

T.C.
AKDENİZ ÜNİVERSİTESİ
TIP FAKÜLTESİ
GENEL CERRAHİ ANABİLİM DALI

SICAK İSKEMİ VE REPERFÜZYONA BAĞLI GELİŞEN RENAL DOKU HASARININ ÖNLENMESİNDE KOBALT'IN ROLÜ

UZMANLIK TEZİ

T 1042/1-1

AKDENİZ ÜNİVERSİTESİ
MERKEZ KÜTÜPHANESİ

Dr.Okan ERDOĞAN

Tez Danışmanı : Prof.Dr.Şükrü AKTAN

"Tezimden Kaynakça Gösterilerek Yararlanılabilir"

Antalya, 1996

TEŞEKKÜR

Genel Cerrahi uzmanlık eğitimim ve bu tezin hazırlanmasında emeği geçen başta Prof.Dr.Tuncer KARPUZOĞLU olmak üzere, tez moderatörüm Prof.Dr.Şükrü AKTAN, Prof.Dr.Gülşen ÖNER ve Anabilim Dalı Başkanımız Prof.Dr.Nezihi OYGÜR'e, ayrıca laboratuvar çalışmalarında emeği geçen Yrd.Doç.Dr.Ümit K.ŞENTÜRK'e teşekkür ederim.

Bu çalışma, organ transplantasyonu konusunda emeği geçen araştırmacılara ithaf edilmiştir.

Dr.Okan ERDOĞAN

Antalya, 1996

İçindekiler

	<u>Sayfa No</u>
Giriş ve Amaç	1 - 3
Genel Bilgiler.....	4 - 22
Gereç ve Yöntemler	23 - 28
Bulgular	29 - 42
Tartışma	43 - 48
Özet	49 - 50
Kaynaklar	51 - 58

GİRİŞ VE AMAÇ

Organ transplantasyonundaki gelişmeler; organların iskemik hasardan korunmasındaki temel fizyopatolojik mekanizmaların önemini ortaya koymuştur. Transplantasyonun başarısını etkileyen en önemli faktörlerden birisinin organda oluşan iskemi ve buna bağlı gelişen doku hasarı olduğunun anlaşılmasından sonra organ koruyucu önlemler konusunda önemli ilerlemeler kaydedilmiştir. Organdaki iskeminin neden olduğu hasarın, organ ısısının düşürülmesiyle azaltılabileceğinin ortaya konması sıcak ve soğuk iskemi kavramlarını gündeme getirmiştir (6, 13, 19, 31, 33).

İskemi vücudun sınırlı bir bölgesine gelen kan miktarının azalması ya da ortadan kalkmasına denir. Bu olay sonucunda iskemik bölge yaşamsal önemi olan besleyici maddelerden, özellikle oksijenden yoksun kaldığı gibi, organizma için zararlı metabolitleri de uzaklaştırılmaz. İskemi terimi genellikle arteryel kan dolaşımının bozulması için kullanılmakta ise de venöz kan dolaşımının bozulmasına bağlı anoksi ve metabolitlerin uzaklaştırılmaması nedeniyle yerel doku zedelenmesine yol açabileceği unutulmamalıdır.

Doku hasarının oluşmasında temel rolün iskemik dokuda oluşan serbest radikallerin olduğunun anlaşılmasından sonra bu konuda pek çok klinik ve deneysel çalışmalar yapılmıştır (18, 61, 64).

Yeryüzünde hayatın doğuşuna serbest radikallerin neden olduğuna inanılmakla birlikte bunlar aynı zamanda hemen hemen

bütün canlılarda yıkımın ve ölümün primer nedeni olarak da kabul edilmektedir. Çevrede ve vücutta sürekli olarak yapılan serbest radikallerin her çeşit dokuda hücreleri tahrip ettiği ve gen programlarını değiştirdiği gösterilmiştir. Serbest radikallerin pek çok hastalığın etiyopatogenezinde rol oynadığı düşünülmektedir. Serbest radikaller mitokondrilerde oksidatif fosforilasyon sürecinde prostoglandin ve lökotrienlerin oluşumunda (Şekil 1) mevcut substratların metabolizması sırasında inflamatuvar reaksiyonlarda üretilmektedir. Isı, ağır egzersiz, inflamasyon, radyasyon, hava kirliliği, sigara, asbestos, fenobarbital ve bazı kanser ilaçları gibi birçok faktör serbest radikal oluşumunu ve doku hasarını başlatabilirler (1, 8, 20, 21, 27).

Canlı dokularda iskemi ve reperfüzyon, normalde sıkı bir şekilde kontrol edilen enerji metabolizmasını bozarak oksijen radikalleri olarak bilinen süperoksit anyon radikal ($O_2^{\cdot-}$), hidroperoksit radikali (HO_2^{\cdot}), hidrojen peroksit (H_2O_2), hidroksil radikal (OH^{\cdot}), peroksit radikal (ROO^{\cdot}), singlet oksijen (1O_2) radikallerinin oluşmasına yol açar. Bu radikallerden süperoksit ve hidroksil radikallerinin ortaya çıkışı demir tarafından katalize edilen Haber Weiss ve fenton reaksiyonu sonucu gelişir (8). Serbest radikallerin neden olduğu lipid peroksidasyonunun membran hasarına yol açarak fonksiyonel bozulmadan sorumlu olduğu pek çok çalışma ile gösterilmiştir (3,14,28,34,40,43). Bu nedenle organizmada lipid peroksidasyonunun önlenmesi ile serbest radikallere bağlı hücre harabiyetinin azaltılabileceğine inanılmaktadır.

Oksidatif strese önlem olarak bulunan antioksidan sistemi oluşturan glutatyon peroksidaz, katalaz, süperoksit dismutaz gibi enzim sistemlerinin yetersizliği halinde oksidan yaralanma hücrede hasarla sonlanmaktadır. Bu enzimlerin hemen hepsinin aktivitesi için +2 değerlikli Se, Zn, Cu gibi eser metaller gereklidir. Bu nedenle serbest radikallerin zararlı etkilerinin önlenmesinde eser metallerin önemi üzerinde durulmaktadır. Kobaltında lipid peroksidasyonu önleyici etkisinin olduğunu bildiren çalışmalarda *invivo* ortamda, fosfatidil serin varlığında uygun PH ve konsantrasyonda serbest radikal oluşumunu demir ile rekabete dayalı antagonizma yaratarak önlediği bildirilmektedir (35). Köpek ototransplantasyon modelinde koruyucu sıvıya kobalt eklenmesi halinde böbrekte soğuk iskeminin neden olduğu lipid peroksidasyonunun kısmen önlendiği gösterilmiştir. Ancak

yapılan başka bir çalışmada fosfolipid libozomları ve yağ asidi miçelleri kullanılırsa, kobaltın lipid peroksidasyonunu stimüle ettiği bulunmuştur (35). Kobaltın lipid peroksidasyon üzerine etkisi halen tartışılan bir konudur. Karaciğer, beyin, myokard üzerinde lipid peroksidasyonunu arttırdığı bildirilmiştir. Deri fleplerinde de iskemi ve reperfüzyona bağlı olarak lipid peroksidasyon artışı dikkati çekmişse de bazı invitro çalışmalarda kobaltın lipid peroksidasyonunu azalttığı gösterilmiştir (2). Ancak böbrek nakillerinde böbreğin maruz kaldığı iskemi ve reperfüzyon hasarına kobaltın etkisi hiç incelenmemiştir. Diğer organlarla karşılaştırıldığında böbrek oldukça ayrıcalıklı hücrelerden oluşmuştur. Örneğin medüller hücreler hipertonic bir ortamda çalışmaya adapte olabilmişlerdir. Bu nedenle invitro koşullarda lipid peroksidasyonunu önlediği bildirilen kobaltın böbrekte iskemi reperfüzyona bağlı lipid peroksidasyonunu da azaltması olasıdır. Bu olasılığı incelemek amacıyla tertiplenen bu deneysel çalışmada iskemi ve reperfüzyona böbreğin de diğer organlara benzer cevap verdiği dikkati çekmiştir.

GENEL BİLGİLER

SERBEST RADİKALLER

Elektronlar atomların yörünge denilen bölgesinde bulunurlar. Bir serbest radikal dış yörüngesinde basitçe bir veya daha fazla eşleşmemiş elektron bulundurabilen herhangi bir molekül olarak tanımlanabilir. Sözü edilen eşleşmemiş elektron yörüngede tek başına bulunan elektronu simgelemektedir. Serbest radikallerin açık bir bağ veya yarı bağ içermeleri kendilerini kimyasal olarak reaktif kılar. İki radikal reaksiyona girerse her iki radikalde elimine olur. Bir radikal, radikal olmayan bir molekülle reaksiyona girerse başka bir serbest radikal oluşur. Bu özellikler, serbest radikallerin zincirleme reaksiyonlara girebilmesine olanak sağlar. Serbest radikallere örnek olarak merkezinde O_2 bulunan süperoksit, kükürt bulunan tiyil (RS^-), karbon bulunan triklorometil (CCl_3) ve çiftsiz elektronun her iki atomu arasında delokalize olduğu nitrik oksit (NO) verilebilir (27, 28).

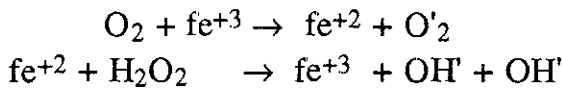
Normal şartlarda oksijen enerji sağlanması, membran bütünlüğünün ve yapısındaki poliansatüre yağ asitlerinin korunmasında kullanılır. Moleküler oksijenin kendisinde bir radikal olup iki eşleşmemiş elektron içerir. Bu durum kısmen onun reaktivitesini açıklar. Serbest oksijen radikalleri; oksijenin belirli koşullarda kısmen indirgenmesi sonucu oluşan çok kısa ömürlü ve güçlü oksidan nitelikli oksijen metaboliti olan H_2O_2 , O_2^{\cdot} , OH^{\cdot} , HO_2^{\cdot} , ROO^{\cdot} 'dir. Oksijenin dış moleküler yörüngesine bir veya daha fazla eşleşmemiş elektronların

eklenmesi yaygın şekilde bulunan bu molekülü güçlü bir toksin olan serbest oksijen radikaline dönüştürür. Metabolik olayların normal sıralanımında, oksijen toplam 4 elektron kabul edebilir. Oksijene bir elektron eklenmesi süperoksit anyonu, iki elektron eklenmesi hidrojen peroksit, üç elektron eklenmesi su oluşumuna neden olur. Süperoksit anyonu ve hidroksil radikali diğer moleküllerden elektronları çekerek enerji gereksinimlerini karşılayabildiklerinden, oksitleyici ajanlar olarak kabul edilirler. Süperoksit anyonu aynı zamanda bir indirgeyici ajan olarakta etki gösterebilir. Serbest oksijen radikallerinin hepsi aynı derecede toksik değildir. Süperoksit anyon radikalleri proteinlere saldırılmaz, fakat sulu çözeltilerde hidrojen peroksit oluşturur. Diğer yandan süperoksit radikalinin olduğu her durumda mutlaka hidrojen peroksit de meydana gelir. Süperoksitten farklı olarak, hidrojen peroksit hücrelere girebilir. Hücre içinde hidrojen peroksit serbest demir veya bakır iyonlarının katalizlediği bir reaksiyonla hidroksil radikali oluşturabilir. Doku demir ve bakırı genel olarak spesifik proteinlere sıkıca bağlıdır, fakat herhangi bir nedenle bu iki metal iyonunun serbest şekilleri birikecek olursa, hidrojen peroksitten hidroksil radikalleri oluşur (27, 28, 34, 44, 51, 52, 54, 58).

Serbest oksijen radikalleri arasında en reaktif ve en sitotoksik olanlar hidroksil radikali ve singlet oksijendir. Bu iki radikal, serbest demir iyonunun yardımıyla hidrojen peroksit ve süperoksit anyonunun birbirleri ile reaksiyona girmeleri (Haber Weiss reaksiyonu) sonucu oluşurlar.

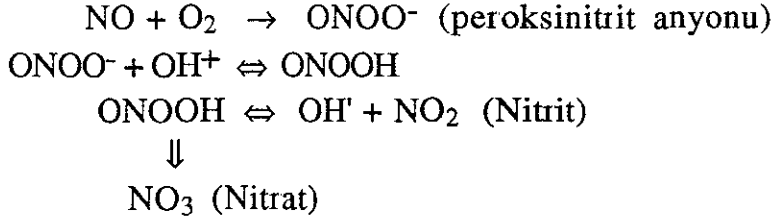


Bununla birlikte fizyolojik PH'da bu reaksiyonun hız sabiti demir tarafından katalizlenen aşağıdaki iki basamaklı reaksiyon ile karşılaştırıldığında çok yavaştır.



Ferrik demir (fe^{+3}) önce süperoksit anyonu ile reaksiyona girerek ferröz demire (fe^{+2}) indirgenmekte ve ferröz demir (fe^{+2}) ardından hidroksil radikali oluşturmak için yeniden H_2O_2 ile oksitlenmektedir. Bu iki basamaklı reaksiyon süperoksit ile oluşan fenton reaksiyonu olarak adlandırılır. Hemoglobinin invitro olarak oksidan stres ile

karşılaştığında katalitik demiri salıvererek bir biyolojik fenton reaktifi olarak etki gösterebileceği bilinmektedir. Hidroksil radikali oluşumu için ikinci bir yolda oksijen ve nitrik oksit etkileşimini içeren demir bağımsız bir reaksiyonla oluşturulmaktadır.



Serbest oksijen radikallerinden H_2O_2 , nötrofillerden salgılanan myeloperoksidaz aracılığı ile klorür veya bromür ile etkileşerek hipokloröz asitlerin (HOCl , BOBr) oluşumuna neden olabilir. HOCl güçlü bir oksidandır, direkt olarak hücreleri zedeleyebilir, ya da latent jelatinaz ve kollagenazı aktive ederek indirekt şekilde doku zedelenmesi oluşturabilir. Aslında serbest radikal oluşumunun normal hücre biyokimyasının bir parçası olduğu ve bazı olaylar sonucu dokularda oluştuğu bilinmektedir. Örneğin pekçok flavin enzimleri, flavin radikalleri ile etki gösterirler. Serbest oksijen radikalleri zararlı etkileri yanısıra; transport ve hücre büyümesinin regülasyonu gibi normal hücre işlevlerinde de rol oynarlar (27, 46, 49, 56, 65).

50 nmol/L - 50 $\mu\text{mol/L}$ arasındaki düşük dozlarda H_2O_2 prostanooidlerin oluşumunu stimüle eder. Ayrıca sitolitik olmayan konsantrasyonlarda endotel hücrelerince cGMP üretimini uyarır. Hem prostanooidler, hem de cGMP vasküler tonusun regülasyonu ve hücrelerarası iletişimde etkilidirler. Son zamanlarda gelişme sırasında dokularda oluşturulan reaktif oksijen türlerinin hücre iskeleti, membran polaritesi, kalsiyum ve diğer iyon akımları üzerindeki etkileriyle dokuların gelişimi ve organogenezi etkileyebilecekleri ileri sürülmüştür.

Kimyasal olarak bilinen en reaktif maddelerden biri hidroksil radikaldır. Hücrelerin en önemli komponentleri olan proteinler, DNA ve membran fosfolipidlerinin doymamış yağ asitleri ile reaksiyona girebilir. Proteinler ve DNA'nın spesifik parçalanmasını hidroksil radikalleri katalizler. Hidroksil radikali doymamış yağ asitlerinin peroksidasyonunda en aktif serbest oksijen radikali olup, malondialdehid birikimine yol açar. Bu yıkım ürünleri (malondialdehid,

formaldehid, asetaldehid, aseton ve propionaldehid), membran doymamış yağ asitlerinin oksidasyonunun en önemli göstergesi olarak kabul edilir. Lipid peroxidasyonu olarak adlandırılan bu olay lökotrienlerin, prostaglandinlerin, sitotoksik ve kemotaktik lipid peroksidlerin biosentezinde oluşur (13, 27, 32, 42, 60).

Normal insan metabolizmasında da az miktarda serbest oksijen radikali oluşur. Diyetteki organik maddelerin (yağ, karbonhidrat, proteinler) oksidatif yıkımı sırasında indirgenme ekivalanları moleküler oksijene taşınır. Harcanan oksijenin bir kısmı (% 1 kadarı) stabil su ve karbondioksit yerine süperoksit anyonu ve diğer stabil olmayan oksijen türlerinin oluşumuna yol açar.

