

765392

**T.C
PAMUKKALE ÜNİVERSİTESİ
TIP FAKÜLTESİ
GENEL CERRAHİ ANABİLİM DALI**

**RATLARDA İNTESTİNAL İSKEMİ / REPERFÜZYONA
BAĞLI OLUŞAN LOKAL VE UZAK ORGAN HASARINDA
TEMPOL'ÜN ETKİSİ**

UZMANLIK TEZİ

DR. ZAFER TEKE

Denizli-2005

İş bu çalışma jürimiz GENEL CERRAHİ ANABİLİM DALI'nda TIPTA
UZMANLIK TEZİ olarak kabul edilmiştir.

BAŞKAN Prof.Dr.Akın ÖZDEN

ÜYE Prof.Dr.Uğur SUNGURTEKİN

ÜYE Prof.Dr.Ergün ERDEM

ÜYE Prof.Dr.Ö.Levent TUNCAY

ÜYE Doç.Dr. Neşe ÇALLI DEMİRKAN

Yukarıdaki imzaların adı geçen öğretim üyelerine ait olduğunu onaylarım.

...../...../2005
DEKAN
Prof. Dr. Hüseyin BAĞCI
Dekan

TEŞEKKÜR

Pamukkale Üniversitesi Tıp Fakültesi Genel Cerrahi Anabilim Dalı'ndaki uzmanlık eğitimim süresince yetişmemde büyük katkısı olan ve emeği geçen, değerli hocalarım ve bana destek olan sevgili asistan arkadaşlarıma, anabilim dalı başkanımız, değerli hocam sayın Prof.Dr.Akın Özden'e ayrı ayrı teşekkürlerimi sunarım.

Tezimin her aşamasında, tezin akışını sağlayacak her türlü bilgilerini benimle paylaşan ve daima sevgi ve şevkat gördüğüm, anabilim dalı başkanımız, değerli hocam sayın Prof.Dr.Akın Özden'e ve öğretim üyesi sayın Yrd.Doç.Dr.Burhan Kabay'a sonsuz teşekkürü bir borç bilirim.

Tezimin histopatolojik incelemesinde bana yardımcı olan PAÜTF Patoloji Anabilim Dalı öğretim üyeleri sayın Doç.Dr.Neşe Çallı Demirkan ve sayın Yrd.Doç.Dr.Ferda Bir'e teşekkür ederim.

Tezimin biyokimyasal incelemesinde yardımlarını esirgemeyen Aydın Adnan Menderes Üniversitesi Tıp Fakültesi Biyokimya Anabilim Dalı Başkanı sayın Doç.Dr.Çiğdem Yenisev'e teşekkür ederim.

Son olarak, sadece ihtisas eğitimi süresince değil hayatım boyunca her daim yanımda olup sevgi ve desteklerini hiçbir zaman esirgemeyen çok sevdiğim annem Mürüvvet Teke'ye, paylaşımcı ve uzakgörülü bir kişiliğe sahip, mükemmel bir kardeş olan ablam Melahat Teke'ye şükranlarımı sunuyor ve sonsuz teşekkür ediyorum.

Dr.Zafer TEKE

İÇİNDEKİLER

I- GİRİŞ.....	1
II- GENEL BİLGİLER.....	2
1) İSKEMİK VE HİPOKSİK HÜCRE ZEDELENMESİ.....	2
2) HÜCRE ZEDELENMESİNDE SERBEST RADİKALLER.....	10
3) SERBEST OKSİJEN RADİKALLERİNE YAKINDAN BAKIŞ.....	14
4) I/R HASARININ PATOFİZYOLOJİSİ.....	22
5) TEMPOL.....	35
III- GEREÇ VE YÖNTEM.....	42
1) HAYVANLAR.....	42
2) İLAÇLAR.....	42
3) İNTESTİNAL I/R OLUŞTURULMASI.....	43
4) ÇALIŞMA GRUPLARI.....	47
5) DOKU ÖRNEKLERİNİN ALINMASI.....	51
6) HİSTOPATOLOJİK İNCELEMELER.....	51
7) BİYOKİMYASAL İNCELEMELER.....	53
8) I/R'a BAĞLI MİKROVASKÜLER DİSFONKSİYONUN TAYİNİ.....	55
9) ORGAN YAŞ/KURU AĞIRLIK ORANLARI.....	55
10) İSTATİSTİKSEL METOD.....	56
IV- BULGULAR.....	57
1) HİSTOPATOLOJİK İNCELEMELER.....	57
2) BİYOKİMYASAL İNCELEMELER.....	65
3) PULMONER MİKROVASKÜLER DİSFONKSİYON ANALİZİ.....	69
4) ORGAN YAŞ/KURU AĞIRLIK ORANLARI.....	70
V- TARTIŞMA.....	72
VI- SONUÇLAR.....	80
VII- ÖZET.....	81
VIII- YABANCI DİLDE ÖZET.....	82
IX- KAYNAKLAR.....	83

TABLolar ÇİZELGESİ

Tablo-I : İrreverzibl İskemik Zedelenmede Membran Hasarının Olası sebepleri.....	10
Tablo-II : Reaktif Oksijen Türevleri (ROS).....	14
Tablo-III : Reaktif Oksijen Türevlerinin (ROS) Oluşum Yolları.....	15
Tablo-IV : Reaktif Oksijen Türevlerinin (ROS) Tayin Yöntemleri.....	20
Tablo-V : Oksidatif Strese Karşı Mücadele Aşamaları.....	21
Tablo-VI : Antioksidanların Etki Mekanizmaları.....	22
Tablo-VII : Çalışmaya Alınan Rat Grupları.....	50
Tablo-VIII : İleum Dokusunda Mukozal Hasar Skoru (Chiu Skorlaması).....	52
Tablo-IX : Akciğer Vasküler Konjesyon Skoru.....	52
Tablo-X : Akut Akciğer Hasar Skoru.....	53



ŞEKİLLER ÇİZELGESİ

Şekil-1 : Hücre zedelenmesinde sitoplazmik kalsiyum artışının kaynakları ve sonuçları.....	4
Şekil-2 : İskemik zedelenmedeki olaylar.....	5
Şekil-3 : Reverzibl ve irreverzibl hücre zedelenmesinde ultrastrüktürel değişikliklerin şematik görünümü.....	6
Şekil-4 : İskemide membran hasar mekanizmaları.....	8
Şekil-5 : Hücre zedelenmesinde oksijenin kritik rolü.....	10
Şekil-6 : Biyolojik sistemlerde reaktif oksijen türevlerinin ve antioksidan mekanizmaların oluşumu.....	13
Şekil-7 : Doku hipoksisi sırasında ksantin dehidrojenazın ksantin oksidaza dönüşümü ve reperfüzyondan sonra serbest oksijen radikallerinin üretimi..	18
Şekil-8 : İskemi ve reperfüzyona maruz kalan post-kapiller venüllerde görülen inflamatuvar yanıtları açıklayan endotel bağımlı mekanizmalar.....	28
Şekil-9 : İlk, lokalize iskemi-reperfüzyon olayını takiben uzak organ hasarı gelişmesinin altında yatan mekanizmaların şematik örneği.....	33
Şekil-10 : Tempol'ün kimyasal yapısı.....	35
Şekil-11 : Ratlarda kuyruk venasından 24-gauge intraket ile damar yolu açılması...	43
Şekil-12 : Ratlarda kuyruk venasından 24-gauge intraket ile damar yolu açıldıktan sonra intraketin kuyruğa tespiti.....	44
Şekil-13 : Ratların karın bölgesinin tıraşlanıp % 10 Povidone-iodine solüsyonu ile temizlenmesi.....	44
Şekil-14 : Ratlarda yaklaşık 4 cm'lik orta hat kesi ile laparotomi yapılması.....	45
Şekil-15 : Ratlarda SMA'nın disseke edilerek ortaya konulması.....	45
Şekil-16 : Ratlarda SMA'ya mikrovasküler klemp konulması.....	46
Şekil-17 : Ratlarda Tempol'ün perfüzör ile kuyruk venasından intravenöz perfüzyon şeklinde verilmesi.....	49
Şekil-18 : Tempol grubu (Subgrup-I) deney protokolü akış şeması.....	50
Şekil-19 : Tempol grubu (Subgrup-II) deney protokolü akış şeması.....	50
Şekil-20 : Chiu skorlamasının gruplar arasındaki ortalama değeri.....	57

Şekil-21 : İleum dokusunda Chiu skoru Grade – 0 normal mukozal villus yapısının mikroskopik görüntüsü.....	58
Şekil-22 : İleum dokusunda Chiu skoru Grade – 1 mukozal lezyonun mikroskopik görüntüsü ; Subepitelyal Gruenhagen aralığı.....	58
Şekil-23 : İleum dokusunda Chiu skoru Grade – 2 mukozal lezyonun mikroskopik görüntüsü ; Subepitelyal aralığın büyümesi.....	59
Şekil-24 : İleum dokusunda Chiu skoru Grade – 5 mukozal lezyonun mikroskopik görüntüsü ; Lamina propria' nın bozulması ve parçalanması, hemoraji ve ülserasyon.....	59
Şekil-25 : Akciğer nötrofil sekestrasyonun gruplar arasındaki ortalama değeri.....	60
Şekil-26 : Akciğer vasküler konjesyon skorunun gruplar arasındaki ortalama değeri.....	61
Şekil-27 : Akut akciğer hasar skorunun gruplar arasındaki ortalama değeri.....	62
Şekil-28 : Sham grubuna ait akciğer parankim dokusunun mikroskopik görüntüsü.....	63
Şekil-29 : I/R grubuna ait akciğer parankim dokusunun mikroskopik görüntüsü ; İnterstisyel ödem ve interstisyel kalınlaşma alanları.....	63
Şekil-30 : I/R + Tempol grubuna ait akciğer parankim dokusunun mikroskopik görüntüsü.....	64
Şekil-31 : I/R + Tempol grubuna ait akciğer parankim dokusunun mikroskopik görüntüsü.....	64
Şekil-32 : İleum MDA değerlerinin gruplar arasındaki ortalama değeri.....	65
Şekil-33 : İleum GSH değerlerinin gruplar arasındaki ortalama değeri.....	66
Şekil-34 : Akciğer MDA değerlerinin gruplar arasındaki ortalama değeri.....	67
Şekil-35 : Akciğer GSH değerlerinin gruplar arasındaki ortalama değeri.....	68
Şekil-36 : Akciğer Evans blue konsantrasyonunun gruplar arasındaki ortalama değeri.....	69
Şekil-37 : İleum dokusu yaş/kuru ağırlık oranının gruplar arasındaki ortalama değeri.....	70
Şekil-38 : Akciğer dokusu yaş/kuru ağırlık oranının gruplar arasındaki ortalama değeri.....	71

GİRİŞ

İskemi/reperfüzyona (I/R) bağlı mikrovasküler disfonksiyon, günümüz modern tıbbında her geçen gün artan sayıda uygulanan çeşitli standart tıbbi ve cerrahi müdahaleler sırasında rastlanılan ciddi bir sorundur (1).

