



T.C.

ADNAN MENDERES ÜNİVERSİTESİ

TIP FAKÜLTESİ

FİZYOLOJİ ANABİLİM DALI

RATLARDA ALT EKSTREMİTE İSKEMİ REPERFÜZYON HASARINA

KARNOZİNİN ETKİSİ

UZMANLIK TEZİ

DR. BİLGE ALAÇAM

DANIŞMAN

Yrd. Doç. Dr. Sadun TEMOÇİN

AYDIN 2008

T.C.
ADNAN MENDERES ÜNİVERSİTESİ
TIP FAKÜLTESİ
FİZYOLOJİ ANABİLİM DALI

**RATLARDA ALT EKSTREMİTE
İSKEMİ REPERFÜZYON HASARINA
KARNOZİNİN ETKİSİ**

UZMANLIK TEZİ

DR. BİLGE ALAÇAM

DANIŞMAN

Yrd. Doç. Dr. Sadun TEMOÇİN

AYDIN 2008

Bu araştırma ADÜ Araştırma Fon Saymanlığı Tarafından TF11- 07011 sayı ile
desteklenmiştir.

TEŞEKKÜR

FİZYOLOJİ uzmanlık eğitimim süresince, bilgi ve tecrübeleriyle eğitimimde büyük katkı ve emekleri olan, her konuda destek ve yardımlarını gördüğüm sayın hocalarım; Yrd. Doç. Dr. Sadun TEMOÇİN, Yrd. Doç. Dr. R. Onur EK ve Yrd. Doç. Dr. Yüksel YILDIZ' a teşekkür ederim.

Her zaman desteğini yanımda hissettiğim tez danışmanım Yrd. Doç. Dr. Sadun TEMOÇİN' e ayrıca teşekkürlerimi sunmak isterim.

Bu çalışmanın oluşturulması sırasında, tüm aşamalarda sağladığı destek ve yardımları ile tezin tamamlanmasında büyük katkıları olan; Biyokimya Anabilim Dalı' ndan Yrd. Doç. Dr. Mukadder SERTER, Arş. Gör. Dr. Ece DEMİR' e ve Histoloji–Embriyoloji Anabilim Dalı' ndan sevgili arkadaşım Arş. Gör. Dr. Tülün BOYLU ve destek veren tüm arkadaşlarıma teşekkür ederim.

Tüm tıp eğitimim boyunca maddi ve manevi olarak desteklerini her zaman yanımda hissettiğim, değerli aileme ve eşim Dr. H. Özgür ALAÇAM' a ve biricik oğluşuma sonsuz sevgi ve saygılarımı sunar, teşekkür ederim.

Dr. Bilge ALAÇAM

İÇİNDEKİLER

	Sayfa
TEŞEKKÜR	I
İÇİNDEKİLER	II
SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ	III
1- GİRİŞ	1
2- GENEL BİLGİLER	2
2.1. İskemi	2
2.2. Reperfüzyon	6
2.3. İskemi – Reperfüzyon Modelleri	7
2.4. Aort Kros-Klempin Sistemik Etkileri	7
2.5. Aortik İskemi-Reperfüzyona Bağlı Gelişen Uzak Organ (Akciğer) Hasarı	10
2.6. Serbest Radikaller	12
2.7. Antioksidanlar	16
2.8. Lipid Peroksidasyonu	19
2.9. İskemi Reperfüzyon Hasarını Önlemek İçin Tedavi Stratejileri	20
2.10. Karnozin	21
3- GEREÇ ve YÖNTEMLER	26
3.1. Deney Grupları	26
3.2. Aortik Oklüzyon ve İskemi-Reperfüzyon Modeli	27
3.3. Biyokimyasal İşlemler	27
3.4. İstatistiksel Analiz	31
4- BULGULAR	32
4.1. Biyokimyasal Bulgular	32
TARTIŞMA	61
SONUÇ	68
ÖZET	69
İNGİLİZCE ÖZET (SUMMARY)	70
KAYNAKLAR	72

SİMGELER VE KISALTMALAR

AGE	: İleri Glikasyon Son Ürünleri
AİR	: Aortik İskemi Reperfüzyon
EDTA	: Etilen Dinitrilotetra Asetik Asit
GSSG	: Okside Glutasyon
GSH	: Redükte Glutasyon
GSH-Px	: Glutasyon Peroksidaz
GR	: Glutasyon Redüktaz
H₂O₂	: Hidrojen Peroksit Radikali
HOCL	: Hipoklorik Asit
İAA	: İnfrarenal Abdominal Aorta
İ/R	: İskemi/Reperfüzyon
İRH	: İskemi Reperfüzyon Hasarı
İP	: İntraperitoneal
KAT	: Katalaz
KAR	: Karnozin
MDA	: Malonil Dialdehit
MPO	: Myeloperoksidaz
NO	: Nitrik Oksit
NO₂	: Azot Dioksit
NO₂⁻	: Nitronyum İyonu
O₂⁻	: Süperoksit Radikali
OH⁻	: Hidroksil Radikali
PAF	: Trombosit Aktive Edici Faktör
PMNL	: Polimorfonükleer Lökosit
SOD	: Süperoksit Dismutaz
SR	: Serbest Radikal
SOR	: Serbest Oksijen Radikali
TAK	:Total Antioksidan Kapasitesi
tGSH	: Total Glutasyon
TNFα	:Tümör Nekroz Faktör Alfa
TNF	:Tümör Nekroz Faktör

1- GİRİŞ

Yapılan çalışmalar, artmış serbest oksijen radikalleri ve lipid peroksidasyonunun, birçok hastalığın patogeneğinde rol aldığını göstermektedir (1, 2, 3). Miyokard enfarktüsü gibi kardiyolojik hastalıklar, bazı nörolojik hastalıklar, astım, diabetes mellitus, romatoid artrit gibi romatolojik hastalıklar, kanser ve yaşlanma dahil birçok hastalığın oksidatif stres ile ilişkisi gösterilmiştir (1, 2, 3, 4, 5, 6, 7).

İskemi, hücre enerji düzeyinin düşmesine ve toksik metabolitlerin dokuda birikimine yol açarak, hücre fonksiyon bozukluğundan, hücre ölümüne kadar giden bir dizi biyokimyasal reaksiyonu başlatır (5). İskemik dokunun tekrar kanlanması reperfüzyondur, enerji gereksiniminin geri kazanılması ve toksik metabolitlerin ortamdan uzaklaştırılması için gereklidir. Ancak, iskemi sırasında oluşmuş toksik metabolitlerin ve çeşitli inflamatuvar mediatörlerin sistemik dolaşıma geçmesi ile ciddi metabolik bozukluklar oluşabilir ve reperfüzyon daha ileri doku hasarına yol açabilir (6, 7). İskemi Reperfüzyon Hasarı (İRH), hipoksik organın tekrar oksijenlenmesinin ardından ortaya çıkan hücresel hasarlanmadır (8). Bu hasardaki patolojik bozukluklar, İRH' nin yol açtığı lokal ve sistemik etkiler, vasküler cerrahide önemli sorunlara yol açar. Alt ekstremitelerde akut İRH, özellikle aort cerrahisinde abdominal aortaya geçici süre kros-klemp uygulanması sırasında ve tek veya çift taraflı akut femoral arter tıkanıklıklarında ortaya çıkmaktadır (7,8).

İskemi altındaki ekstremitelerde lokal doku hasarı, iskemik alanın dışındaki bölgelerde de uzak organ hasarı oluşabilir. Özellikle alt ekstremitelerde iskemi/reperfüzyon (İ/R)' u sonrasında oluşan uzak organ hasarında, akciğerler hedef organ konumundadır ve bu durum klinik olarak önem taşımaktadır (9). Akciğerlerde oluşan bu hasara lenfositler, pulmoner arteriel endotel hücreleri, alveoler makrofajlar, pulmoner alveoler tip II hücreleri aracılık etmektedir (10 - 14).

Karnozin (KAR) (β -alanyl-L-histidine), 1900'lerde keşfedilmiş bir nöropeptiddir. Kas ve sinir dokuda geniş dağılım gösterir (15). Karnozinin antioksidan etkisi ilk kez 1984'de gösterilmiştir (16). Hidroksil ve süperoksit radikallerinin ve çok kuvvetli olarak da singlet oksijen molekülünün temizleyicisidir. Bu özelliği nedeniyle beyin, böbrek ve iskelet kası İRH'nda KAR'ın koruyucu etkisi araştırılmış ve olumlu sonuçlar alınmıştır (15–16).

Ancak literatürde KAR'ın abdominal aorta İRH ve uzak organ hasarı üzerine etkisi ile ilgili herhangi bir çalışmaya rastlanılamamıştır.

Kan akımının azalması doku hasarına ve çok geçmeden iskemik alanın nekrozuna sebep olur (17). Kan akımının yeniden sağlanması ise İRH dediğimiz, hücre membran yıkımı ve sıvı ekstrasvazasyonu ile ilgili lokal doku kayıplarına ve böbrek, akciğer gibi uzak organların hasarına sebep olacaktır (18). Bu sistemik etkiler reperfüzyon sırasında üretilen toksik serbest oksijen radikallerine bağlanmaktadır. Bununla beraber serbest oksijen radikalleri de organizma tarafından bazı temizleyici sistemlerle yok edilmeye çalışılır (19).

Deneysel olarak serbest oksijen radikallerinin İRH' ndaki etkisini önlemede ksantin oksidaz inhibitörleri ve birçok serbest oksijen radikali temizleyicilerinin etkinliği gösterilmiştir (20 - 24). Bu çalışmadaki amacımız, alt ekstremité İ/R modelinde, KAR'ın İRH'nı önlemedeki rolünü araştırmaktır. İskemi reperfüzyon hasarı belirlemede, İRH'nın genel bir ayırıcı olan malonil dialdehit (MDA), antioksidan mekanizmanın belirleyicisi olarak superoksit dismutaz (SOD), redükte glutatyon (GSH), glutatyon peroksidaz (GSH-Px), katalaz (KAT), total antioksidan kapasite (TAK), nitrik oksit (NO) ve glutatyon reduktaz (GR) seviyeleri, polimorfonükleer lökosit birikiminin göstergesi olarak myeloperoksidaz (MPO) aktivitesi tayini kullanılmıştır.

Karnozinin, aortik iskemi reperfüzyon (AİR) modelinde, uzak organ hasarı ve damar endotelinde oluşan değişikliklere olan etkisi henüz yeterince araştırılmamıştır. Karnozinin, uzak dokularda İRH'ndan koruyucu etkisi ortaya konulabilirse, infrarenal aortaya kros klempin uygulandığı abdominal aort anevrizması operasyonları gibi girişimlerde, reperfüzyon sonrası akciğer ve alt ekstremitéde meydana gelebilecek olumsuz etkilerin önlenmesinde, KAR' in bu etkisinden yararlanılabilir.

2-GENEL BİLGİLER

2.1. İskemi

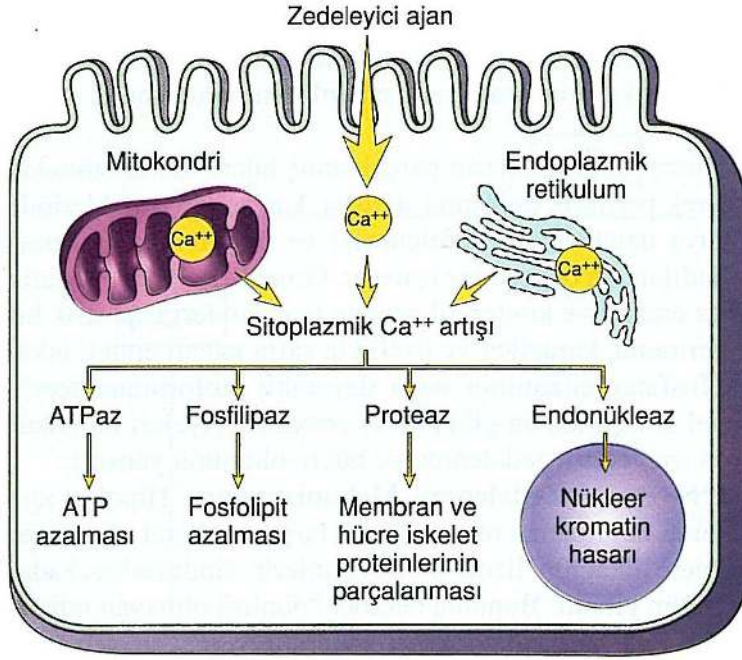
İskemi; dolaşım tarafından dokunun oksijen ve diğer metabolitlere olan ihtiyacının sağlanamaması ve oluşan atık ürünlerin uzaklaştırılamamasıdır. İskemiye bağlı doku hasarında, hücresel enerji depolarının boşalması ve toksik metabolitlerin birikmesi hücre ölümüne neden olur (25, 26). İskemideki hücre zedelenmesinin patogeneğinde, oksijen

yetersizliğinin önemi belirtilmekle birlikte, reaktif oksijen türevleri de hücre ölümünün önemli sorumlularındandır. Serbest radikal türevleri hücre üzerinde lipid peroksidasyonu ve diğer zararlı etkilere neden olur (27).

Sitoplazmik serbest kalsiyum (Ca^{+2}) normalde ATP bağımlı kalsiyum taşıyıcıları ile oldukça düşük yoğunluklarda (0.1 M' den az) tutulur. İskemi veya toksinler hücre dışı kalsiyumun plazma membranından içeri akışına yol açar. Bunu hücre içi stoklardan kalsiyumun serbest bırakılması izler. Artan sitoplazmik kalsiyum, birbiri ardına, membran hasarını ilerleten fosfolipazları, yapısal ve membran proteinlerini katabolize eden proteazları, ATP kaybını hızlandıran ATPaz' ları ve genetik materyali parçalayan endonükleazları aktive eder (Şekil1) (27).

İskemi klinik tıpta hücre zedelenmesine yol açan en sık nedendir (27). İskemi dokuları hipoksinin zedelediğinden daha çabuk zedeler. Hipoksinin ilk etkisi hücrenin aerobik solunumu, yani mitokondrilerdeki oksidatif fosforilasyon üzerinedir. Oksijen basıncının azalması sonucu hücre içi ATP üretimi belirgin olarak azalır. ATP azalmasının hücre içindeki birçok sistem üzerinde etkisi olur (27).

Yukarıda da tanımlandığı gibi iskemi sonucunda sitoplazmik serbest Ca^{+2} da bir artış vardır. Ayrıca, plazma membranı ATP bağımlı sodyum pompasının aktivitesi azalır. Bunu sodyumun hücre içinde birikimi ve potasyumun hücre dışına çıkışı izler. Sodyumun hücre içi net artışı, suyun izoozmotik artışı ile birlikte olup, akut hücresel şişmeye neden olur. Bu şişme inorganik fosfatlar, laktik asit ve pürin nükleozitleri gibi diğer metabolitlerin birikimi ile artan ozmotik yükü daha da artar (27).



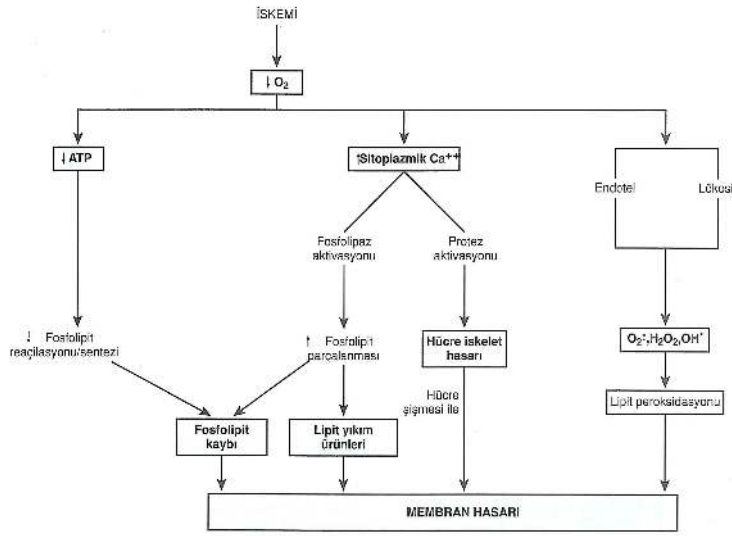
Şekil 1: Hücre zedelenmesinde sitoplazmik kalsiyum artışının kaynakları ve sonuçları. (27)

Hücresel ATP' de azalma ile birlikte, adenosin monofosfatta artma da, fosfofruktokinaz enzimini uyararak, glikojenden ATP üretimi ile hücrenin enerjisini temin amacıyla gelişen anaerobik glikoliz hızını artırır. Sonuç olarak glikojen hızla tükenir (27). Artan glikoliz de fosfat esterlerinin hidrolizi ile laktik asit ve inorganik fosfatların birikimine neden olarak, hücre içi pH' nın düşmesine yol açar (27). Sonraki olay ribozomların granüllü endoplazmik retikülumdan ayrılması ve polizomlardan monozomların oluşumu ile protein sentezinin azalmasıdır. Hipoksi düzelmez ise, mitokondrial fonksiyonun daha da kötüleşmesi ve membran permeabilitesinin artması, daha fazla morfolojik bozulmaya neden olur. Tüm hücreler şişmiş gibi görünür. Eğer oksijen eski haline dönerse, yukarıdaki tüm bozukluklar reverzibldir (27). Bununla beraber iskemi devam ederse, irreverzibl zedelenme gelişir. Morfolojik olarak irreverzibl zedelenmeye, mitokondrilerin daha şiddetli vakuolizasyonu ve mitokondri matriksinde şekilsiz ve Ca^{+2} dan zengin yoğunlukların birikimi, plazma membranlarının geniş hasarı ve lizozomların şişmesi eşlik eder (27).

İskeminin hücresel etkileri aşağıdaki şekilde özetlenebilir (28):

- 1-Membran potansiyelinin değişmesi,
- 2-İyon dağılımının değişmesi (intraseküler Ca^{+2} / Na^{+2}),
- 3-Hücresel şişme,

- 4-Hücre iskeletinin disorganizasyonu,
- 5-Artmış hipoksantin,
- 6-Azalmış ATP,
- 7-Azalmış fosfokreatin,
- 8-Azalmış glutatyon,
- 9-Hücre sel asidoz.



Şekil 2: İskemide membran hasarının mekanizmaları (27).

Membran hasarının birçok potansiyel nedeni vardır (27) (Şekil 2).

- 1- Membran fosfolipitlerinin ilerleyici kaybı: İskemiy e bağı lı stoplazmik Ca^{+2} artışı ile endojen fosfolipazların aktivasyonu artan parçalanmaya yol açabilir.
- 2- Hücre iskelet anormallikleri: Hücre iç i Ca^{+2} artması ile aktive olan proteazlar hücre çatısına zarar verebilirler.
- 3- Toksik oksijen radikalleri: İndirgenmiş oksijen türevleri hücre membranına ve elemanlarına zarar verirler. Bu gibi oksijen radikalleri, iskemik dokularda, özellikle kan akımının düzelmesinden sonra artar. Toksik oksijen türevlerinin büyük ölçüde, reperfüzyon sırasında zedelenme alanına gelen polimorfonükleer lökosit (PMNL)' ler tarafından oluşturulduğu düşünülmektedir (27).
- 4- Lipit yıkım ürünleri: Fosfolipit parçalanması sonucu iskemik hücrelerde biriken bu katabolik ürünler, membranlar üzerinde deterjan etkisi yapar.

Membran hasarının mekanizmaları ne olursa olsun sonuç, yukarıda tanımlanan olaylarla Ca^{+2} , un bol miktarda hücre içine girmesidir (27) (Şekil 2).

2.2. Reperfüzyon

İskemik dokuda, hem hücrenin rejenerasyonu, hem de toksik metabolitlerin temizlenmesi için, yeniden kan akımının sağlanması gerekir. Ancak iskemik dokunun reperfüzyonu bir dizi olayın başlaması ile paradoksal olarak doku hasarına yol açar (26). Reperfüzyon döneminde dokuda nötrofil infiltrasyonu, kopleman sisteminin aktivasyonu, kalsiyum aracılı proteazların aktivasyonu, araşidonik asit (AA) metabolizması gibi pek çok sistem, serbest radikal (SR) oluşumunu artırarak, hasara neden olmaktadır (26). Şok, yanık, sepsis, pankreatit gibi olgularda ortaya çıkan hipovolemi ile iskemi ve bu durumların düzeltilmesi ile de reperfüzyon hasarı ortaya çıkmaktadır (26,29). Serebrovasküler olaylarda, myokard enfarktüsünde uygulanan trombolitik tedavi veya revaskülarizasyon ameliyatları da yine reperfüzyon hasarına neden olmaktadır (26). Travmalarda ve travma cerrahilerinde hipovolemi yada kanama kontrolü nedeniyle yapılan klemp, tampon uygulamaları iskemiye neden olurken, resusitasyon sonrası mutlak bir reperfüzyon ile yine İRH gündeme gelmektedir (26,29). Kardiovasküler cerrahide aort yada periferik arter klemp uygulaması sonrası ortaya çıkan tablo İRH ile karakterizedir. Transplantasyon cerrahisinde kaçınılmaz olarak transplante edilecek organın iskemi ve reperfüzyonu söz konusu olup, oluşan hasar greft fonksiyonlarını etkilemektedir. Özetle neredeyse bütün cerrahi işlemler sırasında dokuların iskemisi ve sıklıkla bunu takip eden bir reperfüzyon periyodu vardır (26).

Daha önce de belirtildiği gibi iskemik dokuların reperfüzyonu, toksik serbest oksijen radikali (SOR) oluşumuna yol açar. Bunlar süperoksit anyonlar (O_2^-), hidroksil radikalleri (OH^-), hipoklorik asit (HOCl), hidrojen peroksit (H_2O_2) ve nitrik oksitten derive peroksinitrittir (29). Oksijen kökenli serbest radikal aracılığı ile oluşan hasarda ilk basamak, ksantin oksidaz kökenli O_2^- anyonlarının üretilmesidir (30). İskemi sırasında hücre ATP, hipoksantin oluşturmak üzere indirgenir. Normal koşullarda hipoksantin, ksantin dehidrogenaz yardımıyla ksantine oksidize edilir. Ancak iskemi sırasında ksantin dehidrogenaz, ksantin oksidaza dönüştürülür. Substrat olarak nikotinamid adenin dinükleotid kullanan ksantin dehidrogenazın tersine, ksantin oksidaz oksijeni kullanır ve bundan dolayı iskemi sırasında hipoksantin ksantine dönüşümünü katalize edemez ve buda hipoksantin dokuda aşırı

seviyelere çıkmasına yol açar. Reperfüzyonla oksijen tekrar sunulduğunda, fazla miktardaki hipoksantin ksantin oksidaz ile dönüştürülmesi toksik SOR oluşumu ile sonuçlanır (29). Sellüler ve subsellüler membranların lipid peroksidasyonu da, oksijen kökenli SR' in artırdığı hücre hasarında önemli bir mekanizmadır (31). Hücre membranları içerisinde poliansatüre yağ asitlerinin lipid peroksidasyonu, hücresel bütünlük ve fonksiyon kaybı ile sonuçlanabilir. Bu durum tek başına OH^- radikalleri ile başlatılabileceği gibi, uygun bir şelatör varlığında O_2^- ile de başlatılabilir (27).

2.3. İskemi-Reperfüzyon Modelleri

Dokuların total iskemiye dayanma süreleri araştırılırken ve fizyopatoloji daha iyi anlaşıldıkça, çeşitli hayvan türlerinde, klinikte rastlanılan durumlara uygun modeller geliştirilmiştir.

İskemi modelleri; (32)

- 1- Total arteriel: Arteriel kan akımının tam olarak durdurulması,
- 2- Total Venöz: Ven akımının dışarıdan (bası, bükülme, v.s.) veya içeriden (tromboemboli) kaynaklanan bir nedenle kesilmesi,
- 3- Total global: Dokuya gelen ve dönen kan akımının tam kesilmesini ifade eder,
- 4- Kısmi venöz: Ven duvarının arter duvarına göre ince ve zayıf olması, dışarıdan olacak bası ve bükülmelerden daha fazla etkilenme sebebidir ve kısmi etki yaratılabilir.

Biz çalışmamızda, uygulama kolaylığı ve referans olarak aldığımız çalışmalarda daha sıklıkla kullanılmış olması nedeniyle, total arteriyel kan akımının durdurulması modelini tercih ettik.

2.4. Aort Kros Klempin Sistemik Etkileri

İskemi, organ veya dokuyu perfüze eden kan akımındaki yetersizliğe bağlı olarak gelişen, geriye dönüşümlü veya dönüşümsüz hücre ve doku zedelenmesine neden olmaktadır

(33). İskemi sonrasında hücrelerde pek çok metabolik ve yapısal değişiklikler oluşmaktadır. Bunlardan biri; iskeminin hücrede oksidatif fosforilasyonu bozarak hücre içinde adenozin trifosfat (ATP) ve fosfokreatin sentezinde azalmaya yol açmasıdır. Bu durum, hücre membranının ATP' ye bağımlı iyonik pompa fonksiyonunu bozarak, hücreye daha fazla kalsiyum, sodyum ve su girmesi ile sonuçlanmaktadır. İyonik pompa fonksiyon bozukluğunu takiben mitokondrial ve lizozomal harabiyet meydana gelir. Lizozomal proteolitik enzimlerin sitoplazmayı sindirmeleriyle hücre ölümü ortaya çıkar (34). İskemi sırasında, adenin nükleotidinin yıkımı da artmaktadır. Bu durum ise SOR prekürsörü hipoksantin hücre içi birikimini artırmaktadır. İskemi sonrasında o bölgedeki kan akımının yeniden sağlanması (reperfüzyon) ve hücre içine moleküler oksijenin yeniden sunulması ile birlikte SOR türevleri hızla oluşmaktadır. İskemi aynı zamanda endotel hücrelerinde baz proinflatuvar gen ürünlerinin (lökosit adezyon molekülü, sitokinler vb.) ve biyoaktif bileşiklerin (endotelin, tromboksan A2 vb.) sentezini artırırken, baz koruyucu gen ürünlerinin (yapısal nitrik oksit sentaz, siklooksijenaz-2) ve bu enzimlerin ürünlerinin (nitrik oksit, prostasiklin) ekspresyon ve sentezini baskılamaktadır (34,35). Geri dönüşsüz hücre hasarını önleyebilmek için organa ve dokuya yeniden kan akımının sağlanması gerekmektedir. Ancak reperfüzyonun gerçekleştirilmesi, iskemik dokularda, iskeminin dokuda ve organda oluşturduğu hasardan daha fazla bir hasara yol açabilmektedir (8).

Endotelin, vasküler homeostazisin sağlanmasında önemli rolleri vardır (36). Bunlar;

- 1- Mikrovasküler permeabilitenin sağlanması,
- 2- Damar kontraktilesi,
- 3- Anjiogenezis,
- 4- Koagülasyon,
- 5- Lökosit trafiği,
- 6- İmmünite.