Vücudun antioksidan savunma mekanizmaları;

Hücrelerde ve ekstrasellüler sıvıda sitotoksik oksijen radikallerini zararsız duruma getirmeye çalışan antioksidan savunma mekanizmaları vardır.

- 1- Reaktif oksijen radikallerini daha az toksik ürünlere dönüştüren antioksidan enzim sistemleri ; süperoksit dismutaz (SOD), katalaz, glutatyon redoks siklusu enzimleri (glutatyon peroksidaz, glutatyon reduktaz, glukoz-6-fosfat dehidrogenaz vb.). Sıçanlarda aktivitesinin yaş ile değişmediği gösterilmiş olan süperoksit dismutaz, süperoksit anyonunu enzimatik olarak hidrojen peroksit ve moleküler oksijene dönüştürür. Hidrojen peroksit ise iki önemli hücre içi enzim olan katalaz ve glutatyon peroksidaz ile su ve oksijene indirgenir (17, 36, 40).

Glutatyon Peroksidaz

1957'de bulunmuştur. Vücut sıvıları ve dokularında lipid hidroperoksidlerin ve hidrojen peroksidlerin yıkımını katalize eder, dolayısıyla organizmada oksidatif hasara karşı koruyucudur. Eritrosit glutatyon peroksidazı her enzim molekülünde 4 selenyum atomu içeren bir seleno proteindir. Selenyum hücresel oksidatif hasarın önlenmesinde bu biyokimyasal molekülün gerekli bir parçasıdır. Uzun süreli selenyum yetmezliği tüm dokularda glutatyon peroksidaz aktivitesinde azalma ile sonuçlanır. Eritrositlerde hemoglobinin ve hücre membranının peroksidasyonunu glutatyon peroksidaz önlemekle yükümlüdür. Lökosit ve makrofaj gibi fagositik hücrelerde artmış

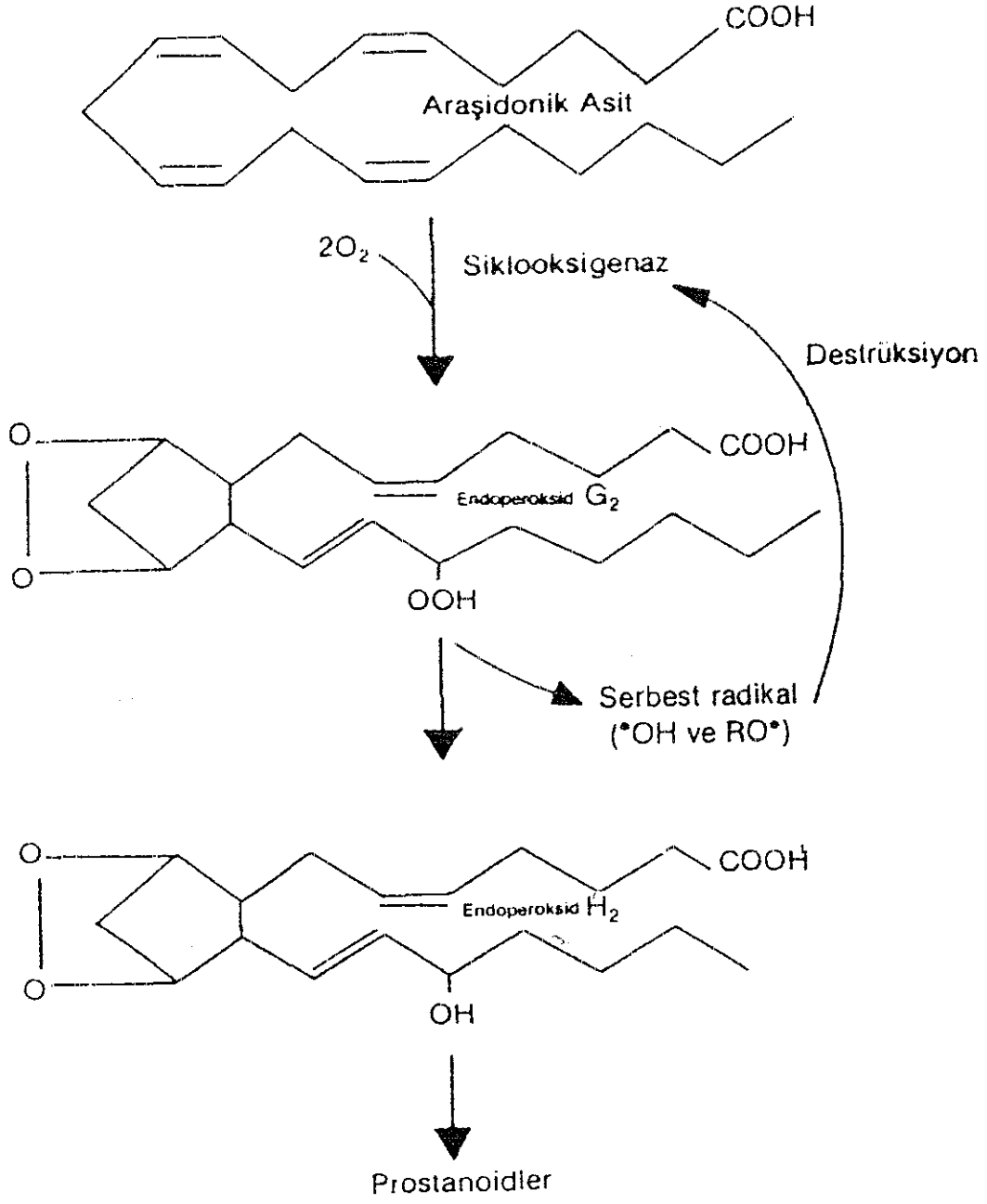
glutasyon peroksidaz aktivitesi oksidatif yıkım sırasında meydana gelen peroksitlerden fagositik hücreyi korumakla yükümlüdür. Trombositlerde azalan glutasyon peroksidaz aktivitesi kanama bozukluklarına, plazmada azalan aktivitesi kapiller membran peroksidasyonuna bağlı ödeme yol açar. Selenyum vitamin E glutasyon ve sülfür içeren aminoasitler karbontetraklorid gibi oksidatif hasarı karaciğerde başlatan maddelerin bu etkilerini önlerler. Sülfür içeren aminoasitler glutasyonun etkinliğini arttırarak glutasyon peroksidazın katalize ettiği enzimatik reaksiyonda lipid peroksit yapımını engellerler.

2 - Radikalleri yakalayıp nötralize eden antioksidan maddeler; alfa tokoferol (E vitamini) ve askorbik asit antioksidanlar olarak fonksiyon gösterirler. E vitamini hücre membranında lipid peroksidasyonunu önler. Askorbik asit ise sitoplazmada ve ekstrasellüler sıvılarda antioksidan etkinlik gösterir ve antiproteazların oksidanlarla inaktivasyonunu engeller. Bununla birlikte askorbik asidin belirli koşullar altında serbest radikallerin oluşumunu artırabileceği unutulmamalıdır. Bu gruptaki diğer maddeler; indirgenmiş glutasyon, ürik asit, β karoten (provitamin A), taurin ve yüksek molekül ağırlıklı antioksidanlar olan mukus ve albumindir (39).

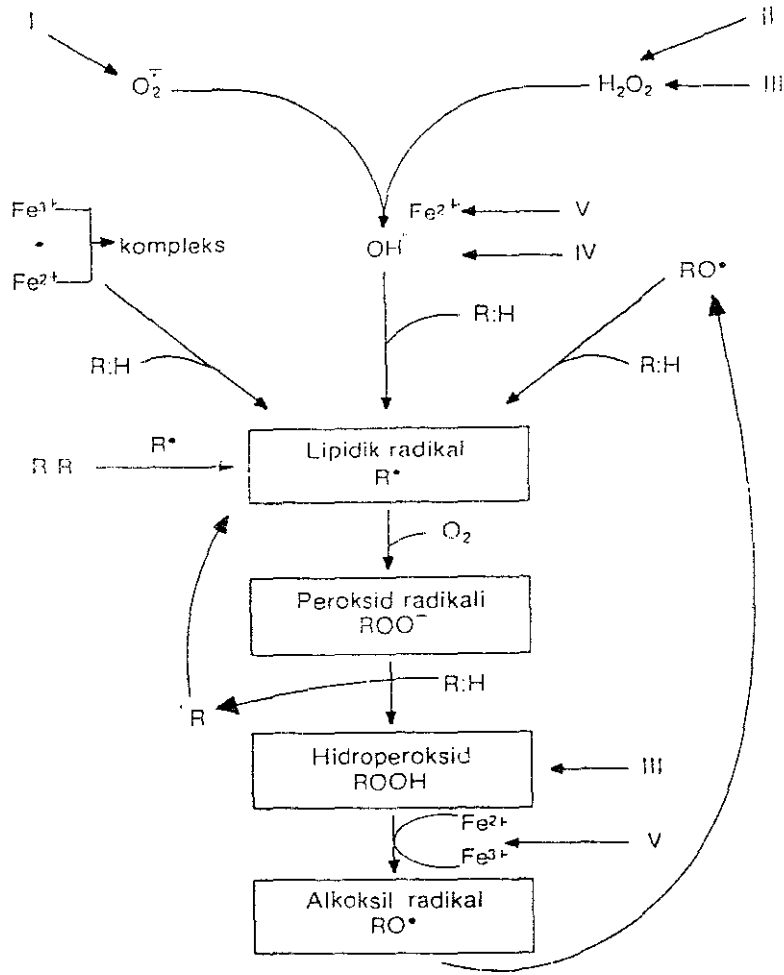
3 - Reaktif oksijen radikallerinin oluşmasını önleyen ve oluşan yayılmasını engelleyen sistemler; bunlar H_2O_2 ve süperoksid anyonundan hidroksil radikali oluşmasını sağlayan Haber-Weiss reaksiyonunu katalizleyen demir ve bakır iyonlarını plazmada ve hücrede bağlayan bakır transport proteini seruloplazmin ile ferritin, transferrin, laktoferin ve mitokondrilerde doğal olarak oluşan serbest radikalleri suya indirgeyen mitokondriyel sitokrom oksidazdır.

Haptoglobulin hemopeksin, glukoz ve taurin, yüksek dansiteli lipoprotein (HDLP), $\alpha 1$ antitripsin, Gc globulin, M_2 makroglobulin, fibronektin, Immunglobulin-G ise insan plazmasında ekstrasellüler antioksidan savunma mekanizmaları olarak bulunan diğer maddelerdir.

Bu mekanizmalar normal biyokimyasal olaylar sırasında az miktarda oluşan radikalleri nötralize edebilirler. Ancak hiperoksi, iskemiden sonra reperfüzyon, dokularda reaktif oksijen radikalleri oluşturan ksenobiotiklerde reaktif oksijen radikalleri bol miktarda



Şekil 3. Siklooksijenazla prostanoidlerin biyosentezi. Serbest radikallerin etkisi.



Şekil 4. Poliansatüre yağ asidinin otooksidasyon siklusu ve korunma yöntemleri :

- I- Superoksid dismutaz (SOD), II- Katalaz,
 III- Glutasyon peroksidaz (GPO), IV- Ürik asid. Ginkgo biloba ekstresi,
 V - Ginkgo biloba ekstresi, seruloplazmin.

Serbest oksijen radikallerinin klinik önemi ;

Reaktif oksijen radikalleri tüm hücre komponentleri ile özellikle sülfhidril içeren aminoasid ve poliansatüre yağ asitleri ile etkileşerek; proteinlerin denatürasyonuna, membran lipidlerinin peroksidasyonuna, kemotaktik faktörlerin oluşumuna, kollagen sentezinin bozulmasına neden olur. Ayrıca polisakkaridlerin depolimerizasyonuna, deoksiribonükleotidlerin yıkılmasına, hücrelerin yapısal proteinlerinin sülfhidril gruplarının oksitlenmesine ve çapraz bağlanmasına, antiproteazların inhibisyonu sonucu proteolitik enzimlerin aktivasyonuna, proteoglikan ve glikozaminoglikan moleküllerinde oksidatif zedelenmesinde de rol oynarlar.

Süperoksid ve sekonder kökenli radikallerin ve lökositlerin mikrovasküler endotele yapışmasını aktive eden ve hızlandıran maddelerin yapımına ve salıverilmesine neden oldukları ve reperfüzyon sonucu endotel hücrelere lökositlerin yapışmasına aracılık ettikleri bildirilmiştir. Endotel hücrelerinin kalsiyum indüksiyonlu aktivasyonunun, olasılıkla NO ve/veya süperoksid oluşumu aracılığı ile solübl NO sentazı etkilemeksizin, partikülat NO sentaz aktivitesinde yaygın bir inhibisyon oluşturduğu, serbest radikalle oluşan bu NO sentaz inhibisyonunun iskemi ve reperfüzyon gibi patofizyolojik koşullarda önemli olabileceği gösterilmiştir.

Süperoksid anyonunun güçlü bir trombosit adhezyon inhibitörü olan endotel derived realising factor (EDRF)'ü tahrip ettiği bilinmektedir. Süperoksid anyonunun dolaylı (nitrik oksid aracılı) etkisinin yanısıra, doğrudan trombositleri aktive edici direkt etkisi de vardır. Trombositlerin invitro olarak süperoksid radikalleri ile inkübasyonu, trombosit serotonin sekresyonunu ve trombin ile oluşan trombosit aktivasyonunu artırır. Trombosit yapışması ve kümeleşmesinde oluşan bu artış süperoksid anyonu dışındaki diğer serbest radikallerle gerçekleşmez.

ATP'nin yıkım ürünü olan adenzinin artması iskemi ve reperfüzyon zedelenmesine karşı doğal bir savunma olarak kabul edilmektedir. Adenzin düzeyinin artması; vazodilatasyon, nötrofillerin yapışması ve aktivasyonunda inhibisyon ve diğer inflamatuvar olaylarda inhibisyon ile birlikte adrenerejik uyarının baskılanması gibi etkilerle sonuçlanmaktadır. İskelet kası, barsaklar, kalp, beyin ve cilt dahil çeşitli organlardaki zedelenme modellerinde ekzojen adenzinin koruyucu etkisi olduğu saptanmıştır. Serbest radikaller iskemi sırasında doğal adenzin üretimini inhibe edebilecekleri gibi adenzinin inozine dönüşümünü de arttırabilirler. Kalpde adenzin oluşturan sistemler 5'-nükleotidaz ve S-adenozil homosistein (SAH) hidrolazdan oluşur. Hem membrana bağlı, hem de sitozolik AMP'ye spesifik 5'-nükleotidaz aktivitesini azaltma potansiyelleri vardır. Alternatif olarak hücre içi serbest radikaller S-adenozil homosisteinden adenzini açığa çıkaran SAH hidrolaz enzimini inhibe edebilirler. İleri sürülen diğer olasılıklar ise serbest radikaller tarafından adenzin deaminaz, adenzin alınımından sorumlu nükleozid transport sistemi

veya AMP deaminaz aktivitesindeki artma sonucu adenozinin uzaklaştırılmasıdır.

Tümör Nekrozis Faktör'ün (TNF) sitotoksik etkisinin oksijen bağımlı olduğu ve serbest oksijen radikalleri oluşumunu içerdiği, TNF'ün stimüle edilmiş nötrofillerde, kemik iliği kökenli ve doku makrofajlarında süperoksid anyonu üretimini artırdığı, serbest oksijen radikallerinin TNF ile oluşan sitotoksitenin mediyatörleri olduğu bildirilmiştir (8, 21, 30, 52, 54, 64).

Süperoksid radikallerinin düz kaslarda kasıcı etkileri olduğu ve invivo koroner anjioplasti sonrası gelişen koroner vazospazm oluşumunda rollerinin olabileceği ileri sürülmüştür. Siklooksijenaz yolağının stimülasyonu ile oluşan TXA₂'nin süperoksid radikallerinin vazokonstriktör etkisinden olasılıkla sorumlu olabileceği ve bu etkinin aynı anda vasküler endotelden PGI₂ salıverilmesi ile azalabileceği bildirilmiştir. Serbest oksijen radikallerinin PGI₂ sentetaz enzimini inhibe ederek PGI₂ oluşumunu da azaltabilecekleri bilinmektedir (7, 12, 24, 26, 32, 34, 45, 47, 59, 62).

