile üre seviyelerinin kontrole göre sonuçları tablo (B) ve grafik (2)'de gösterilmektedir. Elde edilen sonuçlar;

- a- L-arginin ön tedavisi üre seviyelerini kontrole göre düşürmemiştir ($p>0.05$).
- b- L-NAME ön tedavisi üre seviyelerini kontrole göre düşürmüştür ($p<0.05$).
- c- Allopurinol ön tedavisi üre seviyelerini kontrole göre düşürmüştür ($p<0.05$).
- d- Diltiazem ön tedavisi üre seviyelerini kontrole göre düşürmüştür ($p<0.05$).
- e- Prednizolon ön tedavisi üre seviyelerini kontrole göre düşürmemiştir ($p>0.05$).

ANOVA ile analiz edildiğinde kreatinin seviyeleri açısından gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunamamıştır ($p>0.05$). Sonuçlar tablo (C) ve grafik (3)'te gösterilmektedir.

Tablo (B): İlaç ön tedavisi uygulanmış ve uygulanmamış (kontrol) İR gruplarda üre seviyeleri (mg/dl):

Kontrol (A)	L-arginin (B)	L-NAME (C)	Allopurinol (D)	Diltiazem (E)	PSL (F)
117.5 ± 4	119.4 ± 8.2	101 ± 5	101 ± 5.6	99.8 ± 2.9	114.4 ± 4.5

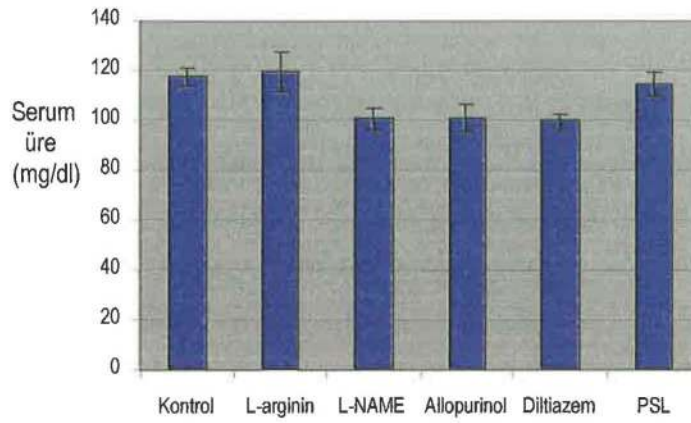
$F(5,26)=3.475$ AC,AD,AE,BC,BD,BE ($p<0.05$)

AB,AF,BF,CD,CE,CF,DE,DF,EF ($p>0.05$)

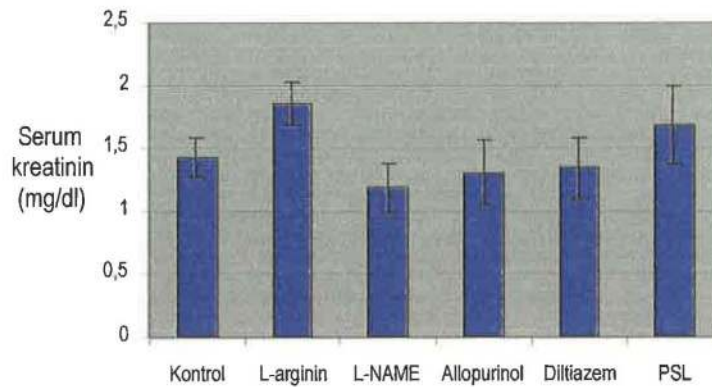
Tablo(C): ilaç ön tedavisi uygulanmış ve uygulanmamış (kontrol) İR gruplarda kreatinin seviyeleri (mg/dl):

Kontrol (A)	L-arginin (B)	L-NAME (C)	Allopurinol (D)	Diltiazem (E)	PSL (F)
1.4±0.2	1.85±0.17	1.18±0.2	1.3±0.26	1.34±0.2	1.6±0.3

F(5,29)=1.003 AB,AC,AD,AE,AF,BC,BD,BE,BF,CD,CE,CF,DE,DF,EF (p>0.05)



Grafik (2) : Renal İR uygulanan ratlarda çeşitli farmakolojik ajanların plazma üre seviyeleri üzerine etkileri.



Grafik (3) : Renal İR uygulanan ratlarda çeşitli farmakolojik ajanların plazma kreatinin seviyeleri üzerine etkileri.

Lipid Peroksidasyon Göstergesi Olarak Malondialdehit Seviyeleri :

Böbrek dokusu malondialdehit (MDA) seviyeleri İR uygulanmış ve uygulanmamış iki grup böbrek dokusunda ölçülmüştür.

- 1.Grup: İR uygulanmamış böbreklerdeki MDA seviyeleri
- 2.Grup: İR'ye maruz kalan böbreklerdeki MDA seviyeleri

1.grupta doku MDA düzeyleri arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunmuştur ($p<0.05$). Değerler tablo (D) ve grafik (4)'te gösterilmektedir. Elde edilen sonuçlar;

- a- L-arginin ön tedavisi İR uygulanmamış böbreklerde doku MDA seviyelerini kontrole göre düşürmüştür ($p<0.05$).
- b- L-NAME ön tedavisi İR uygulanmamış böbreklerde doku MDA seviyelerini kontrole göre düşürmüştür ($p<0.05$).
- c- Allopurinol ön tedavisi İR uygulanmamış böbreklerde doku MDA seviyelerini kontrole göre düşürmüştür ($p<0.05$).
- d- Diltiazem ön tedavisi İR uygulanmamış böbreklerde doku MDA seviyelerini kontrole göre düşürmemiştir ($p>0.05$).
- e- Prednizolon ön tedavisi İR uygulanmamış böbreklerde doku MDA seviyelerini kontrole göre düşürmemiştir ($p>0.05$).

2.grupta doku MDA düzeyleri arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunmuştur ($p<0.05$). Değerler tablo (D) ve grafik (4)'te gösterilmektedir. Elde edilen sonuçlar;

- a- L-arginin ön tedavisi İR'ye maruz kalan böbreklerde doku MDA seviyelerini kontrole göre düşürmüştür ($p<0.05$).
- b- L-NAME ön tedavisi İR'ye maruz kalan böbreklerde doku MDA seviyelerini kontrole göre düşürmüştür ($p<0.05$).
- c- Allopurinol ön tedavisi İR'ye maruz kalan böbreklerde doku MDA seviyelerini kontrole göre düşürmüştür ($p<0.05$).
- d- Diltiazem ön tedavisi İR'ye maruz kalan böbreklerde doku MDA seviyelerini kontrole göre düşürmüştür ($p<0.05$).

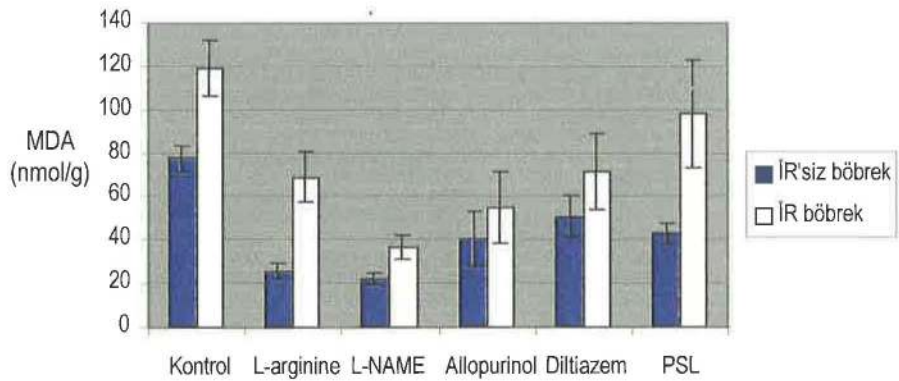
e- Prednizolon ön tedavisi İR'ye maruz kalan böbreklerde doku MDA seviyelerini kontrole göre düşürmemiştir ($p>0.05$).

Tablo (D) : Kontrol grubu ve ilaç ön tedavisi uygulandıktan sonra İR uygulanmamış böbreklerdeki (1) ve İR uygulanmış böbreklerdeki (2) doku MDA seviyeleri (nmol/g):

	Kontrol (A)	L-arginin (B)	L-NAME (C)	Allopurinol (D)	Diltiazem (E)	PSL (F)
1	77.4±5.6	25.8±3.5	22.2±2.6	40.2± 13.2	50.6± 9.8	42.6±5.4
2	119±13.2	69± 11.5	36.2 ±5.5	54.8± 16.6	71.5±17.5	97.8±25

$F(11,86)=6.612$

A1B1,A1C1,A1D1,A1A2,A1C2,A2B1,A2C1,A2D1,A2E1,A2F1,
A2B2,A2C2,A2D2,A2E2,B1B2,B1E2,B1F2,B2C1,C1E2,C1F2,C2F2,
D1F2,D2F2,E1F2,F1F2 ($p<0.05$).



Grafik (4) : Kontrol grubu ve ilaç ön tedavisi uygulandıktan sonra İR uygulanmamış (İR'siz) böbreklerdeki ve İR uygulanmış böbreklerdeki doku MDA seviyeleri.

Histoloji :

İR uygulanmış böbreklerde ışık mikroskobu altında yapılan histolojik incelemelerin sonuçları tablo (E)'de gösterilmiştir. Sonuçlar lezyonun şiddetine göre derecelendirilmiştir. Elde edilen sonuçlar İR'nin oluşturduğu böbrek hasarına karşı prednizolon (şekil-8) dışındaki ilaçların koruyucu etkilerinin olduğunu histolojik olarak göstermiştir. Kontrol grubu ve ilaç ön tedavisi uygulanıp İR'ye maruz bırakılmış böbreklere ait histolojik bulgular aşağıda (şekil 1-8) gösterilmiştir.

Tablo (E) : İR uygulanmış böbreklerde grupların histolojik olarak doku hasarının şiddetine göre değerlendirilmesi:

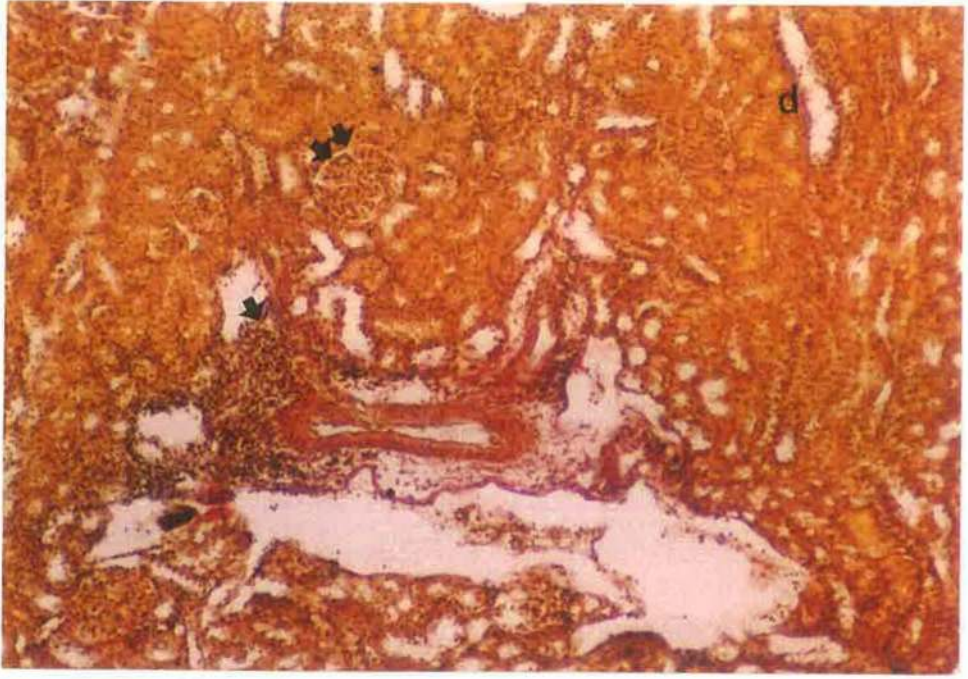
GRUPLAR	HASAR ŞİDDETİ
Kontrol	Grade 4
L-arginin	Grade 1,2
L-NAME	Grade 3
Allopurinol	Grade 2
Diltiazem	Grade 2
Prednizolon (PSL)	Grade 3,4

Grade 1: Lezyon yok (çok az)