Bu endotelial fonksiyonlar eksojen ve endojen bazı faktörler tarafından düzenlenir. Kan akımı regülasyonu büyük oranda sağlam bir endotelial yapının varlığıyla sağlanır. Endotelial hücrelerin NO ürettiği ve bunun da endotel kaynaklı gevşetici faktör (endotelial derived relaxing factor, EDRF) ile aynı olduğu gösterilmiştir (37). NO veya EDRF, siklik guanilat siklazı stimüle ederek, vasküler düz kaslarda relaksasyona, dolayısıyla vazodilatasyona yol açar. Endotelial hücreler endotelin denen güçlü bir vazokonstriktör maddeyi de üretirler. Endotelial hasar bu vazoaaktif maddelerin salınımının azalmasına sebep olmaktadır (38).

Mikrovasküler permeabilite birçok kimyasal mediatör tarafından kontrol edilir. İskemi reperfüzyon hasarında bu mediatörler aktive olur. Bu maddelerin başında trombosit aktive edici faktör (PAF), bradikinin ve histamin gelir. Bunlar kalsiyumun hem hücre içine hem de dışına olmak üzere iki yönlü mobilizasyonuna sebep olurlar. Endotelial sitozolik kalsiyum miktarında anormal artışla NO ve endotelin gibi güçlü vazodilatör ajanlar salgılanır. Endotelial yüzey normal kan akımının sağlanması için pürüzsüz ve böylece nonkoagülanıdır. Bu durum antitrombin III' ün oluşumunun katalizasyonu ve yüzeyel trombomodülin sayesinde sağlanır (39, 40).

İskemi-reperfüzyon sonrası endotel düzeyindeki patolojik değişiklikler, membran permeabilitesinde artışa sebep olur, bu da nötrofil infiltrasyonuna yol açar. Nötrofil infiltrasyonu İRH' nın patofizyolojisinde önemli bir rol oynar. Nötrofillerin yapısında bulunan nikotin amid adenin dinükleotid fosfat (NADPH) oksidazın aktive olmasıyla, NADPH; NADP⁺ ye , H⁺ e ve 2O₂' e dönüşür, süperoksit anyonları üretilir (41). Rees ve arkadaşları, ksantin oksidaz aktivitesindeki hızlı artışın, nötrofil kemotaktik aktivitesini arttıran serbest radikal oluşumunu sağlayabileceğini ve hücre zarı hasarını başlatabileceğini savunmuşlardır. Nötrofil, dokularda iskemi sonrası serbest oksijen radikali üretimi için potansiyel bir kaynaktır (42).

Postiskemik iskelet kası hasarında, granüositlerin varlığının kanıtı, artmış myeloperoksidaz aktivitesidir. Myeloperoksidaz, nötrofiller tarafından üretilen H₂O₂' den dönüştürülen ve süperoksitten daha toksik olan hipoklorik asiti nötralize eder. Myeloperoksidaz iskemi sırasında orta derecede artarken, reperfüzyonun 15–60. dakikalarında anormal bir artış gösterir (43).

İskemi reperfüzyon hasarının patofizyolojisinde lökositlerin rolü yapılan deneysel çalışmalarla gösterilmiştir. Lökosit filtreleri (44), çeşitli hayvan modellerinde farmakolojik ajanlar (45), radyasyon (46) ve monoklonal antikorlar (47, 48) bu deneysel çalışmalarda kullanılan yöntemlerin birkaçıdır. Bütün araştırmacılar uyguladıkları modellerde lökosit oranlarında azalmanın, İRH'nın azalması ile paralel olduğunu göstermişlerdir. Ancak sebep-sonuç ilişkisi halen araştırılmaktadır. Lökosit miktarında azalmanın lökosit filtreleri gibi yöntemlerle sağlanması sonucu, lipid peroksidasyonunda ve kas nekrozunda azalma tespit edilmiştir (48).

2.5. Aortik İskemi-Reperfüzyona Bağlı Gelişen Uzak Organ (Akciğer) Hasarı

I/R hasarının sadece iskemiye maruz kalmış dokuda sınırlı kalmayıp, diğer uzak organların da sistemik dolaşıma katılmış oksijen radikallerinden, sitokinlerden, kompleman proteinlerinden, prostoglandinlerden, tromboksan gibi birtakım medyatörlerden ve toksik ürünlerden etkilenmiş olduğunu gösterilmiştir (49). Ekstremitelerde meydana gelen akut arteriel oklüzyon sonrası reperfüzyonun yeniden başlaması ile metabolik asidoz, hiperkalemi, myoglobinüri ve böbrek yetmezliğinin geliştiği bildirilmiştir (49). Ayrıca superior mezenterik arterin bir saatlik iskemi ve bir saatlik reperfüzyonu ile, böbrek kan akımında, sodyum ve inülin klirensinde belirgin düşme kaydedilmiştir. Çalışmalarda, oluşan oksidatif etkinin, antioksidan maddeler ile azaltılabileceği de gösterilmiştir (50 - 52).

İskemi-reperfüzyonun uzak doku hasarından en fazla etkilenen organlardan biri akciğerlerdir. Sekonder akciğer hasarı hafif düzeyli disfonksiyondan, akut respiratuvar distrese kadar değişebilir. Alt ekstremitede oluşturulan İ/R sonrası akciğer dokusunda belirgin nötrofil göçü ve kardiyak kökenli olmayan akciğer ödeminin geliştiği bildirilmiştir (53).

2.5.1. Akciğer İskemi Reperfüzyon Hasarı

Akut alt ekstremitte İ/R olayı sonrası ortaya çıkan akciğer hasarı, önemli derecede postoperatif mortalite ve morbiditeye sebep olmaktadır. Hipoksemi, pulmoner hipertansiyon, azalmış akciğer kompliansı ve nonhidrostatik pulmoner ödem, İR sonucu oluşan akciğer hasarının birer bulgusu olarak ortaya çıkmakta ve klinik olarak tamamen subklinik seyreden geçici bir durumdan, akut sıkıntılı solunum sendromu (ARDS)' ye kadar gidebilen ciddi bir tabloya yol açabilmektedir. Moleküler olarak, akut alt ekstremitte İRH sonrası vücutta lokal ve sistemik inflamatuvar bir yanıt ortaya çıkmakta ve buna bağlı plazmada artmış proinflamatuvar ajanlarla birlikte (sitokinler, araziidonik asit deriveleri, trombosit aktive edici faktör, kompleman), artmış serbest oksijen radikalleri ve nötrofil infiltrasyonu, oluşan uzak organ hasarında rol oynamaktadır (10). Akciğerde bu hasarın oluşum mekanizması: “washout fenomeni”; reperfüzyonla sistemik dolaşıma katılan kimyasal mediyatörler ve mikroembolilerle açıklanır (53). İskemi ile birlikte tümör nekroz faktör alfa (TNF- α), interlökin-1-beta (IL-1 β) artışı ve polimorf nüveli nötrofil (PMN) aktivasyonu ile karakterize enflamatuvar yanıt, bu hasarda en önemli rolü oynamaktadır (9, 16, 53, 54). Reperfüzyonun

hemen başında artan serbest oksijen radikallerinin hasarı daha da artırdığı bilinmektedir (55-57). Artan SOR ile birlikte, plazmada bulunan proenflamatuvar ajanlardan kompleman (özellikle C3a, C5a ve C5b-9), selektin, sitokinler (IL-6 ve 8), trombosit aktive edici faktör (PAF), tromboksan (Tx) ve lökotrienler (özellikle LTB4) akciğerdeki hasarı daha da artırır (13,58). Sonuç olarak; alt ekstremité İ/R'u, pulmoner vazokonstriksiyon, pulmoner hipertansiyon ve alveoler membran geçirgenliğinde artışla pulmoner ödeme neden olur (54). Bir çalışmada, Zimon ve arkadaşları, akut alt ekstremité iskemisi gelişen ve cerrahi tedavi uygulanan 70 hastada, erken postoperatif dönemde, %64 oranında pulmoner komplikasyon bildirmişler ve preoperatif iskeмі süresi ile oluşan akciğer hasarının şiddeti arasında belirgin bir korelasyon göstermişlerdir (59).

Antioksidan maddelerin akut İRH sonrası görülen uzak organ hasarına karşı koruyucu etkisi çeşitli çalışmalarda gösterilmiştir (60). Punch ve arkadaşları, serbest oksijen radikal inhibitörlerinin, akut alt ekstremité İ/R olayı sonrası ortaya çıkan pulmoner mikrovasküler permeabilite artışı ve nötrofil akümülyasyonunu engellediğini göstermişlerdir (61).

2.5.2. Akciğer İskemi Reperfüzyon Hasarında Endotelin Etkisi

İskemi-reperfüzyon sırasında meydana gelen hasarın derecesini belirleyen en önemli faktör esas olarak hasara uğrayan damar duvarını kaplayan endoteldir. Bununla birlikte akciğer parankimini oluşturan düz kas hücreleri ve pnömositler de iskemiden etkilenirler (25, 62). Süperoksit radikali (O_2^-) ve diğer oksidatif maddeler, hem iskeмі hem de reperfüzyon sırasında fazla miktarlarda üretilir ve direkt olarak protein ve lipidlere saldırarak etkilerini gösterirler (25). Endotelin hasarı sonucu, endotel hücrelerini birbirine yapıştıran bağlar hasar görür ve hücreler arasından ekstraselüler bölgeye kaçak olur. Endotelden prostasiklin salınımı bozulur ve reperfüzyon sırasında prostasiklin-tromboksan dengesi bozularak, trombosit agregasyonu artar. Mikrosirkülyasyonda trombosit agregasyonları sebebiyle tıkanıklıklar oluşur ve doku içinde etkin kan dolaşımı sağlanamaz. Hasara uğramış endotel kompleman sistemini aktive eder ve nötrofilleri hasar bölgesine çağırır. En önemli hasar ise nötrofillerin gelmesiyle oluşur. İskemi-reperfüzyon sonrasında gelişen sıkıntılı solunum sendromundan PMNL sorumludur. Diğer yandan, aktive nötrofillerin akciğer, kalp ve barsak dahil birçok organdaki doku hasarı patogeneğinde önemli olduklarına ilişkin kanıtlar giderek artmaktadır (63 - 65). Sistemik

inflatuar yanıtın gelişmesiyle PMNL aktivasyonu, pulmoner mikrosirkülasyonda PMNL sekestrasyonu ve PMNL' lerin endotelial hücre adezyonu söz konusudur. PMNL' lerin endotel hücrelerine adezyonu sonrası açığa çıkan toksik maddeler sonucu endotelial tabakada hasar oluşur, kapiller permeabilite artar, alveolar ve interstisyel ödem gelişir. Reperfüzyon sırasında endotelden salgılanan nitrik oksit (NO)' in de büyük önemi vardır. NO nötrofillerin yapışmasını (CD11b ve CD18 üzerinden), birikmesini ve içeriklerini boşaltmalarını inhibe eder. Ayrıca hem trombosit aggregasyonunu engeller, hem de vazodilatasyon yaparak vasküler dengenin korunmasını sağlar. Endotel hücreleri, reperfüzyon sırasında, NO sentezini sağlayan endotelial nitrik oksit sentetaz enziminin sayısını arttıran genleri aktive ederler ve bu şekilde artmış NO miktarı ile hasarı engellemeye çalışırlar. Fakat bütün bunlara rağmen NO kana karıştığı zaman çok çabuk bir şekilde hemoglobine bağlanarak inaktif olur. Yine nötrofillerden salgılanan O_2 ve diğer oksidan maddeler, hemen NO ile etkileşime girerler ve NO' in etkilerini ortadan kaldırırlar. Hatta fazla miktarlarda NO' in üretildiği durumlarda; O_2^- , NO ile reaksiyona girerek daha zararlı bir madde olan peroksinitrit oluşumuna sebep olur ve doku hasarını daha da artırır (63, 64, 65, 66).

2.6. Serbest Radikaller

2.6.1. Serbest Radikallerin Tanımı

Moleküllerdeki atomlar uzayda bir yer kaplarlar ve bu kapladıkları yere orbital adı verilir. Her orbitalde biri saat yönünde, diğeri de tersi yönde hareket eden iki elektron bulunur. Eğer bir orbitalde, yalnızca bir adet elektron bulunuyorsa, buna eş olmayan elektron denir. Serbest radikal ise dış orbitalinde tek sayıda, eş olmayan elektron taşıyan, elektrik yüklü veya yüksüz olabilen atom veya moleküllerdir (27, 67). Kimyasal formüllerde bu elektron “ - ” simgesi ile (ör: OH^-) gösterilir. Bu bileşikler organizmada normal metabolik yolların işleyişi sırasında oluştuğu gibi, çeşitli dış etkenlerin etkisiyle de oluşmaktadır. Çok kısa yaşam süreli, ancak yapılarındaki dengesizlik nedeniyle çok aktif yapılı olan serbest radikaller, tüm hücre bileşenleri ile etkileşebilme özelliği gösterirler (67, 68, 69).

Serbest radikal, özellikle aktive oksijen türleri üretimi, kimyasal hasar ve radyasyon yaralanması, oksijen ve diğer gaz yaralanmaları, hücre yaşlanması, fagositik hücrelerle mikrobiyal öldürme, inflammatuar hasar ve makrofajlarla tümör destrüksiyonu gibi pek çok

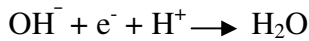
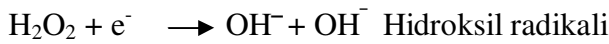
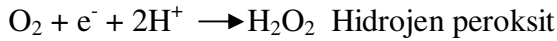
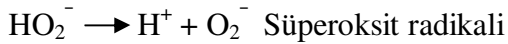
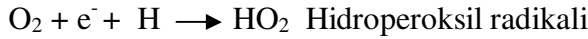
olayın ortak sonucudur (68, 70). Serbest oksijen radikalleri (SOR), doku hasarı ve değişik hastalıkların etiyopatogenezindeki rolü, son yıllarda tıpta giderek daha fazla ilgi çeken bir alanı oluşturmaktadır.

Oksidatif stres; artmış oksidana maruz kalma ya da azalmış antioksidan kapasite olarak tanımlanabilir (71). Organizma, oksidana maruz kalmayı minimum düzeye indirmek için antioksidanlara sahiptir, ancak serbest oksijen radikallerinin aşırı üretiminde ya da varlığında, bu koruyucu sistem yetersiz kalmakta ve oksidan hasar meydana gelmektedir (26).

SOR, akciğerlerde doğrudan solunum yolu düz kas kontraksiyonuna, doku harabiyetine, damar geçirgenliğinde artışa, bronş aşırı duyarlılığına ve mediatör salınımına neden olmaktadır (27). Ayrıca mast hücrelerinden histamin salınımına ve hava yolu epitel hücrelerinden mukus salgılanmasına neden olmaktadır (72).

Aerobik organizmalarda yaşamın sürdürülebilmesi için oksijene mutlak gereksinim vardır. Solunan oksijenin %95' inden fazlası mitokondrilerde ATP şeklinde enerji oluşumunda kullanılırken, yaklaşık %5' i de oldukça toksik SOR' lerine dönüşmektedir (26). Oksijenin bir elektron alarak indirgenmesi ile O_2^- radikali, iki elektron alarak indirgenmesi ile H_2O_2 oluşur. Üçüncü elektron ilavesi ile yüksek derecede reaktif OH^- radikali oluşur. Dördüncü elektron ilavesi ile de su oluşmaktadır (73 – 76).

Serbest radikallerin oluşumu:



SR' ler organizmada mitokondrinin yanı sıra, hücrelerin tüm fraksiyonlarında, zara bağlı veya serbest halde bulunan pek çok enzimin katalizlediği reaksiyonlar sırasında da oluşmaktadır. Bunlar arasında mikrozomal karma fonksiyonlu oksidaz sistemi, sitoplazmada ksantin oksidaz, hücre zarına bağlı NADPH oksidaz ve lipoksigenazlar gibi enzimlerin kataliz ettiği reaksiyonlar sayılabilir.

Ksantin Oksidazın Katalizlediği Reaksiyon: İn vivo serbest oksijen radikali oluşturan enzimlerden biridir. Bu enzim, pürin metabolizmasının son oksidasyonu olan hipoksantin kstantine oksidasyonunu gerçekleştirir. Ksantin oksidaz O_2 varlığında, hipoksantini kstantine, kstantini de ürik aside okside ederek ortama O_2^- ile H_2O_2 salınmasını sağlar. Normal

dokularda ksantin oksidaz, ksantin dehidrogenaz olarak bulunur, elektron alıcısı olarak O_2 yerine NAD^+ yi kullanır ve bu reaksiyonlar sonucunda hiçbir serbest oksijen radikali oluşmaz (77). Postiskemik dokuda süperoksit radikalının büyük kısmının kaynağı ksantin oksidaz sistemidir. Dokuya kan sağlanması belli bir düzeyin altına indiğinde, ATP üretimi için gerekli O_2 miktarı da düşer. Enerji deposu azaldığında hücre, membranından gerekli iyon transportunu yapamaz hale gelir ve sonuçta hücre sitozolünde kalsiyum iyonu konsantrasyonu artar. Artan Ca^{+2} konsantrasyonu da ksantin dehidrogenazı ksantin oksidaza dönüştürecek proteazları harekete geçirir. Proteaz aktivitesinin Ca^{+2} iyonu ile arttığı farklı deney hayvanlarının farklı dokularında gösterilmiştir. Bu da tıpkı serbest oksijen radikallerinin yaptığı hasar gibi türe özgü değildir (77 - 79). Hücrenin ATP miktarının azalması ile eş zamanlı olarak AMP miktarı artar, AMP de adenozin, inozin ve hipoksantine metabolize olur. Hipoksantin miktarının iskemik dokularda arttığı bilinmektedir ve tüm beden hipoksisi ve kısmi iskemisinde de dolaşımda bulunan miktarı artar. Artmış hipoksantin, aktivitesi yükselmiş ksantin oksidaz tarafından metabolize olur, toksik serbest radikaller ortama salınır.

Özet olarak iskemik dokularda iki önemli değişiklik olur; ksantin oksidaz aktivitesinin artışı ve bu enzimin iki substratından biri olan hipoksantin oluşumu. Diğer bir substrat olan moleküler oksijenin de reperfüzyonla sağlanmasıyla, dokuda ani ve çok miktarda süperoksit radikali ve hidrojen peroksit oluşumu gerçekleşir.

2.6.2. Serbest Radikaller ve Oluşum Yolları

Serbest oksijen radikalleri şu yollarla oluşmaktadır (73, 74):

- 1- *Radyan enerji absorpsiyonu* (ultraviyole, X ışını).
- 2- *Hücrenin normal metabolizması sırasında gerçekleşen oksidasyon-redüksiyon reaksiyonları* (örneğin: solunum, ksantin oksidaz, fenton reaksiyonu). Özellikle demir ve bakır metabolizması hücre için büyük bir oksidatif hasardır.
- 3- *Dış kaynaklı kimyasal maddelerin ve ilaçların enzimatik metabolizasyonu.*
- 4- *Nitrik oksid (NO)*; önemli bir kimyasal mediyatördür (endotel, makrofaj ve nöronlarda) ve serbest radikale dönüşebilir.
- 5- *İskemik hasarlı bölgenin reperfüzyonu ve oksijen tedavisi sırasında.*
- 6- *İnflamasyonda polimorf lökositler ve makrofajlar yolu ile.*

Süperoksit radikali:

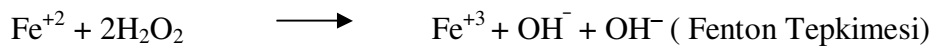
Hemen tüm aerobik hücrelerde, oksijenin bir elektron alarak indirgenmesi sonucu O_2^- meydana gelir. Bu radikalden spontan ya da enzimatik dismütasyon ile ikinci bir ara ürün, H_2O_2 oluşur. Demir (Fe) ve Bakır (Cu) gibi geçiş metalleri iyonlarının indirgeyicisi olması bakımından da önemlidir. Süperoksit radikali direkt olarak fazla zarar vermez. Asıl önemi H_2O_2 kaynağı olması ve geçiş metalleri iyonlarının indirgeyicisi olmasıdır. Süperoksidin, fizyolojik bir serbest radikal olan NO ile birleşmesi sonucu, reaktif bir oksijen türevi olan peroksinitrit meydana gelir. Böylece NO'nın normal etkisi inhibe edilir. Ayrıca, peroksinitritlerin doğrudan proteinlere zararlı etkileri vardır ve azot dioksit (NO_2), hidroksil radikali (OH^-) ve nitronyum iyonu (NO_2^-) gibi daha başka toksik ürünlere dönüşürler (25).

Hidrojen peroksit:

Moleküler O_2 'nin, çevresindeki moleküllerden 2 elektron alması sonucu peroksit oluşur. Peroksit molekülü 2 hidrojen atomu ile birleşerek hidrojen peroksidi meydana getirir. H_2O_2 membranlardan kolayca geçebilen uzun ömürlü bir oksidandır. KAT enzimi ile H_2O ve O_2 ye yıklılır. H_2O_2 bir serbest radikal olmadığı halde, reaktif oksijen türleri içine girer ve serbest radikal biyokimyasında önemli bir rol oynar. Çünkü süperoksid ile reaksiyona girerek, en reaktif ve zarar verici serbest radikal olan OH^- oluşturmak üzere kolaylıkla yıkılabilir. Buna Haber-Weiss Tepkimesi adı verilir. Haber-Weiss Tepkimesi, ya katalizör varlığında ya da katalizörsüz olarak gerçekleşir. Fakat katalizörsüz reaksiyon oldukça yavaş ilerler. Bu tepkime aşağıdaki gibi ilerler.



Demirle katalizlenen ikinci şekli ise çok hızlıdır. Bu tepkimede önce ferri demir (Fe^{+3}) süperoksid tarafından ferro demire (Fe^{+2}) indirgenir. Sonra ferro demir kullanılarak Fenton Reaksiyonu ile H_2O_2 'den hidroksil radikalleri üretilir. Bu tepkime aşağıdaki gibi ilerler.



Görüldüğü gibi süperoksid, hem H_2O_2 kaynağı, hem de geçiş metalleri iyonlarının indirgeyicisidir. İndirgenmiş geçiş metalleri (demir ve bakır), okside şekillerine göre, H_2O_2 ile birlikte daha reaktiftirler.

Hidroksil radikali:

OH^- ; H_2O_2 'nin geçiş metallerinin varlığında indirgenmesiyle meydana gelir (Fenton Reaksiyonu). Suyun yüksek enerjili iyonize edici radyasyona maruz kalması sonucunda da hidroksil radikali oluşur. Hidroksil radikali; son derece reaktif bir oksidan radikalidir. Yarılanma ömrü çok kısadır. Oluştuğu yerde büyük hasara sebep olur (41).

Nitrik Oksit:

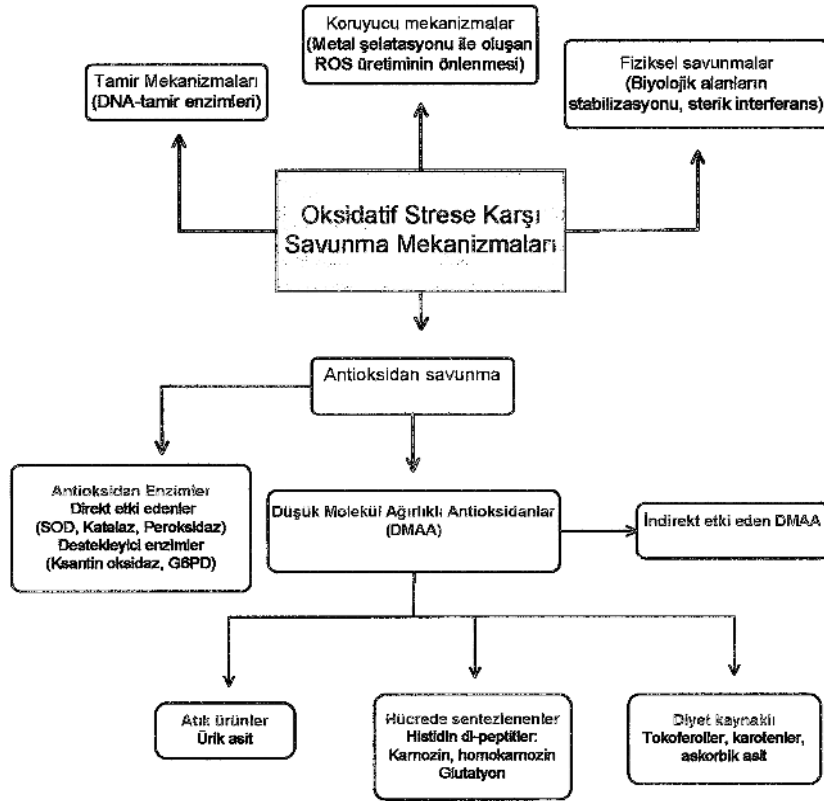
NO hemostatik olaylarda ve organizmanın savunma mekanizmalarında otokrin ve parakrin etkisi olan bir aracıdır. Makrofajlar, nötrofiller, hepatositler ve endotel hücreleri tarafından üretilir. En önemli fonksiyonu vücudun çeşitli dokularında interlökin-1 ve sitokinlerin etkilerine paralel bir işlev görmesidir (75). Tümör hücrelerini, parazitleri, bakteri ve mantar hücrelerini öldürmede görev alır. Ancak yüksek seviyelerde, normal hücreler üzerinde toksik etkisi vardır. O_2^- ile inaktifleşir ve süperoksit dismutaz (SOD) enzimi ile korunur. Bu bakımdan serbest radikal tutucu olarak kabul edilse de, uygun ortamlarda süperoksit ile güçlü bir oksidan olan peroksinitriti oluşturur. Düşük pH' da durağan değildir. Spontan olarak parçalanarak hidroksil radikali ve nitrojen oksit oluşur (76).

2.7. Antioksidanlar

Serbest radikallerin zararlı etkilerine karşı organizmada koruyucu mekanizmalar vardır. Bu mekanizmaların bir kısmı serbest radikal oluşumunu, bir kısmı ise oluşmuş serbest radikallerin zararlı etkilerini önlemektedir. Bu işlevi yapan maddelerin tümüne birden genel olarak antioksidanlar denir (Şekil 3) (41, 80 - 82).

Etkilerini lokal oksijen konsantrasyonunu azaltarak, hidroksil radikallerini temizleyip lipid peroksidasyonunun başlamasını önleyerek, geçiş metal iyonlarını bağlayıp etkisizleştirerek, peroksitlerin alkol gibi nonradikal ürünlere dönüşümünde etkin rol oynayarak ve zincir reaksiyonlarına neden olan tüm radikallerle reaksiyona girip zinciri kırarak gösteren antioksidanlar intraselüler ve ekstraselüler olmak üzere iki grupta incelenir. En belirgin özellikleri okside olan substratlara oranla çok daha az konsantrasyonlarda bile, substratın oksidasyonunu geciktirmeleri ve inhibe etmeleridir (82). Oksidan moleküller belirli düzeyde kaldıkları sürece, organizmanın yabancı maddelere ve enfeksiyon ajanlarına karşı önemli

savunma molekülleridir. Ancak belirli düzeyin üzerinde oluştuklarında veya antioksidan sistemin yetersizliğinde serbest radikal molekülleri, organizmanın yapı elemanları olan protein, lipid, karbonhidrat, nükleik asitler ve enzimleri bozarak zararlı etkilere yol açarlar (78).