Ayrıca oksijen radikallerinin parakuat, dikuat dibromid, sigara dumanı, kinon antitümör ilaçları, iyonizan radyasyon, nitrojen dioksid, ozon, azot protoksid, güneş ışığı, ısı şoku ile pekçok toksik kimyasalların ve ilaçların (asetaminofen, CCl₄, doksorubisin, alloksan vb.) biyolojik etkilerinde rol oynayabilecekleri bildirilmiştir. Örneğin, subsellüler sistemlerde doksorubisin hidroklorürün süperoksid anyonu gibi reaktif oksijen türlerinin oluşumuna neden olduğu gösterilmiştir.

Çeşitli olaylar sırasında dokularda oluşan serbest oksijen radikallerinin aşağıda değinilen sistemlerle ilgili pekçok hastalığın patogeneğinde etkili oldukları öne sürülmektedir.

Enflamatuar ve İmmun Zedelenme ;

Polimorfonükleer (PMN) hücrelerin immün kompleksler ve aktive olmuş kompleman da dahil çeşitli aktive edici ajanlarla karşılaşması sitotoksik oksijen radikallerinin oluşumuna neden olur. PMN hücrelerin ve bunların araşidonik asid yolaklarının aktivasyonunu içeren oksidan

işlemlerin organların mikrosirkülatuvar endotelini zedelemesi ve bu şekilde hem hayvanlarda, hem de insanlarda enflamasyon ve immünite ile ilgili pekçok hastalıkta rol oynamaları beklenebilir. Lipoksin B (LXB), nötrofil lökositlerde süperoksid anyonu üretimini artırarak enflamatuar reaksiyona katkıda bulunabilir. Doku fizyopatolojisi ile oksijen radikal zedelenmesi arasındaki ilişkiyi gösteren ideal klinik durum enflamatuar artritdir. Kıkırdak-panus kesişiminde ve sinovial sıvıda bulunan hyaluronik asid, diğer proteoglikanlar ve bir dereceye kadar kollajen ve elastin, oksijen radikalleri tarafından kolayca yıkılırlar. Oksidanlar proteaz inhibitörlerini enaktive edip, latent kollajenazı aktive edebilirler ve bu şekilde zedelenmeyi daha da artırabilirler. Halen romatoid artrit tedavisinde serbest oksijen radikali giderici SOD enzimi denenmektedir. Diğer otoimmün hastalıklarda, kronik enflamasyon ve DNA zedelenmesi ve primer alloantijen indüksiyonlu T hücresi aktivasyonunda ve çoğalmasında da yüksek konsantrasyonlarda oksijen radikallerine rastlanmaktadır (8, 11, 20, 21, 28).

İlaç Toksisitesi;

Kinonlar, nitroaromatikler, bipiridiller (örneğin dikuat dibromid) ve azo bileşikleri gibi pekçok ksenobiyotik önce bir hücre içi indirgenme ve bunu takiben oksijen radikalleri oluşumu ile sonuçlanan bir oksidasyon (redox cycling) ile hücrede sürekli bir oksidatif strese, antioksidan hücre sel savunma mekanizmalarının bozulmasına, NADH, NADPH ve redükte, glutatyonun tükenmesine, kalsiyumun salıverilmesine ve böylece sitotoksisiteye neden olabilirler (27, 28).

Aşırı Demir Yüklenmesi;

Özellikle demir gibi metallerin daha önce değinildiği gibi toksik oksijen radikallerinin oluşumu üzerinde önemli etkileri vardır. Multiorgan disfonksiyonu ile birlikte transfüzyona bağlı aşırı demir yüklenmesi ve hemokromatozis gibi hastalıkları olan kimselerde şelasyon tedavisinin yararları görülmüştür (27, 28).

Yaşlanma ve Kanser;

Oksijen radikalleri de dahil olmak üzere diğer radikaller hem kanser, hem de yaşlanmada rol oynayabilirler. Radyasyon ve çeşitli kimyasallarla oluşan reaktif oksijen türlerinin kademeli (multistep) karsinogeneizde önemli rollerinin olduğu görünmektedir. Örneğin suyun radyasyona maruz kalması hidroksi radikalleri oluşumuna neden olur, hidroksi radikalının DNA ile reaksiyona girmesi sonucu DNA'da kırılmalar oluşur. Bu kırılmalar radyasyon ile oluşan karsinogenezin temel moleküler reaksiyonunu simgelemektedir (28, 64).

Eritrositler;

Bazı genetik ve sonradan kazanılmış durumlarda eritrositler oksidan zedelenmeye maruz kalırlar. Glukoz-6-fosfat dehidrojenaz eksikliğine bağlı ve orak hücreli anemilerde, eritrositlerin antioksidan savunmasının normalin altında olması, bu hücrelerde malarya parazitlerinin yaşayamamasından sorumlu olabilir. Çünkü malarya parazitleri yüksek miktarda poliansatüre lipid içerdikleri ve antioksidan savunma sistemlerinin zayıf olması nedeniyle özellikle oksijen radikallerine duyarlıdırlar. Antimalaryal ilaçlar eritrositlerde bir hücre içi oksidatif stres oluşturarak parazitleri baskılayabilirler (27, 28, 64).

Akciğerler;

Birçok ajan, aktive oksijen türlerinin oluşumu ile akciğerler üzerinde toksik etkiler gösterir. Bu ajanlar arasında toksik oksidan gazlar, iyonizan radyasyon, parakuat, bleomisin gibi kemoterapötik ilaçlar ve şok, sepsis, travma ve çeşitli immünolojik olaylar gibi yaygın PMN hücre aktivasyonu ile karakterize bazı klinik durumlar sayılabilir. Yetişkinin solunum güçlüğü sendromu patogenezinde aktive PMN hücrelerden salıverilen radikallerin rol oynayabileceği ve bu hastaların nefeslerinde H_2O_2 bulunduğu bildirilmiştir (27, 28, 54). Asbestos gibi pnömokonyozislerin de oksidanla ve buna bağlı akciğer zedelenme mekanizmalarıyla ilişkili olduğu görülmektedir. Sigara dumanı en azından invitro olarak oksidatif mekanizmalar aracılığı ile alfa-1-antiproteaz inhibitörünü

inaktive ederek akciğer dokusunu proteolitik zedelenmeye çok daha duyarlı duruma getirir. Sigara dumanı aynı zamanda makrofajları aktive eden ve nötrofillerin akciğerde toplanmasına neden olan partiküller içerir. Bu hücreler tarafından oluşturulan oksijen radikalleri de zedelenmeye katkıda bulunur (37, 52, 58).

İskelet kaslarının iskemi sonrası reperfüzyonunun katalaz enziminden zengin olan eritrositlerin hemolizine neden olduğu böylece plazma katalaz antioksidan aktivitesindeki artmanın veya katalaz tedavisinin akciğer ve endotel hücrelerini hiperoksik zedelenmeye karşı koruduğu bildirilmiştir (51).

Kalp ve Kardiovasküler Sistem;

Oksijen radikal reaksiyonları olasılıkla iskemik myokardiyal zedelenme ve aterogenez oluşumuna katkıda bulunmaktadır. İskemi-reoksijenizasyona bağlı zedelenmede oksijen radikallerinin rolü olduğu bilinmektedir. Kompleman sistemin aktivasyonu, kemotaktik peptidlerin oluşumu, PMN hücrelerin migrasyonu ve aktivasyonu, serbest oksijen radikallerine bağlı membran ve lipid değişiklikleri ve hücre içi serbest radikal gidericilerin tükenmesi gibi olaylar reperfüzyon zedelenmesinde rol oynayabilirler. Serbest oksijen radikalleri dolaşımdaki lipoproteinlerin kinetiklerini değiştirmekte, endotel hücrelerinin geçirgenliğini artırmakta ve makrofajlar tarafından lipoproteinlerin alınmasını modüle etmektedirler. Bu nedenle ateroskleroz oluşumunda rol oynayabilecekleri düşünülmektedir (20, 23, 27, 28, 34, 45, 47).

Böbrekler;

PMN hücre ve olasılıkla glomerüler mezansyal hücre kaynaklı serbest oksijen radikallerinin deneysel nefrotoksik nefritin erken akut fazı sırasındaki proteinüri ve akut glomerüler zedelenme patogenezinde rol oynadıkları görülmektedir ve olasılıkla immün kompleks glomerülonefritin patogenezinde katkıda bulunmaktadır (6, 20, 22, 25, 28, 50).

AKÜL
MERKEZ
MERSİN

Gastrointestinal Sistem;

Barsak kan akımında kısa süreli azalmalar sonrası gelişen mukozal ve endotel lezyonlarını açıklamada günümüzde popüler bir teori, reperfüzyon sırasında radikallerin oluşumunu içermektedir. Alkol nonsteroid antienflamatuar ilaçlar (NSAI) ve sirkülatuvar şok gibi etkenlere bağlı gastrointestinal zedelenmelerin patogeneğinde de serbest radikallerin rolü olabileceği bildirilmektedir. Ayrıca, çeşitli etkenlere bağlı karaciğer ve pankreas zedelenmelerinde serbest oksijen radikali gidericilerinin yararlı etkileri gösterilmiştir. İnsülin bağımlı diyabetes mellitusda pankreasın insülin üreten beta hücrelerinin otoimmün zedelenmesinde serbest radikal aracılı mekanizmaların rolü olabileceği bildirilmiştir. Ülseratif kolitin tekrarlayan ataklarında ve bu hastalığın oluşumunun mekanizmasında serbest oksijen radikallerinin rolü olabileceği ve tedaviye eklenecek allopurinol veya dimetil sulfoksid gibi serbest oksijen radikali gidericilerinin atakların tedavisinde yararlı olabilecekleri gibi, tekrarlayan ataklara karşı da koruyucu oldukları gösterilmiştir (8, 11, 17, 20, 27, 28, 52, 53, 61).

Beyin;

Mekanik (travma) veya oksijen yetmezliğine bağlı (inme) beyin zedelenmeleri demir iyonlarının salıverilmesine ve bunun sonucu olarak, serbest radikal reaksiyonlarını hızlandırarak zedelenmenin yayılmasına neden olabilirler.

Beyin hiperbarik oksijene de duyarlıdır. Her ne kadar toksisitenin temel mekanizması tam olarak belirlenememişse de lipozomlar içindeki SOD oluşumunun rolü olabileceği ileri sürülmüştür. Oksijen radikallerinin hipertansif ensafalopatide olduğu gibi, hem serebral vazoreaktivitede, hem de vasküler duvar zedelenmenin de rol oynayabilecekleri bildirilmiştir (5, 8, 20, 28).

Göz;

Serbest oksijen radikallerinin kornea, lens ve retina hastalıklarının patogeneğinde önemi giderek daha çok ilgi çekmektedir. Çeşitli deneysel modellerde oksidanların lensi zedeledikleri anlaşılmıştır. Katarakt oluşumundaki oksidatif mekanizmalar halen araştırılmaktadır (20, 27, 48).

Deri;

Ultraviyole radyasyon, porfiri, bazı tetrasiklinler ve benoksaprofen fototoksisitesine bağlı olarak gelişen kutanöz yapıların zedelenmesinde oksijen radikallerinin rolü olduğu anlaşılmıştır. Eritem, kontakt dermatit, yaşlanmaya bağlı kırışıklıklar ve deri kanserlerinde serbest oksijen radikallerinin rolü aktif araştırma konularıdır (27, 28).

İskemi- Reperfüzyon Zedelenmesi;

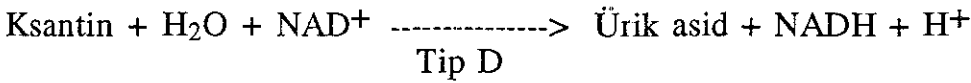
İskemi ile oluşan hastalıklar günümüzde en yaygın görülen ölüm nedenlerindedir. Yeterli kan akımı olmaksızın organlar fonksiyonlarını sürdüremeyeceğinden, kalp ya da beyin gibi yaşamsal bir organın ciddi olarak etkilenmesi durumunda ölüm kaçınılmazdır. Kısa bir iskemi periyodu sonrasında belirli dokularda oluşan zedelenme beklenenden çok fazla olmaktadır. Çünkü zedelenmenin asıl nedeni iskemi olmayıp, reperfüzyon ya da çok daha spesifik olarak reoksijenasyondur. Tek başına iskemi ya hiç, ya da çok az zedelenme bulgusu oluşturur.

Basit bir tanım olarak reperfüzyon zedelenmesi organın reperfüzyonu sırasında moleküler oksijenin yeniden sunumu sonucu oluşan geri dönüşümsüz hücre zedelenmesidir. Bu tanım, oksijenin yeniden dokuya sunumunun zedelenmeye neden olduğunu, perfüzyon olmaksızın böyle bir zedelenmenin ya hiç oluşmayacağını, ya da bu kadar hızlı olmayacağını ortaya koymaktadır.

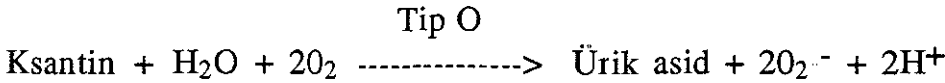
Reperfüzyon zedelenmesinde rol oynayan hücresel olayları açıklayan en önemli iki mekanizma aşırı kalsiyum yüklenmesi ve serbest radikal hasarıdır. Önce kalsiyumun ekstrasellüler alandan tamamen uzaklaştırılması ve sonradan yeniden sunulmasıyla masif doku yıkımı, belirgin enzim salınımı ile birlikte şiddetli hücresel zedelenme oluşmaktadır. Mitokondriler yeniden fonksiyone olduğunda enerjilerini, sitozolden aşırı Ca^{+2} alınması için kullanırlar. Bu ise solunum zincirini şiddetle zedeleyerek bu yolla oluşan enerji üretimini azaltır. Aniden reoksijene olan mitokondiler tarafından hızlı ve aşırı Ca^{+2} alınması enerji kaybına, sitazolik kalsiyum kontrolünün bozulmasına sarkolemmal zedelenmeye neden olmaktadır. Kalsiyum

paradoksunda mitokondriyel zedelenme aşırı Ca^{+2} yüklenmesine bağlı olmasına karşın, oksijen paradoksunda mitokondriyel zedelenmeye başlangıçta serbest radikaller aracılık etmekte ve bunu aşırı kalsiyum yüklenmesi izlemektedir.

Postiskemik dokularda süperoksid radikalının ana kaynağı ksantin oksidaz enziminin katalizlediği reaksiyondur. Bu enzim, süperoksid radikalının ilk bildirilen biyolojik kaynağıdır. Bu enzim özellikle barsak, akciğer, karaciğer ve böbrek gibi dokularda yaygın olarak bulunur ve ksantin dehidrogenaz (Tip D) olarak sentezlenir. Enzimin bu tipi, sağlıklı bir dokuda total aktivitenin % 90'ını oluşturur. Dehidrogenaz, süperoksid ve hidrojen peroksid oluşturmak üzere elektronları moleküler oksijene transfer edemez, fakat NAD^{+} 'yi indirger.



Ksantin oksidaz ise, NAD^{+} yerine moleküler hidrojeni kullanır ve süperoksid, hidrojen peroksid ya da her ikisini de oluşturur.