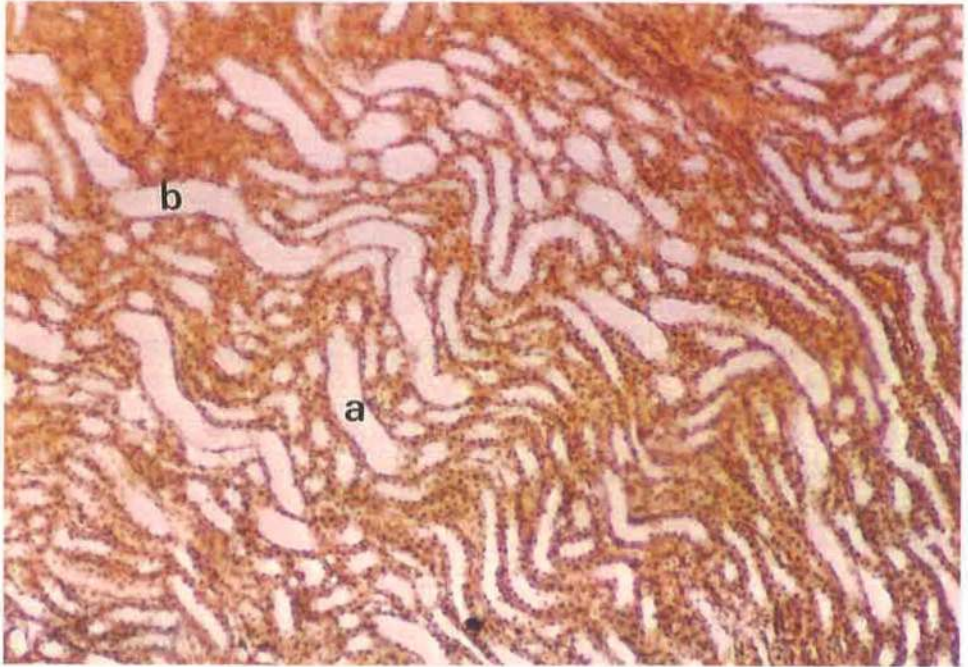
Grade 2: Az şiddetli lezyonlar

Grade 3: Orta şiddetli lezyonlar

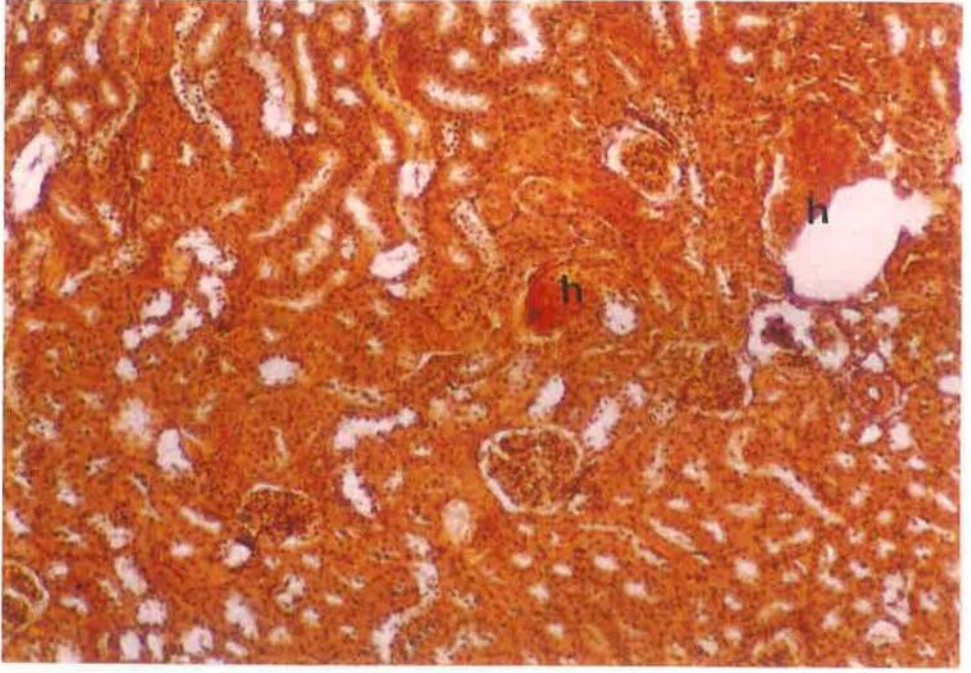
Grade 4: Çok şiddetli lezyonlar



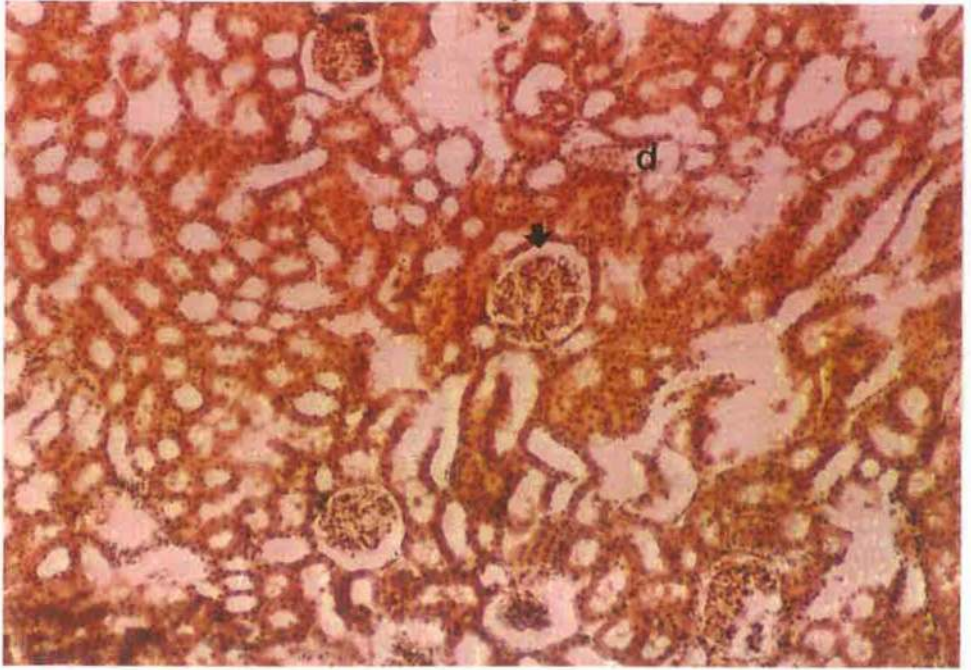
Şekil (1): Kontrol grubuna ait böbrek kesiti; kortekste yer alan damarlarda perivasküler mononükleer lenfosit infiltrasyonu (↗), bowman mesafesinde daralma (↗↗), distal tübül epitelinde deskuamasyon (d) izlenmektedir (H&V, orijinal büyütme x 41).



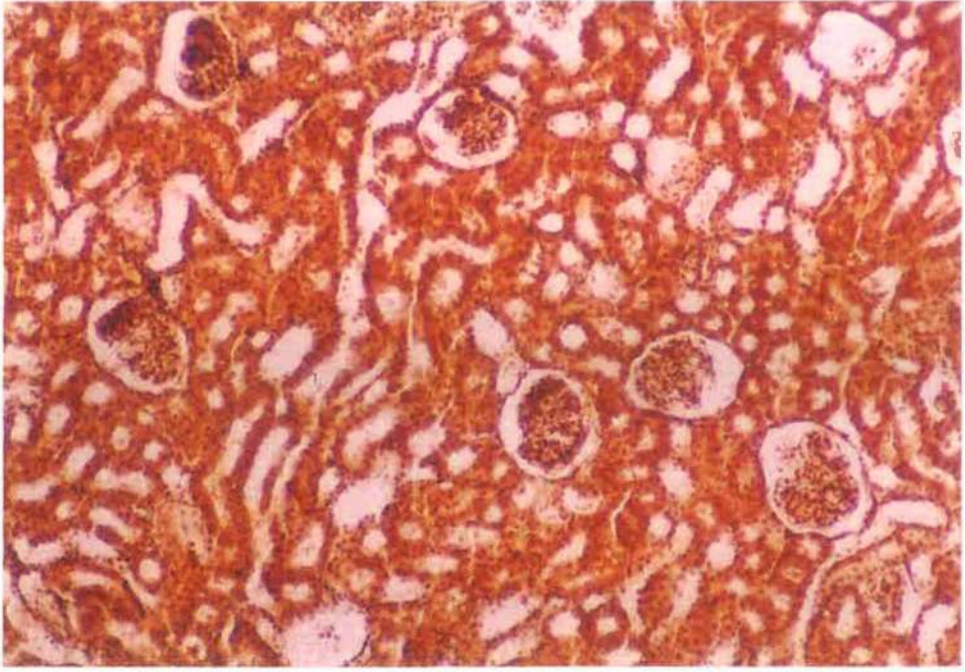
Şekil (2): Kontrol grubuna ait böbrek kesiti; medullada yer alan toplayıcı tübüllerde dilatasyon (a) ve tübül epitelinde silinme (b) izlenmektedir (H&V, orijinal büyütme x 41).



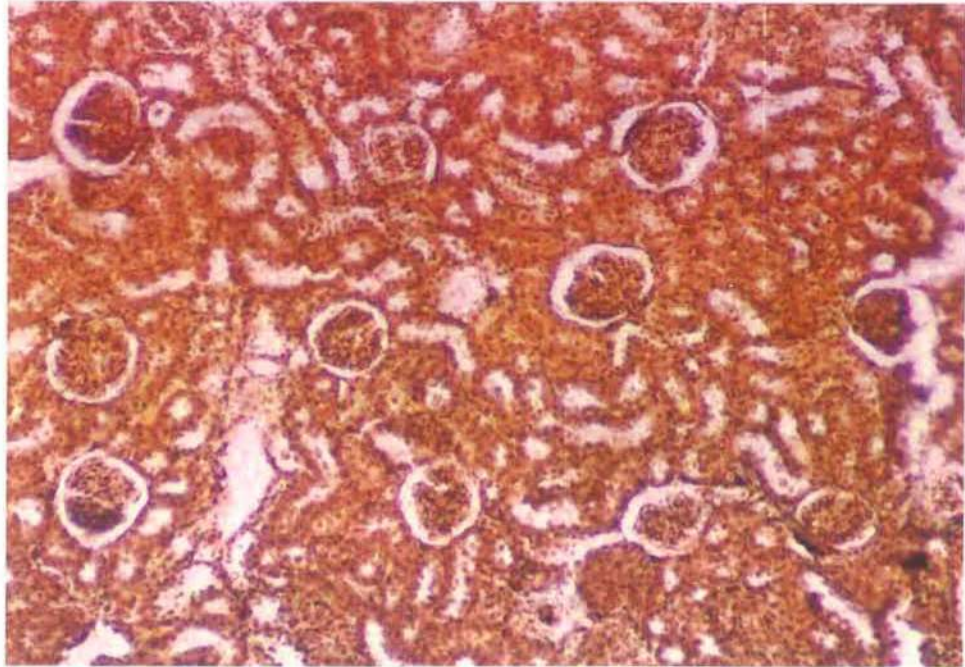
Şekil (3): Kontrol grubuna ait böbrek kesiti; kortikal bölgede hemorajik alanlar (h) izlenmektedir (H&V, orijinal büyütme x 41).



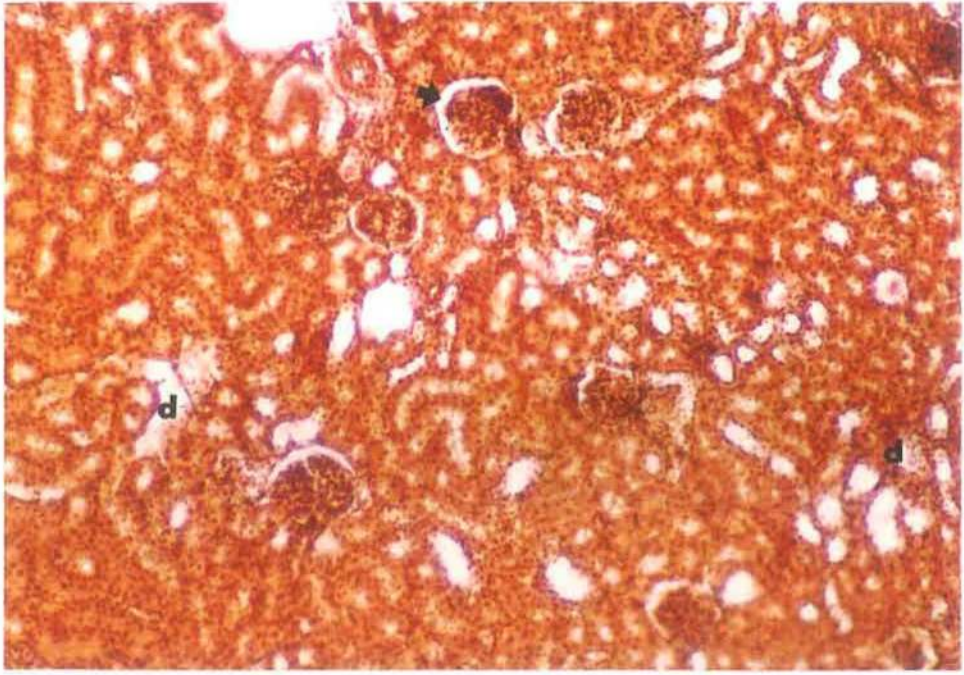
Şekil (4): Diltiazem grubuna ait böbrek kesiti; kontrol grubuna göre bowman mesafesindeki daralmanın azaldığı (↗) ve bazı bölgelerdeki distal tübül epitelinde deskuamasyonun (d) devam ettiği izlenmektedir (H&V, orijinal büyütme x 41).



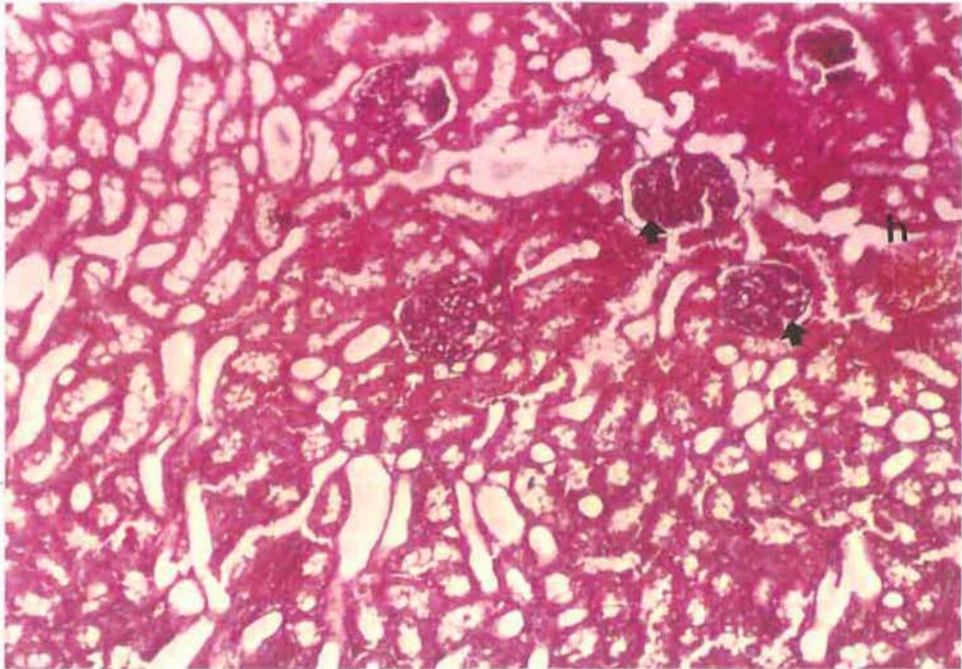
Şekil (5): L-arginin grubuna ait böbrek kesiti; kontrol grubuna oranla korteksteki lezyonların şiddetinde azalma izlenmektedir (H&V, orijinal büyütme x 41).