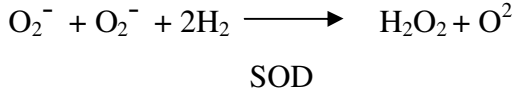


Şekil 3 ; Oksidatif hasara karşı koruyucu mekanizmalar ve antioksidan sistem (80).

Aortik iskemi reperfüzyon (AİR) hasarı oluşumunda serbest oksijen radikalleri önemli bir yer tutar (83). İskemik dokuların reperfüzyonu toksik/reaktif oksijen türleri oluşumuna yol açar. Bunlar süperoksit anyonlar, hidroksil radikalleri, hipoklorik asit, hidrojen peroksit ve nitrik oksitten derivate peroksinitrittir (29). Serbest radikal temizleyicileri, reaktif oksijen parçaları ile reaksiyona girerek, bunları zararsız maddeler haline dönüştüren ajanlardır. Bu ajanlar SOD, KAT, GSH, GR, GSH-Px olarak sıralanabilir.

Süperoksit Dismutaz:

SOD, bir metalloenzimdir. Oksijeni metabolize eden bütün hücrelerde bulunur. SOD , McCord ve Fridovich (84) tarafından bulunmuştur ve süperoksidin hidrojen perokside dönüşümü reaksiyonunu katalizler.



Süperoksit dismutaz, bu reaksiyonda hem oksidan, hem de redüktan olarak hareket eder. Oksijen radikalleriyle oluşan hasara karşı SOD; katalaz ve glutatyon enzim sistemiyle birlikte çalışan bir savunma mekanizmasıdır. Böylece oluşan hidrojen peroksit, katalaz veya glutatyon peroksidaz enzimleri tarafından su ve oksijene indirgenmektedir. Peroksit radikalinin dismutasyonu ile oluşan hidrojen peroksit doku için biyolojik avantaj sağlar. SOD'ın görevinin aerobik organizmaları, süperoksidin zararlı etkilerine karşı korumak olduğu sanılmaktadır. Enzim, hücrede değişik kompartmanlarda bulunmaktadır. Sitozolik enzim, her biri içinde bir ekivalan bakır ve çinko taşıyan, birbirine benzer iki alt üniteden meydana gelir. Fakat mitokondriyal enzim, bakterilerde bulunana benzer şekilde sadece manganez (Mn^{+2}) içerir. Dismutaz bütün temel aerobik dokularda bulunmaktadır (85).

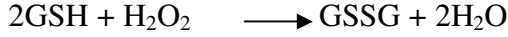
Glutatyon:

Metabolizmada önemli rol oynayan glutatyon, bir tripeptid (gama glutamil sisteinilglisin) olup, birçok hücrede bulunmaktadır. Glutatyon; glutamat, sistein ve glisin aminoasitlerinden oluşur. Glutamat, sisteine gama-karboksil aracılığı ile bağlanır. Molekülün aktif kısmı sisteinin sülfidril grubudur. Gama-glutamil kısmı hücre içi stabilizeyi ve peptidazlara direnci sağlamaktadır. Glutatyon, hücre zarında aminoasitlerin taşımada rol alır ve koenzim olarak enzim yapısına girer. Proteinlerin sülfidril yapılarını korur, toksik maddelerin etkilerinin ortadan kaldırılmasında rol oynar (86).

Glutatyon Peroksidaz (GSH-Px):

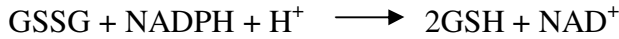
Eritrositlerde ve diğer dokularda, prostetik grup olarak selenyum içeren glutatyon peroksidaz enzimi, indirgenmiş glutatyon tarafından hidrojen peroksit ve lipid peroksitlerinin

parçalanmasını katalize eder; böylece membran lipidlerini ve hemoglobini, peroksitlerin oksidasyonuna karşı korur. Spesifik hidrojen verici olarak glutasyonu kullanır. Peroksit radikallerine afinitesi katalazdan daha fazladır.



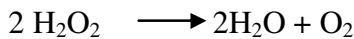
Glutasyon Redüktaz:

Glutasyon redüktaz, bir flavin enzimidir ve koenzimi NADPH, prostetik grubu FAD' dır. Hem sitozol hem de mitokondride bulunmaktadır. Okside glutasyon hücreyi oksidanlara karşı koruyamaz. Hücre, elektron kaynağı olarak NADPH kullanan redüktazın katalizlediği bir reaksiyon ile indirgenmiş glutasyonu tekrar oluşturur. NADPH, hidrojen peroksidin indirgenmesinde endirekt olarak elektronları sağlar. Oluşan NAD^+ ise Glikoz 6-fosfat dehidrogenaz enzimi yardımıyla NADPH' a dönüştürülür (86).



Katalaz (KAT):

Katalaz, dört hem proteini içeren bir hemoproteindir. Kan, kemik iliği, karaciğer, böbrek ve müköz membranlarda bol miktarda bulunmaktadır. Katalaz, iki hidrojen peroksit molekülünden birini elektron vericisi, diğerini de elektron alıcısı olarak kullanarak su ve oksijen meydana getirir (87).



2.8. Lipid Peroksidasyonu

Lipid peroksidasyonu, serbest radikaller tarafından başlatılan ve zar yapısındaki çoklu doymamış yağ asitlerinin oksidasyonunu içeren kimyasal bir olay olarak tanımlanmaktadır (79). Hidroksil radikali; DNA, protein ve karbonhidratlar dahil olmak üzere her canlı molekülü ile reaksiyona girerek hasar yapar, membran lipidlerinden H^+ çıkararak lipid peroksidasyonunu başlatır.

Hidroksil radikalının başlattığı peroksidasyon, zincirleme bir reaksiyondur ve lipid zinciri bitene ya da reaksiyon bir antioksidan tarafından durdurulana kadar devam eder (79).

Lipid peroksidasyonu, lipid hiperoksitlerinin aldehit ve diğer karbonil bileşiklere dönüşmesiyle sona ermektedir. Bu bileşiklerden sonuncusu olan malonil dialdehit (MDA) miktarı, tiyobarbitürik asit testi ile ölçülmekte ve bu yöntem lipid peroksit düzeylerinin saptanmasında sıklıkla kullanılmaktadır. Lipid hiperoksitlerinin parçalanması ile oluşan etan, bütan ve pentan gibi gazların tayini de son yıllarda lipid peroksidasyon göstergesi olarak değerlendirilmektedir (79).

2.9. İskemi Reperfüzyon Hasarını Önlemek İçin Tedavi Stratejileri

Serbest radikaller tüm biyolojik maddelerle reaksiyona girerler ve özellikle hidroksil radikalleri hücre zarındaki lipidlerin peroksidasyonuna neden olarak hücrenin yapısının bozulmasına sebep olurlar. Lipid radikallerin oluşması, zar lipid yapısında değişikliklere ve zar işlevinin bozulmasına neden olmaktadır. Hücre içi kalsiyumun artması ile başlayan ve radikallerin enzimler ve diğer hücre elemanlarına etkisi ile oluşan sitotoksik ürünlerin katılımıyla, hücreyi ölüme kadar götüren sürece karşı, hücrenin kendini korumak için geliştirdiği mekanizmalara antioksidan mekanizmalar adı verilir (28). Bunlar;

- Serbest radikallerin üretiminin inhibisyonu,
- Nötrofillerin inhibisyonu,
- Serbest radikallerin süpürülmesi,
- Antioksidan enzimler,
- İskemik ön koşullama,
- Hipotermi mekanizmaları olarak özetlenebilir.

Vitamin E, vitamin C, beta karoten gibi vitaminler; süperoksit, hidroksil ve lipid peroksit radikallerini tutma özelliğine sahiptirler. Süperoksit dismutaz, katalaz, glutatyon peroksidaz gibi enzimler, allopürinol gibi metal bağlayan proteinler ve dimetil sülfoksit, desferroksamin gibi birçok ajan, oksijen radikallerinin oluşumunu azaltarak, radikallerin yükseltgen olmalarını engellerler ya da DNA onarım mekanizmalarını arttırarak antioksidan etki gösterirler. Ayrıca :

Antioksidan tedavi,

Kalsiyum antagonistleri,

Anjiyotensin konverting enzim inhibitörleri,

Anti-kompleman tedavi,

Lökosit deplesyonu/filtrasyonu,
Anti-sitokin veya lökosit adezyon molekülü,
Endotelin reseptör antagonisti,
Platelet aktivasyon faktör antagonistleri,
LTB4 antagonistleri, İRH' nı azaltmak için kullanılan diğer tedavi stratejilerini oluşturmaktadır (45).

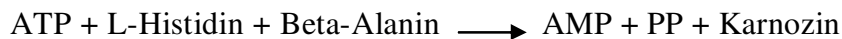
2.10. Karnozin (beta-alanil-L-histidin)

Doğal karnozin (KAR) deriveleri, KAR ilişkili dipeptitler (CRCs) veya aminoasit-histidin dipeptitleri olarak da adlandırılmaktadırlar. Bunlar; KAR (beta-alanil-L-histidin), homokarnozin (gama-aminobutiril-L-histidin), anserin (beta-alanil-L-l-metil-histidin), balain, ophidin, beta-alanil-L-3-metil histidindir. Karnozin, aminoasit-histidin dipeptitleri olarak bahsedilen bileşikler serisinin ilk örneğidir (88). Karnozin, 1900 yılında, ilk olarak Gulewitsch ve Amiradzibi adlı Rus bilim adamları tarafından et ekstraktlarından saflaştırılmıştır (89). Endojen olarak sentezlenen bu dipeptit (89, 90); beta-alanin ve L-histidinden oluşmuş (91) multifonksiyonel bir dipeptittir (92). Özellikle beyin, iskelet ve kalp kası gibi uyarılabilen dokularda (92, 93, 94) yüksek konsantrasyonlarda bulunmasına karşın, lenste, midede ve böbrekte de yaygın olarak bulunmaktadır (93).

Karnozinin esas biyolojik rolü tam olarak anlaşılamamış olmasına rağmen, yapılan çeşitli deneysel çalışmalarda KAR'ın; antioksidan, tamponlayıcı aktivite, nörotransmitter, yara iyileştirici bir ajan ve savunma sistemini güçlendiren bir etkiye sahip olduğu rapor edilmiştir (92). Sonradan yapılan bazı çalışmalarda ise, bu fonksiyonlarına ek olarak KAR'ın homeostatik fonksiyonunun olduğu ileri sürülmüştür (22).

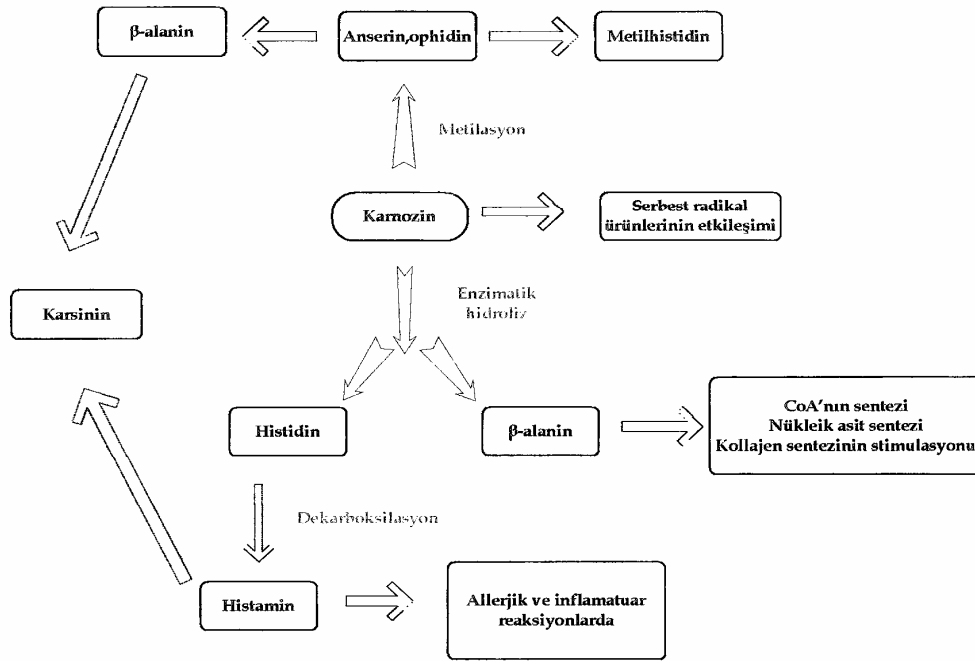
2.10.1. Karnozinin Yapısı ve Metabolizması

Beta alanin ve L-histidinden oluşan basit bir dipeptit olan KAR' de, beta-alaninin karboksil grubu, histidinin amino grubu ile amid bağı ile bağlanır (90). Karnozin dokularda metabolik kontrol altındadır. Karnozin, karnozin sentetaz enzimi tarafından (beta-alanin ve L-histidinden) sentezlenir (95-97).



Karnozin sentetaz enzimi % 98 sitozolik aktiviteye sahiptir (98). Enzim genel substrat özgülüğü gösterir ve farklı aminoasit histidin dipeptidleri (homokarnozin ve anserin gibi) sentezleme yeteneğine sahiptir (95-97, 99).

Karnozinin yıkımı karnozinaz enziminin 2 izoformuyla sağlanır. Bu izoformlar, doku (aminoasit-histidin dipeptidaz) ve serum karnozinaz (Beta-Ala-His dipeptidaz)'dır (100-103).



Şekil 4: Dokularda KAR sentezi (103).

2.10.2. Karnozinin fizyolojik fonksiyonları

Karnozin ve metabolizması hakkında çok az bilgiye sahibiz. Yapılan araştırmalar, KAR'ın hücreleri oksidatif stres hasarına karşı koruyucu etkisinden başka; kültüre edilmiş hücrelerin yaşam sürelerini uzattığı, yaşlı hücreleri gençleştirdiği, hücreleri hipoklorit, MDA ve amiloid peptidin toksik etkilerine karşı koruduğu, proteinlerin ve protein-DNA'nın glikasyonunu ve protein-protein çapraz bağlanmayı inhibe ettiği ve hücresel homeostazın korunmasına yardımcı olduğunu göstermiştir. Ayrıca KAR, yaşlanmaya bağlı olarak ortaya çıkan görme bozukluklarını geciktirmekte ve kataraktı da etkili bir şekilde önlemektedir (22). Bu yüzden, KAR belki de insanlarda, yaşlanmaya karşı bir ilaç olarak uygulanabilir.

Kataraktlı hayvanlarda KAR konsantrasyonu düşük bulunmuştur. Düşük KAR konsantrasyonunda, kataraktın şiddeti yüksektir. Yüksek oranda kolesterol içeren diyetle beslenen tavşanlara, KAR yüklemesi yapılırsa, ateroskleroz ve katarakta karşı koruma bir hayli artmaktadır (104). Karnozinin yaşlanmaya karşı etkisi, diyetle KAR alındığında, hem hücre kültürlerinde, hem de çeşitli hayvan çalışmalarında gösterilmiştir (105). Karnozin, protein modifikasyonlarını inhibe etmektedir. Karnozin, in vitro ortamda yaşlanmayla ilişkili olan protein karbonillerinin oluşumu ve çapraz bağlanmaların oluşumunu inhibe etmektedir. Glike edilmiş lizin (glikoz+lizin) öldürücü iken, glike edilmiş KAR (glikoz+KAR) öldürücü değildir. Karnozin; asetaldehit ve formaldehit kaynaklı DNA/protein çapraz bağlanmalarının oluşumunu önlemektedir (22, 106-107).

Karnozin ve anserin, fizyolojik pH' da dikkate değer bir tamponlama aktivitesi gösterir (107). Zayıf bazik pH' da, KAR, kolaylıkla lipit peroksidasyonunu baskılayabilir. Kastaki aktivite esnasında, intrasellüler ortamda asidifikasyonun artmasıyla, KAR tamponlama etkisi gösterir. Böylelikle KAR peroksidasyonu baskılayarak homeostazinin korunmasını sağlar.

Karnozinin belki de en önemli görevi anti-glikasyon etkisidir. Serbest radikal hasarından bağımsız olarak yaşlanmanın ana süreçlerinden birisi glikasyondur. İleri glikasyon ürünleri olan AGE'ler (Advanced Glycosylation Endproducts - İleri Glikasyon Son Ürünleri) organizmaya geniş çapta zarar verirler (15). Karnozin bu etkiyi bloke eder. Sonuç olarak KAR, aldehit ve ketonları inaktive eder ve protein glikasyonu ve AGE oluşumunu azaltır. Ayrıca var olan AGE'lere bağlanıp onları inaktive eder. KAR, interleukin-1 β yapımını artırır, apoptozisi baskılar, B ve T lenfositleri aktive eder. Kan hücrelerinin membranları üzerine koruyucu etkiye sahiptir. İnflamasyonu azaltır, yara tedavi edici özelliği vardır. Karnozinin, myeloperoksidaz aktiviteleri spektrofotometrik olarak ölçüldüğünde, belirgin inhibitör etkinlikleri olduğu bulunmuştur (16). Karnozinin beyin ve kalpte belirgin antiiskemik etkileri; antioksidan ve membran koruyucu etkileri, proton tamponlayıcı kapasitesi, ağır metaller ile kompleksler oluşturma ve makrofaj fonksiyon düzenlenmesi etkilerinin kombinasyonudur. Deneysel beyin iskemisinde KAR mortaliteyi azaltır ve hayvanların nörolojik fonksiyonlarına yararlı etki gösterir. Karnozin sadece radikal temizleyici değil, aynı zamanda SOR üreten enzim sistemlerinin aktivitelerinin düzenleyicisidir (15,16).

2.10.2.1. Karnozinin Antioksidan Etkileri

Karnozin, suda eriyebilen hayvansal dokuların doğal bir metabolitidir. Reaktif oksijen türlerini temizleyici fonksiyonundan dolayı, antioksidan özelliğe sahiptir. Antioksidan özelliğinin yanı sıra, membran koruyucu rolü de vardır. Suda çözünebilir serbest radikalleri temizlerken, hücre membranını lipid peroksidasyonundan korur (108 - 110). Karnozin, suda erime özelliğine bağlı olarak, suda çözünen oksidasyon mediatörlerinin (metaller ve oksijen radikalleri) yüksek olduğu sitozolde fonksiyon görür. Hidroksil ve süperoksit radikallerinin ve çok kuvvetli olarak da singlet oksijen molekülünün temizleyicisidir (15, 16).

Karnozinin antioksidan özelliğinden yola çıkılarak, birçok deneysel modelde etkisi denenmiştir. Fujii ve arkadaşları yaptığı böbrek İ/R modelinde KAR verilmesinin, sempatik sinir aktivitesini ve böbrekte oluşan İRH' nı azalttığını bulmuşlardır (16). Stvolinsky ve arkadaşları beyin iskemisi oluşturulan deneklerde KAR' in nöroprotektör etkisi olduğunu göstermişlerdir (15). Başka bir çalışmada da; Boldyrev ve arkadaşları, global beyin iskemisi uygulanan deneklere KAR verilmesinin yaşam süresini arttırdığını saptamış, KAR' in nöranal hücreleri SOR' lerine karşı koruduğunu bildirmişlerdir (21). Yine KAR' in serebellar granüler hücreleri serbest radikal hasarından koruduğu gösterilmiştir (22). Hipkiss KAR' in MDA toksisitesine karşı sıçan beyin endotel hücrelerini koruduğunu bildirmiştir (22). Lee ve arkadaşları izole sıçan kalp reperfüzyon hasarına karşı KAR' in koruyucu etkisi olduğunu göstermiştir (23). Kang ve ark.ları kültür ortamında karaciğer epitelyal hücrelerinde 12-O-tetradecanoylphorbol-13-acetate ve hidrojen peroksitin neden olduğu DNA fragmentasyonunu KAR' in engellediğini bulmuştur. Buna neden olarak KAR' in lipid peroksidasyonunu inhibe ettiğini, süperoksit dismutaz ve/veya serbest radikal temizleyici özelliğine sahip olmasına bağlı olduğunu bildirmişlerdir (24).

Birçok antioksidanın amacı, dokulara serbest radikallerin girişini engellemektir, fakat ilk savunmanın aşılmasından sonra etkili değildirler. Karnozin sadece korumada değil, serbest radikallerin reaksiyonlarıyla oluşan tehlikeli bileşiklere karşı da etkilidir. Böylelikle dokuları ikinci bir kimyasal etkiden korumaktadır (106). Örneğin; yüksek reaktiviteye sahip lipid peroksidasyonun son ürünü olan MDA, serbest radikal reaksiyonlarının tehlikeli bir ürünüdür ve KAR tarafından bloke edilebilir. MDA, eğer kontrol edilemezse, enzimleri, lipidleri ve DNA' yı hasara uğratarak; eklem inflamasyonu, ateroskleroz, katarakt oluşumu ve yaşlanmada rol oynar. Karnozin MDA ile reaksiyona girerek MDA' yı inaktifleştirir ve

böylece proteinlerdeki aminoasitleri korur (111-113). Karnozin, kültüre edilmiş rat beyin endotel hücrelerini MDA toksitesine, insan lenfositleri ve fibroblastlarını asetaldehit ve formaldehite karşı, yine kültüre edilmiş insan fibroblastlarını, lizin/deoksiriboz ile inkübe edilmesiyle oluşan AGE' lere karşı korumaktadır (113).

Yaşlanma; serbest oksijen radikalleriyle oluşan makromoleküler hasar ve okside/çapraz bağlanmış/denatüre proteinlerin birikimiyle ilişkilidir. Yaşlanma esnasında proteinler okside olurlar ve çapraz bağlanmalar meydana getirirler. Bu modifikasyonlar, glikoz ve fruktoz gibi zararlı aldehitlerin, peroksidasyon ürünü olan MDA ile reaksiyona girmesiyle artmaktadır. Metilglioksal; benzeri protein modifikasyonlarını arttırmaktadır (özellikle diyabetin ikincil komplikasyonlarında). Karnozin, olasılıkla, proksimal imidazol amino grup ve karboksil gruplara sahip olduğu için, zararlı aldehitlerle reaksiyona girebilmektedir (114). Makrofaj myeloperoksidazı ile H₂O₂ ve klorit iyonlarından hipoklorit oluşmaktadır. Hipoklorit, protein çapraz bağlanmaları ve protein oksidasyonuna sebep olmaktadır. Karnozin in-vitro ortamda; hipoklorit ile reaksiyona girerek stabil kloramin deriveleri oluşturur (115) ve hipoklorit aracılı protein modifikasyonunun oluşumunu engeller.

Karnozin; kültüre edilmiş insan fibroblastlarının maksimum hücre bölünme kapasitesini arttırarak, olgun/yaşlanmış hücreleri genç hücrelere dönüştüren birkaç ajandan biridir. Karnozin kültüre edilmiş insan fibroblast DNA sında bulunan 8-hidroksiguanin (DNA oksidasyon ürünü) düzeylerini azaltır (116).

Yapılan araştırmalarda beyin, böbrek ve iskelet kası İRH' nda KAR' in koruyucu etkisi araştırılmış ve olumlu sonuçlar alınmıştır (15-16). Ancak literatürde KAR'ın abdominal aorta iskemi reperfüzyon hasarı ve uzak organ hasarı üzerine etkisi ile ilgili herhangi bir çalışmaya rastlanılamamıştır.

3-GEREÇ ve YÖNTEMLER

Çalışmada 14-16 haftalık, ağırlıkları 200-300 gram arasında değişen, toplam 24 adet, erkek Sprague-Dawley türü sıçan kullanıldı. Hayvanlar 20-22°C sabit sıcaklık ve onikişer saatlik aydınlık-karanlık siklusu (saat 07:00-19:00 aydınlık; 19:00-07:00 karanlık) sağlanan kontrollü bir odada, kafeslerde tutuldu. Sınırsız miktarda su ve standart yeme ulaşmaları sağlandı. Sıçanlar bu şekilde, bir hafta boyunca kafeslerinde dinlendirilerek ortama uyumları sağlandıktan sonra, deneylere başlandı. Tüm hayvan deneyleri Aydın Adnan Menderes Üniversitesi Tıp Fakültesi Fizyoloji Anabilim Dalı Laboratuvarı'nda gerçekleştirildi. Biyokimyasal parametreler Aydın Adnan Menderes Üniversitesi Tıp Fakültesi Biyokimya Anabilim Dalı Laboratuvarı'nda çalışıldı.

3.1. Deney Grupları

Ağırlıkları 200-300 gram arasında değişen, erkek, toplam 24 adet Sprague-Dawley cinsi rat, eşit sayıda (n = 8) ve rasgele olarak 3 deney grubundan birine dahil edildi.

Grup 1: sham laparotomi (kontrol) + serum fizyolojik (n = 8)

Grup 2: AİR + serum fizyolojik (n = 8)

Grup 3: AİR + KAR (n = 8)

Grup 1 (sham laparotomi (kontrol) + serum fizyolojik (n = 8)): Bu grupta, diğer gruplara uygulanan cerrahi işlem, stresi ve süresi eşit olacak şekilde uygulandı. Batın açılıp abdominal aorta eksplere edildikten sonra, hiçbir girişim yapılmadan, tekrar 3.0 atravmatik sütür ile kapatıldı ve İ/R gruplarına uygulanan 30 dakikalık iskemi süresinin tamamlanmasına 10 dakika kala intraperitoneal serum fizyolojik (uygulanan ilacın hacmi kadar) perfüze edildi ve diğer gruplardaki reperfüzyon periyodu kadar (60 dakika) beklendi.

Grup 2 (AİR + serum fizyolojik (n=8)): Cerrahi işlem olan laparotomi ve abdominal aort diseksiyonunun ardından, infrarenal abdominal aortalarına uygulanan klemp ile 30 dakikalık oklüzyon periyodu oluşturuldu. İnfrarenal aortadaki 30 dakikalık iskemik periyotta, klemp kaldırılmadan 10 dakika önce, intraperitoneal serum fizyolojik (uygulanan ilacın hacmi kadar) perfüze edildi. Ardından klemp açılarak 60 dakikalık reperfüzyon periyodu oluşturuldu.

Grup 3 (AİR+ KAR (n=8)): Laboratomi ve klemp uygulamasının ardından infrarenal aortadaki 30 dakikalık iskemik periyotta, klemp kaldırılmadan 10 dakika önce, intraperitoneal 250mg/kg KAR perfüze edildi ve iskemik periyod devamında 60 dakikalık reperfüzyon periyodu tamamlandı.

İskemi-reperfüzyon gruplarında İ/R süresi sonunda, kontrol grubunda da aynı süre tamamlandıktan sonra, tüm ratlar intrakardiyak 4-5cc kan, akciğer ve kas doku örnekleri alınarak sakrifiye edildi.