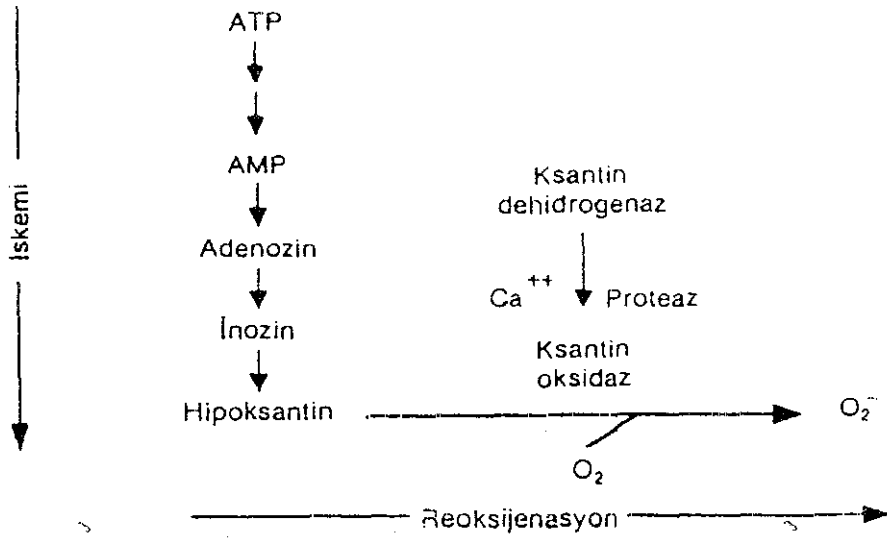


Dokulara kan akımının, ATP oluşumu için gerekli oksijeni sağlayamayacak kadar azalması, Tip D aktivitesinin, Tip O aktivitesine dönüşümüne yol açar. Hücrelerin enerji kaynağı azaldığında, membranın her iki yanındaki iyon dengesi sağlanamaz. Bunun sonucu, sitozolik kalsiyum konsantrasyonunun artışı, dehidrogenazı oksidaz'a çevirecek bir proteaz'ı aktive eder. Hücre ATP düzeylerinin azalması, AMP konsantrasyonunun artmasına neden olur. AMP ise sırasıyla adenozin, inozin ve hipoksantin'e metabolize olur. Tip D'nin Tip O'a dönüşümünde nötrofil kaynaklı lökositik elastaz, $TNF\alpha$, C_{5a} ve bazı kemotaktik faktörlerinde etkili olduğu öne sürülmektedir.

Sonuç olarak; iskemi sırasında dokularda iki önemli değişiklik olur. Birincisi yeni bir enzim aktivitesini belirtir, ikincisi bu enzimin iki substratından biri ortamda hazır hale gelir. Tip O aktivitesi için gerekli

ikinci substrat olan moleküler oksijen dokunun reperfüzyonu sırasında temin edilir. Bu olaylar sonucunda süperoksit radikalinde ve hidrojen peroksit oluşumunda bir patlama oluşur.

Sıçan ileumunda Tip D aktivitesinin Tip O'a çevrilişi 10 saniyede oluşur. Diğer dokularda aynı olaylar benzer şekilde, fakat daha yavaş gelişir. Kalpte oksidaz içeriği iskeminin 8.dakikasında iki katına çıkar. Karaciğer, dalak, akciğer ve böbrekte aynı artışlar 30 dakika gerektirir. Bütün dokular içinde sadece iskelet kasında, iskemi, ksantin dehidrogenazın oksidaza çevrilmesine neden olmaz. İskelet dokusunun, diğer dokulara göre iskemik hasara dirençli olmasının sebebi budur (27, 28, 45, 54, 55, 57, 59, 62, 63).



Şekil 5. İskemide süperoksit oluşumu hipotezi.

KOBALT

Kobalt insanlarda vitamin B₁₂'nin önemli bir parçası olarak bilinmektedir. Vitamin B₁₂'nin kullanılması için kobalt gerekli bir elementtir. Kobalt tek başına mutlak gerekli değildir. Hemostatik kontrol mekanizmaları için kobaltın gerekli olup olmadığı tam olarak ortaya konulamamıştır. İnsan vücudunda bulunan kobalt hızla idrarla atılır. Yetişkin bir insanda kobalt büyük çoğunluğu kemik olmak üzere

karaciğer ve kanda bulunur. Plazmada primer olarak albuminle, daha az miktarı da α_2 makroglobulinle taşınır. Dietle alınan kobaltın büyük çoğunluğu meyve ve sebzelerle nonkobalamin formda, az miktarda kobalamin formunda et ürünleri ile alınır (10, 35).

Yetişkin bir insanda normal değerleri :

Tam kanda; 1-10 ng/ml, eritrositlerde; 0,1-12 ng/ml, plazma ya da serumda; 0,2-2 ng/ml, idrarda; 0,7-10 μ g/d, saçta 0,2-1,0 μ g/g'dır.

Kobalt fazla miktarlarda anlamlı bir yan etki oluşturmaksızın alınabilir. Aşırı kobalt alımına bağlı toksik etkiler eritropoietik ajan kullanan böbrek yetmezliği olan hastalarda ve aşırı bira kullananlarda görülebilir. Bu tip vakalarda ölümlerle sonuçlanan kardiyomyopati bildirilmiştir. Bu hastalarda kobaltın temel atılım yolunun idrar olmasının önemli bir payı olduğu düşünülmektedir (10).

Vücut sıvı ve dokularında kobalt düzeylerinin tayini için emisyon spektroskopisi, nötron aktivasyon analizi ve flameless atomik absorpsiyon spektrofotometresi kullanılmaktadır (10).

Kobalt endüstriyel alanda ve tıpta değişik branşlarda kullanılan bir metaldir. Vitamin B₁₂ fonksiyonu, kan basıncı regülasyonu, tiroid fonksiyonları ve DNA replikasyonu için gerekli bir elementtir. Mutajenik, kasinojenik, teratojenik etkileri yüksek konsantrasyonlarda alınması sonucunda gelişebilir. Fazla miktarlarda alınması gastrointestinal sistem irritasyonu, bulantı, kusma ve diareye yol açabilir. Kontakt dermatit, astım, reversibl hava yolu obstrüksiyonu, pulmoner fibrozise yol açabilir (37). Hem sentezini inhibe eder, hem de parçalanmasını hızlandırır. Kobaltın bu etkilerinin mekanizması tam olarak açıklanamamıştır. Kobaltın toksik etkilerinin çok fazla olduğunun söylenmesine karşın, asetaminofen toksisitesinde karaciğer koruyucu etkisi olduğu gösterilmiştir (10, 35).

Dietle alınan kobaltın barsak lümeninde yarışmalı antagonizma yaratarak demir emilimini bozduğu ve demir eksikliği anemisine neden olabileceği saptanmıştır (35).

Makrofaj ve nötrofillerin fagositik aktivitesi ve antikor sentezinde kobaltın rolü olduğu gösterilmiştir. Transkobalamin II yetersizliği

(vitamin B₁₂ taşıyan protein) olduğunda IgG düzeylerinde düşme olduğu gösterilmiştir (10).

Tiroidektomi yapılan hastalarda tiroid dokusunda Ag, Co, CCl, Fe, Hg, I, Se, Zn konsantrasyonlarına bakılmış, sonuçta sağlıklı tiroid dokusuna göre malignite tanısı alan dokularda I dışındaki diğer elementlerin yüksek konsantrasyonlarda bulunduğu saptanmıştır (67). Sıçan beynine enjekte edilen kobalt kloridin epileptik aktivitesini artırdığı gösterilmiştir. Başka bir klinik çalışmada ise kronik obstrüktif arteriyopati de kobalt eksikliğinin rolü olabileceği rapor edilmiştir (68).

GEREÇ VE YÖNTEMLER

Bu çalışma, Akdeniz Üniversitesi Tıp Fakültesi Cerrahi Araştırma Merkezi'nde yapıldı.

Çalışmada, 70 adet genç erişkin, albino, erkek sıçan kullanıldı. Sıçanlar her birinde 10 hayvan olacak şekilde 7 gruba ayrıldı ve intraperitoneal ürethan (1 g/kg) anestezisi altında ameliyat masasına tesbit edildiler. Sol femoral artere 24 G, sol femoral vene 22 G polietilen branül takıldı. Sıçanlara deney başlangıcında intravenöz 0,1 cc heparin uygulandı. Grup 2 ve 3'de deney süresince 10 cc serum fizyolojik infüzyonu yapıldı. Orta hat kesisi ile laparotomi yapılarak femoral ven deney süresince sıvı ve kobalt infüzyonu (Harvard Aparatus Compact Infusion Pump marka infüzyon pompası kullanıldı.) femoral arter kan basıncı ve nabız monitörizasyonu için kullanıldı. Tablo I'deki protokole uygun olarak Grup 1'deki 10 hayvanda her iki böbrek mobilize edilerek iskemi ve reperfüzyon uygulanmaksızın yalnızca nefrektomi uygulandı.

Grup 2'deki hayvanlarda ise :

Her iki böbreğe atravmatik klemp kullanılarak 45 dakika süre ile iskemi ve takiben 60 dakika reperfüzyon uygulandı.

Grup 3'de bulunan sıçanlarda ise toplam 60 dk'lık iskemi ve 60 dk'lık reperfüzyona maruz bırakıldılar.

4. gruptaki sıçanlarda ise :

Her iki böbrek pedikülü aynı anda klempe edildikten sonra 45 dakikalık iskemi süresince 5 mg/kg kobalt nitrit 10 cc serum fizyolojik sıvısı içinde femoral venden infüze edildi. Müteakiben 60 dakika süre ile reperfüzyon uygulandı.

Grup 5'deki hayvanlar da 4. gruptakine benzer işleme tabi tutuldular. Ancak kobalt nitrit dozu 10 mg/kg idi.

Grup 6 ve 7'de her iki böbrek pedikülü aynı anda klempe edildikten sonra 60 dakikalık iskemi süresince 5 ve 10 mg/kg kobalt nitrit 10 cc serum fizyolojik sıvısı içinde femoral venden infüze edildi. Klempler açılır açılmaz 60 dk süre ile reperfüzyon uygulandı (Tablo I).

Tüm gruplarda deney bitiminde her iki böbrek ve kan numuneleri alınarak sıçanlar öldürüldüler. Alınan böbrekler -60°C 'de korunmak üzere TBARS (Thiobarbitüric acid reactive substance) düzeyi ölçümü için saklandı. Alınan kan numunelerinden serum örnekleri ayrılarak kobalt ölçümü için saklandı. Bu kan örneklerinden hazırlanan eritrosit paketleri $+4^{\circ}\text{C}$ 'de glutasyon peroksidaz aktivite ölçülünceye kadar saklandılar.

Tablo 1. Grupların iskemi süresi ve kobalt miktarına göre dağılımı.

Grup	İskemi Süresi (dk)	Kobalt Miktarı
I	-	-
II	45	-
III	60	-
IV	45	5 mg/kg
V	45	10 mg/kg
VI	60	5 mg/kg
VII	60	10 mg/dk

TİYOBARBITÜRİK ASİT REAKTİF SUBSTANSLARI (TBARS) ÖLÇÜMÜ

-60°C derin dondurucuda saklanan böbrek dokularındaki TBARS analizi esnasında dokular sürekli buz içinde saklandı. Böbrekler korteks ve medulla kısmına ayrılarak homojenizatör (Tri-R Sti-R marka K43 model) ile 10.000 rpm'de 2 dk boyunca 2 ml homojenizasyon sıvısında homojenize edildi. Total volüm yine homojenizasyon sıvısı ile 10 ml'ye tamamlanarak aynı gün çalışılıncaya kadar buzlukta bekletildi.

TBARS ölçümü sırasında homojenizasyon aşamasında Stone ve arkadaşlarının (60), standart kullanımda Rao ve arkadaşlarının (48), deneyin yapılışında ise Stocks ve Dormandy'nin (56) çalışmaları referans alındı.

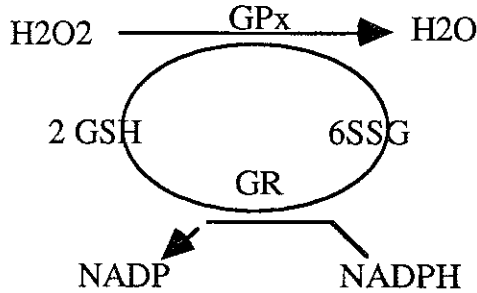
Homojenizasyon sıvısı KH_2PO_4 , K_2HPO_4 , KCl, EOTA, Trito-X, bütilhidroksi toluen kullanılarak hazırlandı ve pH'sı 7,4'e ayarlandı. Protein çöktürmek amacı ile Triklerasetik asit (TCA) % 56'lık konsantrasyonda kullanıldı. Lipid peroksidasyon ürünleri ile renk vermesi için Thiobarbitirik asit (TBA) 5 gramı, 25 ml 1 N NaOH'de çözülerek 500 ml'ye tamamlandı. Standart olarak 1.1.3.3 tetraetoksi propan kullanıldı ve bir milyon kez sulandırılarak en yoğun konsantrasyon olan 4050 nmol/L'ye getirildi.

Proteinlerin çöktürülmesi, 3 ml homojenize doku süspansiyonuna 2 ml TCA eklenerek 4000 ıgm'de 15 dk santrifüj uygulanarak yapıldı. Proteini çöken berrak süpernatandan 3 ml alınarak, 1 ml TBA eklendi ve 15 dk kaynar suda tutuldu. Daha sonra soğutulan tüpler, köre karşı 532 nm dalga boyunda spektrofotometrede (Spectronic 20D) okundu. Numunelerin absorbanlarına, çizilen standart grafiğinde karşılık gelen konsantrasyon değeri nmol/L olarak saptandı. Kör ve standartlarda TCA ile proteinlerin çöktürme aşamasından itibaren aynı işlemler uygulandı. Sonuçlar homojenizatların protein değerleri ölçüldükten sonra nmol/gram protein olarak ifade edildi.

PROTEİN ÖLÇÜMÜ

Protein ölçümünde Lowry'nin tanımladığı metod kullanıldı (38, 69). Homojenize doku süspansiyonlarına 100 µl, 1 N NaOH (100 µl) eklendikten sonra günlük olarak taze hazırlanan D reaktifinden (% 2 Na₂ CO₃ 10 ml, % 1 CuSO₄ 0,1 ml, % sodyum potasyum tartarat 0,1 ml) 1 ml konularak 20 dk karanlık bir dolapta bekletildi. Son aşamada folin reaktifi (100 µl) eklenen numuneler 30 dk daha karanlıkta bekletilerek spektrofotometrede köre karşı 500 nm dalga boyunda absorbanları saptandı. Kör ve standart (bovine serum albumine) dilüsyonlara da aynı işlem uygulandı. Sonuçlar µgr/ml olarak ifade edildi.

GLUTATYON PEROKSİDAZ (GPx) ÖLÇÜMÜ



340 nm'deki aktivitedeki azalma, GPx aktivitesini gösterir. Glutatyon peroksidaz (GPx) enziminin birkaç izoenzimi vardır;

- Selenyum bağımlı,
- Selenyum bağımsız.

Bu izoenzimlerin aralarındaki fark substratlarından kaynaklanır. Eritrositlerdeki izoenzimin selenyum bağımlı olduğu düşünülmektedir. Bu çalışmada eritrositlerde çalışıldığı için selenyum bağımlı GPx aktivitesi ölçümü yapılmıştır.

Total GPx'in substratı H₂O₂'dir, fakat bu çok stabil olmadığı için deneyde H₂O₂ yerine, t-bütil hidroperoksid kullanıldı. t-bütil hidroperoksid sadece selenyum GPx'e özgü bir substrattır.

Reaktifler ;

1 - 50 mM fosfat tamponu, pH = 7,2

K₂HPO₄ (mA=174,18) 0,8709 g/100 ml (Merck)

KH₂PO₄ (mA=136,04) 0,6802 g/100 ml (Merck)

2 - Reaksiyon karışımı ;

EDIA : 0,3 mM (M.A.=368,40)	0,01105 g/100 ml (Merck)
NADPH : 0,1 mM (M.A.=833,40)	0,00833 g/100 ml (SIGMA N-1630)
Glutasyon Redüktaz : 0,5 µ	0,070 gr/100 ml (SIGMA G-6004)
NaN ₃ : 0,5 mM (M.A.=65,01)	0,00325 g/100 ml

Bunlar 50 mM'lık fosfat tamponunda çözüldü, hepsi tartılıp tüpe konduktan sonra tampon eklendi. Kesinlikle karıştırılmadı, EDTA zor çözüldüğü için 37°C'da karıştırılmadan bekletilerek çözünmesi sağlandı.

3 - GSH (Substrat); 2,5 mM (M.A= 307,03)..... 0,0765 gr/100 ml (SIGMA G-4251)

4 - t-bütil (substrat); 0,4 mM t-bütil (M.A.=90,12. 170)..... 5,478 ml/100 ml
20 ml reaksiyon karışımı için ;

EDTA	0,00221 gr
NADPH	0,001666 gr
GR	0,014 gr
NaN ₃	0,00065 gr veya 0,5 mM'lıktan 166 ml

hepsi bir tüpe konularak 15 ml tamponda çözüldü.