I/R hasarının patogeneğinde mikrovasküler disfonksiyon önemli bir faktördür. Bu nedenle I/R ile ilgili vasküler değişiklikleri tam olarak karakterize etmeye ve bu patolojik sürecin altında yatan mekanizmaları tanımlamaya yönelik büyük bir çaba vardır. I/R'un uzak etkileri en sık olarak akciğer ve kardiyovasküler sistemde gözlenir. Yoğun bakım ünitelerindeki mortalitenin % 30-40'ından sorumludur ve sistemik inflamatuvar yanıt sendromu (SIRS) ve çoklu organ disfonksiyon sendromunun (MODS) gelişmesinde rol oynar (2). Reperfüzyon hasarında serbest oksijen radikalleri hücre zedelenmesinde önemli rol oynamaktadır. Bunu azaltmak ve/veya önlemek üzere bugün serbest oksijen radikallerini hedef alan çok çeşitli deneysel I/R modelleri üzerinde çalışılmaktadır.

Tempol, biyolojik membranları geçip sitozolde biriken düşük moleküler ağırlıklı stabil bir piperidin nitroksid'tir. Tempol'ün yararlı etkilerinin pekçoğu bu ajanın hücre içerisinde hidroksil radikallerini temizleyebilmesine bağlıdır. Tempol'ün intestinal I/R'a bağlı doku hasarını azalttığı konusunda kanıtlar vardır. Sıçanlarda süperior mezenterik arterin (SMA) oklüzyonu ve reperfüzyonu, distal ileumda ağır bir hasar meydana getirmektedir. Thiernemann ve arkadaşları, sıçanlarda intestinal I/R'a bağlı lokal organ hasarının Tempol ile belirgin olarak azaldığını göstermiştir. (3). Zhang ve arkadaşları, polinitroksil-albumin (PNA) ve Tempol'ün uzamış intestinal I/R sonrası akciğerde kapiller kaçağı ve akciğer nötrofil retansiyonunu anlamlı derecede azalttığını göstermişlerdir (4).

Biz bu çalışmada, Tempol'ün SMA oklüzyonuna bağlı gelişen intestinal I/R hasarında hücre içerisinde hidroksil radikallerini temizleyici etkisi nedeniyle lokal ve uzak organ hasarını engelleyip engelleyemeyeceğini araştırmayı planladık.

GENEL BİLGİLER

I- İSKEMİK VE HİPOKSİK HÜCRE ZEDELLENMESİ

A- Hücre Zedelenme Mekanizmaları

Hücre zedelenmesinden sorumlu olan olaylar çok karmaşıktır. Hücre zedelenmesi bir çok nedene bağlı olabilir. Hücre fonksiyonlarını etkileyen geniş, farklı etken grupları ; hipoksi, fiziksel etkenler, kimyasal etkenler ve ilaçlar, mikrobiyolojik etkenler, immunolojik mekanizmalar, genetik defektler, beslenme bozuklukları ve yaşlanmadır. Hücrede birbiriyle bağımlı olan çok sayıda makromolekül, enzim, biyokimyasal sistem ve organel mevcut olup zedelenmedeki esas hedefi, zedelenmeye bağlı değişiklikten ayırt edebilmek zordur. Geri dönüşsüz zedelenmenin ve hücre ölümünün meydana geldiği noktanın saptanması tam olarak yapılamamaktadır. Bütün bunlara rağmen bir miktar genelleme yapılabilir.

1) Zedeleyici uyarana hücrel yanıt zedelenme tipine, süresine ve şiddetine bağlıdır. Böylece düşük doz toksinler veya kısa süreli iskemiler reverzibl hücre zedelenmesine yol açarken, daha yüksek toksin dozları veya daha uzun süreli iskemiler irreverzibl zedelenme ve hücre ölümüne neden olabilirler

2) Zedeleyici uyarıların sonucu, zedelenen hücre tipine, hücrenin o andaki durumuna (besinsel, hormonal gibi) ve hücrenin uyum yeteneğine de bağlıdır. Örneğin bacakdaki çizgili iskelet kası tam iskemiye irreverzibl zedelenme gelişmeksizin 2-3 saat tolere edebilirken, kalp kası sadece 20-30 dakika sonra irreverzibl yanıt vermektedir.

3) Zedelenmenin biyokimyasal yerini tam olarak belirlemek güç olsa da, hücre içi dört sistem özellikle kolayca zedelenir ;

a.Hücrel iyonik ve osmotik homeostaz için gerekli membran bütünlüğü

b.ATP enerji stokları oluşumunda önemli olan aerobik solunum

c. Protein sentezi

d. Genetik yapının bütünlüğü

4) Oksijen ve oksijen türevi serbest radikaller hücre zedelenmesinin birçok türünde rol oynamaktadır.

İskemide hücre zedelenmesinin patogeneğinde oksijen yetersizliğinin önemi belirtilmekle birlikte, aktif oksijen türevleri de hücre ölümünün önemli araçlarındandır. Bu serbest oksijen radikal türevleri hücre üzerinde lipid peroksidasyonu, protein ve nükleik asitlerin oksidasyonu gibi zararlı etkilere neden olur.

5) Hücre içi kalsiyumun homeostatik mekanizmalarının yetersizliği de hücre zedelenmesinde önemli rol oynamaktadır.

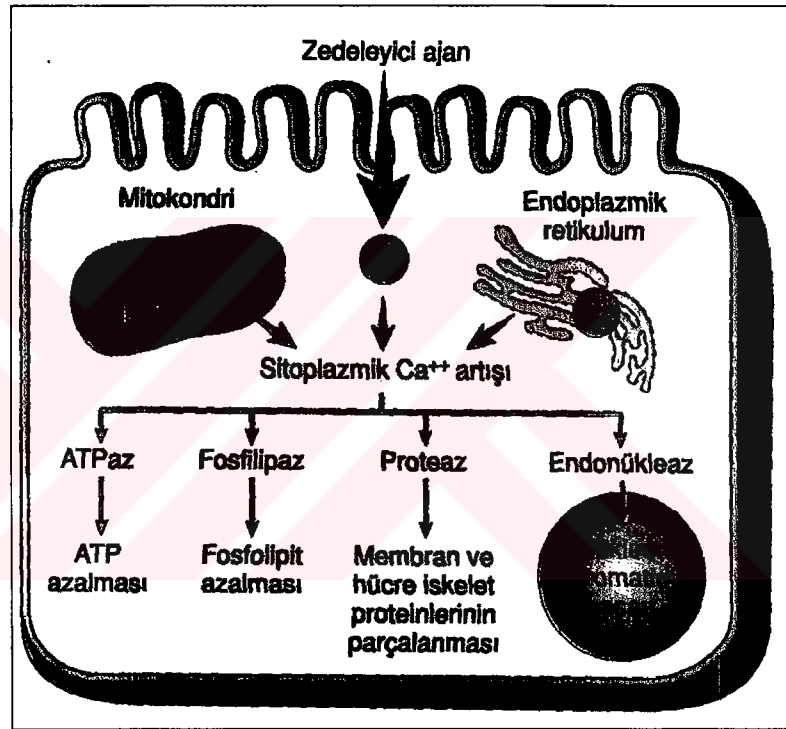
Sitoplazmik serbest kalsiyum normalde ATP bağımlı kalsiyum taşıyıcıları ile çok düşük yoğunluklarda (0.1 M'den az) tutulur. İskemi veya toksinler hücre dışı kalsiyumun plazma membranından hücre içine akışına yol açar. Bunu hücre içi stoklardan kalsiyumun serbest bırakılması izler. Artan sitoplazmik kalsiyum sırasıyla çeşitli fosfolipazları (membran hasarını artırır), proteazları (yapısal ve membran proteinlerini katalize eder), ATPaz'ları (ATP kaybını hızlandırır) ve endonükleazları (DNA'yı parçalar) aktive eder (Şekil-1). Hücre içi kalsiyumun artması, hücre zedelenmesine, dolayısıyla hücre ölümüne ve kalsiyum homeostazının kaybı gibi çeşitli zararlı etkilerin oluşmasına yol açar.

B- Hipoksi

Hipoksi, aerobik oksidatif solunumu etkileyen son derece önemli ve genel bir hücre zedelenme ve ölüm nedenidir. En sık görülen hipoksi sebebi lümendeki tıkaç ya da vasküler hastalık nedeniyle arteriyel ya da venöz akım kesilince meydana gelen kanlanma kaybıdır. Diğer sık görülen neden dolaşım veya solunum yetmezliğine bağlı kanın yetersiz oksijenlenmesidir. Oksijen yetersizliğinin daha az görülen üçüncü nedeni anemi ya da karbon monoksit zehirlenmesinde görülen kanın oksijen taşıma kapasitesinin kaybıdır. Hipoksik durumun şiddetine bağlı olarak hücreler

adapte olabilir, zedelenebilir ya da ölür. Örneğin bacakta femoral arterin çapı daralırsa bacakta iskelet kaslarının çapı küçülür (atrofi). Bu hücre kitlesinin küçülmesi ile metabolik gereksinim ve sağlanabilen oksijen dengelenir. Daha ağır hipoksi doğal olarak hücre zedelenmesi ya da ölümüne yol açar.