3.2. Aortik Oklüzyon ve İskemi-Reperfüzyon Modeli

İskemi-reperfüzyon etkisini oluşturmak için, deney grupları 3 ayrı protokole işleme tabi tutuldu. Deney başlangıcında intraperitoneal enjeksiyonla 1,6gr/kg urethane verilerek anestezi sağlandı. İşlem, ısıtma lambası altında, ratlar supin pozisyonda iken gerçekleştirildi. İşlem boyunca ratlar, solunumları spontan olarak devam edecek şekilde uyutuldu. Ratlara, ciltleri aseptik olarak hazırlanarak, orta hat göbek üstü ve altı median insizyonla laparotomi yapıldı. İnfrarenal abdominal aorta (İAA), barsakların ıslak gazlı bez yardımıyla uzaklaştırılmasının ardından, dikkatli bir şekilde explore edildi ve atravmatik mikrovasküler klemp konularak oklüzyon yaratıldı. Batın kapatıldı, 30 dakika sonra batın tekrar açılarak, İAA' daki klemp kaldırıldı ve 60 dakika süreyle reperfüzyon sağlandı. Aortik klempleme; işlem sonucunda distal aortada pulsasyonun kaybolmasıyla ve reperfüzyon ise klempleme sonrası distal aortada pulsasyonun geri gelmesiyle onaylandı. Kontrol grubunu oluşturacak ratlarda laparotomi ve abdominal aort diseksiyonu eşit sürede uygulandı ve bu gruba İ/R uygulanmadı. İ/R periyotları sonrası tüm ratlar intrakardiyak 4-5cc. kan alınarak sakrifiye edildi ve akciğer ile gastrocnemius kası enzimatik inceleme için çıkartıldı.

3.3. Biyokimyasal İşlemler

3.3.1 Dokuların homojenizasyonu

B. Braun marka homojenizatörde, doku homojenizasyon tamponu ile yapıldı. Doku homojenizasyon tamponu (1mM, pH=7,4); phenylmethylsulfonylfluoride (C₇H₇FO₂₅, SIGMA, katalog numarası P-7626), di-Natriumhydrogenphosphat-Dihydrate

($\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, MERCK, katalog numarası K25979680), potasyumdihydrogenphosphat (H_2KPO_4 , MERCK, katalog numarası A986373), ethylenediaminetetraacetic asid (EDTA) disodyum ($\text{C}_{10}\text{H}_{14}\text{N}_2\text{O}_8\text{Na}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, SIGMA, katolog numarası E-1644) kullanılarak hazırlandı (117).

3.3.2. Malonil Dialdehit Ölçümü

TBARS (tiobarbitürik asit ile reaksiyon veren ürünler) ölçümü yapılarak indirek olarak değerlendirildi. Doku MDA düzeyi ölçümü; Drapper ve Hadley'e göre yapıldı (117). Örnekler %1 fosforik asit (Phosphoric acid, MERCK, 1.00563) ve %0,6 TBA (2-Thiobarbutiric Acid, 4,6-Dihydroxypyrimidine-2-thiol, SIGMA, katolog numarası T-5500) kullanılarak hazırlandı. MDA standardı; malonaldehyde bis (dimethyl acetal) (ALDRICH, AL-108383) kullanılarak hazırlandı. Örnekler ve standartlar Shimadzu UV-160 A spektrofotometrede 532 nm'de köre karşı okuma yapılarak değerlendirildi. Serum MDA düzeyi ölçümü; Yoshioka T ve arkadaşlarının yöntemine göre yapıldı (118). %20 TCA solüsyonu için TCA, RIEDEL, 27242 kullanıldı. Örnekler ve standartlar Shimadzu UV-160 A spektrofotometrede 532 nm'de okundu.

3.3.3. Süperoksit Dismutaz Aktivitesi Ölçümü

Yi Sun ve arkadaşlarının yöntemine göre yapıldı (119). SOD assay reaktifi: 0,3mM Xanthine solüsyonu (Xanthine ,SIGMA, SIX7375), 0,6mM EDTA solüsyonu (EDTA, ALDRICH, 31788), 150µmol NBT (SIGMA, SIN6639), 400mmol Na_2CO_3 solüsyonu (MERCK, 1.06392), BSA solüsyonu (Bovine serum albümin, SIGMA, SIA7906) ile hazırlandı. Xanthine oxidase solüsyonu: Xanthine oxidase (SIGMA, SIX4376), 2mmol amonyum sülfat çözeltisi (Ammonium sulfate, RIEDEL, RH31119) içinde çözündürülerek hazırlandı. Örneklerdeki reaksiyon, ortama 0,8mmol CuCl_2 eklenmesiyle durduruldu. Absorbans ölçümü Shimadzu UV 160 A spektrofotometrede 560 nm'de yapıldı

3.3.4. Katalaz Aktivitesi Ölçümü

Hugo Aebi yöntemine göre yapıldı (120). Tampon (50mM, pH=7); potasyumdihydrogenphosphat (KH_2PO_4 , MERCK, katalog numarası A986373) ve disodyumhidrojenfosfat ($\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, MERCK, katolog numarası K25979680) ile hazırlandı. H_2O_2 'li tampon; hazırlanmış olan tampona hidrojen peroksit (H_2O_2 , RIEDEL, RH18312) eklenmek suretiyle hazırlandı. Tampon ile dilüe edilmiş örneğe, H_2O_2 'li tamponun eklenmesi ile başlayan absorbands değişimi Shimadzu UV-160 A spektrofotometrede 240 nm'de izlenip, 15 saniyedeki absorbands değişimi saptanarak formüle göre hesaplama yapıldı.

3.3.5 Total Glutasyon (tGSH) tayini

Griffith ve Smith' e göre yapıldı (121). Presipite edici solüsyon; glasiyal metaphosphoric acid (RIEDEL-de HAEN, 04103), disodyum EDTA ($\text{C}_{10}\text{H}_{14}\text{N}_2\text{O}_8\text{Na}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, SIGMA, katolog numarası E-1644) ve sodyum klorür (NaCl , J.T.BAKER) kullanılarak hazırlandı. Disodyum phosphate solüsyonu; di Sodyum hidrojen fosfat (Na_2HPO_4 , MERCK, katolog numarası F368386) ile hazırlandı. DTNB solüsyonu; DTNB 5,5-Dithio-bis(2-NitrobenzoicAcid) ($\text{C}_{14}\text{H}_8\text{N}_2\text{O}_8\text{S}_2$, SIGMA, katalog numarası D-8130) ve sodyum sitrat ($\text{C}_6\text{H}_5\text{Na}_3\text{O}_7 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, SIGMA, katalog numarası S-4641) ile hazırlandı. Ortama NADPH (β -Nicotinamide Adenine Dinucleotide Phosphate Red SIGMA, SIN1630) ve GR (Glutathione reductase , SIGMA, SIG3664-) eklendi. Glutasyon standardı; Glutathione Reduced Form ($\text{C}_{10}\text{H}_{17}\text{N}_3\text{O}_6\text{S}$, SIGMA, katalog numarası G-4251) kullanılarak hazırlandı. Standartlar ve örnekler Shimadzu UV-160 A spektrofotometrede 412 nm'de absorbands izlendi (121).

3.3.6. GR Aktivitesi Ölçümü

Carlberg ve Mannervick 'e göre yapıldı (122). NADPH , GSSG (okside glutasyon) ve EDTA (etilen daimin tetra asetik asit) bulunan ortama örnek eklendi. UV Spektrofotometrede 340 nm'de absorbands izlendi.

3.3.7. GSH-Px Aktivitesi Ölçümü

Paglia ve Valentin yöntemine göre yapıldı (123). 1mmol GSH çözeltisi (glutathion free acid reduced form, SIGMA, SIG4251), 0,5mmol EDTA çözeltisi (EDTA, ALDRICH, 31788), 1mmol sodyum azid çözeltisi (NaN_3 , SIGMA, SIS2002), 0,1mmol NADPH çözeltisi (β -Nicotinamide Adenine Dinucleotide Phosphate red SIGMA, SIN1630), 1,25mmol T-BOOH çözeltisi (tert-butyl hydroperoxide, SIGMA, B2633) , 5000U/L glutatyon redüktaz (GR, glutathione reductase, SIGMA, SIG3664) kullanıldı. (Enzimatik reaksiyon, ortama 1,25 mmol T-BOOH çözeltisinin eklenmesiyle başlar). NADPH'ın NADP'ye çevrimi Shimadzu UV 160 A spektrofotometrede 340 nm'de 2. ve 4. dakikalar arasındaki sürede izlendi.

3.3.8. Nitrik Oksit Sentetaz Aktivitesi Ölçümü

NO'nun parçalanma ürünlerinden olan nitrat'ın düzeyi saptanarak, indirekt yolla, NO düzeyi hakkında bilgi sahibi olundu. Bu konuda Najwa K. Cortas ve arkadaşlarının yöntemi kullanıldı (118). Bu yöntemine göre; Kadmiyum (FLUKA, katalog numarası 20890) granülleri kullanıldı. Glisin-NaOH tamponu; glisin ($\text{C}_2\text{H}_5\text{NO}_2$, MERCK, katalog numarası K23214990) ve sodyum hidroksid (NaOH, PROLABO, katalog numarası EMB 45053) kullanılarak hazırlandı. Glisin NaOH tamponu içindeki CuSO_4 çözeltisi; glisin, NaOH ve bakır sülfat ($\text{CuSO}_4 \cdot 5 \text{H}_2\text{O}$, RIEDEL, RH12849-1) kullanılarak hazırlandı. Sülfanilamid çözeltisi; hydrochloric acid %37 (HCl, MERCK, katalog numarası K24016914) ve sulfonilamid ($\text{C}_6\text{H}_8\text{N}_2\text{O}_2\text{S}$, SIGMA, katalog numarası S-9251) ile hazırlandı. NED çözeltisi; (N0(1-Naphtyl)Ethyl-Enediamine dihydrochloride, ALDRICH, 22,248) kullanılarak hazırlandı. Standartlar sodyum nitrit (NaNO_2 , SIGMA, katalog numarası S-3421) kullanılarak hazırlandı. Örnekler ve standartlar ELISA mikropate readerda 540 nm'de okundu.

3.3.9. Total Antioksidan Kapasite Ölçümü

Kan heparinize tüplere alındıktan sonra, bekletilmeden plazma örnekleri ayrılıp, total antioksidan kapasitesi ölçümleri yapılana kadar -80°C ' de saklandı. Analiz, ticari ELISA KİT kullanılarak yapıldı (119).

3.3.10. Miyeloperoksidaz Aktivitesi Ölçümü

Suzuki ve Ota'ya göre yapıldı (123). HETAB (hexadecyltrimethylammonium bromide), EDTA , dimethylphormamide , TMB (3,3', 5,5' tetramethylbenzidine) ve hidrojen peroksit içeren ortama örnek eklenerek UV spektrofotometrede 615 nm'de absorbans izlendi.

3.4. İstatistiksel Analiz

İstatistiksel analizin yapılmasında bilgisayar programı olarak SPSS 11.5 kullanıldı. Sayısal değişkenler 'ortalama $\pm$ standart sapma' şeklinde sunuldu. Biyokimyasal bulguların istatistiksel değerlendirilmesi sırasında gruplar arasındaki anlamlı farkların belirlenmesinde Kruskal-Wallis testi, iki grup arasındaki farkın belirlenmesinde de Mann-Whitney U testi kullanıldı. Kruskal- Wallis testi için $p < 0.01$ değerleri ve Mann-Whitney U testi için $p < 0.05$ değerleri istatistiksel olarak anlamlı kabul edildi.

4-BULGULAR

4.1. Biyokimyasal Bulgular :

Yaptığımız çalışmada, Grup 1 [Kontrol (sham laparotomi) + serum fizyolojik Grubu]’e ait, kas dokusunda incelediğimiz biyokimyasal parametrelerin sayısal sonuçları tablo I’de verilmiştir.

Tablo I: Kas Dokusunda Kontrol (Sham Laparotomi) + Serum Fizyolojik Grubuna Ait Biyokimyasal Sonuçlar

	NO (nmol/g doku)	GR (mikromol of NADPH oxidized min/g protein)	KATALAZ (Cat k s-1 mg-1)	MDA (nmol/mgprotein)	SOD (U/mgprotein)	GSSG (milimol/gdoku)	tGSH (milimol/gdoku)	GSH-Px (µg/min/mg protein)
1	72,2160	,07306336	,35184319	5,0740	8,0547582	,4087	3,3553	1,406
2	28,6200	,10632478	,36972966	15,8562	7,0329670	,3269	6,7105	1,649
3	41,5800	,07292413	,23301487	,0000	2,6009852	,2452	6,7105	1,836
4	31,8960	,09483408	,42348262	,0000	6,7648943	,2452	6,7105	2,264
5	54,5160	,10366666	,56316457	12,6850	9,1428571	,3269	6,7105	1,758
6	39,0720	,10366666	,50560040	,0000	12,285714	,1635	9,3947	2,093
7	158,8200	,09399111	,47713069	44,3975	13,714285	,2452	9,3947	2,144
8	-	,087490110	,77779612	,0000	15,070643	,4904	12,0789	2,252

Not: Tablolardaki (-) işareti ile gösterilen parametreler, teknik nedenlerle biyokimyasal değerlendirmelerin yapılamadığı veya hatalı çıkan sonuçları göstermekte olup, istatistiksel değerlendirme dışında tutulmuştur.

Grup 2 [AİR + serum fizyolojik grubu]' ye ait kas dokusunda incelediğimiz biyokimyasal parametrelerin sayısal sonuçları tablo II' de verilmiştir.

Tablo II: Kas Dokusunda AİR + Serum Fizyolojik Grubuna Ait Biyokimyasal Sonuçlar

	NO (nmol/g doku)	GR (mikromol of NADPH oxidized min/g protein)	KATALAZ (Cat k s-1 mg-1)	MDA (nmol/mgprotein)	SOD (U/mgprotein)	GSSG (milimol/gdoku)	tGSH (milimol/gdo ku)	GSH-px (µg/min/mg protein)
1	539,2080	,08754074	,55936145	39,9577	7,6190476	12,7500	,4087	1,9815
2	25,2720	,11560404	,18388686	53,2770	16,900432	9,3947	,0817	2,0303
3	30,0480	,14292766	2,3555089	53,9112	14,881459	7,3816	,4087	2,1596
4	229,2120	,12693877	,52036767	,0000	16,793002	4,6974	,4087	2,4872
5	57,6840	,13350243	,31195531	40,5920	14,383275	6,0395	,3269	2,5244
6	-	,10885000	,30094302	38,6892	9,1428571	12,7500	,1635	2,1667
7	379,3680	,08386516	,36145564	59,6195	6,1637239	5,3684	,4087	1,4326
8	316,8960	,116839779	,36149285	8,2452	12,501973	6,0395	,3269	2,6519

Not: Tablolardaki (-) işareti ile gösterilen parametreler, teknik nedenlerle biyokimyasal değerlendirmelerin yapılamadığı veya hatalı çıkan sonuçları göstermekte olup, istatistiksel değerlendirme dışında tutulmuştur.

Grup 3 [AİR + KAR grubu]'e ait kas dokusunda incelediğimiz biyokimyasal parametrelerin sayısal sonuçları tablo III'de verilmiştir.

Tablo III: Kas Dokusunda AİR + KAR Grubuna Ait Biyokimyasal Sonuçlar

	NO (nmol/g doku)	GR (mikromol of NADPH oxidized min/g protein)	KATALAZ (Cat k s-1 mg-1)	MDA (nmol/mgprotein)	SOD (U/mgprotein)	GSSG (milimol/gdoku)	tGSH (milimol/gdoku)	GSH-px (μg/min/mg protein)
1	204,600	,0947809	,96875048	,0000	12,408163	6,0395	,3269	2,392
2	35,6760	,0719421	,53973076	,0000	15,862306	6,0395	,1635	2,433
3	27,4920	,0915126	,75365969	9,5137	14,502463	7,3816	,3269	2,321
4	171,996	,0878117	,25537713	,0000	13,552941	4,6974	,3269	2,470
5	31,7400	,0995200	1,2080735	,6342	17,980952	7,3816	,2452	2,144
6	228,408	,1113052	,65226702	26,6385	16,240601	8,0526	,2452	1,631
7	26,5440	,1147378	,32256330	18,3932	16,643550	7,3816	,2452	2,293
8	40,8720	,084931727	,31519034	12,6850	17,349397	10,7368	,2452	2,188

Not: Tablolardaki (-) işareti ile gösterilen parametreler, teknik nedenlerle biyokimyasal değerlendirmelerin yapılamadığı veya hatalı çıkan sonuçları göstermekte olup, istatistiksel değerlendirme dışında tutulmuştur.

Yaptığımız çalışmada kas dokusunda incelenen parametrelerin her grup için ortalaması ve standart sapması tablo IV'de verilmiştir.

Tablo IV: Gruplara Göre Kas Dokusunda Biyokimyasal Sonuçların Ortalama ve Standart Sapma Değerleri (Kas Dokusu)

	NO (nmol/g doku)	GR (mikromol of NADPH oxidized min/g protein)	KATALAZ (Cat k s-1 mg1)	MDA (nmol/mgprotei)	SOD (U/mgprotein)	GSSG (milimol/gdoku)	tGSH (milimol/gdoku)	GSH-PX (µg/min/mg protein)
Grup 1: sham laparotomi (kontrol) grubu + serum fizyolojik	60,960000	,091995	,462720	9,751586	9,333388	,306490	7,633224	1,925765
	45,625400	,0132678	,163293	15,34583	4,135389	,1047576	2,609782	,3116156
Grup 2: AİR + serum fizyolojik	225,38400	,114509	,619371	36,786469	12,29822	,316707	8,052632	2,179272
	198,70829	,0207979	,711753	21,6548995	4,173531	,1268991	3,228234	,3885440
Grup 3: AİR + KAR	95,916000	,094568	,626952	8,483087	15,56754	,265625	7,213816	2,234686
	88,983212	,0139964	,339484	10,1702649	1,922495	,0577924	1,784473	,2686891

Çalışmamızda gruplar arasındaki anlamlı farkların belirlenmesinde Kruskal-Wallis testi, iki grup arasındaki farkın belirlenmesinde de Mann-Whitney U testi kullanıldı. Kruskal-Wallis testi için $p < 0.01$ değerleri ve Mann-Whitney U testi için $p < 0.05$ değerleri istatistiksel olarak anlamlı kabul edildi. Kas dokusu için incelenen parametrelerin istatistiksel analizi tablo V'de verilmiştir.

Tablo V: Kas Dokusundaki Biyokimyasal Sonuçların Gruplar Arasındaki Anlamlı Farklarının Belirlenmesi

Kruskal Wallis Test	NO (nmol/g doku)	GR (mikromol of NADPH oxidized min/g protein)	KATALAZ (Cat k s-1 mg-1)	MDA (nmol/mgprotein)	SOD (U/mgprotein)	GSSG (milimol/gdoku)	tGSH (milimol/gdoku)	GSH-px (µg/min/mg protein)
$p < 0.01$ anlamlı	-	-	-	-	anlamlı	-	-	anlamlı

Mann-Whitney U testi $p < 0.05$ anlamlı	NO (nmol/g doku)	GR (mikromol of NADPH oxidized min/g protein)	KATALAZ (Cat k s-1 mg-1)	MDA (nmol/mgprotein)	SOD (U/mgprotein)	GSSG (milimol/gdoku)	tGSH (milimol/gdoku)	GSH-px (µg/min/mg protein)
I-II	-	anlamlı	-	anlamlı	-	-	-	-
I-III	-	-	-	-	anlamlı	-	-	anlamlı
II-III	-	-	-	anlamlı	-	-	-	-

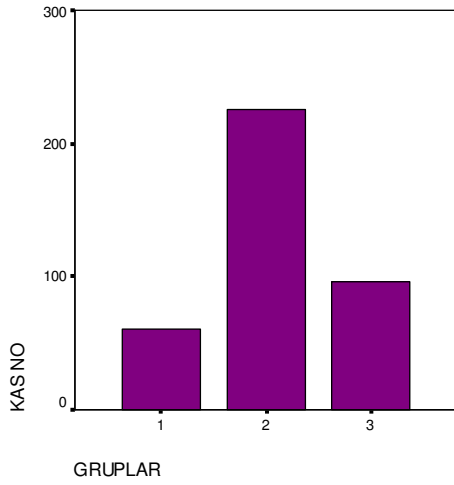
Kruskal-Wallis testi için $p < 0.01$ değerleri ve Mann-Whitney U testi için $p < 0.05$ değerleri istatistiksel olarak anlamlı kabul edildi

AİR grubunda (Grup 2); GR enzim aktiviteleri ve MDA değerleri kontrol grubundaki (Grup1) değerlere göre ($p<0,05$) anlamlı derecede yüksek bulundu. AİR grubunda (Grup 2) NO ve KATALAZ, SOD, GSH-PX enzim aktivitelerinde kontrol grubuna (Grup1) göre rakamsal olarak yükselme görüldü ancak bu yükselme istatistiksel olarak anlamlı bulunmadı.

tGSH ve GSSG enzim aktivitelerinde gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı fark saptanmadı.

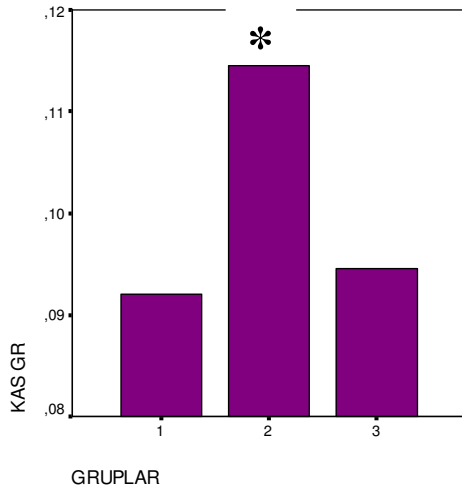
AİR + KAR grubunda (Grup3) NO ve GR enzim aktivitelerinde AİR grubundaki (Grup 2) değerlere göre rakamsal olarak azalma gözlemlendi ancak bu azalma istatistiksel olarak anlamlı bulunmadı. MDA değerleri AİR + KAR grubunda (Grup3), AİR grubundaki (Grup 2) değerlere göre ($p<0,05$) anlamlı derecede düşük bulundu.

Her parametrenin gruplar arasındaki farklılığını gösteren grafiksel analizler şekil 5-12’de gösterilmektedir.



Şekil 5: Kas dokusunda NO (nmol/g doku)’nun gruplar arası değerlerinin grafiksel analizi

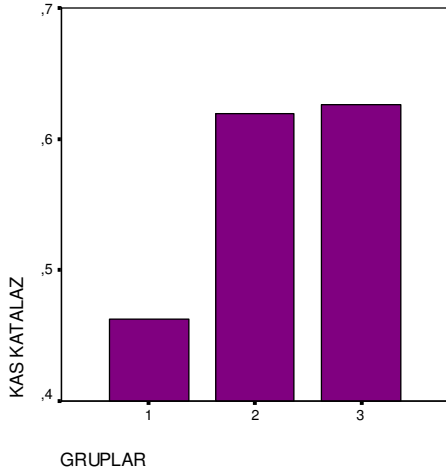
AİR grubunda (Grup 2) ve AİR+ KAR grubunda (Grup 3), NO değerinde, kontrol grubuna (Grup 1) göre rakamsal olarak yükselme gözlemlendi ancak bu artış istatistiksel olarak anlamlı bulunmadı ($p>0.05$). AİR + KAR (Grup 3) grubunda NO değerleri AİR grubuna (Grup 2) göre rakamsal olarak düşme gösterdi ancak bu düşme istatistiksel olarak anlamlı bulunmadı ($p>0.05$) (Şekil 5).



Şekil 6: Kas dokusunda GR (mikromol of NADPH oxidized min/g protein)'nin gruplar arası değerlerinin grafiksel analizi

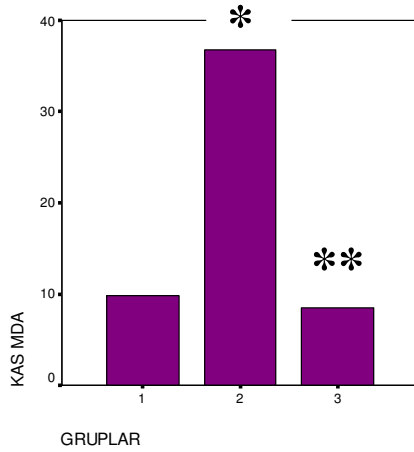
* Grup 1'e göre istatistiksel olarak anlamlı derecede yüksek. ($p < 0,05$)

GR, AİR grubunda (Grup 2) kontrol grubuna (Grup 1) göre anlamlı derecede yüksek bulundu ($p < 0,05$). AİR + KAR grubunda (Grup 3) GR enzim aktivitelerinde AİR grubuna göre (Grup 2) rakamsal olarak azalma gözlemlendi ancak bu azalış istatistiksel olarak anlamlı bulunmadı. ($p > 0,05$). AİR + KAR grubu (Grup 3) ile kontrol grubu arasında istatistiksel olarak anlamlı fark saptanmadı (6).



Şekil 7: Kas dokusunda KATALAZ'ın gruplar arası değerlerinin grafiksel analizi

Katalaz enzim aktiviteleri için AİR + KAR grubu (Grup 3) ile AİR grubu (Grup 2) arasında istatistiksel olarak anlamlı fark saptanmadı. Hem AİR + KAR grubu (Grup 3) hem de AİR grubunda (Grup 2) KAT enzim aktiviteleri kontrol grubundan (Grup 1) rakamsal olarak yüksek bulundu ancak bu yükselme istatistiksel olarak anlamlı bulunmadı ($p > 0,05$) (Şekil 7).

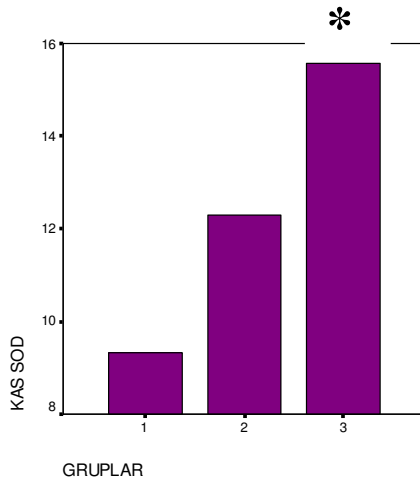


Şekil 8: Kas dokusunda MDA' nın (nmol/mg protein) gruplar arası değerlerinin grafiksel analizi

* Grup 1'e göre istatistiksel olarak anlamlı derecede yüksek. ($p < 0,05$)

**Grup 2'ye göre istatistiksel olarak anlamlı derecede düşük. ($p < 0,05$)

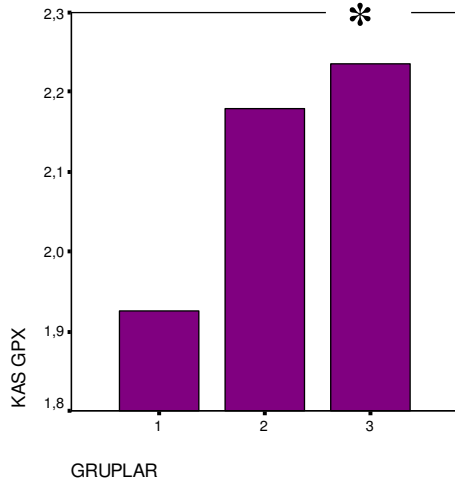
MDA, AİR (Grup 2) grubunda, kontrol grubuna (Grup 1) göre anlamlı derecede yüksek bulundu ($p < 0,05$). AİR+KAR grubunda (Grup 3) MDA değeri, AİR (Grup 2) grubuna göre anlamlı derecede düşük bulundu ($p < 0,05$) (8).