Şekil (6): L-NAME grubuna ait böbrek kesiti; kontrol grubuna göre korteksteki lezyonların orta şiddetli olduğu izlenmektedir (H&V, orijinal büyütme x 41).



Şekil (7): Allopurinol grubuna ait böbrek kesiti; kontrol grubuna göre lezyonların şiddetinin azaldığı, bowman mesafesindeki daralmanın (↗) normal görünümde olduğu ve tübül epitelindeki deskuamasyonun (d) azaldığı izlenmektedir (H&V, orijinal büyütme x 41).



Şekil (8): Prednizolon grubuna ait böbrek kesiti; kortikal bölgedeki fokal hemorajik alanların (h) azaldığı, bowman mesafesindeki daralmanın (↗) kısmen azaldığı izlenmektedir (H&E, orijinal büyütme x 41).

TARTIŞMA

Biz bu çalışmamızda renal arterin klemplenmesine bağlı 1 saat sıcak renal iskemi ve 4 saat reperfüzyon uygulanan rat böbrek dokusunun ve kan örneklerinin biyokimyasal ve histolojik olarak tetkik edilmesi sonucu böbrekte ciddi hasarlanmanın oluştuğunu saptadık. Bir çok deneysel ve klinik çalışmalarda kalp (46), karaciğer (116), beyin (62), barsak (29), iskelet kası (9), böbrek (3), mide (117) gibi organlarda iskemi-reperfüzyon (İR) ile ciddi hasarlanmanın olduğu gözlenmiştir.

İskemiye maruz kalan doku veya hücrede ciddi hasarlanmalar oluşur. Ancak iskemiye maruz kalan doku ya da hücrede hasarlanmanın şiddeti süreyle ilişkili olarak geri dönüşümlü veya geri dönüşümsüz olarak değişmektedir. İskemiye takiben doku veya hücrenin gerekli besin ve oksijeni almasıyla başlayan reperfüzyon, iskeminin meydana getirdiği hasarı telafi etmeye çalışır. Ancak iskemiye takiben reperfüzyon ciddi hasarlanmalara neden olabilir (Reperfüzyon hasarı) (4). Deneysel ve klinik çalışmalar iskemiye takiben gerçekleşen reperfüzyonun iskemik hasardan daha ciddi hasarlanmalara neden olduğunu göstermektedir. Parks ve Granger yaptıkları bir çalışmada, 3 saatlik bir iskemiye takiben gerçekleştirilen 1 saatlik reperfüzyonun, reperfüzyon gerçekleştirilmeksizin yapılan 4 saatlik iskemiden daha şiddetli hasar oluşturduğunu gözlemlemişler (118).

Bir çok deneysel çalışma İR'ye maruz kalan böbrekte ciddi bir hasarlanmanın oluştuğunu desteklemektedir (3,12,14,119). Kısa yada uzun sürede oluşturulan iskemik hasar böbrek fonksiyonlarında düzensizliklere ve tahribata neden olur. Ancak oluşan bu hasarın büyüklüğü ve geri dönüşebilirliği iskeminin süresine bağlı olarak değişmektedir (119).

İR hasarının oluşumunu açıklayan kesin bir mekanizma yoktur. Ancak hasarı açıklamaya yönelik bir çok mekanizma mevcuttur. Bunlardan; ksantin oksidaz enzim sistemi (28,29,30,31), nötrofil aktivasyonu ve akümülyasyonu ve bunlara bağlı olarak üretilen toksik metabolitler (12,13,14,16,17,18), kalsiyum iyonunun iskemik alanda akümülyasyonu (33,46) en önemli hasarlanma mekanizmalardır. İR ile oluşan hasarın büyük bir kısmından serbest oksijen radikalleri sorumlu tutulmaktadır.

İR'ye maruz kalan böbrekte oluşan hasar; glomerüler filtrasyon oranının (GFR) azalması, renal kan akımının (RBF) azalması ve tübüler fonksiyonlarda bozulma gibi

değişiklikler ile karakterizedir (120,121). GFR'nin ve tübüler fonksiyonun bozulması üre ve kreatinin böbrekten atılımının azalmasına ve bu ürünlerin kandaki düzeylerinin artmasına neden olur. Mevcut çalışmalar renal İR'ye maruz kalan ratlarda böbrek dokusundaki hasara bağlı olarak serum kreatinin ve üre gibi böbrek fonksiyonu ile ilgili test parametrelerinde artışların oluştuğunu göstermektedir (35,122).

Bir çok böbrek hastalığı glomerüler, tübüler, interstisyel ve/veya vasküler alanda hasara neden olarak plazmada üre ve kreatinin konsantrasyonunu artırmaktadır. Ancak bazen böbreklerde hasar oluşmadan da plazma üre konsantrasyonunda artışlar görülebilmektedir. Hafif dehidratasyon, yüksek proteinli diyet, protein katabolizmasında artış, şok, açlık, kan kaybı, GIS kanaması, kortizol veya sentetik analogları ile tedavi ve azalan böbrek perfüzyonu gibi etkenler plazmada üre artışına neden olur. Bu olaylara prerenal azotemi adı verilmektedir. Kreatinin seviyeleri yükselmeksizin üre seviyelerinde yükselme oluşması prerenal azotemiye tanımlama açısından önemlidir (123).

Bu çalışmada 1 saatlik iskemiye takiben 4 saatlik reperfüzyonun, plazma üre seviyesinde ciddi bir artışa neden olduğunu ancak serum kreatinin seviyesinde önemli bir artış oluşturmadığını saptadık.

Mevcut deneysel çalışmalar İR'ye bağlı olarak meydana gelen serbest radikallerin, hücre membranında lipid peroksidasyona yol açarak malondialdehit seviyelerinde ciddi artışlara yol açtığını göstermektedir (35,119). Biz de bu çalışmamızda renal İR'ye maruz kalan kontrol ve ilaç ön uygulaması yapılmış rat gruplarında, böbrek dokusu malondialdehit düzeylerinde artış oluştuğunu saptadık. Histolojik tetkik sonucu İR'ye maruz kalan böbrek dokusunda ciddi patolojik bulgular tespit ettik. Elde edilen böbrek kesitlerinde, kortekste yer alan damarlarda perivasküler mononükleer lenfosit infiltrasyonu, bowman mesafesinde daralma, distal tübül epitelinde deskuamasyon, medullada yer alan toplayıcı tübüllerde dilatasyon, tübül epitelinde silinme ve kortikal bölgede hemorajik alanlar oluştuğunu gözledik (şekil 1-3).

Deneysel veriler eksojen olarak kullanılan bazı maddelerin böbrekte İR hasar oluşumunu azalttığını göstermektedir. Biz de bu çalışmamızda İR uygulanmış böbrekte oluşan toksik metabolitlerin etkilerini gidermek amacıyla nitrik oksit

donörü (L-arginin), antagonisti (L-NAME), ksantin oksidaz inhibitörü (allopurinol), kalsiyum kanal blokörü (diltiazem) ve glukokortikoid grubu bir ajan (prednizolon) kullanarak İR hasar mekanizmasını ve kullanılan ilaçların protektif etkilerinin bulunup bulunmadığını anlamayı amaçladık. Bu amaçla renal İ/R modelinde kullandığımız aşağıda belirtilen maddelerin saptadığımız etkileri sırasıyla şöyledir:

L-arginin, L-NAME: İR uygulanmış grupta İR ile artış gösteren serum üre düzeyini L-argininin değiştirmedir. Amino asitler serum üre düzeyini artırabilen maddelerdir. L-arginin de bir amino asit olduğundan serum üre seviyelerini artırabilir. Bu etki L-arginin uygulanmış grupta serum üre seviyelerinin yüksek olmasına katkıda bulunmuş ve L-argininin böbrek fonksiyonları üzerindeki olası bir yararlı etkisini örtmüş olabilir. L-NAME İR ile artan serum üre düzeylerini azaltırken L-argininin ve L-NAME'in serum kreatinin düzeylerinde ise bir değişiklik oluşturmadığını saptadık. İR uygulanmış ve uygulanmamış böbrek dokusunda lipid peroksidasyonun bir göstergesi olan MDA düzeylerinin hem L-argininin hem de L-NAME tarafından azaltıldığını saptadık. Bu sonuçlara göre İR'ye bağlı böbrek hasarında L-arginin ve L-NAME ön tedavisinin, serbest oksijen radikallerin oluşturduğu hasarın bir göstergesi olan lipid peroksidasyonunu engellediğini ve L-NAME'in üre düzeyini düşürerek böbrek fonksiyonlarında iyileşme sağladığını gözlemledik. Böylece hem L-argininin hem de L-NAME'in serbest oksijen radikallerine ait hasarı azaltıcı etkilerinin bulunduğunu, MDA seviyeleri üzerindeki etki şiddetlerine göre L-NAME'in serbest radikal hasarını önlemedeki etkinliğinin L-argininden daha fazla olduğunu ileri sürebiliriz.

Histolojik tetkik sonucunda; İR uygulanmış böbreğin korteks ve medulladasında oluşan tahribatı L-arginin uygulaması önemli derecede azaltmıştır (şekil-5). Bu gözlem de İR sonucu böbrek dokusunda oluşan hasara karşı L-arginin ön uygulamasının protektif etkisinin olduğunu göstermektedir. Buna karşın L-NAME ön uygulamasının İR uygulanmış böbrek dokusundaki hasar şiddetinde belirgin bir azalma oluşturmadığı ve/veya kontrol grubuna yakın bir hasarlanmanın oluştuğunu gözledik (şekil-6). Bu da L-NAME ön uygulamasının böbrek İR hasarına karşı koruyucu etkisinin, lipid peroksidasyon üzerine olan etkisinden bağımsız olarak gerçekleştiğini ve yeterli olmadığını göstermektedir.

Rehman ve arkadaşları (89) ile Dikshit ve arkadaşlarının (90) hem L-arginin hem de L-NAME'in serbest radikal temizleyici etkilerinin bulunduğunu ileri sürmeleri çalışmamız sonuçları ile uyumlu bulunmuştur. Rehman ve arkadaşları yaptıkları çalışmada L-NAME'in serbest radikal temizleyici (free radical scavenger) etkisinin yüksek konsantrasyonlarda (mM) oluştuğunu saptamışlardır. Bu çalışmada L-NAME'in hidroksil radikali (OH $\cdot$) ile, hidroksil radikali (OH $\cdot$) temizleyicisi olan mannitolden daha hızlı bir şekilde reaksiyona girdiğini saptamışlar. Aynı çalışmada L-argininin hidroksil radikalini temizlemedeki etki gücü mannitolünki kadar bulunmuştur. Bu çalışma L-NAME ve benzeri bileşiklerin NO $\cdot$ radikalinden türeyen, özellikle hidroksil radikali (OH $\cdot$) ve peroksinitrit anyonu gibi, sitotoksik metabolitleri temizlemedeki etkilerini gösteren bir çalışmadır. Dikshit ve arkadaşları da L-NAME'in serbest radikal temizleyicisi olduğunu rapor etmişlerdir. Bu çalışmada L-NAME'in 300 mikromolar konsantrasyonu serbest radikalleri temizlemede etkili bulunmuştur. L-NAME, NO $\cdot$ 'nun fizyolojik ve patolojik olaylardaki rolünü aydınlatmak için yaygın olarak kullanılan bir maddedir (124).

Lopez ve arkadaşları rat böbreğinde yaptıkları benzer bir çalışmada, iskemiden 1 saat önce intravenöz L-arginin ve L-NMMA (NOS inhibitörü) uygulamış sonra 75 dakika iskemi ve takiben reperfüzyon gerçekleştirmişler. Renal hasar seviyesini böbrek fonksiyon testleri (serum üre ve kreatinin), doku MDA düzeyleri ve histolojik tetkikler ile değerlendirmişler. Elde edilen sonuçlara göre eksojen olarak kullanılan L-argininin lipid peroksidasyondan bağımsız olarak İR hasarına karşı koruyucu etkisinin bulunduğunu gözlemişler. Bu çalışmada L-arginin uygulanmış grupta MDA seviyelerindeki artışlar kontrol İR grubuna yakın olduğu halde, L-NMMA ön uygulamasının MDA seviyelerinde önemli bir azalmaya yol açtığı saptanmıştır. Biz ise bu çalışmamızda eksojen olarak kullandığımız L-argininin hem lipid peroksidasyonu hem de histolojik hasarlanmaları kontrol İR grubuna göre azaltarak İR hasarına karşı koruyucu etkisinin bulunduğunu gözledik. Lopez ve arkadaşları L-NMMA'nın böbrekte histolojik olarak ciddi tahribata yol açarken lipid peroksidasyonunu azalttığını saptamaları bizim bu çalışmada gözlediğimiz L-NAME'in etkileri ile paralellik göstermektedir (35).

Yang ve Mehta tarafından yapılan bir çalışmada iskemi-reperfüzyon uygulanmış sıçan kalbinde İR'nin neden olduğu miyokardiyal hasarı L-NAME'in etkilemediği,

ancak artan MDA seviyelerini düşürdüğü gözlenmiştir. Bu gözlem de rat kalbinde L-NAME'in serbest radikallere bağlı hasarı önleyici etkisinin bulunduğunu göstermektedir (83).