İnsanlarda, deney hayvanlarında ve kültür hücrelerinde akut hipoksik zedelenmedeki yapısal değişiklikler yoğun biçimde araştırılmış ve bu değişikliklerin mekanizmaları anlaşılır şemalarla gösterilmiştir (Şekil-1).

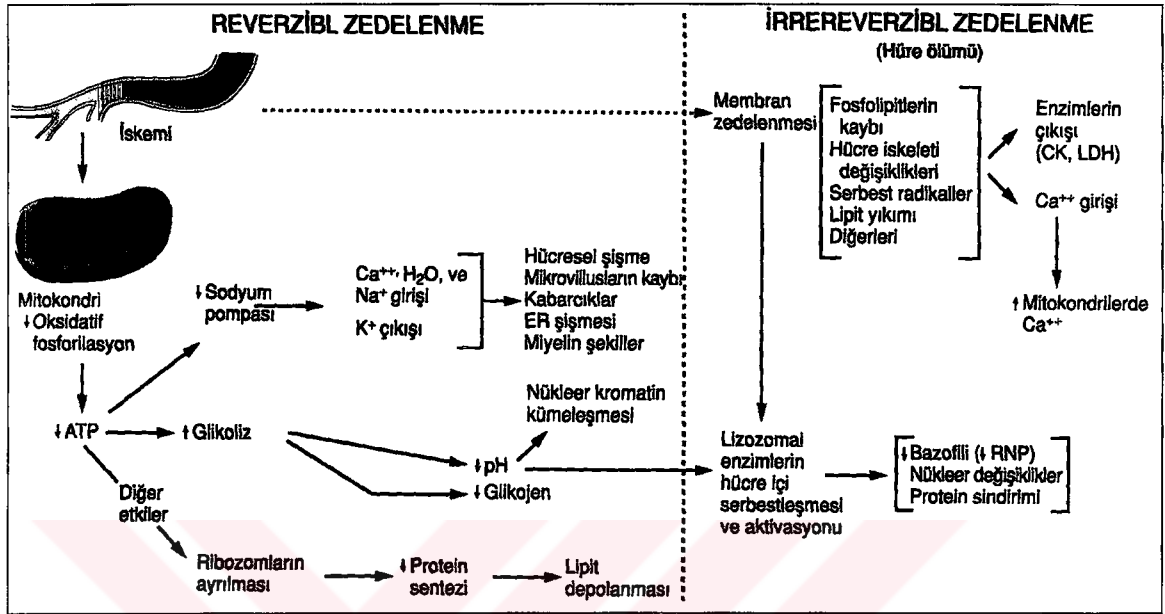


Şekil-1 : Hücre zedelenmesinde sitoplazmik kalsiyum artışının kaynakları ve sonuçları

1-) Reverzibl Hücre Zedelenemesi

Hipoksinin ilk etkisi, hücrenin aerobik solunumuna yani mitokondrilerdeki oksidatif fosforilasyona olur. Oksijen basıncının azalması sonucu hücre içi ATP üretimi belirgin olarak azalır. ATP azalmasının hücre içi pekçok sisteme etkisi olur. Sitoplazmik serbest kalsiyum artar. Plazma membranının ATP enerjisi kullanan sodyum pompasının aktivitesi azalır. Bunu sodyumun hücre içinde birikimi ve

potasyumun hücre dışına geçişi izler. Sodyumun net artışı, suyun izoosmotik artışı ile birlikte olup akut hücresel şişmeye sebep olur. Bu şişme inorganik fosfatlar, laktik asid ve pürin nükleozidleri gibi diğer metabolitlerin birikimi ile artan ozmotik yükü daha da artar.

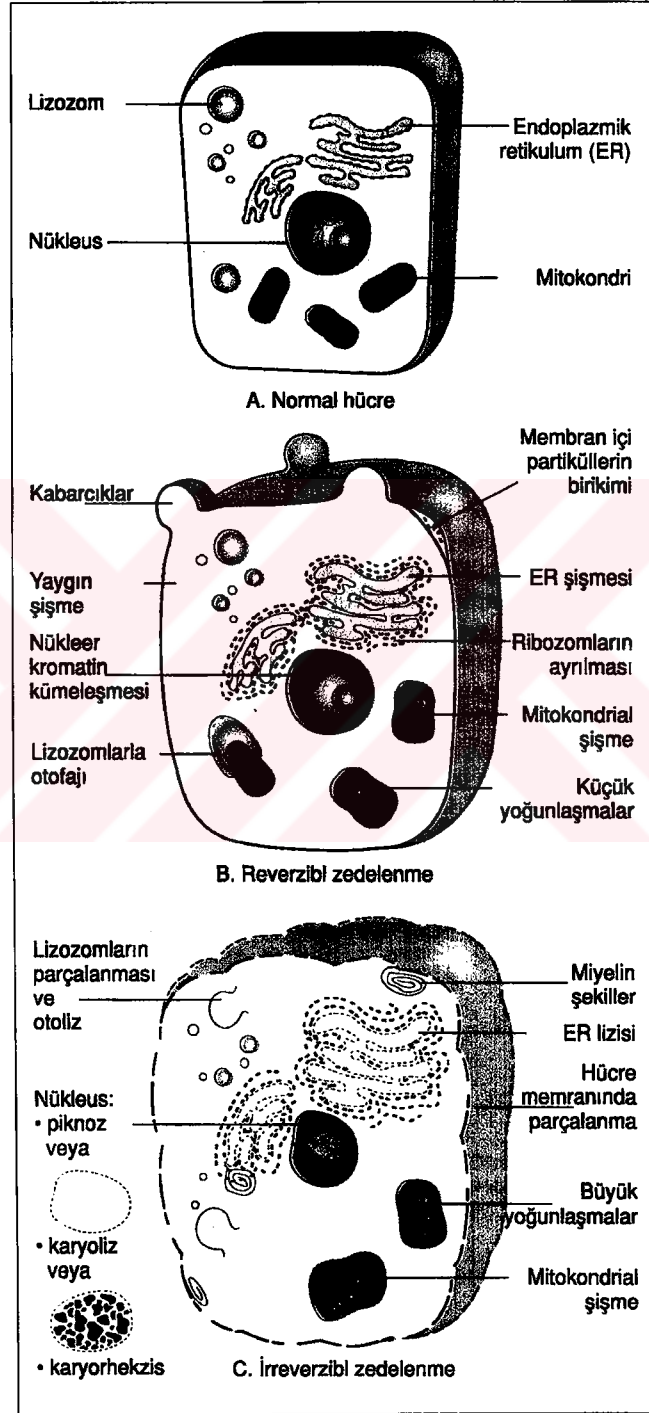


Şekil-2 :İskemik zedelenmedeki olaylar

Hücre ATP’de azalma ile birlikte adenosin monofosfattaki (AMP) artış fosfofruktokinaz enzimini uyararak, glikojenden ATP üretimi ile hücrenin enerjisini temin amacıyla gelişen anaerobik glikoliz hızını artırır. Sonuçta glikojen hızla tükenir. Bu durum histolojik olarak karbonhidratların boyanmasının (periyodik asit-Schiff (PAS) boyası) azalmasıyla gösterilebilir. Artan glikoliz, fosfat esterlerinin hidroliziyle laktik asit ve inorganik fosfatların birikimine neden olarak hücre içi pH’nın düşmesine yol açar.

Bundan sonraki olay ribozomların granüllü endoplazmik retikulumdan ayrılması ve polizomlardan monozomların oluşumuyla protein sentezinde azalmadır. Hipoksi geçmezse mitokondriyal fonksiyonun daha da kötüleşmesi ve membran permeabilitesinin artması daha fazla morfolojik bozulmaya neden olur. Hücrenin ana hatları, mikrovilluslar gibi ultrastrüktürel özelliklerin kaybı ve hücre yüzeyinde kabarcıkların oluşumuyla bozulur. Mitokondriler, endoplazmik retikulum ve tüm

hücreler ozmotik regülasyon kaybından dolayı şişmiş görünür. Oksijen verildiğinde yukarıdaki tüm bulgular reverzibldir. İskemi devam ederse irreverzibl zedelenme gelişir (Şekil-3).



Şekil-3 : Reverzibl (B) ve irreverzibl (C) hücre zedelenmesinde ultrastrüktürel değişikliklerin şematik görünümü

2-) İrreverzibl Hücre Zedelenmesi

Morfolojik olarak irreversible zedelenmeye mitokondrilerin daha şiddetli vakoulizasyonu ve mitokondri matriksinde şekilsiz, kalsiyumdan zengin cisimciklerin birikimi eşlik eder. Burada plazma membranlarında yaygın hasar ve lizozomlarda şişmede vardır. Özellikle iskemik alan yeniden kanlandırılırsa hücre içine masif kalsiyum akışı olur. Bu ise yukarıda tanımlanan kalsiyuma bağlı bozuklukların gelişmesiyle sonuçlanır. Aşırı geçirgen membranlardan proteinlerin, esansiyel koenzimlerin ve ribonükleik asitlerin kaybı devam eder (Şekil-3). Lizozomal membranların zedelenmesi enzimlerin sitoplazma içine sızmasına yol açar. Asit hidrolazlar, iskemik hücrenin azalmış hücre içi pH'sında aktifleşerek sitoplazmik ve nükleer elemanları parçalar. Hücre ölümünden sonra hücre sel elemanlar lizozomal hidrolazlarla sindirilmeye devam eder. Hücre sel enzimlerin hücre dışına yaygın olarak sızması yanısıra interstisyumdaki hücre dışı makromoleküllerinde hücre içine geçişi söz konusudur. Ölü hücre sonunda myelin şekiller olarak tanımlanan büyük, helezon şeklinde fosfolipid kitleleri haline gelebilir. Bu fosfolipid çökeltiler daha sonra ya diğer hücreler tarafından fagosit edilir ya da yağ asitlerine parçalanır. Bu yağ asitlerinin kalsifikasyonu kalsiyum sabunlarının oluşumuna neden olur.