Şekil 9: Kas dokusunda SOD' ın (U/mg protein) (1/2 dilüe idi) gruplar arası değerlerin grafiksel analizi

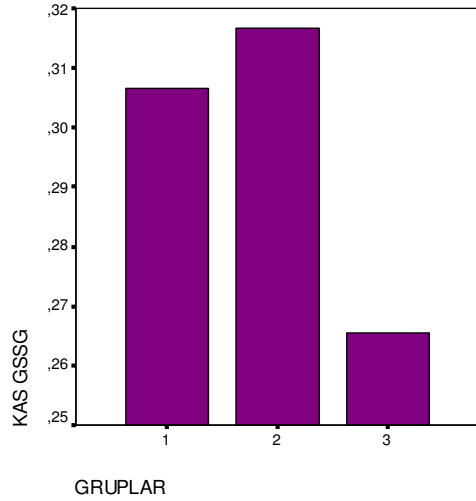
* Grup 1'e göre istatistiksel olarak anlamlı derecede yüksek. ($p < 0,05$)

SOD, AİR + KAR grubunda (Grup 3), kontrol grubuna (Grup 1) göre anlamlı derecede yüksek bulundu ($p < 0,05$). AİR grubunda (Grup 2) SOD değeri kontrol grubuna göre rakamsal olarak yüksek bulundu, ancak bu değer istatistiksel olarak anlamlı bulunmadı ($p > 0,05$) (Şekil 9).



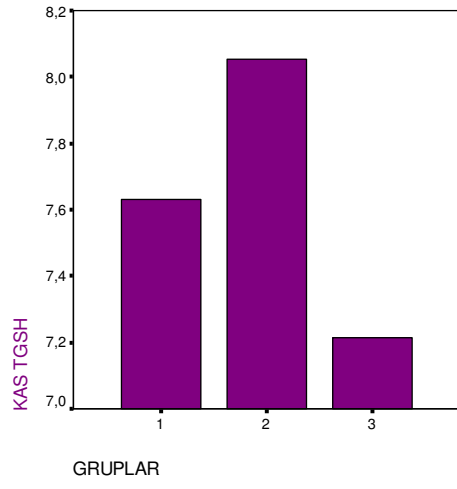
Şekil 10: Kas dokusunda GSH-Px' in ($\mu\text{g}/\text{min}/\text{mg}$ protein) gruplar arası değerlerin grafiksel analizi
 * Grup 1'e göre istatistiksel olarak anlamlı derecede yüksek. ($p < 0,05$)

GSH-Px, AİR + KAR grubunda (Grup 3) kontrol grubuna (Grup 1) göre anlamlı derecede yüksek bulundu ($p < 0,05$). AİR grubunda (Grup 2) GSH-Px değeri kontrol grubuna (Grup 1) göre rakamsal olarak yüksek bulundu ancak bu değer istatistiksel olarak anlamlı bulunmadı ($p > 0,05$). AİR + KAR grubu (Grup 3) ve AİR grubu (Grup 2) arasında istatistiksel olarak anlamlı fark bulunmadı (Şekil 10).



Şekil 11: Kas dokusunda GSSG' ın (milimol/g doku) gruplar arası değerlerin grafiksel analizi

Gruplar arasında anlamlı farklılık saptanmadı (Şekil 11).



Şekil 12: Kas dokusunda tGSH'ın (milimol/g doku) gruplar arası değerlerin grafiksel analizi

Gruplar arasında anlamlı farklılık saptanmadı (Şekil 12).

Yaptığımız çalışmada Grup 1 [Kontrol (sham laparotomi) + serum fizyolojik Grubu]'e ait kanda incelediğimiz biyokimyasal parametrelerin sayısal sonuçları tablo VI'da verilmiştir

Tablo VI: Kontrol (Sham Laparotomi) + Serum Fizyolojik Grubuna Ait Biyokimyasal Sonuçlar (KAN)

	SOD (U/g Hb)	NO (nmol/g doku)	GR (min/g protein)	GSH-px (µg/min/mg protein)	GSSG (milimol/g doku)	ıGSH (milimol/g doku)	TAK (U/g doku) yaşı	KATALAZ (k/g Hb)
1	1147,2108	123,525	11,8095238	141,7143	136,9272	237,2294	184,4544	318,622667
2	754,12244	99,9315	8,85714286	113,3714	54,7709	364,9683	184,3465	233,539711
3	562,62686	90,3600	7,40298508	27,2430	109,5417	383,2167	180,2462	207,014988
4	638,83900	74,7990	6,29841270	17,6356	54,7709	273,7262	189,3100	178,483134
5	588,32900	79,3950	7,51515152	24,0485	54,7709	328,4715	183,1596	164,331807
6	745,86466	71,0640	5,22105263	5,5691	136,9272	383,2167	184,9939	225,826680
7	659,78454	70,0080	4,87868853	15,6118	54,7709	474,4588	185,4255	190,553568
8	638,83900	86,3880	4,72380952	31,4921	27,3854	456,2104	184,1307	207,694318

Not: Tablolardaki (-) işareti ile gösterilen parametreler, teknik nedenlerle biyokimyasal değerlendirmelerin yapılamadığı veya hatalı çıkan sonuçları göstermekte olup, istatistiksel değerlendirme dışında tutulmuştur

Tablo VII: AİR + Serum Fizyolojik Grubuna Ait Biyokimyasal Sonuçlar (KAN)

	SOD (U/g Hb)	NO (nmol/g doku)	GR (min/g protein)	GSH-px (µg/min/mg protein)	GSSG (milimol/g doku)	tGSH (milimol/g doku)	TAK (U/g doku) yaş	KATALAZ (k/g Hb)
1	1039,238	70,8870	4,40888889	56,4338	27,3854	310,223	184,562	119,036223
2	925,4810	-	8,09795918	66,4033	109,5417	328,471	185,425	142,841131
3	883,6302	84,3390	9,72549020	150,9396	109,5417	328,471	186,288	185,012021
4	1120,531	82,1370	9,22790698	245,4623	82,1563	383,216	188,231	240,437335
5	518,9537	75,5820	5,58873239	134,1296	27,3854	291,974	183,375	168,526950
6	377,9047	82,2870	4,72380952	270,2019	109,5417	255,477	188,446	191,368145
7	526,3673	92,5680	5,66857143	113,3714	164,3126	182,484	185,209	234,896928
8	554,3529	81,2250	8,75294118	175,0588	109,5417	291,974	182,943	224,132761

Not: Tablolardaki (-) işareti ile gösterilen parametreler, teknik nedenlerle biyokimyasal değerlendirmelerin yapılamadığı veya hatalı çıkan sonuçları göstermekte olup, istatistiksel değerlendirme dışında tutulmuştur.

Tablo VIII: AİR + KAR Grubuna Ait Biyokimyasal Sonuçlar (KAN)

	SOD (U/g Hb)	NO (nmol/g doku)	GR (min/g protein)	GSH-px (µg/min/mg protein)	GSSG (milimol/g doku)	tGSH (milimol/g doku)	TAK (U/g doku) yaş	KATALAZ (k/g Hb)
1	1286,3296	88,323	12,7179487	276,7426	109,5417	310,223	185,965	340,513024
2	812,85175	81,423	11,2301887	220,1117	136,9272	310,223	183,807	528,075961
3	1039,2381	277,70	6,61333333	176,3556	17499,29	383,216	185,425	182,181075
4	776,80423	53,547	7,34814815	202,8089	82,1563	273,726	189,957	201,683010
5	767,83376	264,96	16,2327273	173,1491	27,3854	364,968	187,259	198,996133
6	925,48105	98,067	8,09795918	184,6335	246,4689	401,465	184,886	227,511723
7	767,83376	74,157	12,6254546	220,7651	82,1563	346,719	186,180	194,638795
8	-	73,434	-	649,7600	54,7709	383,216	184,993	-

Not: Tablolardaki (-) işareti ile gösterilen parametreler, teknik nedenlerle biyokimyasal değerlendirmelerin yapılamadığı veya hatalı çıkan sonuçları göstermekte olup, istatistiksel değerlendirme dışında tutulmuştur.

Yaptığımız çalışmada kanda incelenen parametrelerin her grup için ortalaması ve standart sapması tablo IX'da verilmiştir.

Tablo IX: Gruplara Göre Kanda Biyokimyasal Sonuçların Ortalama ve Standart Sapma Değerleri (Kan)

	SOD (U/g Hb)	NO (nmol/g doku)	GR (min/g protein)	GSH-px (µg/min/mg protein)	GSSG (milimol/g doku)	tGSH (milimol/g doku)	TAK (U/g yaş doku)	KATALAZ (k/g Hb)
Grup1: sham laparotomi (kontrol) grubu + serum fizyolojik	716,9520	86,93381	7,088346	47,08571	78,733118	362,6872	184,5083	215,7583
	186,3835	17,97741	2,398920	50,84643	42,519923	81,86402	2,515380	47,52368
Grup 2: AİR + serum fizyolojik	743,3074	81,28928	7,024287	151,5000	92,425834	296,5367	185,5604	188,2814
	280,1456	6,819200	2,148911	77,00552	46,144946	59,13162	2,026692	43,83204
Grup 3: AİR + KAR	910,9103	126,4530	10,69510	263,0407	2279,8372	346,7198	186,0594	267,6571
	194,1484	90,40549	3,497090	159,7945	6149,9439	44,69930	1,876424	126,7821

Çalışmamızda gruplar arasındaki anlamlı farkların belirlenmesinde Kruskal-Wallis testi, iki grup arasındaki farkın belirlenmesinde de Mann-Whitney U testi kullanıldı. Kruskal-Wallis testi için $p < 0.01$ değerleri ve Mann-Whitney U testi için $p < 0.05$ değerleri istatistiksel olarak anlamlı kabul edildi. Kan örneklerinde incelenen parametrelerin istatistiksel analizi tablo X'da verilmiştir.

TabloX: Kanda Biyokimyasal Sonuçların Gruplar Arasındaki Anlamlı Farklarının Belirlenmesi

Kruskal Wallis Test	SOD (U/g Hb)	NO (nmol/g doku)	GR (min/g protein)	GSH-px μ g/min/mg protein	GSSG (milimol/g doku)	tGSH milimol/g doku	TAK (U/g doku) yaş	KATALAZ k/g Hb
$p < 0.01$ anlamlı	-	-	-	anlamlı	-	-	-	-

Mann-Whitney U test $p < 0.05$ anlamlı	SOD (U/g Hb)	NO (nmol/g doku)	GR (min/g protein)	GSH-px μ g/min/mg protein	GSSG (milimol/g doku)	tGSH milimol/g doku	TAK (U/g doku) yaş	KATALAZ k/g Hb
I-II	-	-	-	anlamlı	-	-	-	-
I-III	anlamlı	-	anlamlı	anlamlı	-	-	-	-
II-III	-	-	anlamlı	anlamlı	-	-	-	-

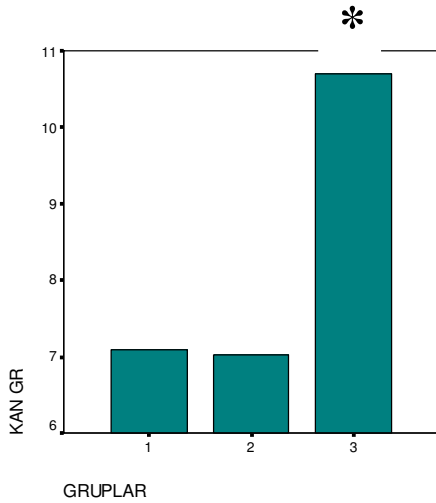
Kruskal-Wallis testi için $p < 0.01$ değerleri ve Mann-Whitney U testi için $p < 0.05$ değerleri istatistiksel olarak anlamlı kabul edildi

AİR grubunda (Grup2) GSH-Px enzim aktiviteleri, kontrol grubundaki (Grup 1) değerlere göre ($p<0,05$) anlamlı derecede yüksek bulundu. AİR grubunda (Grup 2) SOD enzim aktivitelerinde kontrol grubuna (Grup 1) göre rakamsal olarak yükselme görüldü ancak bu yükselme istatistiksel olarak anlamlı bulunmadı. AİR grubunda (Grup 2) NO ve GR, KATALAZ enzim aktivitesinde kontrol grubuna (Grup 1) göre istatistiksel olarak anlamlı farklılık saptanmadı.

tGSH, GSSG ve TAK düzeylerinde gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark saptanmadı.

AİR + KAR grubunda (Grup 3) GR ve GSH-Px enzim aktiviteleri, AİR grubundaki (Grup 2) değerlere göre anlamlı derecede yüksek bulunurken ($p<0,05$), AİR + KAR (Grup 3) grubunda KATALAZ, SOD, NO değerlerinde AİR grubuna (Grup 2) göre rakamsal olarak yükselme gözlemlendi ancak bu yükselme istatistiksel olarak anlamlı bulunmadı.

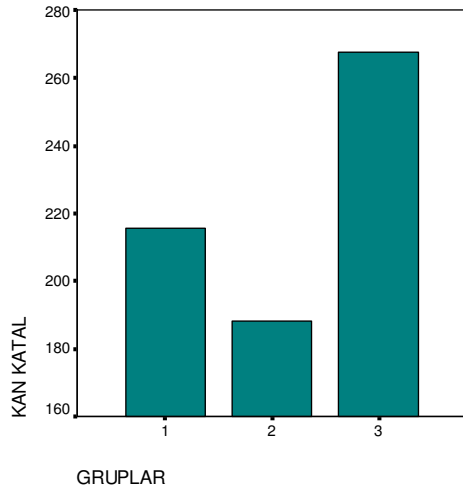
Her parametrenin gruplar arasındaki farklılığını gösteren grafiksel analizler şekil 13-20 ile gösterilmektedir.



Şekil 13: Kanda GR (min/g protein), gruplar arası değerlerin grafiksel analizi

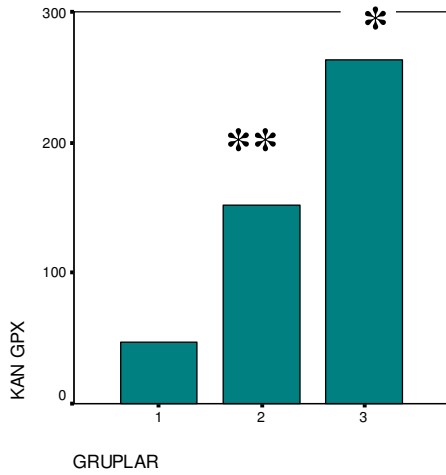
* Grup 1'e ve Grup 2'e göre istatistiksel olarak anlamlı derecede yüksek ($p<0,05$).

AİR + KAR (Grup 3) grubunda, GR değeri, hem AİR grubuna (Grup 2) göre, hem de kontrol grubuna (Grup 1) göre anlamlı derecede yüksek bulundu ($p<0,05$) (Şekil 13).



Şekil 14: Kanda KAT' ın (k s-1 mg-1) gruplar arası değerlerinin grafiksel analizi

Katalaz enzim aktiviteleri AİR + KAR grubunda (Grup 3), AİR grubuna (Grup 2) ve kontrol grubuna (Grup 1) göre rakamsal olarak yükselme gösterdi ancak bu yükselme istatistiksel olarak anlamlı bulunmadı ($p>0.05$) (Şekil 14).

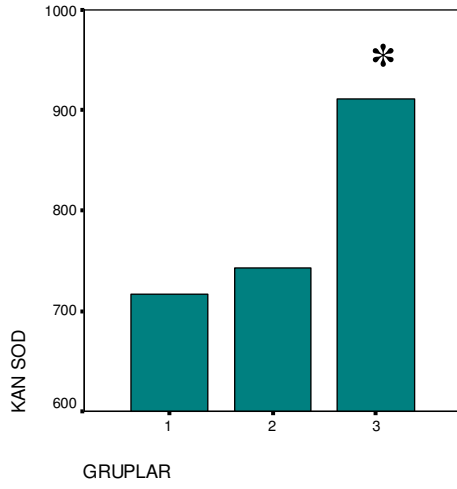


Şekil 15: Kanda GSH-Px (nmol/mg protein), gruplar arası değerlerin grafiksel analizi

* Grup 1' e ve Grup 2' ye göre istatistiksel olarak anlamlı derecede yüksek ($p<0,05$.)

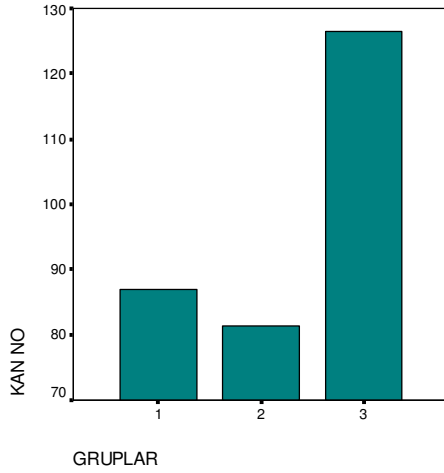
** Grup 1' e göre istatistiksel olarak anlamlı derecede yüksek ($p<0,05$).

AİR + KAR grubunda (Grup 3) GSH-Px enzim aktiviteleri, AİR grubundaki (Grup 2) ve kontrol (Grup 1) grubundakilere göre anlamlı derecede yüksek bulundu. AİR grubunda da GSH-Px değeri kontrol grubuna göre anlamlı derecede yüksek bulundu ($p<0,05$) (Şekil 15).



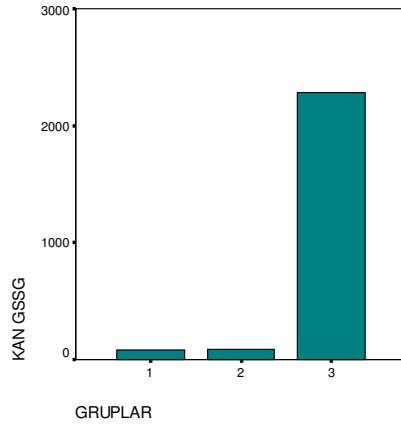
Şekil 16: Kanda SOD (U/mg protein 1/2 dilüide idi), gruplar arası değerlerin grafiksel analizi
 * Grup 1'e göre istatistiksel olarak anlamlı derecede yüksek ($p < 0,05$).

SOD enzim aktiviteleri AİR+ KAR grubunda (Grup 3), kontrol grubuna (Grup 1) göre anlamlı derecede yüksek bulundu ($p < 0,05$). AİR+ KAR grubu (Grup 3) ile AİR grubu (Grup 2) SOD enzim aktiviteleri karşılaştırıldığında, Grup 3'te rakamsal olarak yüksek bulundu ancak istatistiksel olarak anlamlı fark saptanmadı ($p > 0,05$) (Şekil 16).

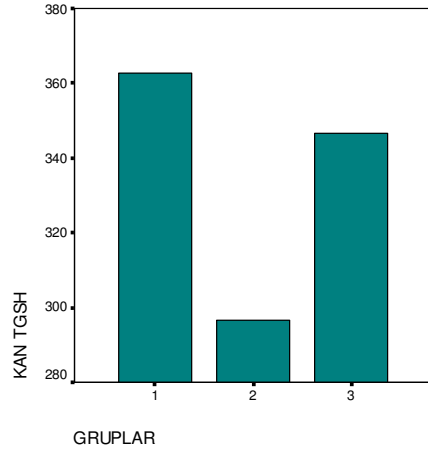


Şekil 17: Kanda NO (nmol/g doku), gruplar arası değerlerin grafiksel analizi

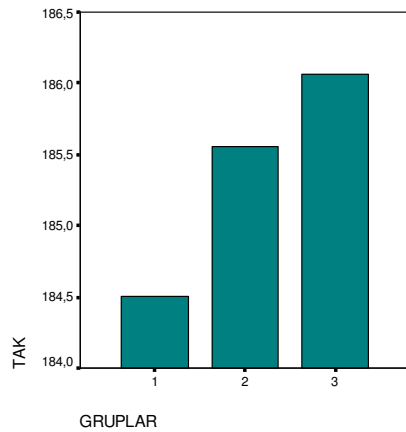
AİR + KAR grubunda (Grup 3) NO değeri, hem AİR grubuna (Grup 2) göre, hem de kontrol grubuna (grup 1) göre rakamsal olarak yüksek bulundu ancak istatistiksel olarak anlamlı fark saptanmadı ($p > 0,05$) (Şekil 17).



Şekil 18: Kanda GSSG (milimol/g doku), gruplar arası değerlerin grafiksel analizi
Gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı farklılık saptanmadı (Şekil 18).



Şekil 19: Kanda tGSH (milimol/g doku), gruplar arası değerlerin grafiksel analizi
Gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı farklılık saptanmadı (Şekil 19).



Şekil 20: Kanda TAK (U/g yaş doku), gruplar arası değerlerin grafiksel analizi
Gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı farklılık saptanmadı (Şekil 20).

Yaptığımız çalışmada Grup 1 [Kontrol (sham laparotomi) + serum fizyolojik Grubu]’ e ait, akciğer dokusunda incelediğimiz biyokimyasal parametrelerin sayısal sonuçları tablo XI’de verilmiştir.

TabloXI: Akciğer Dokusunda Kontrol (Sham Laparotomi) + Serum Fizyolojik Grubuna Ait Biyokimyasal Sonuçlar

	NO (nmol/g doku)	GR (mikromol of NADPH oxidized min/g protein)	KATALAZ Cat (k s-1 mg-1)	MDA (nmol/mgprotein)	MPO (U/g yaş doku)	SOD (U/mgprotei n)	tGSH (milimol/g doku)	GSSG (milimol/g doku)	GSH-px (µg/min/ mg protein)
1	38,484	336,427	,377644187	24,10147992	24,2000	6,03773	0,6710526	0,0817307	1,281
2	38,22	452,045	,193632178	57,7167019	-	3,86317	0,6710526	0,1634615	1,260
3	44,052	370,404	-	12,68498943	12,5400	4,43017	0,6710526	0,1634615	1,397
4	45,936	465,644	,166257331	0,0000	11,0000	,00000	0,6710526	0,2451923	1,743
5	39,12	470,806	,339824122	13,3192389	4,62000	7,17362	0,0000	0,0817307	1,469
6	44,16	333,214	,207684019	51,37420719	2,86000	6,36734	2,6842105	0,3269230	1,669
7	43,2	309,980	,242070204	39,9577167	3,52000	4,49648	1,3421052	0,4086538	1,286
8	36,804	329,536	,247920935	8,8794926	8,36000	7,62913	0,6710526	0,4086538	1,165

Not: Tablolardaki (-) işareti ile gösterilen parametreler, teknik nedenlerle biyokimyasal değerlendirmelerin yapılamadığı veya hatalı çıkan sonuçları göstermekte olup, istatistiksel değerlendirme dışında tutulmuştur

Grup 2 [AİR + serum fizyolojik grubu]' ye ait, akciğer dokusunda incelediğimiz biyokimyasal parametrelerin sayısal sonuçları tablo XII'de verilmiştir.

TabloXII: Akciğer Dokusunda AİR + Serum Fizyolojik Grubuna Ait Biyokimyasal Sonuçlar

	NO (nmol/g doku)	GR (mikromol of NADPH oxidized min/g protein)	KATALAZ Cat (k s-1 mg-1)	MDA (nmol/mgprotein)	MPO (U/g yaş doku)	SOD (U/mgprotein)	tGSH (milimol/g doku)	GSSG (milimol/g doku)	GSH-px (µg/min/mg protein)
1	57,168	310,232099	,319628628	67,86469345	43,78000	6,77248677	1,3421	0,7355769	1,0864
2	52,968	176,364557	,710451561	68,49894292	99,44000	5,38155515	4,0263	0,7355769	1,3165
3	34,548	294,713217	,785924401	68,49894292	43,34000	7,86604916	4,6974	0,6538461	1,1097
4	58,116	473,326829	,432201585	6,976744186	25,52000	10,0348432	1,3421	0,1634615	1,4065
5	81,948	318,404762	,480039702	17,12473573	17,16000	7,75510204	2,0132	0,6538461	1,5104
6	42,888	337,003345	,167512181	91,33192389	19,80000	7,56808409	,6711	0,5721153	1,3629
7	40,692	342,308725	,546722612	68,49894292	-	7,59348035	2,0132	0,5721153	1,5856
8	45,492	274,411765	,079058738	32,34672304	-	5,21008403	4,0263	0,6538461	,9191

Not: Tablolardaki (-) işareti ile gösterilen parametreler, teknik nedenlerle biyokimyasal değerlendirmelerin yapılamadığı veya hatalı çıkan sonuçları göstermekte olup, istatistiksel değerlendirme dışında tutulmuştur

TabloXIII: Akciğer Dokusunda AİR + KAR Grubuna Ait Biyokimyasal Sonuçlar

	NO (nmol/g doku)	GR (mikromol of NADPH oxidized min/g protein)	KATALAZ Cat (k s-1 mg-1)	MDA (nmol/mgprotein)	MPO (U/g yaş doku)	SOD (U/mgprotein)	tGSH (milimol/g doku)	GSSG (milimol/g doku)	GSH-px (µg/min/mg protein)
1	41,304	320,4993	-	30,443974	18,920000	7,8315310	1,3421	0,57211538	1,268
2	125,904	223,9200	,307421564	19,027484	10,120000	4,3102040	,0000	0,24519230	1,407
3	68,604	298,5600	,589447774	13,953488	37,840000	5,3194805	2,6842	0,65384615	1,090
4	32,952	172,2461	-	58,985200	14,520000	6,6310832	2,0132	0,40865384	,8462
5	47,316	203,2450	,479982152	45,665961	16,720000	5,9879275	2,0132	0,49038461	1,218
6	46,872	152,0099	,449244825	24,101479	-	3,2490203	1,3421	0,49038461	1,003
7	47,172	146,8327	,222308735	16,490486	21,560000	9,4426229	,6711	0,49038461	1,582
8	41,304	253,4404	-	30,443974	44,660000	6,8866571	,0000	0,40865384	1,284

Not: Tablolardaki (-) işareti ile gösterilen parametreler, teknik nedenlerle biyokimyasal değerlendirmelerin yapılamadığı veya hatalı çıkan sonuçları göstermekte olup, istatistiksel değerlendirme dışında tutulmuştur

Yaptığımız çalışmada akciğer dokusunda incelenen parametrelerin her grup için ortalaması ve standart sapması tablo XIV'de verilmiştir.

Tablo XIV: Gruplara Göre Akciğer Dokusunda Biyokimyasal Sonuçların Ortalama (1.Değer) ve Standart Sapma (2.Değer) Değerleri

	NO (nmol/g doku)	GR (mikromol of NADPH oxidized min/g protein)	KATALAZ Cat (k s-1 mg-1)	MDA (nmol/m gprotein)	MPO (U/g yaş doku)	SOD (U/mgprotei n)	tGSH (milimol/g doku)	GSSG (milimol/g doku)	GSH-px µg/min/m g protein
Grup 1: sham laparotomi (kontrol) grubu + serum fizyolojik	41,2470	383,5073	,253576	26,004	13,557500	4,999711	,922697	,234976	1,40924
	3,44789	67,93020	,077803	21,231	13,1795228	2,433520	,797032	,134208	,205568
Grup 2: AİR + serum fizyolojik	50,5590	315,8456	,440192	60,412	41,506667	7,272711	2,51644	,592548	1,28713
	15,6397	82,46613	,246367	31,845	30,6082124	1,534619	1,51119	,184056	,228960
Grup 3: AİR + KAR	56,9520	221,3442	,409681	30,126	23,477143	6,207316	1,25822	,469952	1,21257
	29,5983	65,38698	,145248	15,521	12,8046264	1,961533	,978218	,121619	,231526

Çalışmamızda gruplar arasındaki anlamlı farkların belirlenmesinde Kruskal-Wallis testi, iki grup arasındaki farkın belirlenmesinde de Mann-Whitney U testi kullanıldı. Akciğer dokusu için incelenen parametrelerin istatistiksel analizi tablo XV'de verilmiştir.