Çeşitli organlarda yapılan İR uygulamalarında nitrik oksitin hasar oluşmasındaki rolü açık olmayıp, mevcut bir çok çalışmadaki sonuçlara göre akut böbrek yetmezliğine yol açan İR hasarındaki rolü de açık değildir. Nitrik oksit normal böbrekte glomerüller ve diğer bazı hücrelerde üretilip, vasküler ve epiteliyal düzenleyici etkilerine ilave olarak renal hemodinamiği ve tübüler fonksiyonları modüle edici özelliğe de sahiptir. Bir çok çalışma nitrik oksitin (NO) bazal seviyelerde böbrek fonksiyonlarını koruduğu ve normal böbreklerde NO'nun indüklenmesi ile renal kan akımının, glomerüler filtrasyonun ve idrar akışının arttığı ve İR'ye maruz kalmış böbrekte, L-arginin ön tedavisinin İR hasarına karşı koruyucu etkilerinin bulunduğu gösterilmiştir (85,86,87,88,125). Bununla birlikte İR uygulanmış böbrekte, koruyucu role sahip olan NO'nun üretiminin, L-NMMA (126) ve L-NAME (75,120,127) gibi nitrik oksit sentaz (NOS) inhibitörleri ile inhibisyonunun böbrek fonksiyonlarında azalmaya neden olduğu saptanmıştır. Bu da nitrik oksitin İR hasarındaki koruyucu etkisini ve rolünü göstermektedir.

İskemik böbreğin reperfüzyonu ile oluşan hasarın iyileşme döneminde de kan akımının düzenlenmesinde NO'nun yararlı etkileri vardır (85). NO trombositlerin agregasyonunu inhibe ederek (78) ve nötrofillerin adezyonunu azaltarak mikrovasküler kan akımını düzenlemektedir (79). NO üretiminin azalması; lökosit, trombosit agregasyonuna, lökositlerin endotele yapışmasına ve ekstravasküler aralığa migrasyonuna, mikrovasküler bozulmaya neden olarak İR hasarını şiddetlendirebilir. Renal İR öncesinde eksojen olarak verilen NO donörlerinin inflamatuvar yanıtı neden olan mediyatörleri inhibe ederek, süperoksit radikal üretimini azaltarak, serbest radikalleri temizleyerek, nötrofillerin infiltrasyonunu azaltarak renal fonksiyonları ve yaşam süresini artırdığı gözlenmiştir (128). Bu nedenle NO donörlerinin reperfüzyondan önce verilmesi renal fonksiyonları artırabileceği ve inflamatuvar cevabı azaltabileceği ileri sürülebilir.

Ancak NO'nun bu faydalı etkileri yanı sıra İR'ye maruz dokuda serbest oksijen radikallerinden süperoksit radikali ($O_2^{\cdot-}$) ile etkileşerek toksik peroksinitrit bileşiğinin oluşmasına ve dokuda lipid peroksidasyona neden olarak zararlı etkilere

sahip olabileceği de bildirilmiştir (129,130,131,132,133). Aşırı NO'nun neden olduğu peroksinitrit birikimi hidroksil radikali (OH[•]) gibi oldukça reaktif ürünlerin üretimine neden olarak doku hasarına yol açar. En reaktif serbest oksijen radikali olan hidroksil radikalının (OH[•]) yarılanma ömrü son derece kısa olduğu halde hidroksil radikali donörü olan peroksinitritin yarılanma ömrü uzundur. İR hasarı gibi bir çok durumda NO'nun aşırı üretimi peroksinitrit, dolayısıyla hidroksil radikali gibi sitotoksik metabolitlerin oluşumu ile hücre hasarına neden olmaktadır (77,124). Aşırı NO ile oluşan radikal artışı nörodejeneratif hastalıklar, kronik inflamasyon gibi bir çok hastalığın patogeneğinde önemli rol oynamaktadır (124,134). İR'ye maruz kalan beyinde de NO'nun peroksinitrit oluşumuna neden olarak hasarlanmaya yol açtığı gözlenmiştir (135).

Cristol ve arkadaşlarının yaptıkları bir çalışmada İR uygulanmış böbrekte L-arginin infüzyonunun İR'nin neden olduğu lipid peroksidasyonunda artışa neden olduğu gözlenmiştir. Bunun muhtemel nedeni süperoksit radikali ile reaksiyona giren NO'nun peroksinitrit anyonu oluşturmasıdır (132). Bu bulgular NO'nun İR hasarında zararlı etkilerinin de olabileceğini göstermektedir.

Lefer ve arkadaşları fizyolojik koşullarda nanomolar derişimlerdeki NO'nun peroksinitrit aracılığı ile lökosit-endotel hücre etkileşmelerini ve P-selektin ekspresyonunu inhibe ederek miyokardiyal İR hasarına karşı sitoprotektif etkisinin bulunduğunu gözlemiştir (136). Bu nedenle peroksinitritin zararlı biyolojik etkilerinin yanı sıra lökosit-endotelial hücre etkileşimini inhibe ederek sitoprotektif etkilere sahip olduğu da düşünülmektedir.

Bazı araştırmacılar İR hasarına bağlı olarak endotel disfonksiyonun geliştiğini ve buna bağlı olarak özellikle NO salınımında azalma oluştuğunu bildirmişlerdir. Tsao ve arkadaşları izole böbrekte 25 dakikalık iskemiye takiben perfüze edilen dokuda EDRF aktivitesinde azalma yani NO'nun salıverilmesinde azalma oluştuğunu gözlemiştir (137). Tolins ve arkadaşlarının yaptıkları bir çalışmada NOS inhibitörlerinin verilmesi ile renal vasküler rezistansta artış oluştuğu gözlenmiştir (138). Bu araştırmacılar postiskemik renal vazokonstriksiyonu bu mekanizma ile açıklamıştır. Liu ve arkadaşlarının rat karaciğerinde yaptıkları İR çalışmasında L-NAME uygulanması doku perfüzyonunu azaltarak hasarın şiddetini artırmıştır (75).

Mashiac ve arkadaşları yaptıkları bir çalışmada böbreğe İR uygulamasının, renal NO seviyelerini düşürdüğünü ve NO üretimindeki azalmanın NOS aktivitesindeki bozulmadan veya renal kan akımındaki değişimlerden değil endotelial reseptör sinyal iletimindeki hasardan kaynaklandığını saptamışlar. Bu çalışmada L-NAME'in İR hasarını şiddetlendirdiği gözlenmiştir (139).

Bir çalışmada renal İR hasarının remisyonunun erken fazında NO konsantrasyonunda artış olduğu ve bu artışın renal hasarı azalttığı gözlenmiştir. Bu çalışmada L-NAME ön tedavisinin, İR ile erken dönemde görülen NO patlamasıyla ilgili sitotoksik etkiyi önleyerek dokuda iyileşme sağladığı, ancak geç dönemdeki hasarı artırdığı bildirilmiştir (140).

Mevcut çalışmalar L-arginin'den NO'un meydana gelmesi ile makrofajların sitotoksik etkilerinin arttığını göstermektedir (141).

İR hasarında nötrofiller önemli rol oynamaktadır. Mevcut çalışmalarda iskemik olmayan böbrekte uyarılmayan nötrofillerin hasar oluşturmadığı ancak iskemik böbrekte uyarılmamış nötrofillerin aktive olarak reperfüzyon ile oluşan hasarda iyileşmeyi engellediği saptanmıştır. Granger yaptığı bir çalışmada, İR ile aktive olan nötrofillerden salınan toksik metabolitlerin ciddi hasarlanmaya neden olduğunu göstermiştir (30). Nötrofillerin İR uygulanmış böbrekte tübüler ve glomerüler fonksiyonu bozarak İR hasarını şiddetlendirdiği gözlenmiştir (129,130). Ancak NO nötrofil akümülyasyonunu önleyerek doku hasarını azaltıcı etkiye sahiptir. Nitekim İR uygulanan karaciğer dokusunda NO'nun nötrofil akümülyasyonunu azaltarak koruyucu bir rol oynadığı saptanmıştır (75).

Mevcut çalışmalar NO'nun nötrofil fonksiyonları üzerine güçlü etkilere sahip olduğunu göstermektedir. NO nötrofil kemotaksisini (142) ve NADPH-oksidaz enzim aktivitesini (13) azaltır. İR hasarına bağlı olarak endotel disfonksiyonunun oluşması NO'nun salınımının azalmasına neden olarak nötrofillerin iskemik alana akümülyasyonuna ve hasar şiddetinin artmasına yol açar. NADPH-oksidaz oksidatif patlamada önemli rol oynayan bir enzim sistemidir. NO konsantrasyonundaki artış süperoksit radikallerinin NADPH oksidaz gibi enzimatik kaynaklarını da inhibe etmektedir (13). Bazı çalışmalar NO'nun İR ile aktive olan nötrofillerden salınan serbest oksijen radikallerinin temizlenmesinde rol oynadığını göstermiştir (13,129,130). NO endotel hücre adezyon moleküllerinin (CD11/CD18, P-selektin,

ICAM-1) down-regülasyonuna neden olur. Nötrofil membranı üzerindeki CD11/CD18'in fonksiyon veya ekspresyonunu bloke eder (124). NO'nun nötrofil adezyonunu ve serbest oksijen radikallerinin salınımını azaltan bu etkileri İR ile ilişkili hasarın azalmasına neden olur.

Bazı çalışmalara göre NO'nun İR hasarına iştiraki ortamda nötrofillerin bulunup bulunmamasına göre de değişmektedir. Linaş ve arkadaşları nötrofillerin ortamdan uzaklaştırılması ile L-arginin uygulamasının böbrek dokusunda, renal tübüler ve glomerüler fonksiyonları kötüleştirdiğini, NOS inhibitörü bir ilaç olan L-NNA'nın ise bu fonksiyonları iyileştirdiğini gözlemiştir (16).

Garcia ve arkadaşları yaptıkları bir çalışmada İR'ye maruz kalan böbrekte NO donörü olarak kullanılan molsidominin İR ile gelişen inflamatuvar cevabı azalttığını ve bozulan böbrek fonksiyonlarını iyileştirdiğini gözlemişlerdir (128).

Biz ise bu çalışmamızda eksojen olarak kullandığımız NO prekürsörü L-argininin İR esnasında bozulan renal fonksiyonları ve renal mikrosirkülasyonu düzelttiğini ve oksidatif hasarı azaltarak İR'ye karşı koruyucu etkilerinin bulunduğunu gözledik. NO oluşumunun L-NAME tarafından inhibisyonu ile İR böbrek dokusunda oluşan hasarın şiddetinde kontrole göre büyük bir değişikliğin oluşmadığını yani L-NAME'in İR hasarına karşı koruyucu etkisinin yeterli olmadığını, bununla birlikte serbest radikallere bağlı hasarın göstergesi olan lipid peroksidasyonu (MDA düzeylerini) azalttığını saptadık. Bu da L-NAME'in serbest oksijen radikallerini süpürücü bir etkisinin bulunduğunu göstermektedir.

Sonuç olarak NO'nun renal İR hasarı oluşmasında önemli etkilere sahip olduğunu söyleyebiliriz. İR'ye maruz kalan böbrek dokusunda eksojen olarak kullandığımız L-argininin koruyucu etkileri şöyle açıklanabilir: NO serbest oksijen radikallerinin üretimini azaltarak, böbrek kan akışını düzenleyerek, lökosit adezyonunu ve/veya agregasyonunu önleyerek, trombositleri inhibe ederek protektif etki yapabilir.

Allopurinol: Allopurinol ksantin oksidaz (XO) enzimini inhibe eden bir ilaçtır. İskemiye maruz kalan bir hücrede intraselüler kalsiyum seviyelerinin artış göstermesi, lizozomal bütünlüğün bozulup proteazların aktive olup serbestleşmesi ksantin dehidrojenaz (XDH) enzimini ksantin oksidaza dönüştürür. Ksantin oksidaz

iskemik koşullarda intraselüler alanda miktarı artan hipoksantini üreye dönüştürürken serbest oksijen radikallerinin de bol miktarda üretilmesine neden olur. Reperfüzyon gerçekteştiğinde dokuya sunumu artan oksijen ksantin oksidaz aracılığı ile serbest oksijen radikallerinin üretiminde aşırı bir artışa neden olur. Serbest oksijen radikalleri aracılığı ile hücre hasarı artar. Bu nedenle ksantin oksidazın inhibe edilmesinin reperfüzyona bağlı oksidan stresi önleyeceği umulur.

Biz bu çalışmada, İR uygulanmış rat böbreğinde allopurinol ön uygulamasının serum üre seviyelerini azalttığını, kreatinin seviyelerini ise değiştirmediğini saptadık. Allopurinol İR uygulanmış ve uygulanmamış böbreklerde MDA seviyelerinde azalmaya yol açmıştır. Histolojik incelemeler kontrol grubuna göre allopurinol uygulanmış gruba ait böbrek kesitindeki lezyonların (şekil 7'deki gibi); bowman mesafesindeki daralmanın ve tübül epitelindeki deskuamasyonun azaldığını göstermiştir.

Elde edilen bulgular allopurinol ön uygulamasının İR hasarına karşı koruyucu olduğu kanısını uyandırmıştır. Allopurinolün İR'ye maruz kalmayan böbrek dokusunda da MDA seviyelerini düşürmesi düşündürücüdür.

Allopurinolün kalp (95,143), karaciğer (94), intestinal doku (10) ve testis (144) gibi bir çok organda iskemi öncesi uygulanması halinde İR hasarına karşı protektif olduğu saptanmıştır.

Mevcut bir çok deneysel çalışma da İR'ye maruz kalan böbrek dokusunda allopurinol ön uygulamasının İR hasarına karşı koruma sağladığını göstermektedir. (31,92,93,145,146). Bu çalışmalar bizim çalışmamız ile uyumludur.

Allopurinol özel hazırlanmış koruyucu perfüzyon solusyonlarına (BTO1) katılarak İR'ye maruz kalan böbrekte ksantin oksidaz enzim sistemi ile oluşacak hasara karşı proteksiyon sağlamada kullanılmaktadır (48). Bu çalışmalarda İR'ye bağlı hasarın asıl kaynağının ksantin oksidaz tarafından oluşturulan serbest oksijen radikalleri olduğu iddia edilmektedir.

$\text{Na}^+ - \text{K}^+ - \text{ATPaz}$ enzimi hücre yaşamının sürdürölmesini sağlayan membrana bağlı önemli bir enzimdir. İR sonucu oluşan serbest radikaller hücre membranında lipid peroksidasyonuna neden olarak bu enzimin aktivitesini değiştirirler. Allopurinol ise bu enzimin aktivitesini korumaktadır (145).