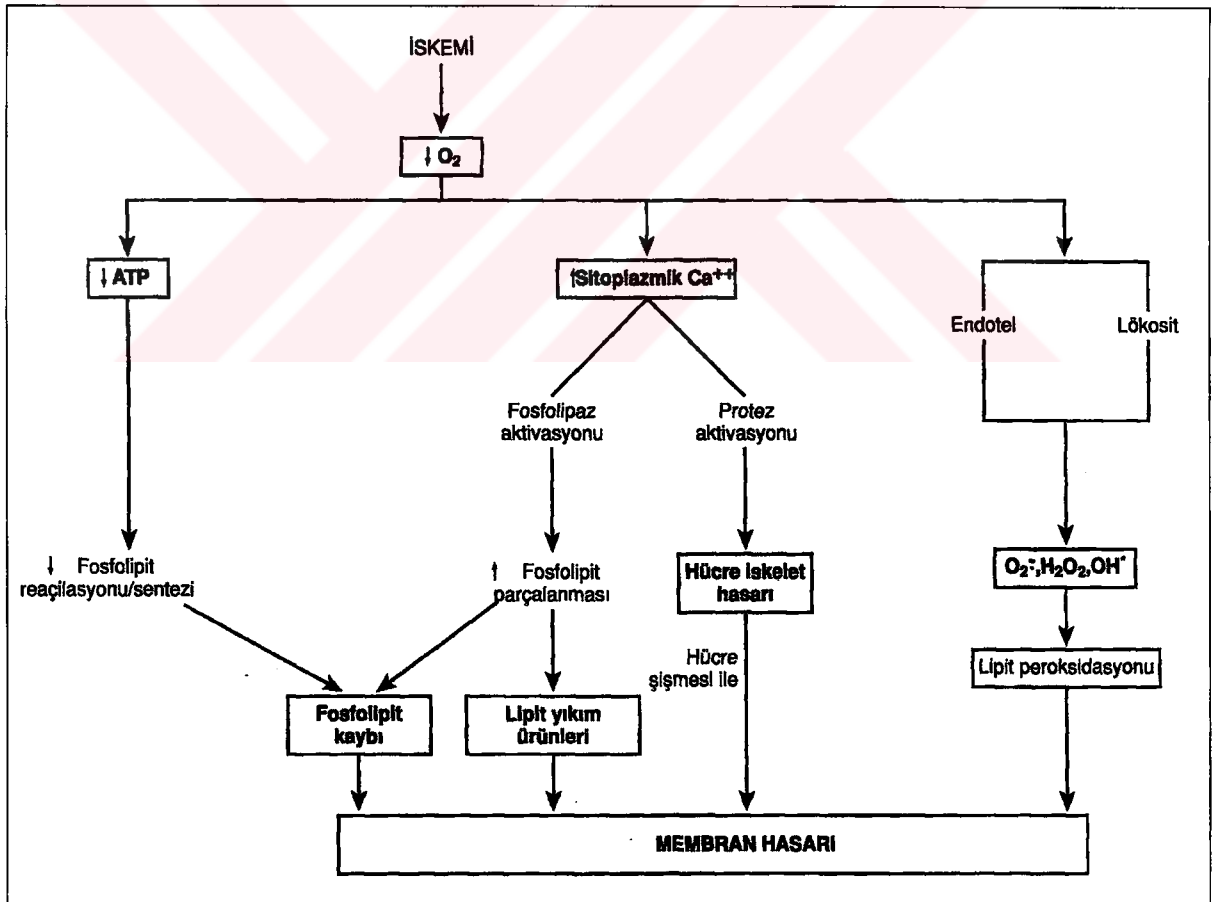
Hücre içi proteinlerin parçalanmış hücre membranından geçerek periferik dolaşıma sızması, kan serum örneklerinde dokuya özgül hücre zedelenmesi ve ölümünü gösterdiğinden değerli bir bulgudur. Örneğin kalp kası kreatin kinaz enzimi ve kontraktıl protein troponinlerin spesifik bir izoformunu, karaciğer ve özellikle safra kanalı epiteli alkalen fosfataz enziminin ısıya dayanıklı izoformunu içerir. Sistemik dolaşımda bu gibi artmış protein düzeyleri bu dokularda irreversible zedelenme ve hücre ölümünü yansıtır.

İrreverzibl Hücre Zedelenmesi Mekanizmaları :

Hipoksi için yukarıda tanımlanan olaylar dizisi başlangıcından, letal olarak zedelenen hücrenin lizozomal enzimlerle sindirimine kadar bir bütün gibidir. İrreverzibilitayı birbirine uyan iki olay tanımlar. Birincisi mitokondriyal fonksiyon bozukluğunun (oksidatif fosforilasyon ve ATP üretiminin kaybı) kan akımı ve/veya

oksijenlenmenin sağlanmasından sonra bile geri döndürülmesinde yetersizlik ; İkincisi membran fonksiyonlarında ileri derecede bozukluğun gelişmesidir. ATP'nin tükenmesi başlıbaşına letal bir olay olsada bulgular tartışmalıdır. Morfolojik değişiklikleri, hatta ATP tükenmesini deneysel hücre ölümünden ayırmak mümkündür.

İrreverzibl hücre zedelenmesinin patogenezinde hücre membran hasarını ana faktör olarak destekleyen çok sayıda kanıt vardır. Hacim regülasyonunun kaybı, hücre dışı moleküllere karşı permeabilite artışı ve ultrastrüktürel olarak gösterilebilen plazma membran defektleri irreverzibl zedelenmenin erken evrelerinde bile oluşabilir. Membran hasarının pekçok olası nedeni vardır ve bunlar zedelenmenin bazı şekillerinde rol oynayabilir (Şekil-4). İrreverzibl iskemik zedelenmede membran hasarının olası sebepleri Tablo-I'de özetlenmiştir.



Şekil-4 : İskemide membran hasar mekanizmaları

I- Membran fosfolipidlerinin ilerleyici kaybı : İskemik karaciğerde, irreverzibl zedelenmede membran fosfolipidlerinde belirgin azalma vardır. İskemiye bağlı sitoplazmik kalsiyum artışı ile endojen fosfolipazların aktivasyonunun artan parçalanmaya yol açtığı bir açıklama olabilir. İlerleyici fosfolipid kaybı, ATP bağımlı re-açılasyonun veya fosfolipid sentezinin azalmasına sekonder olarak da gelişebilir.

II- Hücre iskeleti anormallikleri : Hücre içi kalsiyumun artmasıyla aktive olan proteazlar hücre çatısına zarar verebilir. Hücre şişmesinde, bazı zedeleyiciler hücre membranının hücre iskeletinden ayrılmasına neden olarak membranı gerilmeye ve yırtılmaya duyarlı kılabilir.

III- Toksik oksijen radikalleri :Kısmen indirgenmiş oksijen türevleri oldukça toksik olup hücre membranları ve diğer hücre elemanlarına zarar verir. Bu gibi oksijen radikalleri iskemik dokularda özellikle kan akımının düzelmesinden sonra artar. Toksik oksijen türevlerinin büyük ölçüde reperfüzyon sırasında zedelenme alanına gelen polimorfonükleer lökositler tarafından oluşturulduğu düşünülmektedir. Reperfüzyon olmadığı takdirde letal iskemik hücre zedelenmesi sonuç olarak yine gelişecek fakat toksik oksijen türevleri burada muhtemelen rol almayacaktır.

IV- Lipid yıkım ürünleri : Fosfolipid parçalanması sonucu iskemik hücrelerde biriken bu katabolik ürünler membranlar üzerinde deterjan etkisi yapar.

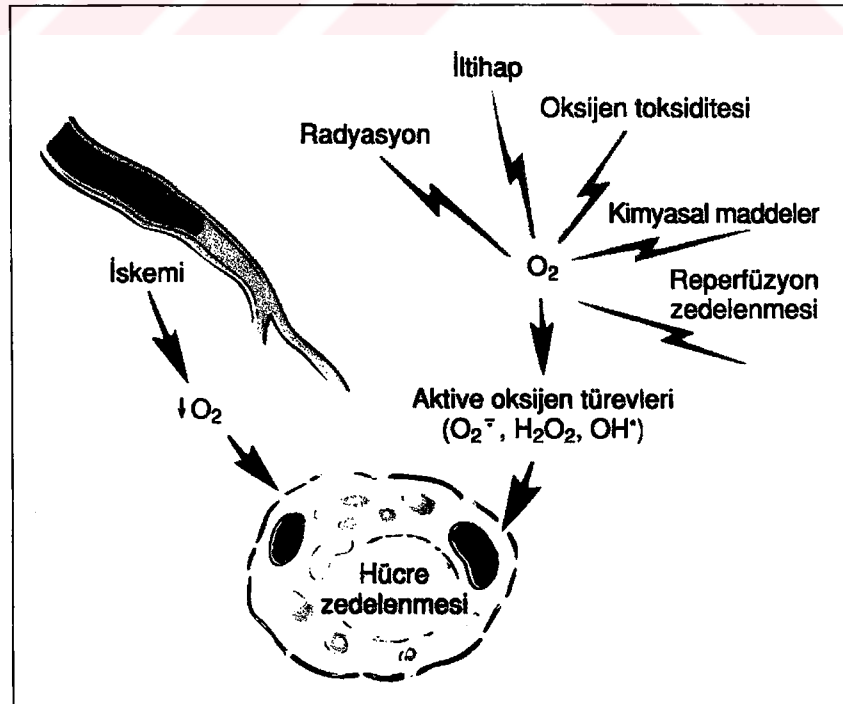
Özet olarak, hipoksi oksidatif fosforilasyonu ve dolayısıyla hayati ATP sentezini etkiler ; membran hasarı, letal hücre zedelenmesinin gelişiminden sorumludur ; kalsiyum hücre ölümünde morfolojik değişikliklerin potansiyel aracıdır (5).

Tablo-I : İrreverzibl İskemik Zedelenmede Membran Hasarının Olası sebepleri

- Hücresel ATP tükenmesi
- Membran fosfolipidlerinin kaybı (Sentez azalması ya da parçalanmanın artışı)
- Lipid yıkım ürünleri (serbest yağ asitleri, lizofosfolipidler)
- Toksik oksijen türevleri
- Hücre iskeleti değişiklikleri
- Lizozomların yırtılması

II- HÜCRE ZEDELLENMESİNDE SERBEST RADİKALLER

İskemi/Reperfüzyon sırasında serbest radikaller ile özellikle de aktive olmuş oksijen türevleri ile oluşturulan zedelenme, hücre zedelenmesinin önemli bir mekanizmasıdır. Serbest radikal hasarı, kimyasal ve radyasyon zedelenmesi, oksijen ve diğer gaz toksisiteleri, hücresel yaşlanma, fagositik hücrelerle mikropların öldürülmesi, inflamatuvar hasar, makrofajların tümör imhası ve diğer zedeleyici olaylara katkıda bulunur (Şekil-5).