İŞLEM :

1 - Heparinli kandan hazırlanan eritrosit paketinde Hb ölçümü yapıldı; 20 ml eritrosit paketi 6 ml Drabkins solüsyonuna eklendi ve 5-10 dk oda ısısında bekletildikten sonra 546 nm dalga boyunda ölçüm yapıldı.

$$\frac{OD + 0.001}{0,018} = \% \text{ gr Hb}$$

2 - β-merkaptto etanollü stabilize edici ajanla 1 gr hemoglobine ayarlandı.

3 - Tüpler hazırlandı.

	GSH (+)	GSH (-)
RK	750 µl	750 µl
Hemolizat	50 µl	50 µl
GSH	100 µl	100 µl distile su
t-bütil	100 µl	100 µl

Tüplere önce reaksiyon karışımları konularak 37°C'de bekletildi. Daha sonra çalışma sırası geldiğinde diğer reaktifler eklenerek ve 340 nm'de ölçüm yapıldı.

4 - Okuma spektrofotometrede (Photometer 4010) 340 nm'de yapıldı. Alet suyla sıfırlandı ve 3 dk süre ile okundu.

5 - 3. dakikadaki değerden 0. dakikadaki değer çıkarılarak ΔOD (1 dk'daki 340 nm'de absorbans değişikliği) saptandı.

GSH (+) tüplerindeki $\Delta OD = 0,050$ olması normal aktiviteyi göstermektedir.

GSH (-) tüplerinde ΔOD çok düşüktür.

6 - Hesap ; GSH(+) ΔOD ve GSH(-) ΔOD , 3 dakikada ölçüm yapıldığı için teker teker üçe bölündü. Daha sonra ;

$GSH(+)\Delta OD - GSH(-)\Delta OD \times 10^5/311 = IU/gHb$ formülüne göre hesaplandı. Çıkan sonuç GPx aktivitesini verdi.

Hochstein ve Utley'in metodunun modifiye edildiği bu yöntem glutatyon peroksidaz aktivitesi ile glutatyon redüktaz aktivitesinin birleştirilmesine dayanır (57).

KOBALT ÖLÇÜMÜ

Deiyonize cam tüpler kullanılarak ayrılan serumlarda kobalt ölçümü yapıldı. Ege Üniversitesi Ziraat Fakültesi Toprak Anabilim Dalında Varian Techtron Model 40 Atomik Absorbsiyon Spektrofotometre (AAS) marka cihazda (dalga boyu : 240.7 nm, silit : 0.2 nm, lamba akımı : 7 mA, ısı programı : asetilen hava karışımı, sıcaklık : 2200°C) serum örneklerinde kobalt düzeyi tayini yapıldı. Sonuçlar ppm olarak ifade edildi.

İSTATİSTİKSEL DEĞERLENDİRME

Deney sonuçları ortalama \pm standart sapma olarak verildi. Sonuçların istatistiksel olarak önemliliği tek yönlü varyans analizi (ANOVA), gruplar arası farklılık ise Student-t testi ile bakıldı. 0.05'den küçük p değerleri anlamlı kabul edildi.

BULGULAR

Bu çalışmada 70 adet genç eriştin, albino, erkek, ağırlıkları 250-300 gr arasında değişen sıçan kullanıldı. Her bir sıçan ürethan anestezisi altında kan basıncı ve kalp atım sayısı için monitörize edildi. Böbrekte TBARS düzeyi, eritrositlerde glutatyon peroksidaz aktivitesi ve serum kobalt düzeyleri ölçülerek sonuçlar karşılaştırıldı.

Serum kobalt düzeyleri

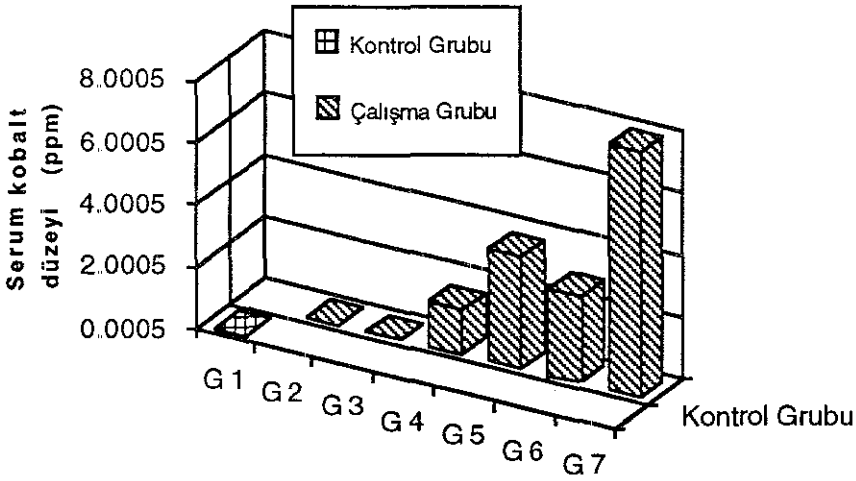
Yalancı operasyon uygulanan kontrol grubunda serum kobalt düzeyi 0.0067 ± 0.001 ppm iken, 45 dk'lık iskemi uygulanan ikinci grupta 0.0015 ± 0.0021 ppm ve 60 dk'lık iskemi grubunda 0.0033 ± 0.0026 ppm olarak bulundu ($p < 0,05$). Tablo 2'de izlendiği gibi kobalt nitrit uygulanan 45 ve 60 dk'lık iskemi gruplarında serum kobalt düzeylerinin anlamlı olarak artış gösterdiği saptandı ($p < 0,01$). 5 mg/kg kobalt nitrit uygulanan 4. ve 6.gruplarda ve 10 mg/kg kobalt nitrit uygulanan 5. ve 7.gruplarda serum kobaltında anlamlı derecede artışlar görüldü ($p < 0,01$). Aynı doz kobalt nitrite maruz kalmalarına karşın iskemi süresinin farklı olması nedeniyle 5 ve 7.gruplarda serum kobalt düzeyleri çok daha belirgin artış gösterdi (Şekil 6).

Tablo 2. Gruplara göre ortalama serum kobalt düzeyleri (ppm)..

Grup	Kobalt
I	0,0067 ± 0,001
II	0,0015 ± 0,0021 *
III	0,0033 ± 0,0026 *
IV	1,41 ± 0,84 **
V	3,58 ± 3,06 **
VI	2,8 ± 2,3 **
VII	7,85 ± 4,73 **

* : Kontrole göre ($p > 0.05$)

** : Kobalt alınmasına göre karşılaştırma ($p < 0.01$).



Şekil 6. Serum ortalama kobalt düzeylerinin gruplara göre dağılımı..

Serum kobalt düzeyi serum kobalt tedavisi yapılan gruplar arasında standart sapmalardaki yüksek değerler nedeniyle istatistiksel olarak anlamlı bulunmadı ($p > 0.05$).

BÖBREK KORTEKS TBARS DÜZEYLERİ

Tablo 3'de de görüldüğü gibi böbrek korteks ve medullasından ayrı ayrı yapılan ölçümlerden lipid peroksidasyonun göstergesi olarak kabul edilen TBARS düzeyleri hem iskemi zamanı, hem de kobalt dozuna bağlı artış gösterdi.

Kontrol grubunda korteks TBARS'i $303,81 \pm 82,07$ nmol/g protein iken, 45 dk iskemi ve reperfüzyondan sonra $363,64 \pm 138,03$ nmol/g protein'e 60 dk iskemi ve reperfüzyondan sonra ise $429,95 \pm 162,08$ 'e çıktı. 5 mg/kg kobalt nitrit tedavisi (Grup 4) 45 dk iskemi ve reperfüzyonun neden olduğu TBARS artışını daha belirgin hale getirdi. Kobalt nitritin dozu 10 mg/kg olduğu zaman 45 dk'lık iskemi grubunda TBARS artışının çok anlamlı sınırlara ulaştığı ($p < 0,01$) (Grup 5) halde iskemi süresi 60 dk olanlarda TBARS artışı daha az bulundu ($p < 0,05$) (Grup 7).

BÖBREK MEDULLA TBARS DÜZEYLERİ

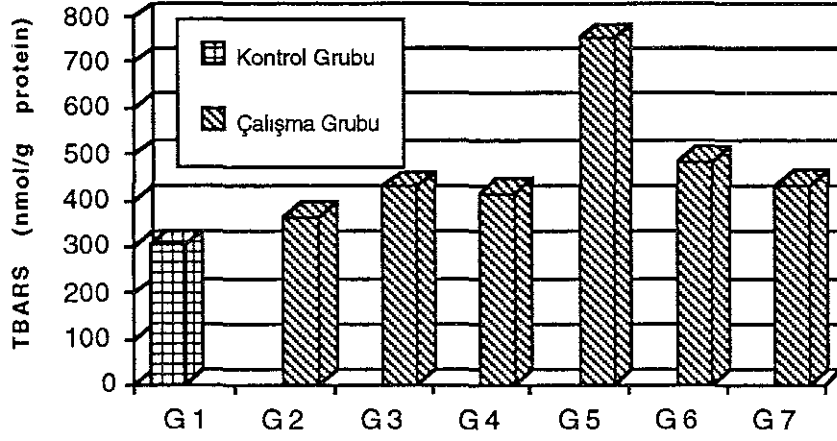
Tablo 4'de görüleceği gibi 45 dk iskemi ve 60 dk'lık reperfüzyona bağlı olarak böbreğin medüller kısmında TBARS düzeyi kontrol grubundakine göre anlamlı olarak arttı ($p < 0,05$). Bu artış 60 dk iskemiye maruz kalan 3.grupta daha belirgindi. 4.grupta 5 mg/kg kobalt nitrit infüzyonu medulladaki iskemi ve reperfüzyona bağlı TBARS artışını anlamlı olarak azalttı ($p < 0,05$) ise de, 10 mg/kg kobalt nitrit infüzyonu tam aksi etkiyle medüller TBARS düzeylerinde artışa neden oldu (Grup 5). Şekil 8'den de görüleceği gibi 6.grupta 5 mg/kg kobalt infüzyonu 60 dk iskemi ve 60 dk'lık reperfüzyonla artmış olan medüller TBARS düzeylerini kontrol değerlerine döndürürken dozun 10 mg(kg'a çıkarılması ile de TBARS düzeyleri kontrol değerlerde tutuldu (Grup 7).

Tablo 3. İskemi ve reperfüzyona bağlı böbrek korteksindeki TBARS değişikliğine kobalt uygulamasının etkisi(Ortalama \pm SD nmol/g protein)

Grup	TBARS
I	$303,81 \pm 82,07$
II	$363,64 \pm 138,03$ *
III	$429,95 \pm 162,03$ *
IV	$415,82 \pm 139,38$ **
V	$752,67 \pm 177,22$ **
VI	$484,05 \pm 107,38$ **
VII	$433,67 \pm 183,34$ **

* : Kontrole göre ($p < 0,05$)

** : Kobalt alınmasına göre karşılaştırma ($p < 0,05$).



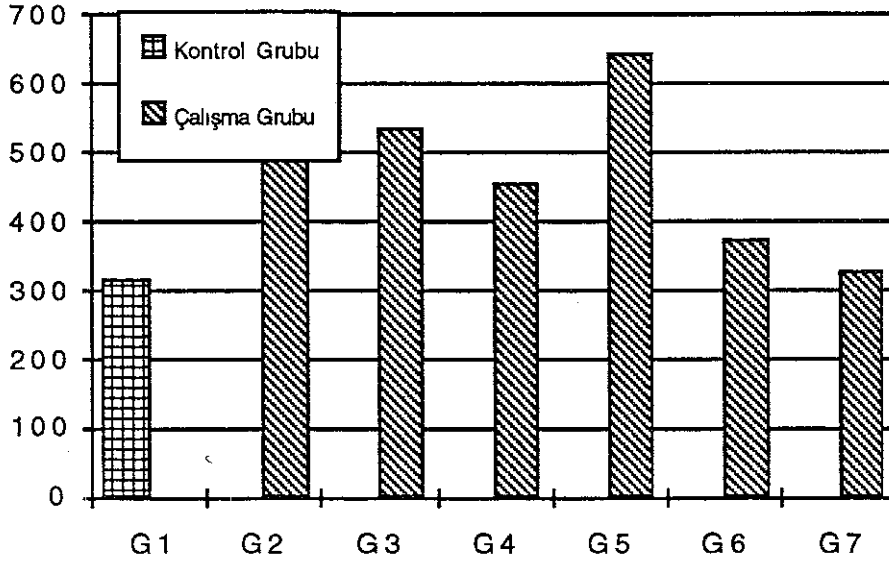
Şekil 7. Ortalama korteks TBARS düzeylerinin gruplara göre dağılımı.

Tablo 4. Ortalama medulla TBARS düzeylerinin gruplara göre dağılımı (nmol/gr).

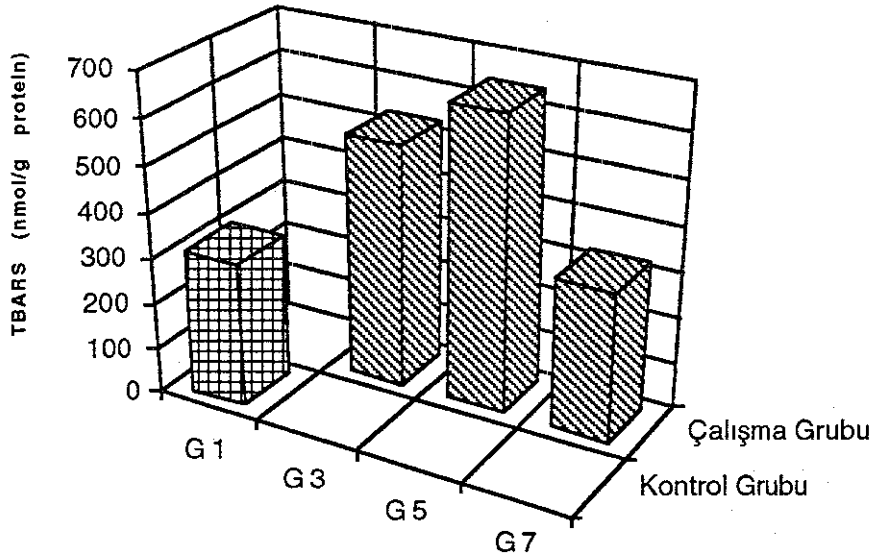
Grup	TBARS
I	315,61 ± 107,52
II	495,64 ± 63,20 *
III	533,97 ± 145,07 *
IV	455,51 ± 118,96 **
V	644,12 ± 121,29 **
VI	373,52 ± 83,60 **
VII	326,42 ± 130,04 **

* : Kontrole göre (p < 0.05)

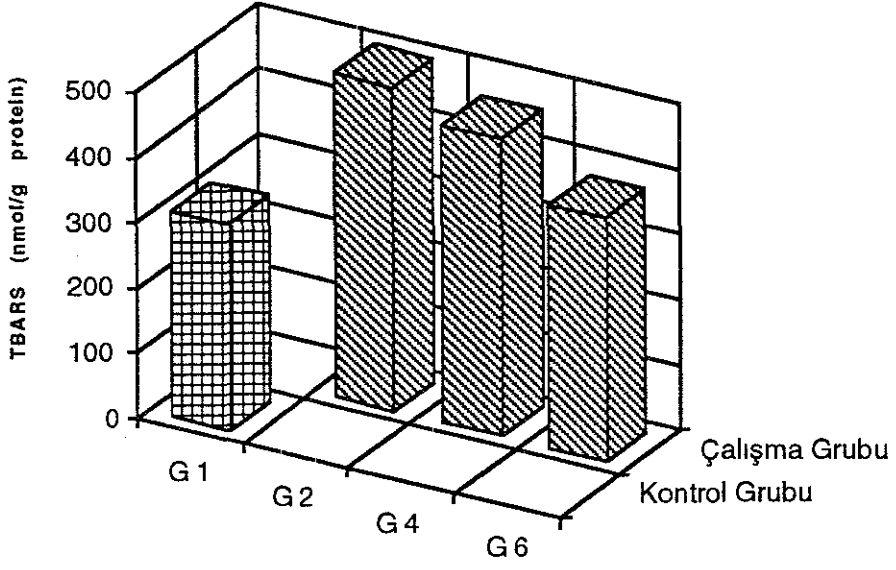
** : Kobalt alınmasına göre karşılaştırma (p < 0.05).