Greene ve arkadaşları rat böbreğinde yaptıkları in vitro çalışmada, hipoksi ve

reoksijenasyon yapılmış proksimal tübül epitel hücrelerinde, ksantin oksidaz inhibitörlerinin (allopurinol, oksipurinol) böbrekte İR hasarının majör kaynağı olarak kabul edilen ksantin oksidaza bağlı süperoksit radikallerinin üretimini inhibe ederek serbest radikal temizleyici etkiye sahip olduğunu gözlemişlerdir (31).

Lopez ve arkadaşları yaptıkları benzer bir çalışmada, renal arterin klemplenmesiyle oluşturulan 1 saatlik iskemiye takiben reperfüzyon uygulayarak 7 gün süreyle yaşam parametrelerini izlemişler. Reperfüzyon başlangıcında i.v olarak allopurinol uygulanmışlar ve böbrek fonksiyon testleri, lipid peroksidasyon ve renal histolojik tetkiklerin sonuçlarına allopurinolün koruyucu olmadığını saptamışlar. 1 saat iskemi ve müteakiben 4 saat reperfüzyon uyguladığımız bu çalışmamızda allopurinolün iskemiden önce uygulanmasının koruyucu etkiye sahip olması Lopez ve arkadaşlarının bulguları ile uyumlu bulunmamıştır (122).

Petho ve arkadaşları İR'ye maruz böbrekte iskemi öncesi ve reperfüzyon esnasında, allopurinol ve diltiazem kombinasyonunun uygulanması ile renal mikrosirkülasyonun iyileştiğini ancak renal fonksiyonlar üzerinde iyileştirici bir etkinin bulunmadığını saptamışlar (146).

Konya ve arkadaşları yaptıkları bir çalışmada renal arterin klemplenmesiyle oluşturulan 45 dakikalık iskemi ve 90 dakikalık reperfüzyon uygulamasında İR öncesi allopurinol verilmesinin kontrol İR'ye göre böbrek fonksiyonlarında ve renal histolojide anlamlı bir değişiklik oluşturmadığını gözlemişler. Allopurinolün koruyucu etkisinin bulunmadığını bildirmişlerdir (121).

Gupta ve arkadaşları ise yaptıkları benzer bir çalışmada allopurinol ön uygulamasının İR'ye maruz kalan rat böbreğindeki hasarı, histolojik ve biyokimyasal parametreleri (üre, kreatinin) iyileştirdiğini saptamışlardır (92).

Fışkın ve arkadaşları da İR'ye maruz karaciğerde iskemiden önce verildiği takdirde allopurinolün serbest radikallere bağlı hasara karşı koruyucu etkisinin olabileceğini, ancak endojen antioksidan savunma sisteminin aktivitesinde artırıcı bir rolünün bulunmadığını ileri sürmüşlerdir (116). Cohen ve arkadaşları allopurinolün karaciğerde İR hasarına karşı serbest radikalleri temizleyici etkisinin iskemiden önce verilmesi koşuluyla görülebileceğini bildirmişlerdir (147).

Mevcut literatürlerden elde edilen veriler; allopurinolün İR'ye maruz böbrekte oluşan hasara karşı serbest radikalleri temizleyici etkisinin, böbrek fonksiyonlarını

ve mikrosirkulasyonu düzeltici etkisinin yani koruyucu etkisinin ancak iskemiden önce uygulanması halinde görülebileceğini işaret etmektedir. Biz de bu çalışmamızda allopurinolün etkilerinin literatür bulgusu ile uyum içerisinde olduğunu gördük.

Diltiazem: İR ekstrasellüler kalsiyumun hücre içine influksunda artışa neden olarak ve intraselüler kalsiyum depolama yeteneğini azaltarak, kalsiyuma bağımlı proteazların aktive olmasına neden olarak sitotoksite oluşturur. Gomoll ve arkadaşları İR'ye maruz kalan myokartda sitozolik kalsiyum konsantrasyonun arttığını ve artan kalsiyumun dokuda hasarlanmaya neden olduğunu saptamışlar (33).

Kalsiyum kanal blokörleri serbest oksijen radikallerini inhibe ederek ve intrasellüler kalsiyum artışını önleyerek İR hasarına karşı koruyucu etki gösterirler. Mevcut çalışmalar İR ile oluşan serbest oksijen radikallerinin kalsiyum kanal blokörleri tarafından temizlendiğini yani kalsiyum kanal blokörlerinin antioksidan etkiye sahip olduklarını ileri sürmektedir (97,148). Bu çalışmalar bizim sonuçlarımız ile uyumludur. Çalışmamızda diltiazem ön uygulaması serum üre seviyelerini azaltırken, kreatinin düzeyini değiştirmemiştir. Diltiazemin doku MDA seviyelerini İR uygulanmamış böbrekte değiştirmedini ancak İR uygulanmış böbrekte düşürdüğünü saptadık. Bu da İR sonrası dokuda veya hücrede serbest oksijen radikalleri ve/veya kalsiyum artışı ile ilgili olayların gerçekleştiğini göstermektedir. Diltiazem ön uygulamasının İR uygulanmış böbrekte histolojik olarak doku hasarının şiddetini kısmen de olsa azalttığını gözledik. Bu sonuçlar ile İR'ye maruz kalan böbrekte diltiazem ön uygulamasının böbrek mikrosirkülasyonunu ve fonksiyonlarını düzenleyerek protektif etki gösterdiği kanısına vardık.

Kalsiyum kanal blokörlerinin böbrekte de koruyucu etkiye sahip olduğu bildirilmiştir. Kalsiyum kanal blokörleri renal vazokonstriktörlerin etkisini azaltarak böbrek hemodinamiğini koruyucu bir etki gösterirler. Ayrıca toksik oksijen metabolitlerini inhibe ederler ve intrasellüler kalsiyum seviyelerini düşürürler. Bu özellikleri nedeniyle İR hasarına karşı koruma sağlayabilirler. Son zamanlarda yapılan çalışmalar böbrek transplantasyonunda ve bazı patolojik durumlarda oluşacak postiskemik akut böbrek yetmezliğinde, GFR'deki azalmayı kalsiyum kanal blokörlerinin önlediğini göstermiştir. Bu protektif etkilerini kan basıncını düşürerek, böbrek hipertrofisini azaltarak, böbrekteki metabolik aktivite azalmasını düzelterek,

böbrek dokusunda kalsiyum birikimini azaltarak ve serbest radikal oluşumunu azaltarak gösterdikleri ileri sürülmüştür (100,101).

Torsello ve arkadaşları İR uygulanan böbrekte yaptıkları bir çalışmada, diltiazem ön uygulamasının 3 saatlik iskemi sonrasında azalan böbrek fonksiyonlarında artışa neden olduğunu gözlemlemişler. 3 saatlik uzun bir iskeminin oluşturacağı iskemik hasara karşı diltiazemin koruyucu etkisinin bulunması bu çalışmada uygulanan 1 saatlik iskeminin neden olduğu hasarı da önleyebileceği fikrini vermektedir (3). Çünkü İR hasarının şiddeti iskemi süresiyle ilişkilidir.

Wang ve arkadaşları sıçanlarda deneysel olarak oluşturdukları akut pankreatitte kalsiyum ve serbest radikallerin önemli rol oynadıklarını tespit etmişlerdir. Kalsiyum kanal blokörü ilaçların (diltiazem ve verapamil) kalsiyum ve serbest radikallerin oluşturduğu endotel hasarını önlediğini gözlemlemişler (149).

Fışkın ve arkadaşları İR'ye maruz kalan sıçan karaciğerinde kalsiyum kanal blokörü bir ilaç olan verapamil ön uygulamasının endojen antioksidan savunma sistemini güçlendirdiğini gözlemlemişler (116).

Obata ve arkadaşları yaptıkları bir çalışmada İR'ye maruz kalan miyokartda diltiazem ön uygulamasının İR ile oluşan serbest oksijen radikallerini baskıladığını gözlemlemişler (97).

Kalsiyum kanal blokörlerinin beyinde de serbest radikal hasarına karşı koruyucu etki gösterirler (99,102) ve bu etkileri muhtemelen; antioksidan aktivitelerine, lipid peroksidasyonunu önleme yeteneklerine ve kimyasal yapılarına bağlı olarak değişmektedir.

Kalsiyum kanal blokörü ilaçlar teorik olarak hem serbest radikalleri hem de kalsiyumu antagonize ederek İR hasarına karşı iyi bir terapötik koruma sağlayabilirler.

Sonuç olarak çalışmamızda diltiazem ön uygulamasının böbrekteki İR hasarına karşı koruyucu etkisinin serbest oksijen radikallerini temizleyip lipid peroksidasyonu önleyerek, intraselüler kalsiyum artışına bağlı sitotoksiteyi engelleyerek, renal mikrosirkülasyonu ve renal hemodinamiği düzenleyerek ve böbrek fonksiyonlarını artırarak meydana gelmiş olabileceğini söyleyebiliriz.

Prednizolon: İskemik dokunun perfüzyonu dokuda akut inflamatuvar reaksiyona benzer bir dizi olaylara neden olur (107).

Son zamanlarda inflamasyon olayında serbest oksijen radikallerinin önemli rol oynadığı bildirilmiştir. Kortikosteroidler yüksek dozda verildiklerinde serbest radikal temizleyicisi olarak rol oynayabilirler. İR'ye maruz kalan dokuda oluşan serbest oksijen radikalleri temizleme yeteneğine sahip olabilirler. Bu nedenle serbest oksijen radikallerinin oluşturduğu lipid peroksidasyonu ve doku hasarını önleyebilirler (10,110). Otamiri'nin ratlarda yaptığı intestinal İR çalışmasında nonenzimatik bir antioksidan olarak kabul edilen hidrokortizon sodyum süksinat (solu-cortef ®) ön tedavisinin İR hasarına bağlı olarak gelişen intestinal MDA seviyelerindeki artışı ve nötrofil infiltrasyonunu azalttığı saptanmıştır. Bu çalışmada hidrokortizon sodyum süksinatın malondialdehit seviyelerini düşürücü etkisinin SOD+allopurinol kombinasyonunununkinden daha fazla olduğu tespit edilmiştir (10).

Günümüzde serbest oksijen radikallerinin yapımının önlenmesi ve oluşmuş radikallerin temizlenmesi ile inflamasyon, İR hasarı ve benzeri inflamatuvar tabloların oluşmasının önlenmesi ve/veya tedavisi amaçlanmaktadır. İnflamasyon şekillenirken membran fosfolipidlerinden prostaglandinlerin ve lökotrienlerin sentezi esnasında serbest oksijen radikalleri oluşmaktadır. Glukokortikoidler fosfolipaz A₂ enziminin inhibisyonuna neden olarak membrandan araşidonik asit salıverilmesini dolayısıyla araşidonik asit metabolitlerinin (prostaglandinler ve lökotrienler) oluşumunu ve salıverilmelerini engellerler. Prostaglandinlerin ve lökotrienlerin sentezinin engellenmesi senteze bağlı serbest radikal salıverilmesini de engeller (112). Fosfolipaz A₂'nin inhibisyonu İR'ye maruz kalan dokuya nötrofil infiltrasyonunun azalmasına yol açabilir. İR hasarında nötrofiller önemli rol oynamaktadır. İR ile aktive olan nötrofiller serbest oksijen radikalleri oluşturabilir ve proteolitik enzimleri salarak İR'ye bağlı hasarın şiddetini artırabilirler (28,108,109). Nötrofil infiltrasyonunun önlenmesi nötrofil kaynaklı serbest oksijen radikallerinin üretimini, nötrofil kaynaklı proteazların salıverilmesini engeller. Otamiri yaptığı çalışmalarda glukokortikoidlerin fosfolipaz A₂'yi inhibe ederek nötrofillerin dokuya infiltrasyonunu engellediğini ve İR'ye bağlı hasarın azalmasına neden olduğunu göstermiştir (10,34).

İR hasarıyla oluşan mikrovasküler disfonksiyondan lökosit-endoteliyal hücre

etkileşiminin sorumlu olduğuna dair bir çok kanıt mevcuttur. İR hasarında önemli rol oynayan bu mekanizmanın modülasyonunda glukokortikoidler önemli rol oynamaktadır. Glukokortikoidler selektinler ve integrinler gibi adezyon moleküllerinin ekspresyonunu azaltarak nötrofil-endotel etkileşimini engeller, inflamatuvar gelişmeyi baskırlar (107).

Tüm bu teorik literatür bilgisine rağmen bir kortikosteroid olan prednizolonun rat böbreğinde İR hasarını önleyici etkisinin bulunmadığını saptadık . İR uygulanmış böbrekte prednizolon ön uygulamasının serum üre ve kreatinin düzeyini, doku MDA düzeyini ve histolojik parametreleri önemli ölçüde değiştirmedini gözlemledik. Bu çalışmamızda iki gün süreyle (üç kez) 5mg/kg/gün dozunda prednizolon ön uygulaması İR hasar şiddetini değiştirmemiştir. İR esnasında oluşan serbest oksijen radikallerinin neden olduğu lipid peroksidasyonu azaltmamıştır.

Ancak bizim bu çalışmada elde ettiğimiz verilerle uyumlu veriler sunan çalışmalar da mevcuttur. Nitekim Tsubota ve arkadaşları yaptıkları bir çalışmada glukokortikoidlerin (deksametazon) iskemik beyin hasarını şiddetlendirdiğini tespit etmişlerdir (150).

Günel ve arkadaşları ise İR'ye maruz kalan rat intestinal dokusunda iskemi esnasında uygulanan metilprednizolonun MDA seviyelerini istatistikel olarak değiştirmedini saptamışlardır (151).

Kronik kortikosteroid uygulamasının İR uygulanmış rat miyokardında infarkt alanının artmasına neden olduğu da gözlenmiştir (152).