Şekil-5 : Hücre zedelenmesinde oksijenin kritik rolü

Serbest radikaller dış yörüngelerinde eşleşmemiş tek bir elektron bulunan kimyasal türevlerdir. Bu gibi kimyasal maddeler son derece değişken olup kolayca inorganik ve organik kimyasal maddeler ile reaksiyona girerler. Hücrelerde oluştuğu zaman özellikle nükleik asitler ve çeşitli membran molekülleri ile etkileşerek onları parçalar. Serbest radikaller ayrıca otokatalitik reaksiyonları da başlatır. Serbest radikallerle reaksiyona giren moleküller sırayla serbest radikallere dönüşerek hasar zincirini ilerletip genişletirler. Serbest radikaller hücre içerisinde 3 şekilde oluşabilir ;

1-) Radyan enerjinin absorpsiyonu ile (ultraviyole ışığı, x-ışınları gibi). Örneğin iyonize radyasyon suyu hidroksil (OH^-) ve hidrojen (H^+) serbest radikallerine hidrolize edebilir.

2-) Normal fizyolojik olaylar sırasında oluşan redüksiyon-oksidasyon (redoks) reaksiyonlarında, örneğin normal solunum süresince moleküler oksijen su oluşturmak için 4 elektronun ilavesiyle birbiri ardına indirgenir. Bu olayda az miktarda toksik ara türevler meydana gelir. Bunlar süperoksid radikalleri (O_2^-), hidrojen peroksid (H_2O_2) ve hidroksili (OH^-) kapsar. Ayrıca bazı hücre içi ksantin oksidaz gibi oksidaz enzimleri aktivitelerinin sonucunda doğrudan süperoksid radikalleri oluşturur (Şekil-6). Bakır ve demir gibi değişimli metallerde hücre içi bazı reaksiyonlar sırasında serbest elektron alıp vererek Fenton reaksiyonunda olduğu gibi serbest radikal oluşumunu katalize eder ($\text{Fe}^{++} + \text{H}_2\text{O}_2 \rightleftharpoons \text{Fe}^{+++} + \text{OH}^- + \text{OH}^-$). Hücre içi serbest demirin çoğu ferrik durumda (Fe^{+++}) olduğundan, Fenton reaksiyonuna katılmak için ilk olarak ferröz (Fe^{++}) forma indirgenmelidir. Redüksiyon süperoksid iyonu ile yükseltildiğinden demir ve süperoksidin her ikisinde maksimum oksidatif hücre zedelenmesi için gereklidir.

3-) Ekzojen kimyasal maddelerin enzimatik metabolizmaları ile (örneğin karbontetraklorür).

Serbest radikaller aracılığı ile gelişen hücre zedelenmesinde özellikle 3 reaksiyon çok önemlidir ;

I- Membranların lipid peroksidasyonu : Membranda çift bağlı poliansatüre lipidler oksijen türevi serbest radikallerin etkisiyle kolayca zedelenir. Lipid-radikal

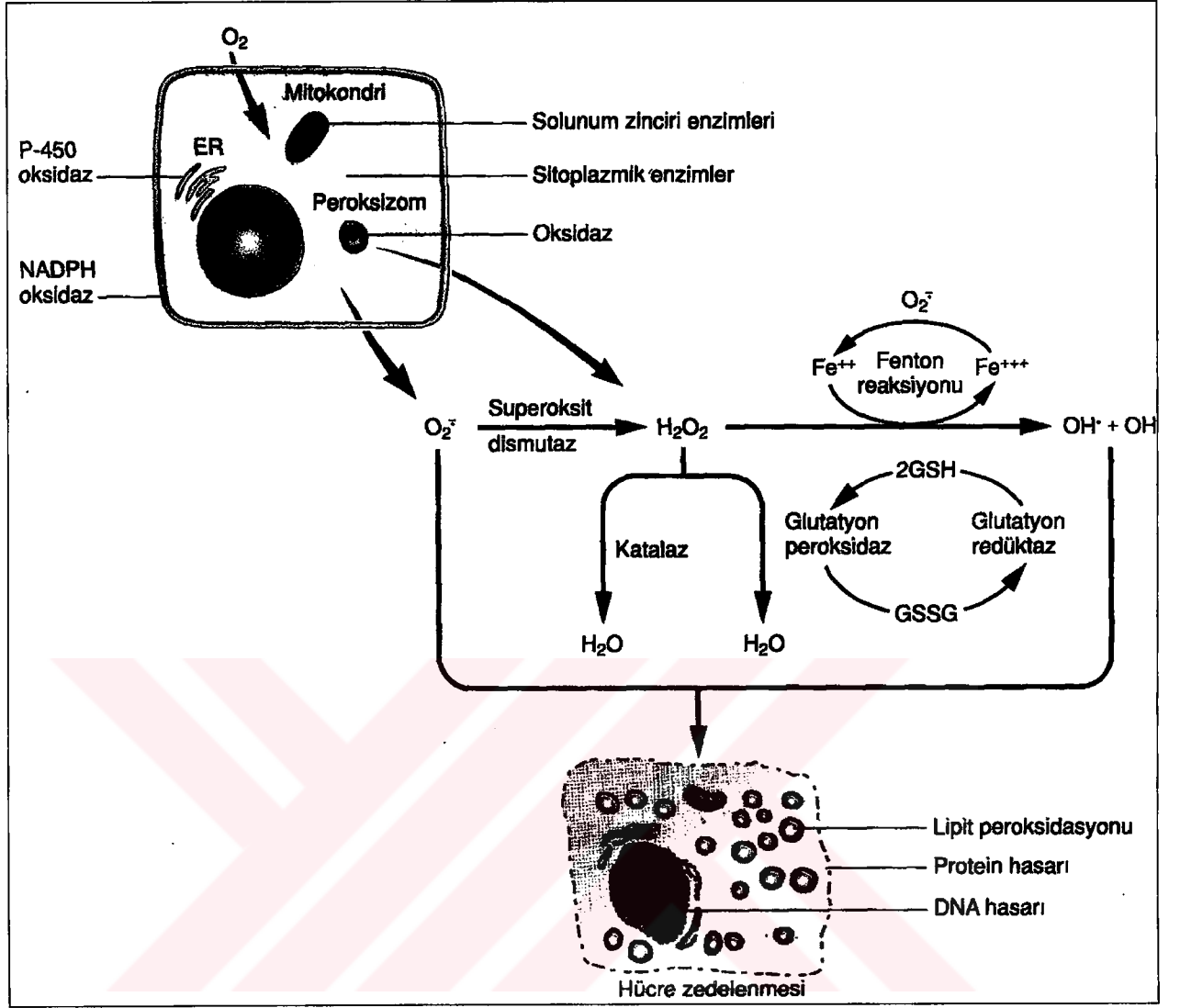
etkileşimleri değişken ve reaktif olan peroksidleri oluşturarak otokatalitik zincir reaksiyonları meydana gelir.

II- Deoksiribonükleik asit (DNA) lezyonları : Timin ile serbest radikal reaksiyonları nükleer ve mitokondriyal DNA'da tek-iplik kırılmaları oluşturur. Bu gibi DNA hasarı hem hücre ölümü hem de hücrelerin malign değişiminde rol alır.

III- Proteinlerin çapraz bağlanması : Serbest radikaller sülfidril aracılı protein çapraz bağları oluşturarak parçalanmanın artmasına veya enzimatik aktivitenin kaybına neden olur. Serbest radikal reaksiyonları doğrudan polipeptid parçalanmasına da yol açabilir.

Serbest radikal oluşumu, kimyasal ve radyasyon zedelenmesi yanısıra, solunum, rutin hücresel aktiviteler ve mikrobiyolojik savunmada da rol alır

Serbest radikallerin değişken tabiatlı ve genellikle kendiliğinden yok olması bir şanstır. Örneğin süpeoksid, su varlığında hızla oksijen (O₂) ve hidrojen perokside (H₂O₂) dönüşür. Bu dönüşümün oranı birçok hücre tipinde bulunan süperoksid dismutazların (SOD'lar) etkisiyle anlamlı bir biçimde arttırılır (Katalize reaksiyon : $2 O_2^- + 2 H^+ \rightleftharpoons H_2O_2 \rightleftharpoons O_2$). Glutasyon peroksidaz (GSH) gibi enzimler de hidrojen peroksid (H₂O₂) yıkımını katalize ederek zedelenmeye karşı koruyucu rol oynar ($H_2O_2 + 2 GSH \rightleftharpoons 2 H_2O + GSHG$ (glutasyon homodimer)). Peroksizomlarda bulunan katalaz, hidrojen peroksidin (H₂O₂) parçalanmasını sağlar ($2 H_2O_2 \rightleftharpoons O_2 + 2 H_2O$) (Şekil-6). Ayrıca, E vitamini ve serüloplazmin gibi endojen veya ekzojen antioksidanlar serbest radikal oluşumunu engelleyerek yada oluştuklarında onları yok ederek antioksidan özellik göstermektedir (5).



Şekil-6 : Biyolojik sistemlerde reaktif oksijen türevlerinin ve antioksidan mekanizmaların oluşumu. O_2 , endoplazmik retikulum (ER), mitokondriler, plazma membranı, peroksizomlar ve sitoplazmada bulunan oksidatif enzimlerle süperokside ($O_2^{\cdot -}$) dönüşür. $O_2^{\cdot -}$, süperoksit dismutaz (SOD) ile H_2O_2 'ye ve daha sonra Cu^{++}/Fe^{++} 'in katalizör olduğu Fenton reaksiyonuyla $OH^{\cdot}$ 'e dönüşür. H_2O_2 peroksizomlarda doğrudan oksidazlardan da oluşabilir. Oluşan serbest radikaller lipidleri (peroksidasyon), proteinleri ve DNA'yı zedeleyebilir. Lipid peroksidasyonu sonucu hücre membran bütünlüğü bozulur. Süperoksit Fe^{+++} 'nin Fe^{++} 'ye redüksiyonunu katalize ettiğinde Fenton reaksiyonu ile $OH^{\cdot}$ oluşumunu artırır (Bkz. Syf. 16). SOD, katalaz ve glutasyon peroksidaz başlıca antioksidan enzimlerdir. GSH : redükte glutatyon ; GSSG : okside glutatyon ; NADPH : Nikotinamid adenin dinükleotid fosfatın indirgenmiş şekli.