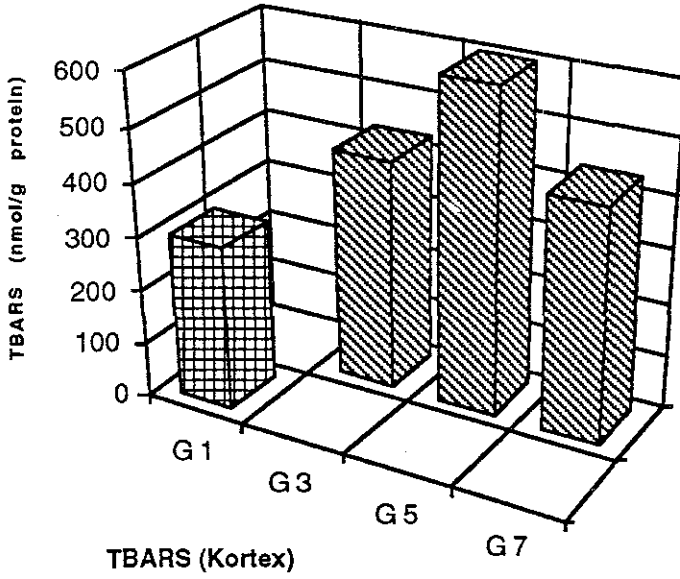
Şekil 8. Ortalama medulla TBARS düzeylerinin gruplara göre dağılımı.



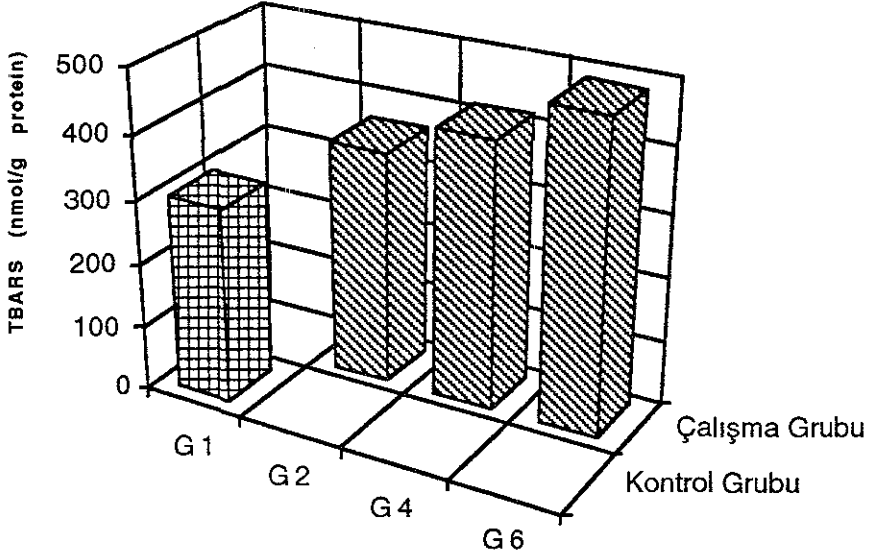
Şekil 9. Grup 1, 3, 5, 7'deki ortalama medulla TBARS düzeylerinin karşılaştırılması.



Şekil 10. Grup 1, 2, 4, 6'daki ortalama medulla TBARS düzeylerinin karşılaştırılması.



Şekil 11. Grup 1, 3, 5, 7'deki ortalama korteks TBARS düzeylerinin karşılaştırılması.



Şekil 12. Grup 1, 2, 4, 6'daki ortalama korteks TBARS düzeylerinin karşılaştırılması.

GLUTATYON PEROKSİDAZ DEĞİŞİKLİKLERİ

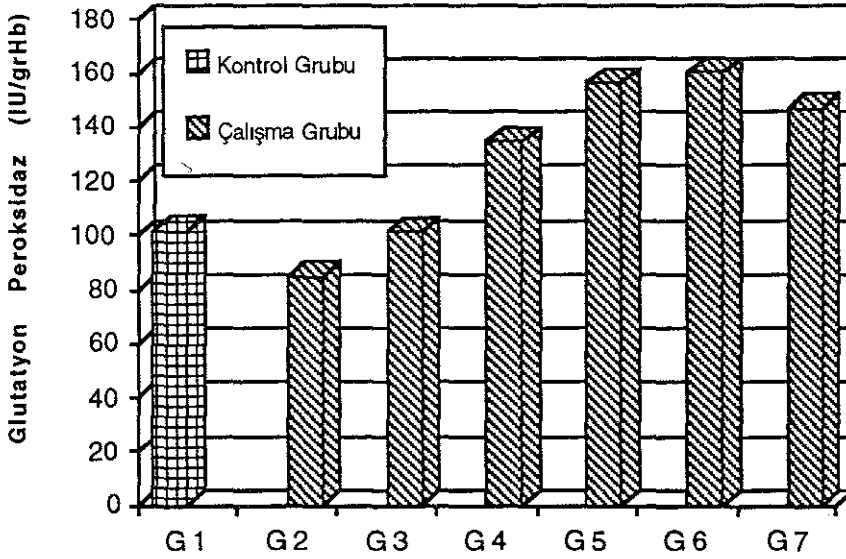
Tablo 5'den de görüleceği gibi antioksidan kapasitenin parametrelerinden birisi olan glutatyon peroksidaz aktivitesinde eritrositlerde 45 dk iskemi ve 60 dk reperfüzyondan sonra azalma saptandı ise de, bu anlamlı değildi ($p > 0,05$). Nitekim iskemi süresinin 60 dk'ya uzatılmasının eritrosit glutatyon peroksidaz aktivitesine hiç etkisi olmadı. Halbuki kobalt infüzyonu ile eritrosit glutatyonunda anlamlı artış oldu ve kobaltın glutatyon peroksidaz artırıcı etkisi doz artışı veya iskemi süresinin artışından etkilenmedi.

Tablo 5. Grupların eritrosit glutatyon peroksidaz aktivitesi ortalama değerleri (IU/grHb).

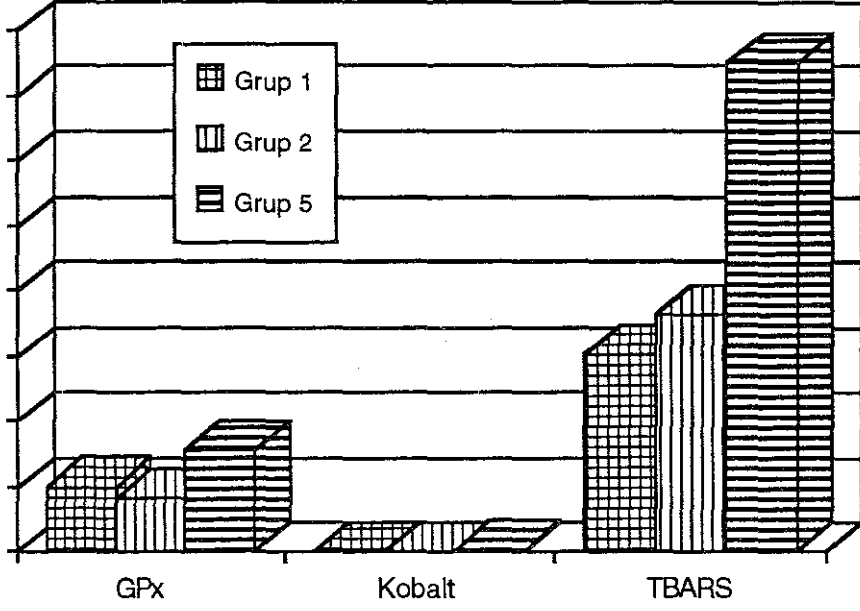
Grup	Glutatyon peroksidaz
I	101,56 ± 46,05
II	84,73 ± 49,57 *
III	100,92 ± 26,36 *
IV	134,63 ± 42,82 **
V	156,33 ± 36,59 **
VI	160,07 ± 67,76 **
VII	147,16 ± 37,57 **

* : Kontrole gre (p < 0.05)

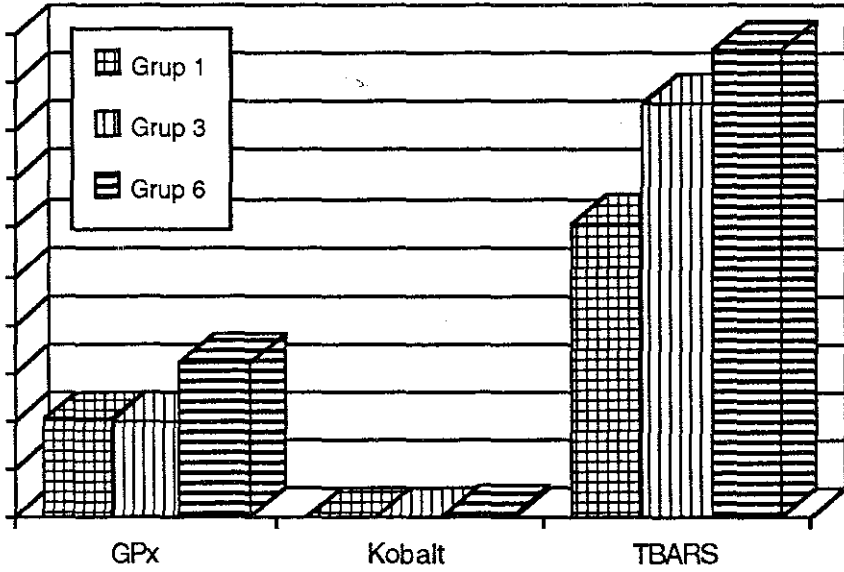
** : Kobalt alınmasına gre karşılaştırma (p < 0.05).



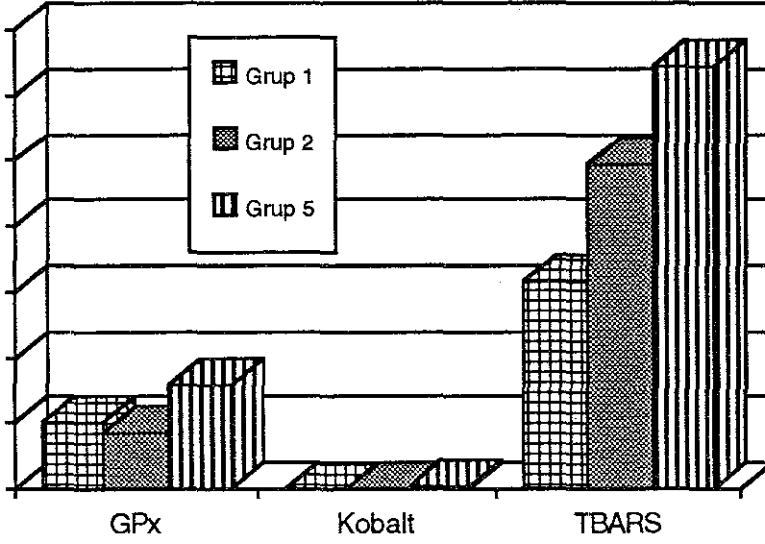
şekil 13. Grupların eritrosit glutatyon peroksidaz aktivitesi ortalama değerleri (IU/gHb).



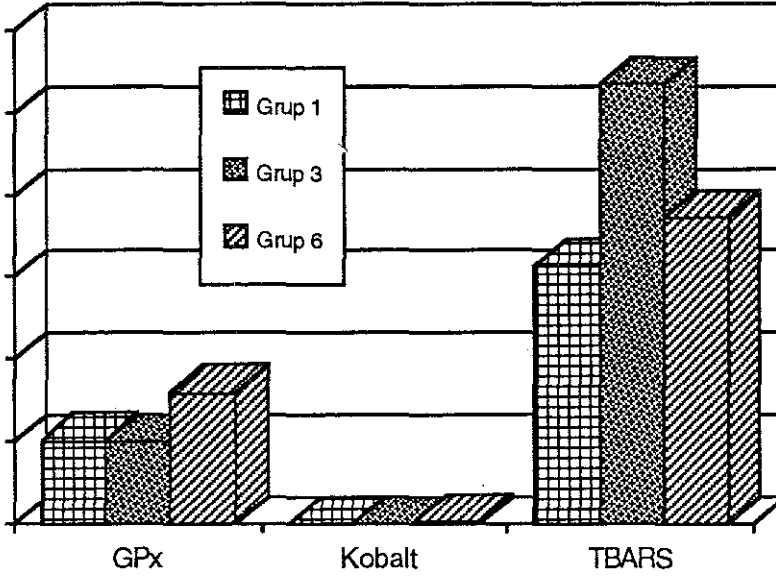
Şekil 14. 1., 2. ve 5. gruptaki glutatyon peroksidaz, serum kobalt düzeyi, korteks TBARS ortalama değerlerinin karşılaştırılması.



Şekil 15. 1., 3. ve 6. gruptaki glutatyon peroksidaz, serum kobalt düzeyi, korteks TBARS ortalama değerlerinin karşılaştırılması.



Şekil 16. 1., 2. ve 5. gruplardaki glutatyon peroksidaz, serum kobalt düzeyi, medulla TBARS ortalama değerlerinin karşılaştırılması.



Şekil 17. 1., 3. ve 6. gruplardaki glutatyon peroksidaz, serum kobalt düzeyi, medulla TBARS ortalama değerlerinin karşılaştırılması.

Tablo 6. Grup 1 böbrek korteks ve medulla TBARS düzeyleri, eritrosit glutatyon peroksidaz aktivite düzeyleri ve serum kobalt düzeyleri.

Denek no	TBARS		GPx (IU/gr Hb)	Co (PPM)
	Kortex (nmol/gr)	Medulla (nmol/gr)		
1	277,131	290,345	70,7	0,001
2	227,776	401,581	73,9	0,002
3	323,663	296,096	77,1	0,03
4	268,061	497,394	170,4	0,002
5	412,938	206,743	54,6	0,001
6	160,704	399,819	77,1	0,001
7	325,454	195,575	86,8	0,02
8	*	*	186,5	0,003
9	415,614	237,393	80,3	0,006
10	322,949	*	138,2	0,001

* : Teknik nedenlerle değerler okunamamıştır.

Tablo 7. Grup 2 böbrek korteks ve medulla TBARS düzeyleri, eritrosit glutatyon peroksidaz aktivite düzeyleri ve serum kobalt düzeyleri.

Denek no	TBARS		GPx (IU/gr Hb)	Co (PPM)
	Kortex (nmol/gr)	Medulla (nmol/gr)		
11	562,613	487,383	112,5	0,002
12	306,355	530,783	64,3	0,06
13	479,535	478,978	86,5	0,003
14	233,025	504,025	51,4	0,004
15	569,911	435,228	202,5	0,009
16	243,022	418,023	41,8	0,008
17	189,68	496,743	80,3	0,003
18	243,022	587,501	48,2	0,005
19	277,74	597,501	*	0,006
20	357,593	419,905	192,9	0,005

* : Teknik nedenlerle değerler okunamamıştır.

Tablo 8. Grup 3 böbrek korteks ve medulla TBARS düzeyleri, eritrosit glutatyon peroksidaz aktivite düzeyleri ve serum kobalt düzeyleri.

Denek no	TBARS		GPx (IU/gr Hb)	Co (PPM)
	Korteks (nmol/gr)	Medulla (nmol/gr)		
21	234,478	771,282	128,6	0,001
22	610,205	*	128,6	0,001
23	727,676	270,61	61,0	0,002
24	392,946	524,399	128,6	0,001
25	327,63	583,822	90,03	0,007
26	320,888	690,831	90,03	0,006
27	219,158	534,269	93,2	0,005
28	404,579	365,36	61,0	0,01
29	*	401,385	122,1	0,02
30	421,238	400,473	106,1	0,07

* : Teknik nedenlerle değerler okunamamıştır.

Tablo 9. Grup 4 böbrek korteks ve medulla TBARS düzeyleri, eritrosit glutatyon peroksidaz aktivite düzeyleri ve serum kobalt düzeyleri.

Denek no	TBARS		GPx (IU/gr Hb)	Co (PPM)
	Korteks (nmol/gr)	Medulla (nmol/gr)		
31	231,651	377,465	138,2	1,05
32	536,239	434,974	125,4	*
33	365,428	485,176	147,9	0,40
34	388,888	493,556	141,4	1,2
35	259,587	504,105	*	1,15
36	432,356	354,252	183,2	0,90
37	1518,048	292,188	183,2	3,45
38	455,703	533,728	73,9	1,6
39	*	368,268	61,0	1,5
40	656,728	711,475	157,5	1,5

* : Teknik nedenlerle değerler okunamamıştır.