Tablo XV: Akciğer Dokusundaki Biyokimyasal Sonuçların Gruplar Arasındaki Anlamlı Farkların Belirlenmesi

Kruskal Wallis Test	NO (nmol/g doku)	GR (mikromol of NADPH oxidized min/g protein)	KATALAZ Cat (k s-1 mg-1)	MDA (nmol/mg protein)	MPO (U/g yaş doku)	SOD (U/mgprotein)	tGSH (milimol/g doku)	GSSG (milimol/g doku)	GSH-px µg/min/mg protein
p < 0.01 anlamlı	-	<i>anlamlı</i>	-	-	-	-	-	<i>anlamlı</i>	-

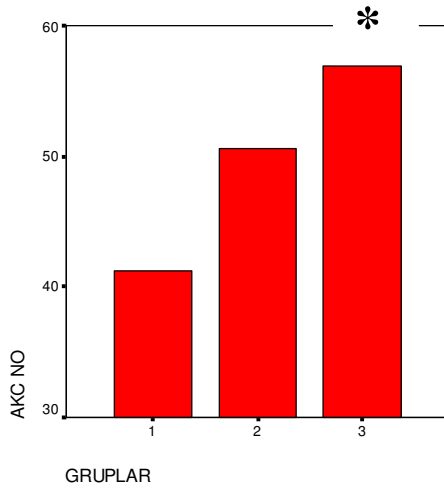
Mann-Whitney U testi <i>p<0.05 anlamlı</i>	NO (nmol/g doku)	GR (mikromol of NADPH oxidized min/g protein)	KATALAZ Cat (k s-1 mg-1)	MDA (nmol/mg protein)	MPO (U/g yaş doku)	SOD (U/mgprotein)	tGSH (milimol/g doku)	GSSG (milimol/g doku)	GSH-px µg/min/mg protein
I-II	-	-	-	<i>anlamlı</i>	<i>anlamlı</i>	<i>anlamlı</i>	<i>anlamlı</i>	<i>anlamlı</i>	-
I-III	<i>anlamlı</i>	<i>anlamlı</i>	-	-	-	-	<i>anlamlı</i>	<i>anlamlı</i>	-
II-III	-	<i>anlamlı</i>	-	<i>anlamlı</i>	-	-	-	<i>anlamlı</i>	-

Kruskal-Wallis testi için p<0.01 değerleri ve Mann-Whitney U testi için p<0.05 değerleri istatistiksel olarak anlamlı kabul edildi

AİR grubunda (Grup 2) MPO, GSSG, tGSH, SOD ve MDA düzeyleri kontrol grubundaki (Grup 1) değerlere göre ($p<0,05$) anlamlı derecede yüksek bulundu. AİR grubunda (Grup 2) NO ve KATALAZ enzim aktivitelerinde kontrol (Grup 1) grubuna göre rakamsal olarak yükselme görüldü ancak bu yükselme istatistiksel olarak anlamlı bulunmadı. AİR grubunda (Grup 2) GR ve GSH-Px enzim aktivitesinde kontrol (Grup 1) grubuna göre rakamsal olarak azalma görüldü ancak bu azalma istatistiksel olarak anlamlı bulunmadı.

AİR + KAR grubunda (Grup 3), GR , MDA ve GSSG değerleri AİR grubundaki (Grup 2) değerlere göre anlamlı derecede düşük bulunurken ($p<0,05$), AİR + KAR grubunda (Grup 3), MPO, KATALAZ, SOD, tGSH, GSH-PX değerlerinde AİR grubuna (Grup2) göre rakamsal olarak azalma gözlemlendi, ancak bu azalma istatistiksel olarak anlamlı bulunmadı.

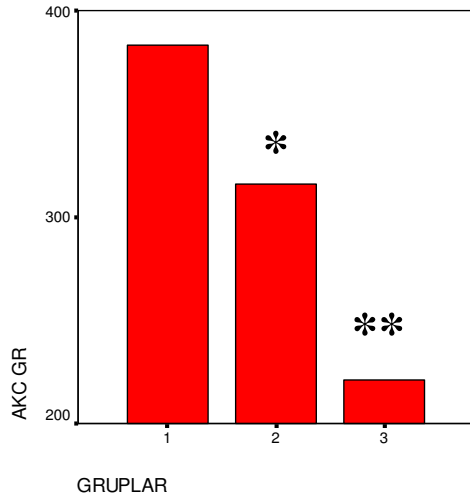
Her parametrenin gruplar arasındaki farklılığını gösteren grafiksel analizler şekil 21–29’ da gösterilmektedir.



Şekil 21 :Akciğerde NO (nmol/g doku), gruplar arası değerlerin grafiksel analizi

* Grup 1'e göre istatistiksel olarak anlamlı derecede yüksek ($p<0,05$).

NO, AİR + KAR grubunda (Grup 3), kontrol grubuna (Grup 1) göre anlamlı derecede yüksek bulundu ($p<0,05$). AİR grubunda (Grup 2) NO değerinde kontrol grubuna göre rakamsal olarak yükselme gözlemlendi ancak bu yükselme istatistiksel olarak anlamlı bulunmadı ($p>0,05$) (Şekil 21).

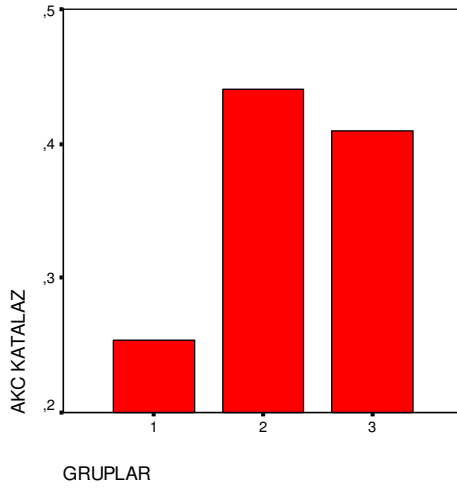


Şekil 22: Akciğerde GR (mikromol of NADPH oxidized min/g protein), gruplar arası değerlerin grafiksel analizi

* Grup 1' e göre istatistiksel olarak anlamlı derecede düşük ($p<0,05$).

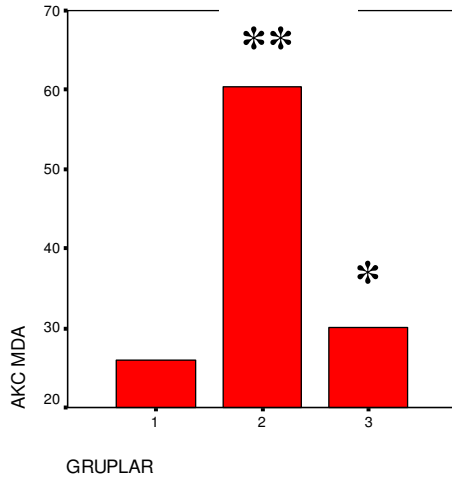
** Grup 1' e ve Grup 2' ye göre istatistiksel olarak anlamlı derecede düşük ($p<0,05$).

GR, AİR grubunda (Grup 2) kontrol grubuna (Grup 1) göre anlamlı derecede düşük bulundu ($p<0,05$). AİR + KAR grubunda (Grup 3), GR değeri hem AİR grubuna (Grup 2) göre, hem de kontrol grubuna (Grup 1) göre anlamlı derecede düşük bulundu ($p<0,05$) (Şekil 22).



Şekil 23: Akciğerde KAT'ın ($k s^{-1} mg^{-1}$) gruplar arası değerlerinin grafiksel analizi

Katalaz enzim aktiviteleri AİR + KAR (Grup 3) ve AİR grubunda (Grup 2) kontrol grubuna (Grup 1) göre rakamsal olarak yükselme gözlemlendi ancak bu yükselme istatistiksel olarak anlamlı bulunmadı ($p>0,05$). AİR + KAR grubunda (Grup 3), AİR grubuna (Grup 2) göre KAT enzim aktivitelerinde rakamsal olarak düşme gözlemlendi ancak bu azalma istatistiksel olarak anlamlı bulunmadı ($p>0,05$) (Şekil 23).

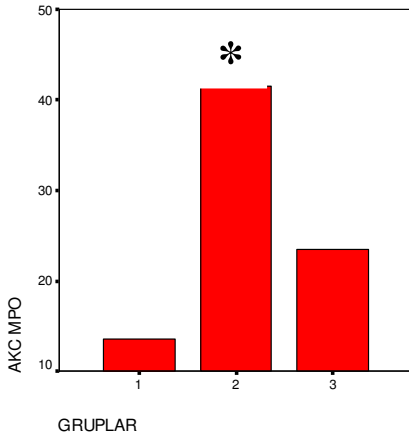


Şekil 24: Akciğerde MDA (nmol/mg protein), gruplar arası değerlerin grafiksel analizi

* Grup 2' ye göre istatistiksel olarak anlamlı derecede düşük ($p < 0,05$).

** Grup 1' e göre istatistiksel olarak anlamlı derecede yüksek ($p < 0,05$).

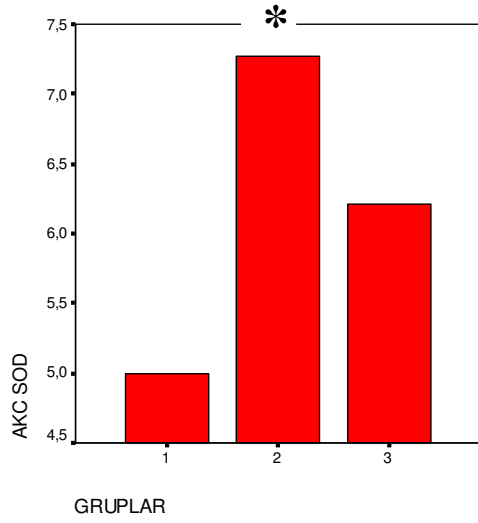
AİR + KAR grubunda (Grup 3) MDA değeri, AİR grubuna göre (Grup 2) anlamlı derecede düşük bulundu ($p < 0,05$). AİR grubu (Grup 2) ile kontrol grubu (Grup 1) arasındaki MDA değerleri arasında da istatistiksel olarak anlamlı yükselme gözlemlendi ($p < 0,05$). AİR + KAR grubunda (Grup 3), MDA değerinde kontrol grubuna (Grup 1) göre rakamsal olarak yükselme gözlemlendi ancak bu yükselme istatistiksel olarak anlamlı bulunmadı ($p > 0,05$) (Şekil 24).



Şekil 25: Akciğerde MPO (U/g yaş doku), gruplar arası değerlerin grafiksel analizi

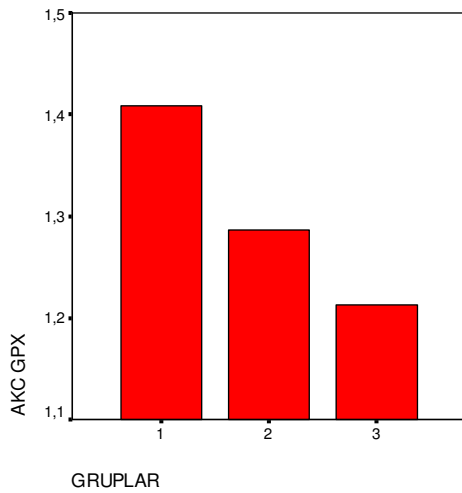
* Grup 1' e göre istatistiksel olarak anlamlı derecede yüksek ($p < 0,05$).

MPO enzim aktiviteleri AİR grubunda (Grup 2) kontrol grubuna (Grup 1) göre anlamlı derecede yüksek bulundu ($p < 0,05$). AİR + KAR grubu (Grup 3) MPO enzim aktiviteleri, AİR grubu (Grup 2) ile karşılaştırıldığında, rakamsal olarak düşük bulundu ancak bu düşme istatistiksel olarak anlamlı bulunmadı (Şekil 25).



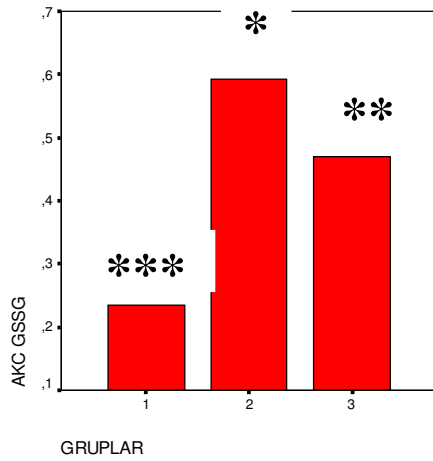
Şekil 26: Akciğerde SOD (U/mg protein)(1/2 dilüe idi), gruplar arası değerlerin grafiksel analizi
* Grup 1' e göre istatistiksel olarak anlamlı derecede yüksek ($p < 0,05$).

SOD enzim aktiviteleri AİR grubunda (Grup 2) kontrol grubuna (Grup 1) göre anlamlı derecede yüksek bulundu ($p < 0,05$). AİR + KAR grubu (Grup 3) ile kontrol grubu (Grup 1) SOD enzim aktiviteleri karşılaştırıldığında, Grup 3' te rakamsal olarak yüksek bulundu ancak istatistiksel olarak anlamlı fark saptanmadı ($p > 0,05$). AİR + KAR grubunda (Grup 3) SOD değeri AİR grubuna (Grup 2) göre rakamsal olarak düşük bulundu ancak bu düşme istatistiksel olarak anlamlı bulunmadı ($p > 0,05$) (Şekil 26).



Şekil 27: Akciğerde GSH-P ($\mu\text{g/min/mg protein}$), gruplar arası değerlerin grafiksel analizi

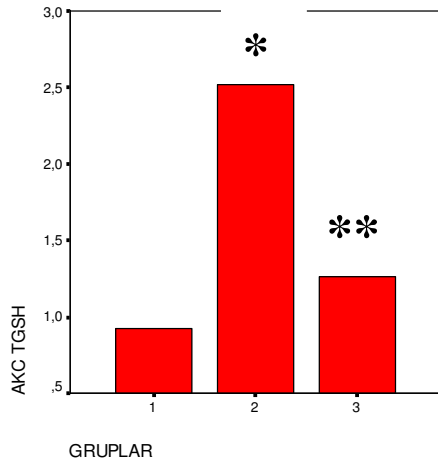
Gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı fark bulunmadı (Şekil 27).



Şekil 28: Akciğerde GSSG (milimol/g doku), gruplar arası değerlerin grafiksel analizi

- * Grup 1'e göre istatistiksel olarak anlamlı derecede yüksek ($p < 0,05$).
- * * Grup 2'ye göre istatistiksel olarak anlamlı derecede düşük ($p < 0,05$).
- * * * Grup 3'e göre istatistiksel olarak anlamlı derecede düşük ($p < 0,05$).

GSSG değerleri AİR + KAR (Grup 3) ve AİR grubunda (Grup 2) kontrol grubuna (Grup 1) göre istatistiksel olarak anlamlı derecede yüksek bulundu ($p < 0,05$). AİR + KAR grubunda (Grup 3), AİR grubuna (Grup 2) göre GSSG değerlerinde istatistiksel olarak anlamlı düşme gözlemlendi ($p < 0,05$) (Şekil 28).



Şekil 29: Akciğerde tGSH (milimol/g doku), gruplar arası değerlerin grafiksel analizi

- * Grup 1'e göre istatistiksel olarak anlamlı derecede yüksek ($p < 0,05$).
- * * Grup 1'e göre istatistiksel olarak anlamlı derecede yüksek ($p < 0,05$).

tGSH değerleri AİR + KAR (Grup 3) ve AİR grubunda (Grup 2), kontrol grubuna (Grup 1) göre istatistiksel olarak anlamlı derecede yüksek bulundu ($p < 0,05$). AİR + KAR grubunda (Grup 3), AİR grubuna (Grup 2) göre tGSH enzim aktivitelerinde rakamsal olarak düşme gözlemlendi ancak bu azalma istatistiksel olarak anlamlı bulunmadı ($p > 0,05$) (Şekil 29).

TARTIŞMA

Çalışmamızda; ratlarda infrarenal abdominal aorta oklüzyonu ile deneysel İ/R modeli oluşturuldu ve oluşan uzak organ (akciğer ve kas) hasarına karşı karnozinin etkisi araştırıldı. Çalışmanın sonucunda KAR' in, akciğerdeki uzak organ hasarını azalttığı saptandı.

Akut ekstremitte iskemisini takiben, ekstremitenin yeniden kanlandırılması ve normal dolaşımın sağlanması, doku hasarı ve sistemik komplikasyonları birlikte getirir. Kaynaklarda ölüm oranı %15-52, amputasyon oranı ise %12-22 olarak belirtilmiştir. Cerrahi girişim sonrasında ancak %60-70 olguda tam düzelme sağlanabilmektedir. Bu yüksek mortalite ve morbiditenin sebebi, reperfüzyon hasarının etkisiyle ortaya çıkan myonefropatik-metabolik sendromdur. Uzun süre iskemik kalmış ekstremitenin tekrar kanlandırılmasıyla ortaya çıkan serbest oksijen radikallerinin, endotel ve nötrofillerle etkileşerek, lipid peroksidasyonunu arttırması, lokal ve sistemik birçok etkinin ortaya çıkmasına neden olur. Hücre şişmesi, ödem, toksin ve myoglobulin salınımı ile beraber, serbest oksijen radikallerinin etkisi ile akut böbrek yetersizliği, akciğer ödemi, akut sıkıntılı solunum sendromu, şok karaciğeri gibi sistemik hasarlar gelişebilir (124 - 125).

Reperfüzyon hasarı, dokunun yeniden oksijen ile karşılaşması sürecinde üretilen toksik serbest oksijen radikallerine bağlı olarak gelişmektedir (62,63). Serbest oksijen radikalleri organizma tarafından bazı temizleyici sistemlerle yok edilmeye çalışılır. Serbest oksijen radikallerinin etkisini önlemede mannitol, allopürinol, askorbik asit, süperoksit dismutaz, pentoksifilin, alfa tokoferol gibi bazı maddeler denenmiştir ve deneysel olarak İRH' nı önlemede etkili oldukları gösterilmiştir (19, 64, 65, 66).

Alt extremitelerde dolaşım sistemi ile ilgili hastalıkların en sık rastlanılan sonucu; kronik yada akut süreçte periferik arterlerin tıkanması ve sonuçta ekstremitte perfüzyonunun bozulmasıdır (126). Klinik uygulamada da abdominal aort anevrizması, Lerische sendromu ve aortailiak hastalıklara yönelik cerrahi girişimlerde, infrarenal aortaya klemp konulmakta ve anastomozlar tamamlanana kadar alt ekstremitte iskemik kalmakta, anastomozun tamamlanması ve aortik klempin kaldırılması ile iskemik dokuların reperfüzyonu gerçekleşmektedir (126, 127). Deneysel araştırmalar için ekstremitte iskemisinin oluşturulmasında çok sayıda model geliştirilmiştir. Aortaya klemp konulması yöntemi özellikle hemodinamik izlemin yapılacağı ve İ/R' un sistemik etkilerinin araştırılacağı

durumlarda sıklıkla uygulanır (126–130). Bu modelde infrarenal abdominal aortaya klempe konularak model oluşturulması, klinikte özellikle aortailiak girişimlere uygun deneysel bir rat çalışma modelidir. Kiriş ve ark. (126) infrarenal AİR modelinde renal hasarı araştırmışlar, 30 dakika iskemi ve 60 dakika reperfüzyon ile oklüzyonun proksimalindeki uzak organda (böbrek) İRH oluştuğunu, MDA düzeyi ve antioksidan enzim aktivitelerinin artışının tespiti ile göstermişlerdir. Biz de çalışmamızda infrarenal aortik iskemi (30 dakika) ve reperfüzyon (60 dakika) uyguladık ve uzak doku olarak akciğer ve kas hasarını araştırdık.

Patel N.S. ve ark. (131) rat renal arterlerine bilateral 30 dakika iskemi ve 24 saat reperfüzyon uygulamışlar. Eritropoetin' i, bir gruba subkutan yolla deney öncesi 3 gün boyunca 1000 Ü/kg' dan ve diğer bir gruba reperfüzyondan 5 dakika önce 1000 Ü/ kg' dan tek doz yine subkutan yolla uygulamışlar. Sonuç olarak 3 gün tedavi uygulanan grupta daha fazla olmak üzere, her iki grupta böbrek hasarına karşı koruyucu olduğunu göstermişlerdir. Biz de çalışmamızda 30 dakikalık iskemi süresinin 20. dakikasında, reperfüzyondan 10 dakika önce, İP yolla 250 mg/kg dozdan KAR uyguladık.

İskemi-reperfüzyonda oluşan serbest radikaller, yüksek reaktiviteleri nedeniyle membranlardaki lipidlere saldırarak lipid peroksidasyonunu başlatırlar. Akciğerlerde İRH sırasında akümüle olan lipid peroksidasyon ürünü MDA' nın, tiyobarbitürik asit reaktif maddeleri ile verdiği reaksiyon spektrofotometrik olarak ölçülerek, akciğer hasarının derecesi hakkında fikir edinilebilir (132). MDA, poliansatüre yağ asitlerinin peroksidasyonu sonucu oluşan stabil bir son üründür. Doku İRH' nda, ksantin oksidaz enzimi, mitokondriyal oksidasyon, siklooksijenaz aracılı doymamış yağ asidi oksidasyonu, katekolamin oksidasyonu, sitokrom p 450 aracılı oksidasyon, lökosit NADPH oksidaz aktivasyonu, demir salınımı ve redoks siklusu, lokal ve sistemik serbest oksijen radikal oluşumuna katkıda bulunur (27, 33). Bununla birlikte her doku için baskın sistem farklıdır. Artmış serbest oksijen radikalleri (özellikle hidroksil radikali), hücre zarı fosfolipidlerinin (araşidonik asit, linoleik asit ve linolenik asit gibi çoklu doymamış yağ asitleri) peroksidasyonuna neden olarak hücre zarı bütünlüğünde bozulma, hücre şişmesi ve arşidonik asit / lipidperoksil salınımına neden olur (27, 33). Bu süreçte, zincirleme bir serbest oksijen ve yağ asidi radikali oluşumu ile ilerleyici hücre zarı hasarı gerçekleşir (27, 33). Dolayısıyla, bu kısır döngü sırasında meydana gelen ve stabil bir molekül olan MDA düzeyi ölçümü ile reaktif oksijen türevleri ve membran hasarı derecesi hakkında fikir sahibi olunabilir (133). Bu yüzden bu çalışmada reperfüzyon hasarının ortaya konabilmesi için MDA ölçümü yapılmıştır. Çalışmamızda, AİR sonrası akciğer dokusunda MDA değerinin anlamlı derecede yükseldiği

görüldü. Kas dokusunda da akciğer dokusunda olduğu gibi MDA düzeyinin kontrol grubuna göre anlamlı derecede yükseldiği görüldü. Benzer şekilde, AİR sonrası plazma MDA düzeylerinin yükseldiğini gösteren deneysel çalışmalar vardır (134 – 136). AİR + KAR grubundaki akciğer dokusunda MDA düzeylerinin, AİR grubundaki düzeye göre anlamlı derecede düşük olduğunu bulduk. Aynı şekilde kas dokusunda da MDA düzeylerinin, AİR grubundaki düzeye göre anlamlı derecede düşük olduğunu tespit ettik.

Uysal ve ark. (137) alt extremité İ/R' nun akciğer üzerindeki hasarını göstermek için kanda ve dokuda MDA düzeyi bakmışlar. İ/R grubunda MDA' nın yükseldiğini ve melatonin verilen grupta MDA düzeyinin azaldığını saptamışlardır. Okutan ve ark. (130) aortik oklüzyon ve reperfüzyon sonrasında oluşan akciğer hasarına karşı melatoninin etkisini araştırmışlar, MDA seviyesinin AİR grubunda yükseldiğini ve melatonin uygulanan grupta MDA seviyesinin anlamlı derecede azaldığını saptamışlardır. Benzer şekilde, Baltalarlı ve ark. (135), iloprost ve vitamin C' nin rat alt ekstremité İ/R' u sonrası akciğer hasarına olan etkisini araştırdıkları çalışmalarında, AİR + iloprost grubunda plazma MDA düzeylerinin AİR grubundaki düzeylere göre anlamlı derecede azaldığını bulmuşlardır. İloprost' un deneysel AİR modelinde iskelet kası hasarına olan etkisinin araştırıldığı bir çalışmada ise, AİR + iloprost grubuna ait MDA değerlerinin, AİR grubundaki değerlere göre anlamlı düzeyde azaldığı bulunmuştur (134). Katırcıoğlu ve ark. (136) ise, köpeklerde deneysel kardiyopulmoner by-pass modelinde, kardiyoplejik solüsyon ile birlikte iloprost verilmesinin, miyokard performansına olan etkisini araştırdıkları çalışmalarında, iloprost grubunda kontrol grubuna göre plazma MDA düzeyinde anlamlı düşüş saptamışlardır. Bunun yanında, Köksel ve ark. (138), rat AİR modelinde, plazma MDA düzeyleri bakımından AİR ve AİR + iloprost grupları arasında anlamlı fark saptamamışlardır. Rabl ve ark.' nın bir çalışmasında, böbrek transplantasyonu veya ekstremité kurtarma amacıyla revaskülarizasyon uygulanan hastaların plazma MDA düzeyleri bakılmış, transplantasyon uygulanan hastalarda ortalama %10, revaskülarizasyon uygulanan hastalarda ise ortalama %50 arttığını gösterilmiştir (139).

AİR hasarı oluşumunda serbest oksijen radikalleri önemli bir yer tutar (83). İskemik dokuların reperfüzyonu, toksik SOR oluşumuna yol açar. Bunlar süperoksit anyonlar, hidroksil radikalleri, hipoklorik asit, hidrojen peroksit ve nitrik oksitten derive peroksinitrittir (29). Oksijen kökenli serbest radikaller aracılığı ile oluşan hasarda başlangıç olay ksantin oksidaz kökenli süperoksit anyonlarının üretilmesidir (30). Serbest radikal temizleyicileri, reaktif oksijen parçaları ile reaksiyona girerek bunları zararsız maddeler haline dönüştüren ajanlardır. Bu ajanlar SOD, KAT ve GSH-Px olarak sıralanabilir.

İnsanlarda SOD' ın Cu-Zn ve Mn kapsayan iki izoenzimi vardır. Cu-Zn içeren tipi sitozolde, Mn içeren tipi mitokondride yerleşmiştir. SOD, süperoksitin hidrojen perokside dönüşümünü katalizler (66).