Mevcut çalışma sonuçlarına göre İR'ye bağlı olarak mikrosirkülasyonda görülen değişiklikler üzerine glukokortikoidler; lökosit akümülyasyonunu önleyerek, vasküler permeabilitedeki artışı azaltarak, sitokinler ve diğer mediyatörlerin etkilerini inhibe ederek, inflamasyonda rol oynayan enzim sistemlerini modüle ederek etki göstermektedir. Bugün geçerli olan görüşe göre glukokortikoidler sitoplazmik reseptörler aracılığı ile regülatör proteinleri şifreleyen bazı genlerin transkripsiyonunu kontrol ederek etkimektedir. Ancak etki mekanizmaları tamamen anlaşılamamıştır. Muhtemel mekanizmalar arasında nötrofil ve endotel fonksiyonunun modülasyonu, araşidonik asit ürünlerinin oluşumunun inhibisyonu, serbest radikallerin temizlenmesi ve membranın stabilize edilmesine bağlı biyolojik membranların lipid peroksidasyonunun azaltılması bulunmaktadır (111).

Bu literatür bilgisine rağmen biz bu çalışmada iki günlük prednizolon ön uygulamasının İR hasarına karşı koruyucu olmadığı sonucuna vardık. Bu bulgumuz ve literatürdeki çelişen bulgular glukokortikoidlerin etkilerini modüle eden bazı faktörlerin bulunduğunu düşündürmektedir. Bu faktörlerin saptanması hangi koşullarda glukokortikoidlerin yararlı hangi koşullarda zararlı veya etkisiz olacağını anlamamıza yardımcı olacaktır.

Sonuç olarak; renal arterin klemplenmesiyle oluşturulan 1 saat sıcak iskemi ve takiben 4 saat reperfüzyonun rat böbreğinde ciddi hasarlanmalara neden olduğunu söyleyebiliriz. İskemi-reperfüzyon (İR) hasarına karşı prednizolon haricinde L-arginin, L-NAME, allopurinol ve diltiazemin koruyucu etkilerinin bulunduğunu düşünmekteyiz.

ÖZET

İskemi; doku için zararlı bir çok metabolitin oluşmasına, artık ürünlerin uzaklaştırılamamasına, enerji depolarının boşalmasına, intraselüler elektrolit dengesi ve pH değişikliklerine neden olur. Bu nedenle hücreşel hasarın önlenmesi için dokunun olabildiğince sūraatli bir şekilde reperfüze edilmesi gereklidir. Ancak iskemi ile oluşan hasar sonrası dokunun reperfüzyonu da doku için zararlı bir çok toksik metabolitlerin oluşmasına, ciddi hücre ve doku hasarına neden olur. Reperfüzyon nōtrofil akūmūlasyonuna, oksidan strese dolayısıyla hücre ve doku hasarına neden olur. İskemi-Reperfüzyon (İR) ile oluşan hasarın büyük bir kısmından serbest oksijen radikalleri sorumlu tutulmaktadır. Deneysel çalışmalar eksojen kaynaklı değişik maddelerin böbrekte İR hasarı oluşumunu azalttığını göstermektedir. Biz bu çalışmada renal arter oklūzyonu ile oluşturulan İR modelinde İR'ye maruz kalan böbrekteki hasarı önlemek amacıyla nitrik oksit (NO) donörü ve antagonisti, ksantin oksidaz inhibitörü, kalsiyum kanal blokörü ve glukokortikoid grubu ajanlar kullanarak bu ilaçların İR hasarına karşı protektif etkilerinin bulunup bulunmadığını incelemeyi amaçladık.

Çalışmamızda erişkin, erkek, Sprague-Dawley ratlar (200-300 g) kullanıldı. Sağ böbrek, iskemi-reperfüzyona maruz kalacak sol böbreğin kontrolü olarak, total nefrektomi ile alındı. Renal arter klemplenerek sol böbreğe 1 saat iskemi ve 4 saat reperfüzyon uygulandı. Histolojik ve biyokimyasal incelemeler için sağ böbrek, İR uygulanmış sol böbrek ve intrakardiyak olarak kan örnekleri alındı. Ratlar sakrifiye edildi. Çalışmamızda kontrol grubu (İR), Allopurinol+İR, L-arginin +İR, L-NAME+İR, Diltiazem+İR ve Prednizolon+İR grupları şeklinde 6 grup oluşturuldu. Prednizolon dışındaki test maddeleri iskemiden bir saat önce penil venden enjekte edildi. Prednizolon grubunda ise ilaç uygulamasına deneyden 2 gün önce i.m enjeksiyon ile başlandı. Renal hasar böbrek fonksiyon testi (serum kreatinin ve üre seviyeleri) ve histolojik tetkik ile değerlendirildi. İR uygulanmış böbreklerde serbest oksijen radikalleri nedeniyle oluşan lipid peroksidasyonun göstergesi olarak doku malondialdehit (MDA) düzeyleri ölçüldü.

Histolojik incelemelerde L-arginin, allopurinol ve diltiazemin İR hasar şiddetini kontrole göre azalttığı, L-NAME'nin zayıf bir koruyucu etkisinin bulunduğu ve

prednizolon grubunda da hasarın şiddetinin azaldığı ancak hasar şiddetinin kontrole daha yakın olduğu gözlemlendi. Böbrek fonksiyon testi sonuçlarına göre: 1) Tüm gruplarda serum kreatinin düzeyi değişmemiştir ($p>0.05$). 2) L-NAME, allopurinol ve diltiazem uygulaması serum üre düzeylerini kontrole göre azaltırken ($p<0.05$), L-arginin ve prednizolon uygulaması değiştirmemiştir ($p>0.05$). L-arginin, L-NAME, allopurinol ve diltiazem doku MDA düzeylerini azaltırken ($p<0.05$), prednizolon değiştirmemiştir ($p>0.05$).

Sonuç olarak; prednizolon haricinde L-arginin, L-NAME, allopurinol ve diltiazemin 1 saat sıcak iskemi 4 saat reperfüzyon uygulanan rat böbreklerinde İR hasarını azaltıcı etkilerinin bulunduğunu saptadık.

SUMMARY

Ischemia; itself causes to produce many toxic metabolites, inefficient removal of waste products, depletion of energy sources, intracellular electrolyte unbalances and pH changes in tissue. Therefore, to prevent the cellular damage, tissue must be reperfused as rapidly as possible. However, reperfusion of ischemic tissue following ischemic damage causes production of toxic metabolites, and leads to serious cell and tissue injuries. Reperfusion causes accumulation of neutrophils in ischemic tissues, oxidative stress and consequently cell and tissue injuries. Free oxygen radicals are responsible from the majority of damages formed by ischemia-reperfusion (IR). Experimental studies show that a variety of exogen substances may reduce IR injury in kidney. In this study we have used a NO donor and antagoniste, xanthine oxidase enzyme inhibitor, calcium channel blocker and a member of glucocorticoids to prevent the damage of kidney that subjects to IR. Our aim was to investigate that whether these drugs have protective effect in experimental IR injury model that is formed by renal artery occlusion and to understand the mechanisms of reperfusion injuries.

In this study, we used adult, male sprague-dawley rats weighing 200-300 g. Right kidney, which would be control of left kidney that subjected to ischemia-reperfusion, was extirpated by total nephrectomy. By clamping renal artery, left kidney was subjected to 1 hour ischemia and 4 hour reperfusion. Left kidney that was subjected to IR, right kidney was extirpated and stored and intracardiac blood samples investigated for biochemical and histological examinations. At the end of experiments rats were sacrificed. In this study, there were 6 groups such as control (IR), allopurinol+IR, L-arginine+IR, L-NAME+IR, Diltiazem+IR and prednisolone + IR groups. Test sustances were administred 60 min prior to ischemia through the penile vein, except prednisolone. Prednisolone administration was started two days before the experiments through the daily intramusculer injection.

Renal damage was assessed by kidney function tests (serum creatinine and urea levels) and histological investigations. Tissue malondialdehyde (MDA) levels, which is an indicator of lipid peroxidation that was formed by free oxygen radicals, were measured at all of the kidneys subjected to IR or not.

According to histological investigations, we observed that L-arginine, allopurinol and diltiazem reduced the severity of IR damage. L-NAME also showed a slight protection and prednisolone reduced the severity of ischemic damage but this was slight and severity of damage was as similar to control. The results of kidney function tests showed that: 1) in all groups serum creatinine levels were not changed ($p>0.05$). 2) Administration of L-NAME, allopurinol and diltiazem were reduced the serum urea levels when compared to control ($p<0.05$), there was not any changes in prednisolone and L-arginine groups. L-arginine, L-NAME, allopurinol and diltiazem were reduced the tissue MDA levels ($p<0.05$) and there was not any change in prednisolone group.

In conclusion, we found that; L-arginine, L-NAME, allopurinol and diltiazem have some effects to reduce IR damage in rat kidneys that subjected to 1 hour ischemia and 4 hour reperfusion, except prednisolone.

KAYNAKLAR

- 1- Kumar V, Cotran RS, Robins SL: Temel Patoloji (Basic Pathology). Çeviri editörü; Uğur Çevikbaş, 6.baskı, Nobel Tıp Kitabevi, ss:5-11, 1995.
- 2- Aktan Ö: İskemi-reperfüzyon hasarı ve cerrah. Infocox siklooksijenaz bülteni, Pfizer, ss: 1-2, 1998/2.
- 3- Torsello G, Reinecke P, Szabo Z, Sandmann W: The role of pharmacologic kidney protection in preventing post-ischemic renal failure in animal experiment. Zentralbl Chir, 118(7): 412-9, 1993.
- 4- Ar'Rajab A, Dawidson I, Fabia R: Reperfusion injury. New Horiz, 4(2): 224-34, 1996.
- 5- Paller MS. Free radical mediated postischemic injury in renal transplantation. Ren Fail, 14(3): 257-60, 1992.
- 6- Miko I, Csabina S, Hauck M, Kovacs J, Schmidt E, Peto K, Furka I, Varga A, Toth G: Protection of the renal artery in nephron-sparing surgery. II. Arterial contractility investigations. Acta Chir Hung, 36(1-4): 236-9, 1997.
- 7- Miko I, Kovacs J, Schmidt E, Peto K, Varga A, Furka I, Toth G: Protection of the renal artery in nephron-sparing surgery. I. Pathomorphological study. Acta Chir Hung, 36(1-4): 233-5, 1997.
- 8- Luchesi BR: Complement, neutrophils and free radicals: mediators of reperfusion injury. Arzneimitteforschung, 44(3A): 420-32, 1994.
- 9- Smith JK, Grisham MB, Granger DN, Korthuis RJ: Free radical defense mechanism and neutrophil infiltration in postischemic skeletal muscle. Am J Physiol, 256(3 pt 2): H789-93, 1989.
- 10- Otamiri T: Oxygen radicals, lipid peroxidation, and neutrophil infiltration after small-intestinal ischaemia and reperfusion. Surgery, 105: 593-7, 1989.
- 11- Zima T, Tesar V, Stipek S, Nemecek K, Platnik J: The role of oxygen radicals in the pathogenesis of glomerulonephritis. Cas Lek Cesk, 134(22): 716-9, 1995.
- 12- Linas SL, Whittenburg D, Parsons PE, Repine JE: Ischemia increases neutrophil retention and worsens acute renal failure: Role of oxygen metabolites and ICAM-1. Kidney Int, 48: 1584-1591, 1995.

- 13- Clancy RM, Leszczynska PJ, Abramson SB: Nitric oxide, an endothelial cell relaxation factor, inhibits neutrophil superoxide anion production via a direct action on the NADPH oxidase. *J Clin Invest*, 90: 1116-1121, 1992.
- 14- Laigth DW, Lad N, Woodward B, Waterfall JF: Assesment of myeloperoxidase activity in renal tissue after ischemia/reperfusion. *Eur J Pharmacol*, 292: 81-88, 1994.
- 15- Grisham MB, Benoit JN, Granger DN: Assesment of leukocyte involvement during ischemia and reperfusion of intestine. *Methods in Enzimotology* Academic Press, 186: 729-742, 1990.
- 16- Linas S, Whittenburg D, Repine JE: Nitric oxide prevents neutrophil-mediated acute renal failure. *Am J Physiol*, 272(41): F48-F54, 1996.
- 17- Linas SL, Shanley PF, Whittenburg D, Berger E, Repine JE: Neutrophils accentuate ischemia-reperfusion injury in isolated perfused rat kidneys. *Am J Physiol*, 255: F728-F735, 1988.
- 18- De Greef KE, Ysebaert DK, Ghielli M, et al: Neutrophils and acut ischemia-reperfusion injury. *J Nephrol*, 11(3): 110-122, 1998.
- 19- Hernandez LA, Grisham MB, Twohig B, Arfors KE, Harlan MJ, Granger DN: Role of neutrophils in ischemia-reperfusion induced microvascular injury. *Am J Physiol*, 253: G49-G53, 1987.
- 20- Kurtel H, Fujimoto K, Zimmerman BJ, Granger DN, Tsao P: Ischemia reperfusion induced mucosal dysfunction: role of neutrophils. *Am J Physiol*, 261: G490-G496, 1991.
- 21- Paller MS: Effect of neutrophil depletion on ischemic renal injury in the rat. *J Lab Clin Med*, 113: 379-386, 1989.
- 22- Zwacka RM, Zhang Y, Halldorson J, Schlossberg H, Dudus L, Engelhardt JF: CD4(+) T-lymphocytes mediate ischemia/reperfusion-induced inflammatory responses in mouse liver. *J Clin Invest*, 100(2): 279-89, 1997.
- 23- Thiagarajan RR, Winn RK, Harlan JM: The role of leukocyte and endothelial adhesion molecules in ischemia-reperfusion injury. *Thromb Haemost*, 78(1): 310-4, 1997.
- 24- Fuggle SV, Koo DD: Cell adhesion molecules in clinical renal transplantation. *Transplantation*, 65(6): 763-9, 1998.