Tablo 10. Grup 5 böbrek korteks ve medulla TBARS düzeyleri, eritrosit glutatyon peroksidaz aktivite düzeyleri ve serum kobalt düzeyleri.

Denek no	TBARS		GPx (IU/gr Hb)	Co (PPM)
	Kortex (nmol/gr)	Medulla (nmol/gr)		
41	674,259	757,282	183,2	9,1
42	508,008	*	128,6	3,6
43	1249,979	574,202	147,9	9,0
44	1417,129	785,226	109,3	1,7
45	867,936	706,593	183,2	1,6
46	782,3	686,017	106,1	1,05
47	667,16	540,662	196,1	3,6
48	*	*	138,2	1,9
49	*	*	157,5	3,5
50	1016,393	458,91	212,2	0,8

* : Teknik nedenlerle değerler okunamamıştır.

Tablo 11. Grup 6 böbrek korteks ve medulla TBARS düzeyleri, eritrosit glutatyon peroksidaz aktivite düzeyleri ve serum kobalt düzeyleri.

Denek no	TBARS		GPx (IU/gr Hb)	Co (PPM)
	Kortex (nmol/gr)	Medulla (nmol/gr)		
51	532,554	512,317	99,6	5,1
52	419,884	261,99	218,6	5,7
53	700,454	454,557	90,0	0,75
54	532,464	349,952	225,0	0,85
55	963,771	312,476	241,1	14,0
56	491,987	468,252	176,8	6,5
57	878,214	323,511	151,1	1,9
58	442,237	385,186	202,5	0,9
59	369,428	386,135	163,9	1,3
60	383,403	280,826	32,1	2,3

Tablo 12. Grup 7 böbrek korteks ve medulla TBARS düzeyleri, eritrosit glutatyon peroksidaz aktivite düzeyleri ve serum kobalt düzeyleri.

Denek no	TBARS		GPx (IU/gr Hb)	Co (PPM)
	Korteks (nmol/gr)	Medulla (nmol/gr)		
61	240,304	493,451	125,4	14,0
62	223,293	205,663	176,8	4,4
63	566,181	256,406	154,3	1,9
64	339,077	368,988	112,5	1,95
65	465,655	384,702	131,8	3,2
66	421,985	213,628	167,2	9,0
67	438,013	203,825	199,3	12,0
68	863,384	551,195	176,8	9,0
69	437,554	1014,212	*	14,0
70	341,256	259,953	80,39	9,5

* : Teknik nedenlerle değerler okunamamıştır.

TARTIŞMA

Transplantasyon alanındaki yoğun çalışmalar; organda oluşan iskemik hasarın en aza indirilmesi, hatta ortadan kaldırılmasına yönelik araştırmaları da beraberinde getirmiştir. Öncelikle iskemi ve reperfüzyonun organda yaratmış olduğu hasarda serbest radikaller olarak bilinen oksijen türevi moleküllerin önemli roller üstlendiklerinin gösterilmesinden sonra araştırmacılar bu konuya yönelmişler ve pekçok antioksidan özelliğe sahip kimyasal madde bulunmuştur. Yapılan klinik ve deneysel çalışmalar sonunda serbest radikallerin dokuda oluşturdukları hasarı tamamen ortadan kaldıran bir kimyasal madde keşfedilmiş değildir. Bu nedenle son yıllarda araştırmalar hep böyle bir kimyasal maddenin arayışına yöneliktir. Yalnızca organ transplantasyonu değil; pankreatit, myokard infarktüsü, atheroskleroz, pulmoner yetmezlik, serebral iskemi gibi birçok ölüm nedenini oluşturan patolojik tablolarda serbest radikal aracılı doku hasarının önemli olduğu gösterilmiştir. Serbest radikallerin hangi aşamada etkili oldukları, neden ya da sonuç ilişkisinin hangi noktasında önemli oldukları tam olarak ortaya konamamıştır (9, 47).

Baron ve arkadaşları köpek ototransplantasyon modelinde perfüzyon solüsyonuna ekledikleri seruloplazmin ve deferoksaminin doku hasarı azaltıcı etkisini araştırmışlardır. Bu çalışmada serum kreatinin düzeyleri ile 5.gün ve 14.günlerdeki sağ kalma oranları

karşılaştırılmıştır. Perfüzyon solüsyonuna deferoksamin ve seruloplazmin eklenen gruplarda 14.gün sağ kalma oranlarında belirgin yükselme saptanırken; serum kreatinin düzeylerinde kontrol gruplarına göre daha kısa sürede düşme olduğu gözlenmiştir. Sonuç olarak perfüzyon solüsyonuna eklenen iki antioksidan maddenin böbrekte serbest radikallere bağlı oluşan hasarı azalttığını ortaya koymuşlardır (4).

Bizim çalışmamızda iskemi reperfüzyon hasarını önlemek amacı ile perfüzyon sıvısına kobalt eklenmiştir. Önceki çalışmaların bir kısmı kobaltın lipid peroksidasyonunu önleyebileceğini, bir kısmı ise aksi görüşü savunduğundan bu konuda kesin fikir birliği yoktur. Biz de, bizden önceki araştırmacılar Gower ve ark. tavşanlarda (22), Baker ve ark. sıçanlarda (3), Demirbaş ve ark'nın köpeklerde (15) yaptığı çalışmalara benzer şekilde 45 ve 60 dk iskemi ve 60 dk'lık reperfüzyondan sonra böbrek dokusunda lipid peroksidasyon artışını TBARS ölçümleriyle saptadık. Gower ve ark. tavşan böbrek ototransplantasyonunda reperfüzyon solüsyonuna deferoksamin ve indometacin ekleyerek korteks ve medullada serbest radikale bağlı lipid peroksidasyonu önlemeyi başardıklarını bildirmişlerdir. Baker ve ark'da süperoksid dismutaz ve allopurinol ile serbest radikallerin böbrek hasarı yapmasını engellediklerini bildirmişler, Demirbaş ve ark. ise köpek ototransplantasyonunda TBARS artışını α -tokoferol ile önlemişlerdir. Halbuki bizim araştırmamızda 5 mg/kg kobalt infüzyonu ile kortikal TBARS düzeylerinde artış gözlenmiş ve benzeri yükselme 10 mg/kg kobalt dozları ile de saptanmıştır.

Meduller TBARS düzeyleri iskemi ve reperfüzyondan sonra beklendiği gibi artmış ve bu artış iskemi süresinin artışı ile belirginleşmiştir. 45 dk iskemiye maruz kalanlarda kobalt tedavisinin çok anlamlı etkisi olmamış, istatistiksel öneme sahip olmasa da kobalt kortekste olduğu gibi medullada da TBARS düzeylerinde artışa yol açmıştır. Ancak 60 dk'lık iskemiye maruz kalan hayvanlarda meduller TBARS artışları hem 5, hem 10 mg/kg kobalt tedavisi ile tamamen önlenmiştir. Korteks ve medulla TBARS düzeylerinin kobalt tedavisinden farklı etkileşiminin mekanizmasını bizim bulgularımız ile tam olarak açıklamak mümkün değilse de, literatür bilgilerinden yararlanarak bazı yaklaşımlarda bulunulabilir.

Gower ve ark. tavşanlarda yaptıkları çalışmalarda da iskemi reperfüzyona bağlı lipid peroksidasyonu kortekste deferroksamin ile azaltılabilmiş, medulladaki artış indometacin ile düşürülmüştür. Bu da, lipid peroksidasyon aracının bu iki böbrek kısmında farklı olduğunu göstermektedir.

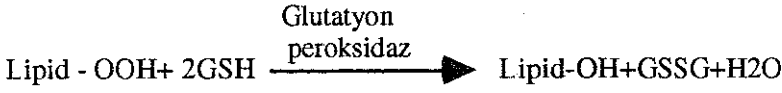
Kobalt iki değerlikli bir metal olmasına rağmen ve demirle rekabet esasına dayanan bir mekanizma ile serbest radikal oluşumunu önlediği bildirilmesine karşın, bizim çalışmamızda deferroksamin ile önlenebilen TBARS artışına kobalt katkıda bulunamamıştır. Atabey ve ark'nın (2) kobaltın lipid peroksidasyonunu stimüle ettiği bildiren sonuçları bizim bulgularımızla daha fazla uyum göstermektedir. Meduller TBARS artışı indometacin ile önlenemediğine göre medullada daha çok prostanooid ürünleri üzerinde oluşan bu hasarın kobalt ile önlenmesi ancak uzun süren iskemilerde bu önlemin belirgin olmasının mekanizmasını açıklayacak verilere ne yazık ki sahip değiliz. Medulladaki TBARS artışı 45 dk iskemi gruplarında 5 ve 10 mg/kg kobalt tedavisinden yarar görmemiştir. Halbuki 60 dk iskemiye maruz kalanlarda her iki doz kobaltta TBARS düzeyini anlamlı ölçüde azaltmıştır. O halde iskemi süresinin kobaltın TBARS azaltıcı etkisinde önemi olması gerekir.

Serum kobalt düzeyleri iskemi süresinin 15 dk uzatılması ile yüzde yüz gibi anlamlı artış göstermiştir. Bunun nedeni 60 dk iskemi yapılan hayvanlarda böbrek hasarının daha fazla olması ve kobaltın böbrekler aracılığı ile 60 dk'lık reperfüzyon esnasında yeterince uzaklaştırılmayıp olabilir. Bir başka olasılık da, 60 dk'lık iskemi ve reperfüzyona maruz kalanlarda dokulara kobalt girişinin az oluşu sonucu serumda birikmesi olabilir. Bizim çalışmamızda böbrek fonksiyonları ölçülmemişse de aynı yöntemi kullanan başka araştırmacıların bulguları böbrek fonksiyonlarının 60 dk iskemide daha fazla bozulduğunu teyid etmektedir. Medüller kanlanma total böbrek kanının % 2-5 kadarını alır ve oldukça yavaş kan akımı söz konusudur. Bu nedenle buraya ulaşan kobaltın dozu kadar hücre ile temas süresi de TBARS azlığında etken olabilir.

Organizmada oksidatif stresi önlemek amacı ile antioksidan bir sistem bulunmaktadır. Bu sistemi oluşturan enzimler içerisinde glutatyon peroksidaz, SOD, katalaz çok büyük öneme sahiptir. İskemi ve

reperfüzyon sonucu oluşan serbest radikallerle mücadele etmek amacı ile antioksidan mekanizmada aktive olur.

Green ve arkadaşları (25) tavşanda yaptıkları çalışmada; soğuk iskemi ve reperfüzyonun böbrekte oluşturduğu hasarın süperoksit dismutaz, redükte ve okside glutatyon düzeylerine olan etkisini araştırmışlardır. Yaptıkları değerlendirmede iskemik hasarın SOD düzeylerinde anlamlı bir değişmeye yol açmadığını, ancak okside glutatyon düzeylerinde artma olduğu sonucuna varmışlardır.



reaksiyonu dikkate alınarak GSH/GSSG oranında oksidatif stresin derecesine paralel olarak artış olduğunu saptamışlardır.

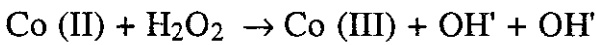
Ancak Aktan ve arkadaşlarının (16) sıçan böbrek modelinde yaptıkları çalışmada ise verapamil ve iloprost (ZK36374) tedavisi uygulanan gruplarda (60 dk iskemi ve reperfüzyon) yalnızca iskemi uygulanan gruplara göre glutatyon (GSH) düzeylerinde anlamlı ölçüde artma saptanırken MDA düzeylerinde anlamlı bir değişme görülmemiştir. Bu araştırmacılar verilen tedavinin tek başına doku hasarını tamamen önlemediğini, ancak oluşan hasarın derecesini azalttığını ortaya koymuşlardır.

Nitekim Winchell ve arkadaşları (65) allopurinol, trifluoroperazine, nitrojenmustard, süperoksit dismutaz, dithiothreitol ve diethylcarbomazine'in perfüzyon solüsyonuna eklenmesinin reperfüzyon hasarı üzerine olan etkisini araştırmışlarsa da, bu maddelerin hiçbirisinin anlamlı derecede doku hasarını önlemediğini göstermişlerdir. Sonuç olarak da, serbest radikallerinin oluşumunun ve etkilerinin önlenmesinin tek başına doku hasarını önlemeye yetmediğini ve preservasyon aracılı hasarda vasküler endotelial yıkım, enerji metabolizmasında ve ATP yapımındaki değişiklikler, önlenemeyen kalsiyum akımı ve bunun gibi pekçok mekanizmanın sorumlu olabileceğini ortaya koymuşlardır.

Bizim çalışmamızda ise 45 dk iskemi ve reperfüzyondan sonra eritrosit glutatyon peroksidazında çok hafif ama istatistiksel öneme sahip olmayan azalma, 60 dk iskemi reperfüzyonundan sonra ise hiç

değişiklik olmamıştır. Kobalt tedavisi ise glutatyon peroksidaz düzeylerinde anlamlı artışa neden olmuştur. Eritrosit glutatyon peroksidaz artışı, kan akımının çok yavaş olduğu ve hemokonsantrasyonun fazla olduğu medulladaki kobalta bağlı TBARS azalışının bir nedeni olabilir.

Gerçi Kılıç ve Rouhani'nin kobalt klorid ile yaptıkları çalışmada mikrozomlar, fosfatidilserin lipozomları ve eritrosit membranında (pH=7,4'de) doza bağımlı olarak demir ve askorbat'ın oluşturduğu lipid peroksidasyonu inhibe ettiği gösterilmişse de Atabey ve arkadaşları da bizim bulgularımıza benzer sonuçlar elde etmiştir (35, 2). Deri fleplerinde kobalt klorid'in invivo etkilerini araştırmışlar ve yalnızca iskemi uygulanan grupla, 5 mg/kg I.p kobalt klorid ve 10 mg/kg I.p kobalt klorid verilen gruplar arasında; doku TBARS düzeyleri, deri flebi canlı kalma oranı, glutatyon peroksidaz, glutatyon redüktaz ve glukoz-6-P'dehidrogenaz düzeyleri arasındaki farklılık araştırılmıştır. Bu araştırmacılar da kobalt klorid verilen grupta doku TBARS düzeylerinde kontrol grubuna göre anlamlı derecede yükselme saptamışlardır. Ayrıca kobalt klorid verilen gruplarda kontrol grubuna göre deri flebi canlı kalma oranının önemli derecede azaldığı gösterilmiştir. Enzim aktiviteleri açısından da kobalt klorid uygulanan gruplarda kontrol grubuna göre glutatyon peroksidaz aktivitesinde artış, glutatyon redüktaz aktivitesinde azalma saptamışlar; glukoz-6-P' dehidrogenaz aktivitesi değişikliğe uğramamıştır. Kobaltın bu etkisi doz arttırılan grupta farklı bulunmamıştır. Bizim bulgularımıza göre kobalt lipid peroksidasyonunu renal sıcak iskemi ve reperfüzyon modelinde arttırmaktadır. Bunun nedeni aşağıdaki reaksiyon sonucu kobaltın hidroksil radikal oluşumunu hızlandırması olarak ileri sürülmüştür.



Kobalt ayrıca glutatyon redox siklusundaki tüm enzimleri inhibe etmemektedir. İskemi ve reperfüzyon sonucunda kobalt; glutatyon peroksidaz aktivitesinde artmaya yol açmaktadır. Sıçan myokardında kobalt verilmesinin glutatyon peroksidaz aktivitesinde artışa yol açtığı gösterilmiştir. İskemi ve reperfüzyonun oluşturduğu doku hasarını inceleyen çalışmalarda GSH peroksidaz aktivitesinin düştüğü gösterilmiştir. Bizim çalışmamızda kobalt verilmesinin yarattığı oksidan stresin ise GSH peroksidaz aktivitesinde artışı ile sonuçlanmıştır.