III- SERBEST OKSİJEN RADİKALLERİNE YAKINDAN BAKIŞ

Serbest radikaller dış yörüngelerinde eşleşmemiş tek bir elektron bulunan kimyasal türevlerdir. Bu durumda radikal ileri derecede reaktiftir ve protein, lipid, karbonhidrat gibi organik ve inorganik kimyasal maddelerle, özellikle hücrede nükleik asitler ve membranlar ile tepkimeye girer (5).

Bugün için serbest oksijen radikalleri yerine daha kapsamlı olan ve hem süperoksid, hidroksil gibi oksijen içeren radikalleri hem de aslında radikal olmayan, ancak reaksiyonları ile oksijen içeren radikallerin oluşumuna neden olabilen peroksid, tek oksijen, ozon, hipoklorik asit gibi molekülleri içine alan ROS (Reactive Oxygen Species – Reaktif Oksijen Türevleri) terimi daha yaygın olarak kullanılmaktadır (6). Başlıca ROS'lar Tablo-II'de gösterilmiştir.

Tablo-II : Reaktif Oksijen Türevleri (ROS'lar)

<u>Radikaller</u>	<u>Non-Radikaller</u>
• Süperoksid radikali (O_2^-) • Hidroksil radikali (OH^-) • Alkoksil radikali (RO^-) • Peroksil radikali (ROO^-)	• Hidrojen peroksid (H_2O_2) • Lipid peroksid ($LOOH$) • Hipoklorik asit ($HOCl$) • Ozon (O_3)

Bazı patolojik süreçlerde reaksiyonların ara kademelerinde ROS'ların aşırı miktarda üretilmesi ya da biyolojik koruyucu mekanizmaların çalışmaması gibi durumlarda istenmeyen etkiler ortaya çıkmaktadır (7). ROS'lar termodinamik stabilite kazanmak için yakınında bulunan diğer moleküllerde elektron ya da hidrojen atomlarını serbestleştirmeye çalışarak bu molekülleri aktif radikal haline getirmektedir. Oluşan serbest radikaller, hücre membranı ve hücre içi organelleri etkilerken hücre dışı kompartmana da geçerek uzak etkiler oluşturmaktadır. Bu noktada ROS'un çözünürlüğü ve diffüzyon hızı önem kazanmaktadır. Hidroksil radikali (OH^-) çok potent olmasına karşın diffüzyon hızı yavaş olduğundan ancak olduğu yerde veya yakınında etki gösterir. Oysa hidrojen peroksid (H_2O_2) çok az potent olmasına karşın plazma ve mitokondriyal membranları rahatlıkla geçerek uzak etki gösterir (7, 8).

ROS, vücutta normal biyolojik işlemler, oksidatif stres yapan durumlar ve yaşlanma süreci içerisinde oluşabilmektedir (9). ROS'un başlıca oluşum yolları Tablo-III'de özetlenmiştir.

Tablo-III : Reaktif Oksijen Türevlerinin (ROS) Oluşum Yolları

1- Normal biyolojik işlemler

- Oksijenli solunum
- Katabolik ve anabolik işlemler

2- Oksidatif stres meydana getiren durumlar

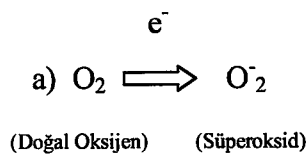
- İskemi, hemoraji, travma, radyoaktivite, entoksikasyon
- Ksenobiyotik maddelerin etkisi ; inhale edilenler, alışkanlık yapan maddeler, ilaçlar
- Stres ile artan katekolaminlerin oksidasyonu
- Fagositik enflamasyon hücrelerinden salgılanma
- Uzun süreli metabolik hastalıklar
- Diğer nedenler ; sıcak şoku, güneş ışını

3- Yaşlanma süreci

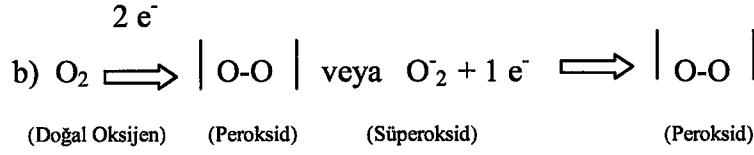
ROS'lar doğal oksijenden (O_2), Fenton veya Haber-Weis reaksiyonlarından, ksantin oksidaz enziminden, katekolaminlerde, nitrik oksid'ten, eikasonoid metabolizmasından ya da aktive olmuş lökositlerden ortaya çıkabilmektedir (9, 10).

i- Doğal oksijen (O_2) kaynaklı radikaller

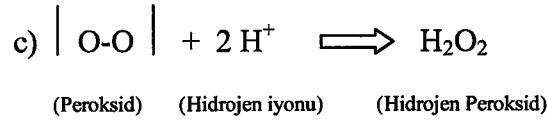
Bu radikaller mitokondri kaynaklı olup elektron transport zincirinde meydana gelir (37).



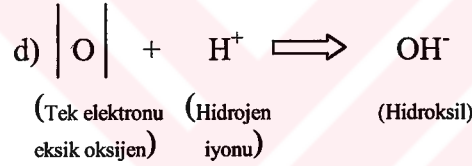
Moleküler oksijenin bir elektron almış hali süperoksid radikalidir ve başka bir molekül ile kolayca elektron alışverişine girebilmektedir.



Moleküler oksijen 2 elektron aldığı anda oluşan molekül peroksid'dir. Bu molekül süperoksid'den 1 elektron alarak da oluşabilir.



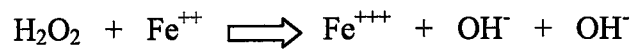
Süperoksid radikalının dismutasyonu ile hidrojen peroksid oluşmaktadır. Aslında radikal olmayan bu molekül hidroksil radikalini oluşturduğu için önemlidir.



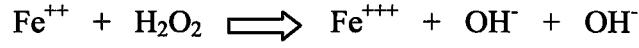
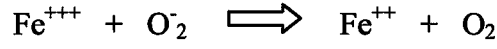
Tek atomu halinde bir elektronu eksik olan oksijen, bir hidrojen iyonu ile birleşirse en potent serbest radikal olan hidroksil radikali oluşur (9, 12, 13).

ii- Fenton ve Haber-Weis reaksiyonları ile radikal üretimi

Süperoksid radikali (O_2^-) en çabuk ve en kolay oluşan radikaldır. Aktivitesi kısmen düşük olmasına karşın diğer radikalleri oluşturduğu için önemlidir. Hidroksil radikali ($OH^\cdot$) oluşması için ortamda demir veya bakır gibi transisyonel metallerin olması gerekir. Transisyonel metal tarafından katalizlenen bu reaksiyonlara "Fenton Reaksiyonu" denilir.



Bu transisyonel metal varlığında süperoksit (O_2^-), hidrojen peroksit (H_2O_2) ile tepkimeye girerek hidroksil radikalini ($OH^\cdot$) oluşturmakta ve buna “Haber-Weis Reaksiyonu” denilmektedir.



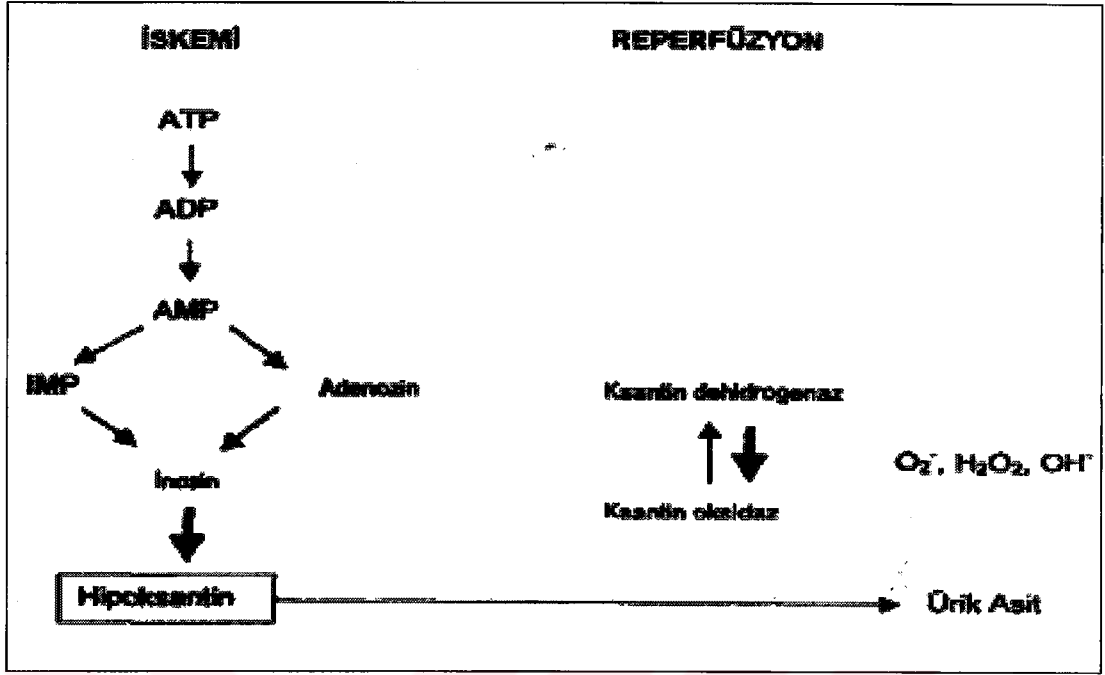
Hidroksil radikali ($OH^\cdot$), hücre içinde bulunan tüm moleküller ile reaksiyona girebilmekte ve diğer serbest radikaller gibi DNA’yı, lipidleri, karbonhidratları ve proteinleri zedeleyebilmektedir (6).

iii- Ksantin Oksidaz aracılı radikal üretimi

Ksantin Oksidaz, endotel hücresinde önemli bir serbest radikal kaynağı olan enzimdir. Normal şartlarda, aktif olan ksantin dehidrojenaz enzimi olup, enzimin bu formu pürin oksidasyonu sırasında elektron transferi için oksijen yerine nikotinamid adenin dinükleotid (NAD^+) kullanır. Oysa iskemik hücrelerde ksantin dehidrojenaz enzimi proteaz aracılığıyla ksantin oksidaza dönüşmektedir. Reperfüzyonda ortama moleküler oksijen girince, hipoksantin, ksantin oksidaz ile reaksiyona girerek ROS oluşturmaktadır (Şekil-7) (14, 15).

iv- Katekolamin aracılı radikal üretimi

İskemik bölgede sempatik sinir uçlarından salınan norepinefrin, monoamino oksidaz (MAO) enzimi tarafından yıkılırken elektron akseptörü olarak oksijen kullanıldığı için H_2O_2 ya da $OH^\cdot$ radikali yan ürün olarak oluşur. Bu yolla oluşan serbest radikallerin miktarının çok az olduğu düşünülür (16).