Çalışmamızda AİR grubunda akciğer dokusunda SOD aktivitesinde istatistiksel olarak anlamlı yükselme saptandı, ancak AİR + KAR grubunda SOD aktivitesinde istatistiksel olarak anlamlı azalma saptanmadı. Dimakakos P.B. ve ark. (127) deneysel bir çalışmada, abdominal aortada oklüzyon oluşturup, intestinal organlarda oksidan hasara karşı vitamin E'nin etkisini araştırmışlar. Bunun için kanda SOD aktivitesine bakmışlar. E vitamini verilen grupta SOD aktivitesinde azalma saptamışlar ve vitamin E' nin postiskemik hasara karşı koruduğunu savunmuşlardır. İlhan A. ve ark. (128) yaptıkları çalışmada, tavşanlarda kafeik asit fenil esterinin spinal kord İRH' na olan etkilerini araştırmışlar ve serbest radikal hasarının göstergesi olarak SOD aktivitesi bakmışlar, ancak tüm gruplar arasında anlamlı fark saptayamamışlardır, özellikle ilaç verilmesiyle SOD aktivitesinin anlamlı azalmaması çalışmamızla uyumludur. Ege E. ve ark. (129) tavşan spinal kord İRH' na erdosteinin etkisini araştırdıkları çalışmada, İ/R grubunda, kontrol grubu ile karşılaştırıldığında, SOD aktivitesinde anlamlı artma saptamış olmaları çalışmamızla uyumlu iken, erdostein verilen grupta SOD enzim aktivitesinde anlamlı azalma saptamışlardır. Bizim çalışmamızda AİR + KAR grubunda SOD düzeyinde belirgin azalma olması ancak bunun kontrol seviyesine inmemesi, oksidatif stresin KAR uygulanan grupta azaldığını ancak tamamen ortadan kalkmadığını düşündürmektedir.

Katalaz enzimi; SOD tarafından oluşturulan hidrojen peroksiti peroksizomlarda su ve oksijene çevirir. KAT vücutta doğal olarak oluşan bir metalloproteindir. İn vivo olarak süperoksit dismutaz ile kombine bir şekilde etki eder (66). Çalışmamızda, AİR grubunda akciğer dokusundaki KAT aktivitelerinde, kontrol grubuna göre rakamsal olarak artma saptandı. AİR + KAR grubunda da AİR grubuna göre rakamsal azalma saptandı, fakat istatistiksel anlam bulunmadı. Kiriş ve ark. (126) infrarenal AİR modelinde renal hasarı araştırdıkları çalışmada, İRH göstergesi olarak KAT aktivitesini incelemişler ve AİR grubunda kontrol grubuna göre KAT aktivitesinin anlamlı olarak arttığını saptamışlar. Erten S.F. ve ark. (140) deneysel spinal kord İRH' na melatoninin etkisini araştırmışlar. İskemi reperfüzyon grubunda KAT aktivitelerinde anlamlı artış saptamışlar. Melatonin verilmesi ile de bu aktivitelerde anlamlı azalma saptamışlardır. Mezzetti A. ve ark. (141) kardiopulmoner by-pass sırasında kanda KAT ve diğer antioksidan enzim aktivitelerini araştırmışlar. İskemi ve takiben yapılan reperfüzyon ile KAT ve diğer antioksidan enzim aktivitelerinde artış

bulmuşlar. Ayrıca bu değişikliklerin iskemik arrestin süresi ile ilişkili olduğunu ve reperfüzyonla serbest radikal üretiminin, önceki iskemik periyodun şiddetine bağımlı olduğunu saptamışlardır. Çalışmamızın AİR ve AİR + KAR gruplarındaki KAT aktivite değerlerinin değişimi bu literatürlerle uyumludur. Çalışmamızda AİR grubunda KAT aktivitesi artışı, yükselmiş SOD aktivitesi ile oluşan hidrojen peroksitin KAT enzimi ile elimine edildiğini düşündürmektedir. Karnozin uygulanan grupta azalan SOD aktivitesi oksidatif stresin azaldığını, ancak tam ortadan kalkmadığını, bununla birlikte bu grupta oluşan hidrojen peroksitin indirgenmesi için KAT aktivitesinde artışa yol açmadığı görülmüştür. KAT aktivitesinin AİR + KAR grubunda akciğer dokusunda kontrol grubu değerlerine inmesi de azalmasının bu nedenle olabileceği kanaatindeyiz.

GSH-Px; hidrojen peroksit varlığında, redükte glutatyonun okside glutatyonla yükseltgenmesini katalize eder (142). Ayrıca SOD tarafından oluşturulan hidrojen peroksiti mitokondri ve sitoplazmada su ve oksijene indirger (143). Çalışmamızda GSH-Px aktivitelerinde kanda AİR grubunda, kontrol grubuna göre anlamlı yükselme saptanırken, AİR + KAR grubunda AİR grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı yükselme vardı. İlhan A ve ark. (144) nebivololün tavşanlarda spinal kord İRH' na etkisini araştırmışlar ve İ/R grubunda spinal kord dokusunda GSH-Px' ın anlamlı derecede yükseldiğini bulmuşlardır. Castedo E. ve ark. (145) deneysel kalp transplantasyonunda İRH' nı ve bu hasara trimetazidinin sitoprotektif etkilerini araştırmışlar. Serbest radikallere bağlı İRH' nı göstermek için antioksidan glutatyon peroksidaz çalışmışlar. İskemi ve reperfüzyon periodlarında GSH-Px aktivitelerini yüksek bulmuşlardır. Bir grupta standart myokardial koruma yapmışlar, diğer grupta kardioplejik solüsyona trimetazidin eklemişler. Sonuç olarak trimetazidinin serbest radikal kaynaklı hasara karşı koruyucu olduğunu saptamışlardır. Aceto ve ark. (146) yaptıkları araştırmada, kardiopulmoner by-pass uygulanan hastalarda aortik klempleme ve klemple kaldırılması sonrası kanda GSH-Px aktivitelerinde artış olduğunu saptamışlardır. Bizim çalışmamızda, AİR grubunda GSH-Px aktivite artışı olması, SOD aktivitesi ile oluşan hidrojen peroksitin, GSH-Px enzimi ile de elimine edildiğini gösterebilir. KAR uygulanan grupta GSH-Px aktivite değerlerinin kontrol grubundaki değerlerden daha yüksek ve hatta AİR grubundaki kadar yüksek değerlerde kalması, hidrojen peroksit eliminasyonun bu grupta GSH-Px tarafından devam ettirilmesi ile ilgi olabileceği düşüncesindeyiz.

Karnozin, suda erime özelliğine bağlı olarak, suda çözünen oksidasyon mediatörlerinin (metaller ve oksijen radikalleri) yüksek olduğu sitozolde fonksiyon görür.

Aktif oksijen radikallerini temizleyen biyolojik fonksiyonuna bağı olarak antioksidan özelliğe sahiptir. Hidroksil ve süperoksit radikallerinin ve çok kuvvetli olarak da singlet oksijen molekülünün temizleyicisidir (15, 16). Antioksidan özelliğinden yola çıkılarak birçok deneysel modelde etkisi denenmiştir. Fujii ve arkadaşları yaptığı böbrek İ/R modelinde KAR verilmesinin, sempatik sinir aktivitesini ve böbrekte oluşan İRH' nı azalttığını bulmuşlardır (16). Stvolinsky ve arkadaşları beyin iskemisi oluşturulan deneklerde KAR' in nöroprotektör etkisi olduğunu göstermişlerdir (15). Başka bir çalışmada da; Boldyrev ve arkadaşları, global beyin iskemisi uygulanan deneklere KAR verilmesinin yaşam süresini arttırdığını saptamış, ayrıca KAR' in nöranal hücreleri SOR' lerine karşı koruduğunu bildirmişlerdir (21, 147). Yine KAR' in serebellar granüler hücreleri serbest radikal hasarından koruduğu gösterilmiştir (22). Hipkiss, KAR' in MDA toksisitesine karşı sıçan beyin endotel hücrelerini koruduğunu bildirmiştir (22). Lee ve arkadaşları izole sıçan kalp reperfüzyon hasarına karşı KAR' in koruyucu etkisi olduğu göstermiştir (23). Kang ve arkadaşları kültür ortamında karaciğer epitelial hücrelerinde 12-O-tetradecanoylphorbol-13-acetate ve hidrojen peroksitin neden olduğu DNA fragmentasyonunu, KAR' in engellediğini bulmuştur. Buna neden olarak KAR' in lipid peroksidasyonunu inhibe ettiğini, süperoksit dismutaz ve/veya serbest radikal temizleyici özelliğine sahip olduğunu bildirmişlerdir (24).

Karnozin; lipid peroksidasyonu sonucunda oluşan MDA gibi zararlı aldehytlerle reaksiyona girerek, hücredeki protein agregasyonunu azaltmaktadır. Karnozinin oksidatif stres şartlarında, proteinlerin ve membran lipidlerinin oksidatif hasarını önleyebildiği çeşitli çalışmalarda gösterilmiştir. Karnozin hücre düzeyinde koruyucu olabilir. Yapılan çalışmalarda bu dipeptidin kültüre edilmiş insan fibroblastlarını ve lenfositlerini, asetaldehytin toksik etkilerine karşı, ayrıca kültüre edilmiş rat beyin endotel hücrelerini MDA' ya karşı koruduğu bildirilmiştir (148).

Nagasawa ve arkadaşları, in vitro ve in vivo ortamdaki deneysel çalışmada, KAR' in iskelet kası dokusunda, hem lipid peroksidasyonu, hem de protein oksidasyonu üzerinde koruyucu etkilerini araştırmışlardır (149). Çalışma sonucunda KAR' in hem in vivo hem de in vitro ortamda, lipid peroksidasyonunu ve protein oksidasyonunu azalttığı gözlenmiştir. Diğer çalışmalarda da KAR' in, MDA ve metilglioksal aracılı oksidatif protein modifikasyonlarını inhibe ettiği bildirilmiştir. Karnozinin antioksidan özelliği ilk olarak in vitro ortamda 1984 yılında tanımlanmıştır (16). Cu^{+2} ve Zn^{+2} ile KAR kompleksleri SOD benzeri aktiviteye sahiptir. Bu özellik dipeptidin antioksidan aktivite göstermesine katkıda bulunur. Birçok in vitro deneysel çalışmada, KAR ve ilişkili histidin içeren bileşiklerin, hidroksil ve singlet oksijen

radikalini yok edici etkisi ve süperoksit radikalini süpürücü etkisi gösterilmiştir (14). Choi ve arkadaşlarının 1999 yılında in vitro ortamda yaptıkları bir çalışmada; KAR, homokarnozin ve anserinin, oksidatif hasarı önleyebileceği gösterilmiştir (150).

Çalışmamızda, inflamatuvar bir gösterge olan, lökosit ve mononükleer hücrelerden salgılanan MPO' ın akciğerdeki düzeylerine de bakıldı. İskemi reperfüzyon grubunda MPO düzeyleri kontrol ve tedavi gruplarına göre yüksek bulundu. Tedavi grubunun MPO değerleri İ/R grubuna göre rakamsal olarak düşüktü. Bu düşüklük istatistiksel olarak anlamlı bulunmadı. Tedavi grubunda MPO' nun düşük bulunması, KAR' ın İ/R oluşturulmuş dokuya lökosit ve mononükleer hücre göçünü de engellediği ve bu sayede antiinflamatuvar, ilave bir etki oluşturabileceğini göstermektedir. Bu inflamatuvar hücre göçünü azaltıcı etkiler, ilacın İRH sürecinde bu hücrelere bağlı oluşacak hasarın azaltılmasında da etkili olabileceği konusunda beklentileri artırmaktadır.

Serbest oksijen radikalleri, meydana geldikten sonra mikrosaniyeler içinde yok olmaktadır. Ancak bir serbest oksijen radikali, bir atom veya molekül ile karşılaştığında, zincirleme çekirdeksel reaksiyonlara benzer etkilerle, yeni serbest radikal oluşumuna neden olabilmektedir. Böylece olduğu yerde etki mesafesi son derece kısa olan serbest oksijen radikali, bu zincirleme reaksiyonlarla daha uzakta ve sistemik etkiler de oluşturabilmektedir. Serbest oksijen radikallerinin hasar yapıcı özelliklerine karşı, hücreler, doğal olarak, oksidatif hasarı azaltma veya sınırlama yeteneğine sahiptir. Bu hücre koruyucu mekanizmalar oksijen radikallerini gidermek ve detoksifiye etmek üzere düzenlenmiş birkaç enzim sistemini içerirler. Ancak bu savunma sistemleri yetersiz kalınca, serbest oksijen radikalleri zararlı etkiler yapabilirler. Serbest oksijen radikali temizleyicilerinin deneysel ve klinik kullanımının etkinliğini gösteren çalışmalardan özellikle anlaşılan, antioksidanların reperfüzyon başlamadan önce uygulanmasının gerektiğidir (151 – 153).

Klinik uygulamada abdominal aort anevrizması, Lerische sendromu ve aorta iliak hastalıkların cerrahi tedavisinde, infrarenal abdominal aortaya klemp konulması gerekmektedir. Aortanın geçici oklüzyonu ve takiben alt extremitelerin reperfüzyonu sonrası akciğer hasarının ortaya çıktığı da bilinmektedir (12, 13, 14). Polimorfonükleer lökositlerin alt extremitelerin İ/R' u nedeniyle oluşan akciğer hasarında esas role sahip olduğu gösterilmiştir ve bu hücrelerin azalması akciğerler üzerinde koruyucu bir etki gösterir (14). Çalışmamızda elde edilen biyokimyasal bulgularla; infrarenal aortik oklüzyon ve takiben uygulanan alt extremitate reperfüzyonu ile, akciğerde İRH' nın oluştuğunu saptadık. Yine sonuçlar göstermektedir ki KAR uygulanması akciğerde oluşan İRH' nı azaltmaktadır. Bir

başka deyişle çalışmamızda; deneysel infrarenal AİR modelinde oluşan akciğer hasarına karşı, KAR' in akciğer İRH' nı azalttığı biyokimyasal olarak gösterdik. MDA düzeylerinde anlamlı azalma olması oluşan hasarın lipid peroksidasyonu ile ilişkili olabileceği ve KAR' in lipid peroksidasyonunu değiştirerek İRH' nı azalttığını düşündürmektedir. Gruplara ait akciğerde saptanan KAT ve GSH-Px değerlerinin birbirlerinden anlamlı derecede farklı olmamaları, bu enzimlerin, antioksidan kapasite içinde aktive olmasına gerek kalmadan, SOD tarafından AİR hasarının durdurulmuş olmasına bağlanabilir. Bu konudaki etki mekanizmasının ayrıntılı olarak tanımlanması için yeni deneysel çalışmalara ihtiyaç vardır. Bu deneysel çalışmaların sonucunda, KAR' in, farklı dozlarda, infrarenal abdominal aortaya yönelik cerrahi girişimlerde gelişen böbrek, karaciğer gibi diğer uzak doku hasarlarında da etkisinin araştırılabileceği düşüncesindeyiz.

SONUÇ

İskemi-reperfüzyon hasarı mekanizmasının tam olarak anlaşılması, hasarın çabuk ve en uygun bir şekilde önlenmesini sağlayacaktır. Karnozinin, deneysel modelimizde, İRH' nın sistemik-lokal etkilerini engellemede etkili olduğu görülmüştür. Abdominal aort İRH' ında KAR' in ilk defa kullanılması ve ortaya çıkan bulguların, karnozinin iskemi reperfüzyon hasarına karşı koruyucu olabileceğini desteklenmesi nedeniyle, çalışmamızın bundan sonraki araştırmalara yol göstereceği inancındayız. Ancak kullanılan ajanların klinikte uygulanabilirliği açısından daha çok çalışmaya ihtiyaç olduğu da bir gerçektir

ÖZET

Ratlarda Alt Ekstremité İskemi Reperfüzyon Hasarına Karnozinin Etkisi

Amaç: Bu çalışmanın amacı, rat infrarenal abdominal aortasında oklüzyon-reperfüzyon sonrası kas ve akciğer dokusunda oluşan iskemi reperfüzyon hasarına karnozinin etkisini araştırmaktır.

Yöntem : 24 adet Sprague-Dawley cinsi rat, rasgele ve eşit sayıda (n=8) olmak üzere üç gruba ayrıldı. Grup 1; sham laparotomi (kontrol) + serum fizyolojik grubuna, laparotomi ve infrarenal abdominal aorta diseksiyonu yapıldı ancak oklüzyon uygulanmadı ve serum fizyolojik intraperitoneal verildi. Grup 2; Aortik iskemi reperfüzyon + serum fizyolojik grubunda infrarenal abdominal aorta diseksiyonu yapıldı, aortaya kros-klemp konularak 30 dakika iskemi ve kros-klemp kaldırılarak 60 dakika reperfüzyon gerçekleştirildi, klemp kaldırılmadan 10 dakika önce serum fizyolojik intraperitoneal uygulandı. Grup 3; Aortik iskemi reperfüzyon + karnozin grubunda ise, aortaya kros-klemp konularak 30 dakika iskemi ve 60 dakika reperfüzyon uygulandı, kros-klemp kaldırılmadan 10 dakika önce 250 mg/kg karnozin intraperitoneal yolla verildi. Reperfüzyon süresinin tamamlanmasıyla ratlar; kan, kas ve akciğer doku örnekleri alınarak kurban edildi, örneklerde biyokimyasal yöntemlerle malonil dialdehit, süperoksit dismutaz, katalaz, myeloperoksidaz, nitrik oksit, glutatyon redüktaz, total glutatyon, okside glutatyon ve glutatyon peroksidaz düzeyleri ölçüldü. Kan örneklerinde bu parametrelere ek olarak total antioksidan kapasitesi bakıldı.

Bulgular: Akciğer dokusunda aortik iskemi reperfüzyon + serum fizyolojik grubuna (Grup 2) ait malonil dialdehit, süperoksit dismutaz, myeloperoksidaz, okside glutatyon ve total glutatyon değerleri kontrol grubundaki değerlere göre anlamlı derecede yüksek bulundu ($p<0,05$). Aortik iskemi reperfüzyon + karnozin grubuna (Grup 3) ait glutatyon redüktaz, malonil dialdehit ve okside glutatyon değerleri, aortik iskemi reperfüzyon + serum fizyolojik grubundaki değerlere göre anlamlı derecede düşük bulundu ($p<0,05$).

Sonuç: Karnozinin, deneysel modelimizde, iskemi reperfüzyon hasarının sistemik ve lokal etkilerini, özellikle akciğerlerde oluşan hasarı engellemede etkili olduğu görülmüştür. Abdominal aort iskemi reperfüzyon hasarında karnozinin ilk defa kullanılması ve ortaya çıkan bulguların, karnozinin iskemi reperfüzyon hasarına karşı koruyucu olabileceğini

desteklenmesi nedeniyle, çalışmamızın bundan sonraki araştırmalara yol göstereceği inancındayız.

Anahtar Kelimeler: İskemi Reperfüzyon Hasarı, Gastroknemius, Akciğer, Karnozin

İletişim Adresi: drbilgealacam@yahoo.com.tr

SUMMARY

The Effect Of Carnosine On Lower Extremity Ischemia Reperfusion Injury İn Rat

Purpose: The purpose of this study is; to examine the effect of carnosine on ischemia reperfusion injury in lungs and muscle occuring after occlusion – reperfusion of infrarenal abdominal aorta in rats.

Material and Method: Twentyfour Sprague-Dawley rats were randomly divided into 3 groups (n=8). Sham laparotomy (control) group underwent laparotomy and dissection of the infrarenal abdominal aorta without occlusion and saline was given intraperitoneally. In aortic ischemia reperfusion groups (group 2 and 3), after laparotomy and exteriorization of the infrarenal abdominal aorta, aorta was occluded for 30 min ischemia and then the clamp was removed for 60 min reperfusion. In group 2; saline and in group 3; 250mg/kg carnosine, in equal volumes, were given intraperitoneally 10 min before declamping of the aorta. The blood, lung and muscle specimens were taken for biochemical analysis of malonil dialdehyde, superoxide dismutase, catalase, myeloperoxidase, nitric oxide, glutathione peroxidase, glutathione reductase, total glutathione and oxide glutathione. Additionally, in blood samples total antioksidant capacity was analyzed.

Results: İn lung specimens, levels of malonil dialdehyde, superoxide dismutase, myeloperoxidase, oxide glutathione and total glutathione in the aortik ischemia reperfusion + saline group (group 2) were significantly higher than the levels in the sham laparotomy (control) group ($p<0.05$). Level of glutathione reductase, malonil dialdehyde and oxide glutathione in the aortik ischemia reperfusion + carnosine group (group 3) was significantly lower than the level in the aortik ischemia reperfusion + saline group ($p<0.05$).

Conclusion: Carnosine could prevent the systemic and local effects of abdominal aortic occlusion-reperfusion injury in rats. Since this is a first demonstration for the use of carnosine

in abdominal aortic occlusion-reperfusion injury, the results of the present study could light the way for the future studies.

Key word: Ischemia Reperfusion Injury, Gastrocnemius, Lung, Carnosine

e-mail: drbilgealacam@yahoo.com.tr

KAYNAKLAR

- 1- Engin A, Altan N. Effects of obstructive jaundice on the antioxidative capacity of human red blood cells. *Hematologia* 2000; 30(2), 91-96.
- 2-Engin A, Altan N, Işık E. Erythrocyte glutathione levels in lithium-induced hypothyroidism. *Drugs R D* 2005; 6(1), 35-40.
- 3- Hasanoğlu E, Altan N, Sindel P, Ongun CÖ, Bali M, Altıntaş E. The relationship between erythrocyte superoxide dismutase activity and plasma levels of some trace elements (Al, Cu, Zn) of dialysis patients. *General Pharmacology* 1994; 25(1), 107-110.
- 4- Özenirler S, Tuncer C, Ongun CÖ, Altan N, Kandilci U. Activity of superoxide dismutase in erythrocyte of nonalcoholic chronic liver diseases. *General Pharmacology* 1994; 25(7), 1349- 51.
- 5- Engin A, Bozkurt BS, Altan N, Memiş L, Bukan N. Nitric oxide-mediated liver injury in presence of experimental bile duct obstruction. *World Journal of Surgery* 2003; 27(3), 253-5.
- 6- Yardım Akaydın S, Sepici A, Özkan Y, Torun M, Şimşek B, Sepici V. Oxidation of Uric Acid in Rheumatoid Arthritis: Is Allontoin a Marker of Oxidative Stress? *Free Radical Research* 2004; 38(6), 623-628.
- 7- Yardım Akaydın S, Sepici A, Özkan Y, Şimşek B, Sepici V. Evaluation of allantoin levels as a new marker of oxidative stress in Behçet's disease. *Scandinavian Journal of Rheumatology* 2006; 35(1), 61-64.
- 8- Carden DL, Granger DN. Pathophysiology of ischaemia-reperfusion injury. *J. Pathol.* 2000; 190:255-266.
- 9- Yassin MM, Harkin DW, Barros D'Sa AA, Halliday MI, Rowlands BJ. Lower limb ischemia-reperfusion injury triggers a systemic inflammatory response and multiple organ dysfunction. *World J Surg* 2002; 26: 115-21.

- 10- Nakamura T, Vollmar B, Winning J, Ueda M, Menger MD, Schäfers HJ. Heparin and the nonanticoagulant N-acetyl heparin attenuate capillary no-reflow after normothermic ischemia of the lung. *Ann Thorac Surg* 2001; Oct;72(4):1183-8.
- 11- Crestani B, Cornillet P, Dehoux M, Rolland C, Guenounou M, Aubier M. Alveolar type II epithelial cells produce interleukin-6 in vitro and in vivo. Regulation by alveolar macrophage secretory products. *J Clin Invest*. 1994; Aug;94(2):731-40.
- 12- Stallone RJ, Lim RC Jr, Blaisdell FW Pathogenesis of the pulmonary changes following ischemia of the lower extremities. *Ann Thorac Surg* 1969; Jun;7(6):539-49.
- 13- Welbourn R, Goldman G, O'Riordain M, Lindsay TF, Paterson IS, Kobzik L, Valeri CR, Shepro D, Hechtman HB. Role for tumor necrosis factor as mediator of lung injury following lower torso ischemia. *J Appl Physiol* 1991; Jun;70(6):2645-9
- 14- Klausner JM, Anner H, Paterson IS, Kobzik L, Valeri CR, Shepro D, Hechtman HB. Lower torso ischemia-induced lung injury is leukocyte dependent. *Ann Surg* 1988; Dec;208(6):761-7.
- 15- Stvolinsky SL, Kukley ML, Dobrota D, Matejovicova M, Tkac I, Boldyrev AA. Carnosine: an endogenous neuroprotector in the ischemic brain. *Cell Mol Neurobiol* 1999; Feb;19(1):45-56.
- 16- Fujii T, Takaoka M, Muraoka T, Kurata H, Tsuruoka N, Ono H, Kiso Y, Tanaka T, Matsumura Y. Preventive effect of L-carnosine on ischemia/reperfusion-induced acute renal failure in rats. *Eur J Pharmacol* 2003; Aug 8;474(2-3):261-7.
- 17- Shah DM, Bock DE, Darling RC. Beneficial effects of hypertonic mannitol in acute ischemia-reperfusion injuries in humans. *Cardiovasc Surg* 1996;4:97-100
- 18- Smeets HJ, Camps J, Van Milligen de Wit AW. Influence of low dose allopurinol on ischemia-reperfusion injury during abdominal aortic surg. *Eur J VascEndovasc Surg* 1995;9:162-9
- 19- Pepine CJ. The therapeutic potential of carnitine in cardiovascular disorders. *Clin Ther* 1991; 13(1):2-21,

- 20- Önal A, Astarcioglu H, Örmən M, Atilla K, Sarioğlu S. Sıçandaki renal iskemi-reperfüzyon hasarında L-Karnitinin koruyucu etkisi. *Ulus Travma Derg* 2004; 10(3):160-167,
- 21- Boldyrev A, Bulygina E, Leinsoo T, Petrushanko I, Tsubone Shiori, Abe H. Protective of neuronal cells against reactive oxygen species by carnosine and related compounds. *Comparative Biochemistry and Physiology Part B*. 2004; 137:81-88
- 22- Hipkiss AR. Carnosine, a protective, anti-ageing peptide? *The International Journal of Biochemistry&Cell Biology* 1998; 30: 863-868
- 23- Lee JW, Miyawaki H, Bobst EV, Hester JD. Improved functional Recovery of Ischemic Rat Hearts due to singlet Oxygen Scavengers Histidine and Carnosine. *J Mol Cell Cardiol* 1999; 31:113-121
- 24- Kang KS, Yun JW, Lee YS. Protective effect of L-carnosine against 12-Otetradecanoylphorbol-13-acetate or hydrogen peroxide-induced apoptosis on v-myc transformed rat liver epithelial cells. *Canser Letters* 2002; 178: 53-62
- 25- Grace PA. Ischaemia-reperfusion injury. *Br J Surg* 1994; May;81(5):637-47.
- 26- Nuh Zafer Cantürk, İskender Sayek. Cerrahi araştırma kitabı. 2005 nobel tıp kitabevleri.
- 27- Kumar V, Cotran R, Robbins SL. Temel patoloji (Basic Pathology), 6. edisyon ,Temmuz 2000 (6-10, 30-36)
- 28- Collard CD, Gelman S. Pathophysiology , clinical manifestations and prevention of ischemiareperfusion injury. *Anesthesiology*, 2001; 94,1133-1138.
- 29- Toyokuni S: Reactive oxygen species-induced molecular damage and its application in pathology. *Pathol int* 1999; 49:91-102.
- 30- Granger DN. Role of xanthine oxidase and granulocytes in ischaemia-reperfusion injury. *Am L Physiol* 1988; 255.HI269-75.
- 31- Ernster L. Biochemistry of reoxygenation injury. *Crit Care Med* 1988;16:947-53

- 32- Urbaniak JR, Seaber AV, Chen LE. Assessment of ischemia and reperfusion injury. Clin Ortho relat Res 1997; 334: 30-36.
- 33- Siemionow M, Arslan E. Ischemia/reperfusion injury: a review in relation to free tissue transfers. Microsurgery 2004; 24(6):468-75.
- 34- Akgün Y, Batun S, Taçyıldız İ, Akkuş M, Ketani A. Deneysel mezenterik iskemi-reperfüzyon modelinde değişik koruyucu ajanların etkilerinin biyokimyasal ve histopatolojik olarak değerlendirilmesi, Klin Deney Cerrah Derg. 1996; 4(1):13-7
- 35- Aydogdu N, Kaymak K, Yalçın Ö. Sıçanlarda böbrek iskemi-reperfüzyon hasarında n-asetilsisteinin etkileri. Fırat Tıp Dergisi. 2005; 4:151-155.
- 36- Haiomvici H: Skeletal Muscle ischemia-reperfusion injury .Fourth Edition 1996; S519
- 37- Furchgott RF, Vanhoutte PM. Endothelium-derived relaxing and contracting factors. FASEB j 1989; 3:2007-18.
- 38- Ignarro LJ, Bryns RE, Wood KS. Endothelium-dependent modulation of cyclic GMP levels and intrinsic smooth muscle tone in isolated bovine intrapulmonary artery and vein. Circ Res 1987; 60:82-92.
- 39- Rosenberg RD, Rosenberg JS. Natural anticoagulant mechanisms. J Clin Invest 1984; 74:1-5.
- 40- Esmon CT, Owen WG. Identification of an endothelial cofactor for thrombin-catalyzed activation of protein. Proc Soc Natl Acad Sci 1981; 78: 2249-52.
- 41- Akkus İ. Serbest Radikaller ve Fizyopatolojik etkileri. I.Baskı. Konya, Mimoza Yayınları, 1995.
- 42- Rees R, Smith D, Ly TD, Cashmer B, Gamer W, Punch J, Smith DJ. The role of xanthine oxidase and xanthine dehydrogenase in skin ischemia. J Surg Res 56 1994; 162-167.
- 43- Smith JK, Grisham GB. Free radical defense mechanisms and neutrophil infiltration in postischemic skeletal muscle. Am J Physiol 1989; 256:789-793.