- 25- Weiss SJ: Tissue destruction by neutrophils. *N Eng J Med*, 320: 365-376, 1989.
- 26- Broche VF, Suarez AR, Olembe E, Fernandez GE, Cespedez EM, Garcia JC: Aprotinin effects related to oxidative stress in cardiosurgery with mechanical cardiorespiratory support (CMCS). *Ann N Y Acad Sci*, 793: 521-4, 1996.
- 27- Horiguchi T, Harada Y: The effect of protease inhibitor on reperfusion injury after unilateral pulmonary ischemia. *Transplantation*, 55(2): 254-8, 1993.
- 28- Grisham MB, Hernandez LA, Granger DN: Xanthine oxidase and neutrophil infiltration in intestinal ischemia. *Am J Physiol*, 251: G567-G574, 1986.
- 29- Granger DN, Rutilli G, McCord JM: Superoxide radicals in feline intestinal ischemia. *Gastroenterology*, 81: 22-29, 1981.
- 30- Granger DN: Role of xanthine oxidase and granulocytes in ischemia-reperfusion injury. *Am J Physiol*, 255: H1269-H1275, 1988.
- 31- Greene EL, Paller MS: Xanthine oxidase produces $O_2^{\cdot -}$ in posthypoxic injury of renal epithelial cells. *Am J Physiol*, 263: F251-5, 1992.
- 32- Defraigne JO, Pincemail J, Detry O, Franssen C, Meurisse M, Limet R: Preservation of cortical microcirculation after kidney ischemia-reperfusion: value of an iron chelator (see comments). *Ann Vasc Surg*, 8(5): 457-67, 1994.
- 33- Gomoll AW, Roth RA, Swillo RE, Baird AJ, Sargent CS, Behling RW, Malone III, Grover GJ: Effect of timing of treatment of the glyburide-reversible cardioprotective activity of BMS-180448. *J Pharmacol Exp Ther*, 281(1): 24-33, 1997.
- 34- Otamiri T, Lindahl M, Tagesson C: Phospholipase A_2 inhibition prevents mucosal damage associated with small intestinal ischemia in rats. *Gut*, 29: 489- 94, 1988.
- 35- Lopez Neblina F, Paez AJ, Toledo AH, Toledo Pereyra LH: Role of nitric oxide in ischemia/reperfusion of the rat kidney. *Circulatory Shock*, 44: 91-95, 1995.
- 36- Miller RL, Kohan DE: Hypoxia regulates endothelin-1 production by the inner medullary collecting duct. *J Lab Clin Med*, 31(1): 45-81, 1998.
- 37- Ansley DM, Qayumi AK, Duncan S, Merrick PM, Klein R: Platelet activating factor and thromboxane B_2 production after cardiopulmonary bypass. *J Invest Surg*, 10(3): 87-95, 1997.

- 38- Collard CD, Vakeva A, Bukusoglu C, Zund G, Sperati CJ, Colgan SP, Stahl GL: Reoxygenation of hypoxic human umbilical vein endothelial cells activates the classic complement pathway. *Circulation*, 96(1): 326-33, 1997.
- 39- Roberts JA: Etiology and pathophysiology of pyelonephritis. *Am J Kidney Dis*, 17(1): 1-9, 1991.
- 40- Kavas G: Serbest radikaller ve organizma üzerine etkileri. *Türkiye Klinikleri Dergisi*, Cilt 9, sayı 1, ss:1-8, 1989.
- 41- Delaney SM, Shepel PN, Geiger JD: Levels of endogenous adenosine in rat striatum. I. Regulation by ionotropic glutamate reseptors, nitric oxide and free radicals. *J Pharmacol Exp Ther*, 285: 561-567, 1998.
- 42- Haq M, Norman J, Saba SR, Ramirez G, Rabb H: Role of IL-1 in renal ischemic reperfusion injury. *J Am Soc Nephrol*, 9(4): 614-9, 1998.
- 43- Nambi P, Gellai M, Wu HL, Prabhakar U: Upregulation of osteopontin in ischemia-induced renal failure in rats: a role for ET-1?. *Biochem Biophys Res Commun*, 241(1): 212-4, 1997.
- 44- Dong Z, Saikumar P, Griess GA, Weinberg JM, Venkatachalam MA: Intracellular Ca^{2+} thresholds that determine survival or death of energy-deprived cells. *Am J Pathaology*, 152: 231-240, 1998.
- 45- Yavuzer S: Oksidan stres ve trombosit fonksiyonları. *Türk Fizyoloji Bilimler Derneği 23. Ulusal Kongresi. Bildiri özetleri*, Ankara, ss:15, 1997.
- 46- Maulik N, Yoshida T, Das DK: Oxidative stress developed during the reperfusion of ischemic myocardium induces apoptosis. *Free Radic Biol Med*, 24(5): 869-75, 1998.
- 47- Butter G, Lindell SL, Sumimoto R, Schilling MK, Southard JH, Belzer FO: Effect of glycine in dog and rat liver transplantation. *Transplantation*, 56(4): 817 -22, 1993.
- 48- Julia P, Haab F, Sabatier B, Fuzellier JF, Nochy D, Cambillau M: Improvement of postischemic kidney function by reperfusion with a specifically developed solution (BTO1). *Ann Vasc Surg*, 9: S81-8, 1995.
- 49- Ishida T, Yarimizu K, Gute DC, Korthuis RJ: Mechanism of ischemic preconditioning. *Shock*, 8(2): 86-94, 1997.

- 50- Gattullo D, Pagliaro P, Losano G: Mechanisms of ischemic preconditioning : relation with ischemia-reperfusion injury. *G Ital Cardiol*, 27(3): 288-96, 1997. .
- 51- Nogae S, Miyazaki M, Kobayashi N, Saito T, Abe K, Saito H, Nakane PK, Nakanishi Y, Koji T: Induction of apoptosis in ischemia-reperfusion model of mouse kidney: possible involvement of Fas. *J Am Soc Nephrol*, 9(4): 620-31, 1998.
- 52- Ferrari R, Agnoletti L, Comini L, Gaia G, Bachetti T, Cargnoni A, Ceconi C, Curello S, Visioli O: Oxidative stress during myocardial ischaemia and heart failure. *Eur Heart J*, 19 Suppl B: B2-1, 1998.
- 53- MacLellan WR, Schneider MD: Death by design. Programmed cell death in cardiovascular biology and disease. *Circ Res*, 81(2): 137-44, 1997.
- 54- Abdulla M. Trace elements and free radicals in health and disease. In:prasad AS (ed): "Esential and toxic trace elements in healt and disease. "Newyork:Alan R Liss, 409-414, 1988.
- 55- Karakaya A: Oksijen serbest radikalleri ve toksikolojide önemi. *Toksikoloji Bülteni*, Sayı 14, ss:1, 1996.
- 56- Bekerecioğlu M, Uğraş S, Dilek ON, Tercan M, Özyazgan İ: Serbest radikaller; temel görüşler, biyokimyası, fizyopatolojisi ve cerrahi ile ilgileri. *Sendrom*, mart, ss: 85-95, 1998.
- 57- Riebenfeld D: Roche Bilimsel Eserler Serisi, Oksijen radikalleri dergisi, İstanbul, 1-27, 1996.
- 58- Hernandez LA, Grisham MA, Granger DN: A role iron in oxidant-mediated ischemic injury to intestinal microvasculature. *Am J Physiol*, 253: G49-G53, 1987.
- 59- Athar M, Abdulla M, Sultana S, Favler A, Pero R: Free radicals and trace elements. *The Journal of Trace Elements İn Experimental Medicine*, 6:65-73, 1993.
- 60- Wei YH: Mitochondrial DNA mutations and oxidative damage in aging and diseases: an emerging paradigm of gerontology and medicine. *Proc Natl Sci Counc Repub China B*, 22(2): 55-67, 1998.

- 61- Reily PM, Schiller HJ, Bulkley GB: Pharmacologic approach to tissue injury mediated by free radicals and reactive oxygen metabolites. *Am J Surg*, 161: 488, 1991.
- 62- Escureescut E: Cerebral ischemic cascade. *Ann Fr Anesth Reanim*, 14(1): 103-13, 1995.
- 63- Bulkley GB: The role of oxygen free radicals in human disease process. *Surgery*, 94: 407, 1983.
- 64- Karaaslan Y: İnflamasyon ve mediyatörleri-III. İlaç ve tedavi dergisi. Cilt 9, sayı 9, 550-52, 1996.
- 65- Ansari NH, Zhang W, Fulep E, Mansour A: Prevention of pericyte loss by trolox in diabetic rat retina. *J Toxicol Environ Health*, 54(6): 467-75, 1998.
- 66- Gürbüz O. Antioksidanların dermatolojide kullanımı. Serbest radikaller ve antioksidanlar araştırma derneği, I. Ulusal Kongresi Program ve özet kitapçığı, ss: 7, 1997.
- 67- Köse K, Doğan P, Kardaş Y, Saraymen R. Lipid peroxidation and antioxidant activity in rheumatoid arthritis. *Tr J of Medical Sciences*, 22:31-34, 1994.
- 68- Furchgott RF, Zawadzki JV: The obligatory role of endothelial cells in the relaxation of arterial smooth muscle by acetylcholine. *Nature*, 288: 373-76, 1980.
- 69- Lowenstein CJ, Dinerman JL, Synder SH: Nitric oxide; a physiologic messenger. *Ann Intern Med*, 120: 227-237, 1994.
- 70- Kayaalp SO: Rasyonel tedavi yönünden tıbbi farmakoloji. Cilt-III, altıncı baskı, 3018-3021, 1993.
- 71- Anggard E: Nitric oxide: mediatör, murderer, and medicine. *The lancet*, 343: 1199-1206, 1994.
- 72- Ignarro LJ, Lippton H, Edwards JC, Baricos WH, Hyman AL, et al: Mechanism of vascular smooth muscle relaxation by organic nitrates, nitrites, nitroprusside and nitric oxide:evidence for the involvement of S-nitrosothiols as active intermediates. *J Pharmacol Exp Theup*, 218: 739-49, 1981.
- 73- Moncada S: Endogenous nitric oxide:physiology, pathology and clinical relevance. *Eur J Clin Invest*, 21: 361-374, 1991.

- 74- Nussler AK, Billiar TR: Inflammation, immunoregulation, and inducible nitric oxide synthase. *J Leuk Biol*, 54: 171-178, 1993.
- 75- Liu P, Yin K, Nagele R, Wong PYK: Inhibition of nitric oxide synthase attenuates peroxynitrite generation, but augments neutrophil accumulation in hepatic ischemia-reperfusion in rats. *J Pharmacol Exp Theup*, 284: 1139-1146, 1998.
- 76- Panza JA, Castro PR, Cilcoyne CM, Quyyum AA: Role of endothelium derived nitric oxide in the abnormal endothelium dependent vascular relaxation of patients with essential hypertension. *Circulation*, 87: 1468-1474, 1993.
- 77- Lui P, Hock EC, Nagele R, Wong PY K: Formation of nitric oxide, superoxide and peroxynitrite in myocardial ischemia-reperfusion in rats. *Am J Physiol*, 272: H2327-H2336, 1997.
- 78- Radomski MW, Palmer RMJ, Moncada S: L-arginine-nitric oxide pathway prevent in human platelets regulates aggregation. *Proc Natl Acad Sci*, 87: 5193- 5197, 1990.
- 79- Johnson G, Tsao PS, Lefer DN: Cardioprotective effects of authentic nitric oxide in myocardial ischemia with reperfusion. *Crit Care Med*, 39: 244-249, 1991.
- 80- Padmaja S, Huie RE: The reaction of nitric oxide with organic peroxy radicals. *Biochem Biophys Res Commun*, 195: 539-544, 1993.
- 81- Stamler JS, Singel DJ, Loscalzo J: Biochemistry of nitric oxide and its redox-activated forms. *Science*, 258: 1898-1902, 1992.
- 82- Koepfel TA, Thies JC, Schemmer P, Trauner M, Gebhard MM, Otto G, Post S: Inhibition of nitric oxide synthesis in ischemia/reperfusion of the rat liver is followed by impairment of hepatic microvascular blood flow. *J Hepatol*, 27(1): 163-9, 1997.
- 83- Yang BC, Mehta JL: Inhibition of nitric oxide does not affect reperfusion-induced myocardial injury, but it prevents lipid peroxidation in the isolated rat heart. *Life Sci*, 61(3): 229-36, 1997.
- 84- Shiraishi M, Hiroyasu S, Nagahama M, Miyaguni T, Higa T, Tomori H; Okuhama Y, Kusano T, Muto Y: Role of exogenous L-arginine in hepatic ischemia-reperfusion injury. *J Surg Res*, 69(2): 429-34, 1997.

- 85- Shokes DA, Xie Y, Gonzales NF: Nitric oxide synthase activity in renal ischemia-reperfusion injury in the rat. *Transplantation*, 63(4): 495-500, 1997.
- 86- Dagher F, Pollina RM, Rogers DM, Gennaro M, Ascer E: The value and limitations of L-arginine infusion on glomerular and tubular function in the ischemic/reperfused kidney. *J Vasc Surc*, 21(3): 453-459, 1995.
- 87- Schramm L, Heidbreder E, Schmitt A, Kartenbender K, Zimmermann J, Ling H, Heidland A: Role of L-arginine-derived NO in ischemic acute renal failure in the rat. *Ren Fail*, 16(5): 555-69, 1994.
- 88- Rossaint R, Falke KJ, Lopez F, Slama K, Pison U, Zapol WM: Inhaled nitric oxide for the adult respiratory distress syndrome. *N Eng J Med*, 328: 399-450, 1993.
- 89- Rehman A, Whiteman M, Halliwell B: Scavenging of hydroxyl radicals but not of peroxynitrite by inhibitors and substrates of nitric oxide synthases. *Br J Pharmacol*, 122: 1702-1706, 1997.
- 90- Dikshit M, Chari SS, Seth P, Kumari R: Interaction of nitric oxide synthase inhibitors and their D-enantiomers with rat neutrophil luminol dependent chemiluminescence response. *Br J Pharmacol*, 119: 578-582, 1996.
- 91- Kayaalp SO: Gut tedavisinde kullanılan ilaçlar. *Rasyonel Tedavi Yönünden Tıbbi Farmakoloji*, cilt 2, altıncı baskı, Feryal matbacılık, Ankara, ss: 2086-2087, 1992.
- 92- Gupta PC, Matsushita M, Oda K, Nishikimi N, Sakurai T, Nimura Y: Attenuation of renal ischemia-reperfusion injury in rats by allopurinol and prostaglandin E1. *Eur Surg Res*, 30(2): 102-7, 1998.
- 93- Sameshima T, Miyao J, Oda T, Minoda Y, Yoshida H, Yashimura N: Effects of allopurinol on renal damage following renal ischemia. *Masui*, 44(3): 349-56, 1995.
- 94- Karwinski W, Soreide O: Allopurinol improves scavenging ability of the liver after ischemia/reperfusion injury. *Liver*, 17(3): 139-43, 1997.
- 95- Castelli P, Condemi AM, Brambillasca C, Fundaro P, Botta M, Lemma M, Vanelli P, Santoli C, Gatti S, Riva E: Improvement of cardiac function by allopurinol in patients undergoing cardiac surgery. *J Cardiovasc Pharmacol*, 25(1): 119-25, 1995.