Şekil-7 : Doku hipoksisi sırasında ksantin dehidrojenazın ksantin oksidaza dönüşümü ve reperfüzyondan sonra serbest oksijen radikallerinin üretimi

v- Eikosanoid metabolizması ile radikal üretimi

Araşidonik asitten, 9,11-endoperoksi-15-hidroperoksi prostoglandin (PGG_2) oluşumu sırasında bir miktar ROS oluşmakta ve bunlarda lipid peroksidasyonuna yol açabilmektedir. Lipid peroksidleri ortamda aşırı miktarda biriktiğinde siklooksijenaz yolunu inhibe etmektedir (17, 18).

vi- Nitrik oksid aracılı radikal üretimi

Nitrik oksid (NO) aracılı radikal üretimi iskemi ve sepsis gibi patolojik durumlarda indüklenebilir. Nitrik oksid sentetaz (NOS) enzimi aracılığıyla makrofaj ve hepatosit hücrelerinden salınan yüksek miktardaki NO toksiktir. NO, süperoksit radikali (O_2^-) ile reaksiyona girerek peroksinitrite (ONOO^-) dönüşebilir. Ancak NO bir yandan süperoksit radikalini temizlerken diğer yandan oluşan peroksinitrit (ONOO^-) hücre membranında lipid peroksidasyonunu başlatarak hücre hasarına neden olmaktadır (18).

vii- Lökosit kökenli radikal üretimi ve I/R hasarında lökositlerin rolü

Reperfüzyon hasarına sebep olan ROS'ların bir başka önemli kaynağında polimorfonükleer (PMN) lökositlerdir. Reperfüzyon hasarı sonrası endotel veya parankim hücrelerinden ksantin oksidaz aracılığıyla oluşan ROS'ların lökosit yapışması ve aktivasyonuna direkt etkisi yanında, endotel hücre membranındaki fosfolipaz-A₂'yi aktive ederek lökotrien B₄ (LTB₄) ve trombosit aktive edici faktör (PAF) gibi güçlü kemotaktik ajanların açığa çıkmasına yol açar (14).

Metabolik olarak aktive olmuş lökositler inflamatuvar reaksiyon yaratarak hücre dışı aralığa kemotaktik faktörler salgırlar. Lökositler yapışır ve hücrelerin aralarından içeriye göçederler. Lökositlerin hücre membranında lokalize nikotinamid adenin dinükleotid fosfat (NADPH) oksidaz enzimi antibakteriyel etki için gereklidir. Lökosit aktivasyonu ve bu enzimin salgılanmasıyla oluşan süperoksit radikali organizmanın kendisine zarar verir. Lökositlerden myeloperoksidaz, elastaz, kollajenaz ve hyalüronidaz gibi enzimlerde salgılanır. Vasküler yatakta biriken lökositlerin mekanik etkisiyle mikrosirkülasyon bozukluğu artarak iskemi ağırlaşır. ROS'larda kapiller geçirgenliği arttırıp ödem meydana getirir. Böylece artmış interstisyel doku basıncı perfüzyonu kötüleştirir (14, 19, 20).

Myeloperoksidaz (MPO), hidrojen peroksid (H₂O₂) ve klorürden hipoklorik asit (HOCL) oluşturan reaksiyonu katalize eder. Bu reaksiyondaki H₂O₂, NADPH oksidaz enzimiyle açığa çıkan süperoksidin (O₂⁻) dismutasyonu ile meydana gelir. Hipoklorik asit (HOCL), H₂O₂'den 100 kat daha reaktif ve oksidandır (14, 20, 21).

I/R hasarında MPO aktivitesindeki artış lökosit aktivitesindeki artışı gösterir. Bu yüzden MPO düzeyinin ölçümü I/R'a lökositlerin katılım derecesini gösterir. Lökosit birikim ve aktivasyonunun I/R'un bir sebebi mi yoksa sonucu mu olduğu sorusu, antinötrofil serumla nötrofiller ortamdan uzaklaştırıldığında reperfüzyon sonrası görülen mikrovasküler permeabilitedeki artışın tamamen önlenmesiyle açıklanır. Yani lökositler I/R'da sonuç değil, hasar nedenlerinden biridir (14, 20, 21).

Tablo-IV : ROS'ların Tayin Yöntemleri

A- Tayin Yöntemleri

- Spektrofotometri
- ESR spin tuzak yöntemi
- NMR spin tuzak yöntemi
- Kemiluminesans

B- Reaksiyon Ürünlerinin Ölçümü

- Lipid peroksidasyonu

.Lipid Peroksid (PD) Assay
.Tiobarbiturik Asit Reaktif Maddeler (TBARS) Assay, (Malondialdehid ; MDA Tayini)

- Nükleik asit yıkım ürünleri

C- İnhibitör Çalışmaları

- Spesifik: Süperoksit dismutaz, Katalaz, Glutasyon peroksidaz
 - Kısmen spesifik: Allopürinol, Deferoksamin
 - Non-spesifik: Mannitol, Dimetil Sülfoksit (DMSO)
-

A- ROS'ların Tayini

ROS'lar dokuda doğrudan tayin edilebildiği gibi doku ve kanda ROS'ların oluşturduğu ürünlerde ölçülebilir. ROS'lar yarı ömrü çok kısa ve kararsız bileşikler olduğundan dokuda kantitatif ölçümler zordur. Elektron spin rezonans spektroskopisi (ESR), ROS'ların tayinine olanak veren tek direkt yöntemdir. Direkt ölçüm yöntemleri zor olduğundan daha çok reaksiyon ürünleri ölçülmekte veya inhibitör deneyleri tercih edilmektedir (Tablo-IV). Bu amaçla pek çok lipid deriveleri ölçülebilir. Dokuda lipid peroksidasyonunun göstergesi olarak aldehidler (hekzanal,

malondialdehid (MDA), 4-hidroksinonenal), tiyobarbitürik asid reaktivitesi, konjuge diene'ler ve az miktarda oluşan etan ve pentan (hidrokarbiler), ayrıca hidroperoksidler ROS ölçümünde kullanılır. Bunlar içinde en sık MDA kullanılır. Tiyobarbitürik asid yöntemiyle MDA tayini MDA'nın asidik ortamda tiyobarbitürik asidle renk oluşturma ilkesine dayanır. ROS tayininde idrarda DNA deriveleri ve okside ürünler, nükleik asit yıkım ürünleri ve glutatyon ölçülebilir. İnhibitör deneylerinden süperoksid dismutaz (SOD) ve katalaz spesifik olarak, allopurinol, deferoksamin mannitol ve DMSO nonspesifik olarak ROS tayininde araştırılabilir. Okside antioksidanların, oksidatif stresin varlığını göstermede kullanımına örnek, okside glutatyonun total glutatyona oranının değerlendirilmesiyle yapılır (22, 23, 24).

B- ROS'larla Mücadele

Organizmalarda oksidan strese karşı mücadele aşamaları Tablo-V'de özetlenmiştir.

Tablo-V : Oksidatif Strese Karşı Mücadele Aşamaları

- Oksidanları arttırıcı etkenleri ortamdan uzaklaştırmak
- Tetiklenen biyokimyasal reaksiyonları kırmak
- Oksidan salgılayan hücreleri inaktive etmek
- Artmış oksidanları etkisizleştirecek antioksidanları kullanmak

Oksidatif strese karşı mücadelede yapılacak ilk iş oksidatif stres yapan etkenleri ortadan kaldırmaktır. Bir sonraki aşamada amaç tetiklenen biyokimyasal reaksiyonları kırmaktır. Anstabil ve reaktif ROS'lar hücre içinde organik ve inorganik kimyasal maddelerle tepkimeye girer. Ayrıca ROS'lar otokatalitik reaksiyonlar başlatarak, molekülleri ROS'a dönüştürür. Böylece zincirleme hasar oluşup lezyon bölgesinde ROS miktarı toksik düzeye çıkmaktadır. Dışarıdan verilen antioksidanlarla ROS miktarı azaltılabilir (25). Üçüncü aşamada mediyatörlerle aktive edilen lökositlerin bölgeye ulaşması engellenmektedir. Endotel ve parankim hücrelerinden salınan ROS'lar lökosit yapışması ve aktivasyonunda indirekt rol oynar (14). ROS'larla mücadelede son aşama toksik düzeye ulaşan oksidanları inaktive edecek antioksidanları kullanmaktır.

Antioksidanlar 4 şekilde etki gösterir (Tablo-VII) (20).

1- Oksidanlarla etkileşip onları tutma ve daha zayıf yeni bir moleküle çevirerek etkisiz hale getirmeye temizleme (scavenging) etkisi denilir. Doğal antioksidanlardan enzimler, trakeobronşiyal mukus ve küçük moleküller bu etkiyle oksidanların miktarını azaltır.