- 44- Korthius RJ, Grisham MB, Granger DN. Leucocyte depletion attenuates vascular injury in post-ischemic skeletal muscle, *Am J Physiol* 1989; 254:283-7.
- 45- Breitbard GB, Dillon PK. Leukopenia reduces microvascular clearance of macromolecules in ischemia-reperfusion injury. *Curr Surg* 1990; 47:8-12.
- 46- Belkin M, LaMorte WL. The role of leucocytes in the pathophysiology of skeletal muscle ischemic injury. *J Vasc Surg* 1989; 10:14-9.
- 47- Kubes P, Kvietys PR, Granger DN. Ischemia-reperfusion injury In: Mortillaro NA, Taylor AE, eds *The pathophysiology of the microcirculation* Boca Raton, Fla: CRC press, 1994
- 48- Ferrante RJ, Silva MB. Inhibition of leucocyte adhesion at reperfusion decreases tissue damage in postischemic skeletal muscle. *Surg Forum* 1993; 44: 367-9.
- 49- Haimovici H. Muscular, renal, and metabolic complications of acute arterial occlusions: myonephropathic-metabolic syndrome. *Surgery*. 1979; Apr;85(4):461-8.
- 50- Avlan D, Tamer L, Ayaz L, Polat A, Ozturk C, Ozturhan H, Camdeviren H, Aksoyek S. Effects of trapidil on renal ischemia-reperfusion injury. *J Pediatr Surg* 2006; Oct;41(10):1686-93.
- 51- Rothenbach P, Turnage RH, Iglesias J, Riva A, Bartula L, Myers SI. Downstream effects of splanchnic ischemia-reperfusion injury on renal function and eicosanoid release. *J Appl Physiol* 1997; Aug;83(2):530-6.
- 52- Turnage RH, Kadesky KM, Myers SI, Guice KS, Oldham KT. Hepatic hypoperfusion after intestinal reperfusion. *Surgery*. 1996; Feb;119(2):151-60
- 53- Goldman G, Welbourn R, Klausner JM, Kobzik L, Valeri CR, Shepro D. Mast cells and leukotrienes mediate neutrophil sequestration and lung edema after remote ischemia in rodents. *Surgery* 1992;112:578-86.
- 54- Groeneveld AB, Raijmakers PG, Rauwerda JA, Hack CE. The inflammatory response to vascular surgery-associated ischaemia and reperfusion in man: effect on postoperative pulmonary function. *Eur J Vasc Endovasc Surg* 1997;14:351-9.

- 55- Klausner JM, Paterson IS, Kobzik L, Valeri CR, Shepro D, Hechtman HB. Oxygen free radicals mediate ischemia-induced lung injury. *Surgery* 1989;105(2): 192-9.
- 56- Nelson K, Herndon B, Reisz G. Pulmonary effects of ischemic limb reperfusion: evidence for a role for oxygen-derived radicals. *Crit Care Med* 1991;19:360-3.
- 57- İşbir S, Akgün S, Ak K, Civelek A, Tekeli A, Çobanoğlu A. Akut alt ekstremite iskemisi / reperfüzyon hasarının akciğer serbest oksijen radikalleri üzerine olan etkisi. *Türk Göğüs Kalp Damar Cerrahi Dergisi* 2000; 8:632-4.
- 58- Kyriakides C, Austen WG Jr, Wang Y, Favuzza J, Moore FD Jr, Hechtman HB. Neutrophil mediated remote organ injury after lower torso ischemia and reperfusion is selectin and complement dependent. *J Trauma* 2000;48:32-8.
- 59- Zimon IN, Mavlianova NA: Respiratory disorders in patients with acute arterial occlusion of legs and ischemic syndrome. *Khirurgiia* 1997;16-8.
- 60- McGuire, Liu P, Jaeschke H. Neutrophil-mediated lung damage after hepatic ischemia and endotoxemia. *Free Radic Biol Med* 1996;20: 189-97.
- 61- Punch J, Rees R, Cashner B. Acute lung injury following reperfusion ischemia in the hind limbs of rats. *J Trauma* 1991; 31: 760-5.
- 62- Mentzer SJ, Reilly JJ, DeCamp M, Sugarbaker DJ, Faller DV. Potential mechanism of vasomotor dysregulation after lung transplantation for primary pulmonary hypertension. *J Heart Lung Transplant* 1995;14:387-93.
- 63- Deitch EA, Bridges W, Berg R, Specian RD, Granger DN. Hemorrhagic shock-induced bacterial translocation: the role of neutrophils and hydroxyl radicals. *J Trauma* 1990; 30(8):942-51.
- 64- Mueller HW, Nollert MU, Eskin SG. Synthesis of structural analog of platelet activating factor, by vascular endothelial cells. *Biochem Biophys Res Commun* 1991;176: 1557-64.
- 65- Köksoy C, Kuzu MA, Ergün H, Gürhan I. Role of tumor necrosis factor in lung injury caused by intestinal ischemia-reperfusion. *Br J Surg* 2001; 88:464-468.

- 66- Halliwell B. Superoxide, iron, vascular endothelium and injury. *Free Radic Res Common* 1989; 5:315-18
- 67- Halliwell B. Oxidative stress, nutrition and health. Experimental strategies for optimization of nutritional antioxidants intake in humans. *Free Rad Res* 1996, 25: 57-74.
- 68- Nakazawa H, Genka C, Fujishima M. Pathological aspects of active oxygens/free radicals. *Japan J Physiol* 1996; 46:15-32.
- 69- Ufuk E: Deferoksaminin iskemik deri fleplerinde serbest oksijen radikali hasarını önleyici etkisi, vazodilatasyonun rolü. Uzmanlık tezi, İstanbul, 1992
- 70- Dolunay O, L-karnitin'in rat aortik iskemi-reperfüzyon modelinde akciğer ve endotel hasari üzerin etkisi Uzmanlık tezi, İSPARTA , 2006
- 71- Horvath I, Donnelly LE, Kiss A, Kharitonov SA, Lim S, Chung KF, Barnes PJ Combined use of exhaled hydrogen peroxide and nitric oxide in monitoring asthma. *Am J Respir Crit Care Med*. 1998; Oct;158(4):1042-6.
- 72- Hatch GE Asthma, inhaled oxidants, and dietary antioxidants. *Am J Clin Nutr*. 1995; Mar;61(3 Suppl):625S-630S.
- 73- White MJ, Heckler FR. Oxygen free radicals and wound healing. *Clin Plast Surg*. 1990; Jul;17(3):473-84.
- 74- Angel MF, Ramasastry SS, Swartz WM, Basford RE, Futrell JW. Free radicals: basic concepts concerning their chemistry, pathophysiology, and relevance to plastic surgery. *Plast Reconstr Surg*. 1987; Jun;79(6):990-7.
- 75- Aktan ÖA, Yalçın SA . Ischemia-reperfusion injury, reactive oxygen metabolites and the surgeon. *Turk J Med Sci* 1998;1-5
- 76- Ayvaz S. N-asetilsisteinin intestinal iskemi-reperfüzyon hasarına etkisi. Uzmanlık tezi.

- 77- Kehrer JP, Smith CV. Free radicals in biology: Sources, reactivities, and roles in the etiology of human diseases. In: FREI B. Editor. Natural antioxidants in human health and disease. San Diego: Academic Press 1994; 25-62.
- 78- Yalçın AS: Antioksidanlar. Klin Geliş. 1998; 11: 342-6
- 79- Uysal M. Serbest radikaller, lipid peroksidleri ve organizmada prooksidan-antioksidan dengeyi etkileyen koşullar. Klinik Gelişim 1998; 11:336-41.
- 80- Ames BN, Shigenaga MK, Hagen TM. Oxidants, antioxidants, and the degenerative diseases of aging. Proc Natl Acad Sci U S A. 1993; 17: 7915-22.
- 81- Bilgin Ö. Lipopolisakkarit ile uyarılmış hepatik iskemi reperfüzyon hasarı oluşturulan deneklerde, melatonin uygulanmasının NfκB ekspresyonu ile kan ve doku lipid peroksidasyonu üzerine etkisi. Mersin Üniversitesi Tıp Fakültesi Genel Cerrahi Anabilim Dalı. Mersin 2007.
- 82- Halliwell B, Gutteridge JM. The antioxidants of human extracellular fluids. Arch Biochem Biophys. 1990 Jul;280(1):1-8.
- 83- Clark IA. Tissue damage caused by free oxygen radicals. Pathology 1986;18:181-86
- 84- McCord JM, Fridovich I. Superoxide dismutase. An enzymic function for erythrocuprein (hemocuprein). J Biol Chem. 1969 ;25;244(22): 6049-55.
- 85- Spitz DR, Oberley LW. An assay for superoxide dismutase activity in mammalian tissue homogenates. Anal Biochem 1989 ;15;179(1):8-18.
- 86- Paglia DE, Valentine WN. Studies on the quantitative and qualitative characterization of erythrocyte glutathione peroxidase. J Lab Clin Med 1967;70 (1):158-69.
- 87- Aebi H. Catalase in vitro. Methods Enzymol. 1984;105:121-6.
- 88- Sano I. Simple Peptides in Brain, in "International Reviews of Neurobiology", (PFEIFFER, C.C., SMYTHIES, S.R., Eds.), 12,235,263, Academic Press, New York and London, (1970).

- 89- Gulewitsch W, Amiradzibi S. Ueber Das Carnosin, Eine Neue Organische Base Des Fleischextractes, Ber. Dtsch. Chem. Ges., 33,1902-1903. (1900)
- 90- Boldyrev A, Severin SE. The histidine-containing dipeptides, carnosine and anserine: distribution, properties and biological significance. Adv. Enzyme Regul 1990; 30,175-194.
- 91- Decker EA, Livisay SA, Zhou S. Reevaluation of the antioxidant activity of purified carnosine. Biochemistry (Moscow) 2000; 65 (7), 766-770.
- 92- Quinn PJ, Boldyrev AA, Formazuyk VE. Carnosine: its properties, functions and potential therapeutic applications, Molec Aspects Med 1992; 13, 379-444.
- 93- Bonfanti L, Peretto P, De Marchis S, Fasolo A. carnosine-related dipeptides in the mammalian brain, Prog. Neurobiol.1999; 59, 333-353.
- 94- Chan WKM, Decker EA, Chow CK, Boissonneault GA. Effect of dietary carnosine on plasma and tissue antioxidant concentrations and on lipid oxidation in rat skeletal muscle, Lipids 1994; 29,461-466.
- 95- Winnick RE, Winnick T. Carnosine-anserine synthetase of muscle. Biochim Biophys Acta 1959; 31:47-55
- 96- Kalyankar G, Meister A. Enzymatic synthesis of carnosine and related beta-alanyl and gamma-aminobutyryl peptides, J. Biol.Chem 1959; 234: 3210-3218.
- 97- Horinishl H, Grillo M, Margolis FL. Purification and characterization of carnosine synthetase from mouse olfactory bulbs. J Neurochem 1978; 31: 909-919.
- 98- Harding J.W, Margolis FL. denervation in the primary olfactory pathway of mice. III. effect of enzymes of carnosine metabolism. Brain Res 1976; 110, 351-360.
- 99- Ng RH, Marshall FO. Regional and subcellular distribution of homocarnosine-carnosine synthetase in the central nervous system of rats. J Neurochem 1978;30,187-190.

- 100- Murphey WH, Patchen L, Lindmark DG. Carnosinase: a fluorometric assay and demonstration of two electroporetic forms in human tissue extracts. *Clin Chim Acta* 1972; 42, 309-314.
- 101- Murphey WH, Lindmark DG, Patchen LI, Housler ME, Harrod EK, Mosovich L. Serum carnosinase deficiency concomitant with mental retardation. *Pediatr. Res.* 1973; 7, 601-606.
- 102- Wolos A, Piekarska K, Glogowski J, Konieckza I. Two molecular forms of swine kidney carnosinase. *Int. J. Biochem.* 1978; 9: 57-62.
- 103- Lenney JF, Kan SC, Siu K, Sugiyama GH. Homocarnosine a hog kidney dipeptidase with a broader specificity than carnosinase. *Arch. Biochem. Biophys.* 1977;184, 257-266.
- 104- Michaelis J, Hipkiss AR, Panagiotopoulos S. Method for the treatment of the complications and pathology of diabetes. Approved United States Patent 1996 ; 5, (561,110).
- 105- Mcfarland GA, Holliday R. Retardation of senescence of cultured human diploid fibroblasts by carnosine. *Exp. Celi Res* 1994; 212,167-175.
- 106- Hipkiss AR, Worthington VC, Himsworth DT, Herwig W. Protective effects of carnosine against protein modification mediated by malondialdehyde and hypochlorite. *Biochim. Biophys. Acta* 1998; 1380,46-54.
- 107- Bate Smith EC. The buffering of muscle in rigor; protein, phosphate and carnosine. *J. Physiol* 1938; 92, 336-343.
- 108- Dahl TA, Midden WR, Hartmann PE. Some prevalent biomolecules as defenses against singlet oxygen damage, *Photochem Photobiol* 1988; 47,357-362.
- 109- Kohen R, Yamamoto Y, Cundy KC, Ames BN Antioxidant activity of carnosine, homocarnosine, and anserine present in muscle and brain. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1988; May;85(9):3175-9
- 110- Pavlov AR, Revina AA, Dupin AM, Boldyrev AA, Yaropolov AI. The mechanism of interaction of carnosine with superoxide radicals in water solutions. *Biochim Biophys Acta.* 1993; Jul 11;1157(3):304-12.

- 111- Libondi T, Ragone R, Vincenzi D, Stiuso P, Auricchio G, Collona G. in Vitro Cross-Linking of Calf Lens α -Crystallin by Malondialdehyde. *Int. J. Peptide Protein Res* 1994; 44, 342-347.
- 112- Stadtman, E.R.: Protein oxidation and aging, *Science*, 1992; 257, 1220-1224.
- 113- Griffith OW. Glutathione and glutathione disulfide, in: H.U. Bergmeyer (Ed.), *Methods of Enzymatic Analysis*, Verlagsgesellschaft mbH, Weinheim, 1985; 521– 529.
- 114- Hipkiss AR, Chana H. Carnosine protects proteins against methylglyoxal-mediated modifications. *Biochem Biophys Res Commun.* 1998; Jul 9;248(1):28-32.
- 115- Hipkiss AR, Preston JE, Himsvoth DT, Worthington VC, Keown M, Michaelis J, Lavvrence JC, Mateen A, Ailende L, Eagles PAM, Abbott J. Pluripotent Protective Effects of Carnosine, A Naturallyoccurring Dipeptide, *Ann. N. Y. Acad. Sci.*1998; 85 (4), 37-53
- 116- Khandoga A, Enders G, Biberthaler P, Krombach F. Poly(ADP-ribose) polymerase triggers the microvascular mechanisms of hepatic ischemia-reperfusion injury. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 2002;283:553-560.
- 117- Witt EH., Reznick AZ., Viguie CA., Starke Reed P., Packer L. Exercise, oxidative damage and effects of antioxidant manipulation. *J Nutr* 1992;122:766-773.
- 118- Laaksonen DE., Atalay M., Niskanen L., Uusitupa M., Hanninen O., Sen CK., Blood glutathione homeostasi as a determinant of resting and exercise-induced oxidative stres in young men. *Redox Rep.* 1999. 4, 53-59.
- 119- Pick E, Keisari V. Superoxide anion and H_2O_2 production by chemically elicited peritoneal macrophage induced by multiple nonphagocytic stimuli. *Cell Immunol* 1981; 59: 301-318.
- 120- Demirel HA, Powers SK, Zengeroglu MA, Shanely RA, Hamilton K, Coombes J, Naito H. Short-term exercise improves myocardial tolerance to in vivo ischemia-reperfusion in the rat. *J Appl Physiol* 2001; 91(5): 2205-12.

- 121- Kantha SS, Wada S, Tanaka H, Takeuchi M, Watabe S, Ochi H. Carnosine sustains the retention of cell morphology in continuous fibroblast culture subjected to nutritional insult. *Biochem Biophys Res Commun*. 1996 Jun 14;223(2):278-82.
- 122- Carlberg I, Mannervick B. Glutathione reductase. In:Meister A. (Ed.). *Methods in Enzymology*, 1985; 113: 484-490.
- 123- Suzuki K, Ota H, Sasagawa S, et al. Assay method for myeloperoxidase in human polymorphonuclear leukocytes. *Anal Biochem* 1983;132:345–352.
- 124- Pontoppidan H, Geffin B, Lowenstein E. Acute respiratory failure in the adult. *N Engl J Med* 1972; 287:690-806.
- 125- Dantzker DR, Scharf SM. *Cardiopulmonary Critical Care*. 3rd ed. Philadelphia, WB Saunders, 1998. 41-42,
- 126- Kiris ,Okutan H, Savas Ç, Yönden Z, DelibasN. Deneysel aortik iskemi reperfüzyon modelinde renal hasara gadolinyum klorürün etkisi. *Turkish J Vasc Surg* 2005;14(2):13-18.
- 127- Dimakakos PB, Kotsis T, Kondi-Pafiti A, Katsenis K, Doufas A, Chondros K, Kouskouni E. Oxygen free radicals in abdominal aortic surgery. An experimental study. *J Cardiovasc Surg (Torino)*. 2002; Feb;43(1):77-82.
- 128- İlhan A, Koltuksuz U, Özen S, Uz E, Çıralık H, Akyol O. The effects of caffeic acid phenethyl ester (CAPE) on spinal cord ischemia/reperfusion injury in rabbits. *Eur J Cardiothorac Surg*. 1999; Oct;16(4):458-63.
- 129- Ege E, İlhan A, Gurel A, Akyol O, Ozen S. Erdosteine ameliorates neurological outcome and oxidative stress due to ischemia/reperfusion injury in rabbit spinal cord. *Eur J Vasc Endovasc Surg*. 2004; Oct;28(4):379-86.
- 130- Okutan H, Savas Ç, Delibas N.The antioxidant effect of melatonin in lung injury after aortic occlusion-reperfusion. *Interactive CardioVascular and Thoracic Surgery* 3 2004; 519-522.

- 131- Patel NS, Sharples EJ, Cuzzocrea S, Chatterjee PK, Britti D, Yaqoob MM, Thiernemann C. Pretreatment with EPO reduces the injury and dysfunction caused by ischemia reperfusion in the mouse kidney in vivo. *Kidney int* 2004; Sep;66(3):983-9.
- 132- Sakamaki F, Hoffmann H, Muller C, Dienemann H, Messmer K, Schildberg FW. Reduced lipid peroxidation and ischemiareperfusion injury after lung transplantation using low-potassium dextran solution for lung preservation. *Am J Respir Crit Care Med* 1997; 156(4): 1073-81.
- 133- Kingston R, Kelly CJ, Murray P. The therapeutic role of taurine in ischaemia-reperfusion injury. *Curr Pharm Des.* 2004;10(19):2401-10.
- 134- Bozkurt AK. Alpha-tocopherol (Vitamin E) and iloprost attenuate reperfusion injury in skeletal muscle ischemia/reperfusion injury. *J Cardiovasc Surg (Torino)* 2002; Oct;43(5):693-6
- 135- Baltarli A, Ozcan V, Bir F, Aybek H, Sacar M, Onem G, Goksin I, Demir S, Teke Z. Ascorbic acid (vitamin C) and iloprost attenuate the lung injury caused by ischemia/reperfusion of the lower extremities of rats. *Ann Vasc Surg.* 2006 ; Jan;20(1):49-55.
- 136- Katircioglu SF, Saritas Z, Ulus AT, Yamak B, Yücel D, Ayaz S. Iloprost added to the cardioplegic solutions improves myocardial performance. *Prostaglandins & other Lipid Mediators.* 1998; 55;51-65.
- 137- Uysal A, Akar İ, Özsin KK, Rahman A, Üstündag B, Özercan Hİ. Alt ekstremite iskemi reperfüzyonunun yol açtığı akciğer hasarında melatoninin koruyucu etkinliği. *Türk Göğüs Kalp Damar Cerrahisi Dergisi* Ekim 2006, Cilt: 14, Sayı 4, 308-314.
- 138- Koksel O, Ozdulger A, Aytacoglu B, Tamer L, Polat A, Sucu N, Yildirim C, Degirmenci U, Kanik A. The influence of iloprost on acute lung injury induced by hind limb ischemia-reperfusion in rats. *Pulm Pharmacol Ther.* 2005;18(4):235-41.
- 139- Rabl H, Khoschorur G, Colmbo T, Tatzber F, Esterbauer H. Plasma lipid peroxide levels show a strong transient increase after successful revascularization operations. *Free Rad Biol Med* 1992; 13:281-8.

- 140- Erten SF, Kocak A, Ozdemir I, Aydemir S, Colak A, Reeder BS. Protective effect of melatonin on experimental spinal cord ischemia. *Spinal Cord*. 2003; Oct;41(10):533-8
- 141- Mezzetti A, Lapenna D, Pierdomenico SD, Di Giammarco G, Bosco G, Di Ilio C, Santarelli P, Calafiore AM, Cuccurullo F. Myocardial antioxidant defenses during cardiopulmonary bypass. *J Card Surg*. 1993; Mar;8(2):167-71
- 142- Kus İ, Zararsız İ, Yılmaz HR, Türkoglu AÖ, Pekmez H, Sarsılmaz M. Sıçan prefrontal korteksinde formaldehit maruziyetiyle oluşan oksidatif hasara karşı melatonin hormonunun koruyucu etkisi. *Erciyes Üniversitesi Sağlık Bilimleri Dergisi (e.ü. journal of health sciences)* 2004;13(2) 1-7.
- 143- Jaeschke H. Mechanism oxidant stress induced acute tissue injury PSEBM. 1995; 209:104-111
- 144- İlhan A, Yılmaz HR, Armutçu F, Gürel A, Akyol O. The protective effect of nebivolol on ischemia reperfusion injury in rabbit spinal cord. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry*. 2004;28(7):1153-60.
- 145- Castedo E, Segovia J, Escudero C, Olmedilla B, Granado F, Blas C, Guardiola JM, Millan I, Pulpon LA, Ugarte J. Ischemia-reperfusion injury during experimental heart transplantation. Evaluation of trimetazidine's cytoprotective effect. *Rev Esp Cardiol*. 2005 Aug;58(8):941-50.
- 146- Aceto A, Mezzetti A, Di Ilio C, Calafiore AM, De Cesare D, Bosco G, Acciai N, Cappelletti L, Federici G, Cuccurullo F. Effect of ischaemia-reperfusion on glutathione peroxidase, glutathione reductase and glutathione transferase activities in human heart protected by hypothermic cardioplegia. *Free Radic Res Commun*. 1990;8(2):85-91.
- 147- Boldyrev A, Bulygina E, Leinsoo T, Petrushanko I, Tsubone Shiori, Abe H. Protective of neuronal cells against reactive oxygen species by carnosine and related compounds. *Comparative Biochemistry and Physiology Part B*. 2004; 137:81-88

- 148- Hipkiss AR, Preston JE, Himsworth DT, Worthington VC, Abbot NJ. Protective effects of carnosine against malondialdehyde-induced toxicity towards cultured rat brain endothelial cells. *Neurosci Lett*. 1997 ; Dec 5;238(3):135-8.
- 149- Nagasawa T, Yonekura T, Nishizawa N, Kitts DD. In vitro and in vivo inhibition of muscle lipid and protein oxidation by carnosine. *Mol Cell Biochem*. 2001; Sep ; 225 (1):29-34.
- 150- Choi SY, Kwon HY, Kwon OB, Kang JH. Hydrogen peroxide-mediated Cu, Zn-superoxide dismutase fragmentation: protection by carnosine, homocarnosine and anserine. *Biochim Biophys Acta*. 1999; Nov 16;1472(3): 651-7.
- 151- Goa KL, Brogden RN. L-Carnitine. *Drugs* 1987; 34:1-24.
- 152- Feller MA, Roth C A. Experimental evaluation of oxygen free radical scavengers in the prevention of reperfusion injury to skeletal muscle. *Ann Plast Surg* 1989; 22:321-331.
- 153- Seekamp A, Mulligan MS, Till GO, Smith CW, Myasaka M, Tamatom T. Role of beta 2 integrins and ICAM-1 in lung injury following ischemia reperfusion of rat hind limbs. *Am J Pathol* 1993; 14:464-72.