- 96- Roveri A, Coassin M, Maiorino M, et al: Effect of hydrogen peroxide on calcium homeostasis in smooth muscle cells. *Arch Biochem Biophys*, 297(2): 265-70, 1992.
- 97- Obata T, Yamanaka Y: Protective effect of diltiazem on myocardial ischemic injury associated with OH[•] generation. *Comp Biochem A Physiol*, 117(2): 257-61, 1997.
- 98- Vanella A, Sorrenti V, Castorina C, Campisi A, Di-Giacomo C, Russo A, Perez R: Lipid peroxidation in rat cerebral cortex during post-ischemic reperfusion: effect of exogenous antioxidants and Ca⁺⁺-antagonist drugs. *Int J Dev Neurosci*, 10(1): 75-80, 1992.
- 99- Mak IT, Boehme P, Weglicki WB: Antioxidant effects of calcium channel blockers against free radical injury in endothelial cells. *Circ Res*, 70(6): 1099-103, 1992.
- 100- Pepine CJ: The role of calcium antagonist in ischaemic heart diseases. *Eur Heart J*, 16: 19-24, 1995.
- 101- Ichihara K, Haneda T, Onodera S, Abiko Y. Inhibition of ischemia-induced subcellular redistribution of lysosomal enzymes in the perfused rat heart by the calcium entry blocker, diltiazem. *J Pharmacol Exp Ther*, 242(3): 1109-1113, 1987.
- 102- Goncalves T, Carvalho AP, Oliveira CR: Antioxidant effect calcium antagonist on microsomal membranes isolated from different brain areas. *Eur J Pharmacol*, 204(3): 315-22, 1991.
- 103- Neumayer HH, Gelert J, Luft FC: Calcium antagonist and renal protection. *Ren Fail*, 15(3): 353-8, 1993.
- 104- Iversen LL: Pharmacological approaches to the treatment of ischaemic neuronal damage. *Eye*, 5(2): 193-7, 1991.
- 105- Napoli C, Chiariello M, Palumbo G, Ambrosio G: Calcium channel blockers inhibit human low-density lipoprotein oxidation by oxygen radicals. *Cardiovasc Drugs Ther*, 10(4): 417-24, 1996.
- 106- Kayaalp SO: Rasyonel tedavi yönünden tıbbi farmakoloji, Cilt 3, altıncı baskı, ss: 2566-2625, Ankara, Feryal matbaacılık, 1993.

- 107-Granger DN, Kvietsy PR, Perry MA: Leukocyte-endothelial cell adhesion induced by ischemia and reperfusion. *Can J Physiol Pharmacol*, 71(1): 67-75, 1993.
- 108-Werns SW, Lucchesi BR: Myocardial ischemia and reperfusion: the role of oxygen in tissue injury. *Cardiovasc Drugs Ther*, 2(6): 761-9, 1989.
- 109-Fantone JC, Ward PA: Role of oxygen-derived free radicals and metabolites in leukocyte-dependent inflammatory reaction. *Am J Pathol*, 107: 397-418, 1982.
- 110-Hess ML, Mansson NH: The paradox of steroid therapy: Inhibition of oxygen free radicals. *Circ Shock*, 10:1-5, 1983.
- 111-Korompilias AV, Chen LE, Seaber AV, Urbaniak JR: Actions of glucocorticosteroids on ischemic-reperfused muscle and cutaneous tissue. *Microsurgery*, 17(9): 495-502, 1996.
- 112-Flower RJ, Blackwell GJ: Anti-inflammatory steroids induce biosynthesis of a phospholipase A₂ inhibitor which prevents prostaglandin generation. *Nature*, 278: 456, 1979.
- 113-Moncada S and Palmer R M J: Inhibition of the induction of nitric oxide synthase by glucocorticoids: yet another explanation for their anti-inflammatory effects?. *TIPS*, 12:130-131, 1991.
- 114-Steven HY, Joseph A: Lipoperoxides in plasma as measured by liquid chromatographic separation malondialdehyde. Thiobarbituric Acid Adduct *Clin Chem*, 33(2): 214-220, 1987.
- 115-Propket EB, Mils B, Arington JB, Sabin LH: Laboratory methods in histotechnology. *Armed Force Inst of Pathology, Washington*, P:134-135, 1992.
- 116-Fışkın K, Yeşilada Ö, Yılmaz İ, Hamamcı D: The role of radical scavengers, reduced glutathione in hepatic ischemia/reperfusion injury and the protective effects of allopurinol, superoxide dismutase, verapamil and vitamin E. *Tr J of Biology*, 19: 129-136, 1995.
- 117-Stein HJ, Hinder RA, Osthuizen MJ: Gastric mucosal injury caused by hemorrhagic shock and reperfusion: protective role of the antioxidant glutathione. *Surgery*, 108: 467-74, 1990.
- 118-Parks DA, Granger DN: Contributions of ischemia and reperfusion to mucosal lesion formation. *Am J Physiol*, 250: G749-G753, 1986.

- 119-Yu DS, Char DL, Chang SY, Ma CP: Pathogenesis of ischemia reperfusion injury of the kidney after transient renal arterial clamping in rats. *J Formos Med Assoc*, 97(9): 606-13, 1998.
- 120-Cristol JP, Thiemermann C, Mitchell JA, Walder C, Vane JR: Support of renal blood flow after ischemia-reperfusion injury by endogenous formation of nitric oxide and of cyclo-oxygenase vasodilator metabolites. *Br J Pharmacol*, 109(1): 188-94, 1993.
- 121-Konya L, Bencshat P, Szenasi G, Takacs L, and et al: Effect of free radical in ischemic renal failure in the dog. *Acta Physiol Hung*, 76(4): 319-31, 1990.
- 122-Lopez NF, Toledo LH, Suzuki S, Mirmiran R. Protective effect of combined allopurinol and verapamil at reperfusion in severe renal ischemia. *J Invest Surg*, 8(1):57-63, 1995.
- 123-Carl AB, Edward R: Ürea and creatinine biochemistry and physiology. *Teitz Textbook of Clinical Chemistry*, Second edition, W.B Saunders Company, U.S.A, pp: 1528-1544, 1994.
- 124-Moncada S, Palmer RMJ, Higgs EA: Nitric oxide: physiology, pathophysiology and pharmacology. *Pharmacol Rev*, 43: 109-142, 1991.
- 125-Huk I, Nanobashvili J, Neumayer C, Punz A, et al: L-Arginine treatment alters the kinetics of nitric oxide and superoxide release and reduces ischemia-reperfusion injury in skeletal muscle. *Circulation*, 96(2): 667-675, 1997.
- 126-Chintala MS, Chiu PJ, Vemulapalli S, Watkins RW, Sybert EJ: Inhibition of endothelial derived relaxing factor (EDRF) aggravates ischemic acute renal failure in anesthetized rats. *Naunyn Schmiedeberg's Arch Pharmacol*, 348(3): 305-10, 1993.
- 127-Salom MG, Ramirez P, Carbonell LF, Lopez CE, Cartagena J, Quesada T, Parrilla P, Fenoy FJ: Protective effect of N-acetyl-L-cysteine on the renal failure induced by inferior vena cava occlusion. *Transplantation*, 65(10):1315-21, 1998.
- 128-Garcia FJ, Eleno N, Santos BF, Valdunciel JJ, and et al. Protective effect of exogenous nitric oxide on the renal function and inflammatory response in a model of ischemia-reperfusion. *Transplantation*, 66(8): 982-90, 1998.
- 129-Saran M: Reaction of NO with O_2^- implications for the action of endothelium-derived relaxing factor (EDRF). *Free Rad Res Commun*, 10: 221-226, 1999.

- 130-Ischiropoulos H, Chen J, Tsai J, et al: Peroxynitrite (ONOO^-) reacts with superoxide dismutase to give the reactive nitronium ion. *Free Rad Biol Med*, 9(SI): 131, 1990.
- 131-Hogg N, Darley UV, Wilson M, Moncada S: Production of hydroxyl radicals from the simultaneous generation of superoxide and nitric oxide. *Biochem J*, 281: 419-424, 1992.
- 132-Cristol JP, Thiernemann C, Guerin MC, Torreilles J, de Paulet AC: L-arginine infusion after ischemia-reperfusion of rat kidney enhances lipid peroxidation. *J Lipid Mediat Cell Signal*, 13(1): 9-17, 1996.
- 133-Pryor WA, Squadrito GL: The chemistry of peroxynitrite: a product from the reaction of nitric oxide with superoxide. *Am J Physiol*, 268(37): L699-L722, 1995.
- 134-Beal MF: Oxidative damage in neurodegenerative disease. *Neuroscientist*, 321-27, 1997.
- 135-Coeroli L, Renolleau S, Arnaud S, Plotkine D, Cachin N, Plotkine M, Ben Ari Y, Charriaut MC: Nitric oxide production and perivascular tyrosine nitration following focal ischemia in neonatal rat. *J Neurochem*, 70(6): 2516-25, 1998.
- 136-Lefer DJ, Scali R, Champbell B, Nossuli T, Hayward R, Salamon M, Grayson J, Lefer AM: Peroxynitrite inhibits leukocyte-endothelial cell interactions and protects against ischemia-reperfusion injury in rats. *J Clin Invest*, 99: 684-691, 1997.
- 137-Tsao PS, Aoki N, Lefer DJ, Johnson G, Lefer AM: Time course of dysfunction and myocardial injury during myocardial ischemia and reperfusion in the rat. *Circulation*, 82: 1402-1412, 1990.
- 138-Tolins JP, Palmer RM, Moncada S, Rajj L: Role of endothelium-derived relaxing factor in regulation of renal hemodynamic responses. *Am J Physiol*, 258: H655-H662, 1990.
- 139-Mashiach E, Sela S, Winaver J, Shasha SM, Kristal B: Renal ischemia - reperfusion injury: contribution of nitric oxide and renal blood flow. *Nephron*, 80(4): 458-67, 1998.

- 140-Weigh SC, Furness PN, Nicholson ML: Nitric oxide generation is increased in experimental renal warm ischemia-reperfusion injury. *Br J Surg*, 85(12): 1663-8, 1998.
- 141-Hibbs J, Taintor R, Vavrin Z, Rachlin E: Nitric oxide: a cytotoxic activated macrophage effector molecule. *Biochem Biophys Res Commun*, 157: 87-94, 1988.
- 142-Belenky SN, Robins RA, Rennard SI, Gossman GL, Nelson KJ, Rubinstein I: Inhibitors of nitric oxide synthase attenuate human neutrophil chemotaxis in vitro. *J Lab Clin Med*, 122: 388-394, 1993.
- 143-Yamazaki I, Soma T, Ichicava Y, Iwai Y, Kondo J, Matsumoto A: Usefulness of allopurinol for prevention of myocardial reperfusion injury in open heart surgery. *Nippon Kyobu Geka Gakkai zasshi*, 43(1): 26-31, 1995.
- 144-Akgur FM, Kilinc K, Aktug T, Olguner M: The effect of allopurinol pretreatment before detorting testicular torsion. *J Urology*, 151(6): 1715-7, 1994.
- 145-Aricoglu A, Aydin S, Turkozhan N, Durmus O: The effect of allopurinol on Na^+K^+ ATPase related lipid peroxidation in ischemic and reperfused rabbit kidney. *Gen Pharmacol*, 25(2): 341-4, 1994.
- 146-Petho SA, Mielke W, Vettelein F, Schmidt G: Effects of diltiazem and allopurinol in postischemic microcirculatory changes in the rat kidney. *Int J Microcirc Clin Exp*, 10(2): 155-68, 1991.
- 147-Cohen JP: Allopurinol administered prior to hepatic ischemia in the rat prevents chemiluminescence following restoration of circulation. *Can J Anesth*, 39(10): 1090-1093, 1992.
- 148-Jacobsen WK, Schell RM, Matsumura JS, Cole DJ, Stier GR, Martin RD, Fandrich BL: Nitrendipine and superoxide dismutase in ischemic renal injury. *Ren Fail*, 16(6): 697-705, 1994.
- 149-Wang XD, Deng XM, Hareldsen P, Andersson R, Ihse I: Antioxidant and calcium channel blockers counteract endothelial barrier injury induced by acute pancreatitis in rats. *Scand J Gastroenterol*, 30(11): 1129-36, 1995.
- 150-Tsubota S, Adachi N, Chen J, Yoruzoya T, Nagaro T, Arai T: Dexamethasone changes brain monoamine metabolism and aggravates ischemic neuronal damage in rats. *Anesthesiology*, 90(2): 515-23, 1999.

- 151-Günel E, Caglayan F, Caglayan O, Dilsiz A, Duman S, Aktan M. Treatment of intestinal reperfusion injury using antioxidative agents. *J Pediatr Surg*, 33(10): 1536-9, 1998.
- 152-Scheuer DA, Mifflin SW: Chronic corticosterone treatment increases myocardial infarct size in rats with ischemia-reperfusion injury. *Am J Physiol*, 272(6 Pt 2): R2017-24, 1997.