Sonuç olarak araştırmamızdan elde edilen bulgulara göre kobalt nitrit uygulaması böbrek korteksinde sıcak iskemi ve reperfüzyon hasarına bağlı lipid peroksidasyonu engelleyememiş, hatta daha da artışına neden olmuş, buna karşın aynı işlemin neden olduğu medüller lipid peroksidasyonu kobalt infüzyonundan özellikle iskeminin uzadığı hallerde yarar grmştir. Medullanın farklı davranışının nedenlerinin daha ileri çalışmalarla incelenmesi gerektiği kanısına ulaşılmıştır.

ÖZET

Kobalt'ın sıcak iskemi ve reperfüzyona bağılı gelişen renal doku hasarını önlemedeki etkisini araştırmak amacı ile yapılan deneysel çalışmada 70 genç erişkin erkek albino sıçan kullanıldı. Her bir grupta 10 adet sıçan olmak üzere, çalışma 7 ayrı grupta yapıldı. Grup 1'de yalnızca laparotomi ve nefrektomi; Grup 2'de 45 dk iskemi ve 60 dk reperfüzyonu takiben nefrektomi; Grup 3'de 60 dk iskemi ve 60 dk reperfüzyonu takiben nefrektomi; Grup 4'de Grup 2'ye ek olarak 5 mg/kg kobalt nitrit, Grup 5'de 10 mg/kg kobalt nitrit verildi. Grup 6'da Grup 3'e ek olarak 5 mg/kg kobalt nitrit, Grup 7'de 10 mg/kg kobalt nitrit iv verildi. Her hayvana intraperitoneal ürethan anestezisi altında sol femoral arter ve ven kanüle edilerek, kan basıncı, kalp atımı izlendi. Iskemi süresince infüzyon pompası aracılığı ile kobalt nitrit 10 cc SF içinde infüze edildi. Serum kobalt düzeyleri, böbrek TBARS ve eritrosit GPx analizleri yapıldı.

Elde edilen sonuçlara göre :

- 1 - Kobalt nitrit uygulanan gruplarda böbrek korteks TBARS düzeyleri anlamlı olarak yüksek bulunurken ($p < 0,01$) medulla TBARS düzeylerinde 60 dk'lık iskemi grubunda azalma saptandı ($p < 0,05$), 45 dk'lık iskemi grubunda ise belirgin değişiklik görülmedi.

- 2 - Kobalt nitrit uygulanan gruplarda kontrol gruplarına göre eritrosit glutatyon peroksidaz aktiviteleri anlamlı olarak yükseldi ($p < 0,05$).
- 3 - Uygulanan kobalt dozu ie TBARS ve glutatyon peroksidaz aktivitesi açısından gruplar arasında anlamlı fark bulunmadı.
- 4 - Böbrek korteks TBARS düzeyinin genel olarak tüm gruplarda medullaya oranla daha yüksek olduğu görüldü. Bu da böbrek korteksinin medullaya göre iskemiye karşı daha hassas olduğunu ortaya koydu.

Çalışmamızda kobaltın böbrek korteksinde lipid peroksidasyonunu arttırdığı, medullada azalttığı, glutatyon peroksidaz aktivitesini yükselttiği sonucuna varıldı. Medulla ve kortekste ki lipid peroksidasyonuna kobaltın farklı etkisinin mekanizmasının daha ileri çalışmalarla incelenmesi gerektiği kanısına ulaşıldı.

KAYNAKLAR

1. Angel FM, Ramasastary SS, Swartz WM : Free radicals ; basic concepts concerning their chemistry pathophysiology, and relevance to plastic surgery. *Plastic and Reconstructive Surgery* 79(6); 990-6, 1987.
2. Atabey A, Akgür FM, Vander Kolk CA : The effect of cobalt chloride on skin flap survival. *British Journal of Plastic Surgery* 49; 1-4, 1996.
3. Baker GL, Corry RJ, Autor AP : Oxygen free radical induced damage in kidneys subjected to warm ischemia an reperfusion. *Ann Surg* 202(5); 628-40, 1985.
4. Baron P, Marin OG, Casas C : Renal preservation after warm ischemia using oxygen free radical scavengers to prevent reperfusion injury. *Journal Surgical Research*. 51(1): 60-65, 1991.
5. Barut S, Canbolat A, Bilge T : Lipid peroxidation in experimental spinal cord injury; time level relationship. *Neurosurg Rev* 16(1); 53-9, 1993.
6. Belzer FO, Southard JH : Principles of solid-organ preservation by cold storage. *Transplant* 45(4); 673-6, 1988.

7. Boudjema K, VanGulik TM, Lindell SL : Effect of oxidized and reduced glutathione in live preservation. *Transplantation* 50(6); 948-50, 1990.
8. Bulkley GB : The role of oxygen free radicals in human disease processes. *Surgery* 94(3); 407-11, 1983.
9. Carone D, Loverro G, Greco P : Lipid peroxidation products and antioxidant enzymes in red blood cells during normal and diabetic pregnancy. *European Journal of Obstetrics-Gynecology* 51(2); 103-9, 1993.
10. Chandra RK : Trace elements in nutrition of children. 1985.
11. Closa D, Bulbena O, Rosello-Catafau J, Fernandez Cruz L : Effect of prostaglandins and superoxide dismutase administration on oxygen free radical production in experimental acute pancreatitis. *Inflammation* 17(5); 563-71, 1993.
12. Coghlan JG, Flitter WD, Clutton SM, et al : Allopurinol pretreatment improves postoperative recovery and reduces lipid peroxidation in patients undergoing coronary artery bypass grafting. *The Journal of Thoracic and Cardiovascular Surgery* 107(1); 248-56, 1992.
13. Cordis GA, Bagchi D, Maulik N : High performance liquid chromatographic method for the simultaneous detection of malonaldehyde, acetaldehyde, formaldehyde, acetone and propionaldehyde to monitor the oxidative stress in heart. *J Chromatog A* 661(1-2); 181-91, 1994.
14. Cotterill LA, Gower JD, Fuller BJ : Oxidative damage to kidney membranes during cold ischemia. *Transplantation* 48(5); 745-51, 1989.
15. Demirbaş A, Bozoklu S, Özdemir A, et al : Effect of alpha tocopherol on the prevention of reperfusion injury caused by

- free oxygen radicals in the canine kidney autotransplantation model. *Transplant Proc* 25(3); 2274, 1993.
16. Döşlüoğlu HH, Aktan AO, Yeğen C : The cytoprotective effects of veropamil and ilioprost (ZK36374) on ischemia-reperfusion injury of Kidneys. *Transplant Int* 6(3); 138-42, 1993.
 17. Elsisı AE, Earenst DL, Sipes IG : Vitamin A potentiation of carbon tetrachloride hepatotoxicity ; role of liver macrophages and active oxygen species. *Toxicol App Pharmacol* 119(2); 295-301, 1993.
 18. Fleck CH, Hauroid T, Hilmann T : Evaluation of methods indicating higher susceptibility of immature rats to renal ischemia. *Exp Toxic Pathol* 45; 155-160, 1993.
 19. Foschi D, Castoldi L, Iesma A, et al : Effects of ischemia and reperfusion on liver regeneration in rats. *Eur J Surg* 159(8); 393-8, 1993.
 20. Freeman BA, Crapo JB : Biology of disease free radicals and tissue injury. *Laboratory Investigation* 47(5); 412-26, 1982.
 21. Goode HF, Webster NR : Free radicals and antioxidants in sepsis. *Critical Care Medicine* 21(11); 1770-6, 1993.
 22. Gower JD, Healing G, Fuller BJ : Protection against oxidative damage in cold stored rabbit kidneys by desferrioxamine and indomethacin. *Cryobiology* 26; 309-17, 1989.
 23. Gray RP, Wickens DG, Patterson DL : Free radical activity after reperfusion in diabetic and nondiabetic patients with acute myocardial infarction. *Clinical Science* 85(5); 549-55, 1993.
 24. Grech ED, Bellamy CM, Jackson MJ : Free radical activity after primary coronary angioplasty in acute myocardial infarction. *American Heart Journal* 127(6); 1443-9, 1994.

25. Green CJ, Healing G, Lunec J : Evidence of free radical-induced damage in rabbit kidneys after simple hypothermic preservation and autotransplantation. *Transplantation* 41(2); 161-5, 1986.
26. Gupta JB, Prasad M, Kalra J : Platelet activating factor induced changes in cardiovascular function and oxyradical status of myocardium in presence of the PAF antagonist CV-6209. *Agiology* 45(1); 25-36, 1994.
27. Halliwell B, Gutteridge JM : Oxygen toxicity, oxygen radicals-transition metals and disease. *Biochem J* 219; 1-14, 1984.
28. Halliwell B, Gutteridge JM, Cross CE : Free radicals antioxidants and human disease ; where are we now ? *J Lab Clin Med* 119(6); 598-620, 1992.
29. Hattori Y, Moriwaki A, Hayashi Y : Involvement of adenosine sensitive cyclic AMP-generating systems in cobalt induced epileptic activity in the rat. *J Neurochem* 61(6); 2169-74 1993.
30. Horton JW, White DJ : Lipid peroxidation contributes to cardiac deficits after ischemia and reperfusion of the small bowel. *Am J Physiol* 264(5 pt 2); 1686-92, 1993.
31. Hoshino T, Maley WR, Bulkley GB : Ablation of free radical mediated reperfusion injury for the salvage of kidneys taken from nonheartbeating donors. *Transplant* 45(2); 284-9, 1988.
32. Johnson WD, Kayser KL, Brenowitz JB : A randomized controlled trial of allopurinol in coronary bypass surgery. *American Heart Journal* 121(1) : 20-4, 1991.
33. Kawano K, Kim YI, Ono M : Evidence that both cyclosporin azathioprine prevent warm ischemia reperfusion injury to the rat liver. *Transpl Int* 6(6); 330-6, 1993.

34. Keith F : Oxygen free radicals in cardiac transplantation. *J Card Surg* 8 (2 suppl); 245-8, 1993.
35. Kılınc K, Rouhani R : Cobaltous ion inhibition of lipid peroxidation in biological membrans. *Biochemica et Biophysica Acta* 1125; 189-95, 1992.
36. Krinsky NI : Membrane antioxidant. *Annals NY Acad Sci* 551; 17-32, 1988.
37. Lewis CP, Demedts M, Nemery B : The rola thiol oxidation in cobalt (II) induced toxicity in hamster lung. *Biochem Pharmacol* 43(3); 519-25, 1992.
38. Lowry OH, Rosenbrough NJ, Far AL, Randele RJ : Protein measurement with folinphenol reagent. *Journal of Biological Chemistry* 193; 265-75, 1951.
39. Marubayashi S, Dohi K, Ochi K : Role of free radicals in ischemic rat liver cell injury; Prevention of damage by α -tocopherol administration. *Surgery* 99(2); 184-91, 1986.
40. Menasche P, Piwnica A : Free radicals and myocardial protection ; a surgical viewpoint. *Ann Thorac Surg* 47; 939-45, 1989.
41. Michetti G, Mosconi G, Zanelli R : Bronchoalveolar lavage its role in diagnosing cobalt lung disease. *Sci Total Environ* 150(1-3); 173-8, 1994.
42. Minor T, Isselhard W : Platellet-activating factor antagonism enhances the liver's recovery from warm ischemia in situ. *J Hepatol* 18(3); 365-8, 1993.
43. Minor T, Isselhard W : Role of the Hepatovasculature in free radical mediated reperfusion damage of the liver. *Eur Surg Res* 25; 287-293, 1993.

44. Minor T, Isselhard W, Yamanoto Y : The effects of allopurinol and SOD on lipid peroxidation and energy metabolism, in the liver after ischemia in an aerobic/anaerobic persufflation. *Surg Today* 23(8); 728-32, 1993.
45. Özdem SS, Şadan G : Myokardial iskemi-reperfüzyon zedelenmesi ve farmakolojik tedavisi. *Akdeniz Üniversitesi Tıp Fakültesi Dergisi* 10(1,2); 93-102, 1993.
46. Patterson E : Coronary vascular injury following transient coronary artery occlusion ; prevention by pretreatment with deferoxamine, dimethylthiourea and N-2-mercapto-propionyl glycine. *J Pharmacol Exp Ther* 266(3); 1528-35, 1993.
47. Prasad K, Kalra J, Bharadwaj B : Increased oxygen free radical activity in patients on cardiopulmonary by pass undergoing aortacoronary by pass surgery. *American Heart Journal* 123(1); 37-45, 1992.
48. Rao N, Fernandez MA, Cid LL, et al : Retinal lipid peroxidation in experimental uveitis. *Arch Ophthalmol* 105 : 1712-6, 1987.
49. Schön MR, Hunt CJ, Pegg DE : The possibility of resuscitating livers after warm ischemic injury. *Transplant* 56(1); 24-31, 1993.
50. Serino F, Grevel J, Napoli KL : Generation of oxygen free radicals during the metabolism of cyclosporine A ; a cause effect relationship with metabolism inhibition. *Molecular and Cellular Biochemistry* 122(2); 101-12, 1993.
51. Seyama A : The role oxygen derived free radicals and the effect of free radical scavengers on skeletal muscle ischemia/reperfusion injury. *Surg Today* 23(12); 1060-7, 1993.
52. Slater TF : Free radical mechanisms in tissue injury. *Biochem J* 222; 1-15, 1984.

53. Sokol RJ, Devereaux M, Khandwala R : Evidence for involvement of oxygen free radicals in bik acid toxicity isolated rat hepatocytes. *Hepatology* 17(5); 869-81, 1993.
54. Southorn PA, Powis G : Free radicals in medicine. II. Involvement in human disease. *Mayo Clinic Proc* 63; 390-408, 1988.
55. Stein HJ, Mathys MJ, Hinder RA : Effect of Verapamil on hepatic ischemia/reperfusion injury. *Am J Surg* 165; 96-100, 1993.
56. Stocks J, Dormandy TL : The autooxidation of human red cell lipid induced by hydrogen peroxide. *Br J Heamatol*, 20 ; 95-11, 1971.
57. Stocks J, Offerman EL, Modell CB, Dormandy TL : The susceptibility to autooxidation of human red cell lipids in health and disease. *Br J Heamatol*, 23; 713-24, 1972.
58. Stone RC, Cotton W, Frayer AA, et al : Lipid peroxidation and expression of Copper-Zinc and manganese superoxide dismutase in lungs of premature infants with hyaline membrane disease and bronchopulmonary dysplasia. *Clin Lab Med* 116; 666-773, 1990.
59. Tabayashi K, Suzuki Y, Nagamine S : A clinical trial of allopurinol (zyloric) for myocardial protection. *J Thorac Cardiovasc Surg* 101; 713-8, 1991.
60. Takayama F, Egashira T, Kudo Y : Effects of anti-free radical interventions of phosphatidylcholine hydroperoxide in plasma after ischemia-reperfusion in the liver of rats. *Biochem Pharmacol* 46(10); 1749-57, 1993.
61. Tanaka J, Ynda Y : Role of lipid peroxidation in gastric mucosal lesions induced by ischemia-reperfusion in the pylorus ligated rat. *Biol Pharm Bull* 16(1); 29-32, 1993.

62. Toivonen JH, Ahotupa M : Free radical reaction products and antioxidant capacity in arterial plasma during coronary artery by pass grafting. *The Journal of Thoracic and Cardiovascular Surgery* 108(1); 140-7, 1994.
63. Tsimoyiannis EC, Moutesidou KJ, Moschos CM : Trimetazidine for prevention of hepatic injury induced by ischemia and reperfusion in rats. *Eur J Surg* 159(2); 89-93, 1993.
64. Weisiger RA : Oxygen radicals and ischemic tissue injury. *Gastroenterology* 90(2); 494-6, 1986.
65. Winchell RJ, Halasz NA : Lack of effect of oxygen radical scavenging systems in the preserved reperfused rabbit kidney transplantation 48(3); 393-6, 1989.
66. Wong SH, Knight JA, Hopfer SM : Lipoperoxides in plasma as measured by liquid chromatographic separation of malondialdehydethiobarbituric acid adduct. *Clinical Chemistry* 33(2); 214-20, 1987.
67. Zaichick VYE, Tsyb AF, Vtyurin BM : Trace elements and thyroid cancer. *Analyst* 120(3); 817-21, 1995.
68. Zotti GC, Frangillo P, Micheletti G, et al : Hypocobaltemia in chronic obstructive arteriopathy. Physiopathologic and therapeutic impotence. *Minerva Chir* 48(3-4); 147-52, 1993.

AKADEMIK UNIVERSITESI
MERKEZ KUTUPHANESİ