2- Oksidanlarla etkileşime girip onlara 1 hidrojen iyonu aktararak aktivitelerini söndüren ve inaktif hale getiren moleküllerin etkinliğine söndürme (quenching) etkisi denilir. Vitaminler, flavonoidler, trimetazidin, mannitol bu şekilde etki gösterir.

3- Oksidanları kendilerine bağlayarak zincirlerini kıran ve ROS fonksiyonlarını engelleyen etkinliğe zincir kırıcı (chain breaking) etki denilir. Hemoglobin, seruloplazmin ve ağır metaller bu şekilde etki gösterir.

4- Antioksidan savunma sistemleri etkili olmazsa, onarıcı enzimler serbest radikallerin zedelediği proteinleri parçalar ve DNA'daki serbest radikal hasarını tamir ederler. Bu etkinliğe onarıcı (repair) etki denilir (26).

Tablo-VI : Antioksidanların Etki Mekanizmaları

-
- Scavenging Etki (Temizleme)
 - Quenching Etki (Söndürme)
 - Chain Breaking Etki (Zincir Kırıcı)
 - Repair Etki (Onarıcı)
-

IV- İSKEMİ-REPERFÜZYON HASARININ PATOFİZYOLOJİSİ

A- Giriş

I/R hasarının yüksek morbidite ve mortalitesi hekimlerin dikkatini doku nekrozunu önlemek ve organ fonksiyonunu yeniden kazandırmak amacıyla iskemik dokuya kan akımını yeniden sağlamaya çekmiştir. Fakat son zamanlarda bir müddet

iskemi sonrası kan akımının yeniden sağlanması anlamına gelen reperfüzyonun iskemik organları daha fazla hücrel nekroz riskine sokabileceği ve böylelikle fonksiyonun geri dönmesini kısıtlayabileceği açık hale gelmiştir. Parankimal hücrelere letal reperfüzyon hasarı görüşü evrensel olarak kabul edilmemesine karşın, mikrovasküler yapıların, özellikle mikroskopik kan damarlarını döşeyen endotel hücrelerinin, iskemi ve reperfüzyonun (I/R) zararlı sonuçlarına çok yatkın olduğu geniş çapta kabul edilir. Gerçekten, pek çok organda I/R'a bağlı mikrovasküler disfonksiyon tanımlanmış olup trombolitik tedavi, organ nakli, koroner anjioplasti ve kardiyopulmoner bypass gibi çeşitli standart tıbbi ve cerrahi müdahaleler sırasında rastlanılan potansiyel olarak ciddi bir sorun olarak kabul edilir (1).

I/R hasarının patogenezinde mikrovasküler disfonksiyonun erken ve hız belirleyici bir faktör olduğunun kabul edilmesi, I/R ile ilgili vasküler değişiklikleri tam olarak karakterize etmeye ve bu patolojik sürecin altında yatan mekanizmaları tanımlamaya yönelik büyük bir çabaya yol açmıştır. Post-iskemik dokuda bu inflamatuvar reaksiyonun şiddeti, reperfüzyona karşı verilen hasar yanıtı uzak organlarda da kendini gösterecek kadar büyük olabilir (2). I/R'un bu uzak etkileri en sık olarak akciğer ve kardiyovasküler sistemde gözlenir ve herikisinin üçüncü derecede referans yoğun bakım ünitelerindeki mortalitenin % 30-40'nı açıkladığı, sistemik inflamatuvar yanıt sendromu (SIRS) ve çoklu organ disfonksiyon sendromunun (MODS) gelişmesine sebep olabildiği bildirilmektedir (22).

B- I/R'a Lokal Mikrovasküler Yanıtlar

Kan damarlarının en içteki yüzeyini döşeyen endotel hücreleri vasküler homeostazın temeli olan vital ve dinamik bir yapı teşkil eder. Bu hücrelerin gerek hipoksi (iskemi) gerekse reoksijenizasyonun (reperfüzyon) zararlı etkilerine özellikle yatkın olduğu görünür. Uzamış hipoksinin membran potansiyelini değiştirdiği, iyonların dağılımını bozduğu, intrasellüler volümü arttırdığı, membran akışkanlığını azalttığı ve endotel hücrelerinin hücre iskeleti organizasyonunu bozduğu bilinir. Sonuç olarak, reperfüzyon sonrası ilk dönemde süratle ağır endotel hücre disfonksiyonu meydana gelir ve belirgin morfolojik hücre hasarı olmaksızın gelişebilir. Uzamış iskemi sonrası reperfüzyona eşlik eden bu morfolojik

değişiklikler genel olarak hücre şişmesi, pinositik veziküllerin kaybı, endotel hücrelerin alttaki bazal membrandan kalkması ve aktive olmuş lökositlerin (başlıca nötrofiller) endotel hücre yüzeyine yapışmasını (adherence) kapsar. Reperfüzyon sonrası erken dönemde reaktif oksijen metabolitleri'nin üretimi artar ve nitrik oksid'in üretimi azalır (27).

i- Arteriyoller

I/R sonrası arteriyollerde endotel hücre disfonksiyonu başlıca kendini asetilkolin gibi tüm reseptör bağımlı vazodilatatörlere karşı bozulmuş endotel bağımlı, NO aracılı düz kas gevşemesi şeklinde gösterir. Post-iskemik arteriyollerde endotelden bağımsız vazodilatatörlere (nitroprusside gibi) karşı relaksasyonun korunması, bozulmuş vasküler yanıtın arteriyoller düz kas fonksiyonundaki bir açığa atfedilemeyeceğine işaret eder. Post-iskemik endotel hücrelerince aşırı süperoksid anyon üretimi arteriyollerin endotel bağımlı, NO aracılı relaksasyon gösterememelerini açıklayabilir, çünkü süperoksid dismutaz ve diğer antioksidanlar post-iskemik arteriyollerde bu yanıtı yeniden düzenleyebilir (28). Genetik olarak lökosit (CD11/CD18) veya endotel hücre adezyon moleküllerinden (P-selectin, ICAM-1) yoksun fareler, yabani tipteki (kontrol) farelerin aksine, I/R sonrası bozulmuş endotel bağımlı vazodilatasyon göstermeyip aktive olmuş ve yapışmış lökositlerin reperfüzyondan sonra endotel hücre kökenli NO'ı inkative edebilen başka bir potansiyel olarak önemli süperoksid kaynağını temsil ettiğini akla getirir (29).

ii- Kapillerler

I/R'a maruz kalan kapillerlerde meydana gelen endotel disfonksiyonu kendini gerek interstisyuma artan sıvı filtrasyonu gerekse perfüze kapiller sayısında azalma şeklinde gösterir. Post-iskemik endotel hücrelerince azalan NO üretimini uyarıcı, başka açıdan normal kapillerlerde NO sentaz'ın inhibisyonu, artan kapiller sıvı filtrasyon hızıyla sonuçlanıp, azalan NO etkisinin I/R'a karşı kapiller filtrasyon yanıtını açıklayabileceğini akla getirir (30).

iii- Venüller

Post-kapiller venüllerde endotel hücre disfonksiyonu I/R ile ilgili inflamatuvar yanıtların çoğunu açıklar. Lökosit-endotel hücre adezyonu, transendotelial lökosit migrasyonu, trombosit-lökosit agregasyonu, albumin ekstrasvazasyonu ve artmış oksidan üretimi I/R'a karşı verilen venüler yanıtların karakteristik özellikleridir. Normalde post-kapiller venüllerin hemen yanındaki interstisyel boşluklarda bulunan mast hücreleri ve makrofajlar da I/R ile aktive olur. Post-iskemik dokularda bu yardımcı hücrelerin aktivasyon ürünleri tespit edilir ve I/R'a karşı verilen inflamatuvar yanıtları büyüttüğü, venüler endotelden kısa mesafeye dağıldığı varsayılır (31).

Post-hipoksik endotel hücre mono tabakaları ve post-iskemik venül çalışmaları I/R sonrası mikrosirkülasyonun bu bölümünde gözlemlenen abartılı lökosit hareketinin gerek endotel hücrelerinin gerekse lökositlerin yüzeyinde artan adezyon molekül ekspresyonundan kaynaklandığını gösterir (32). P-selectin, post-iskemik venüllerde lökosit yuvarlanmasında dominant reseptör olarak görülmekte, fakat lökositler üzerindeki β_2 -integrin'ler ile endotel hücreleri üzerindeki temel olarak eksprese edilen ICAM-1 arasındaki etkileşim birbirine sıkıca yapışan lökositlerin toplanmasını açıklamaktadır (33). İntestinal vasküler sistemde P-selectin ekspresyonu I/R sonrası hızlıca artar (<30 dakika). Bu gözlem, ayrıca artan ICAM-1 ekspresyonu, hipoksi-reoksijenizasyona maruz bırakılan kültüre ekilmiş endotel hücrelerinde yapılan deneylerle doğrulanmıştır (32). Bu *in vitro* çalışmalar reoksijenizasyondan birkaç (4-6) saat sonra gözlemlenen nötrofil-endotel hücre adezyonuna, transkripsiyon bağımlı ICAM-1, P- ve E-selectin ekspresyonunun bir katkısını ortaya koymasına karşın, bu gözlemleri doğrulamak için *in vivo* I/R modellerinden edinilen çok az bilgi mevcuttur.

I/R sonrası mikrovasküler sistemin tüm bölümlerindeki endotel hücreleri oksidan stres yaşamakla birlikte, post-kapiller venülleri döşeyen bu hücrelerin, bu yanıtın en ağır yükünü taşıdığı görünür. Oksidan yüküne bu yoğun maruziyet muhtemelen post-iskemik venüllerde iki oksijen radikali üretim kaynağı olmasından kaynaklanır, endotel hücreleri ve lökositler gibi (33). Önemli bir endotel hücre kökenli süperoksid ve hidrojen peroksid kaynağı ksantin oksidaz enzimidir. Pekçok

vasküler yataktaki endotel hücreleri ksantin oksidaz'dan zengindir. İskemi sırasında hipoksantin birikimi , oksijen reperfüzyon esnasında kan damarına tekrar verildiğinde enzim tarafından süperoksid ve hidrojen peroksit üretim patlamasına imkan verir (34). Bu oksidan üretim mekanizması allopürinol gibi ksantin oksidaz inhibitörüyle ön işleme tabi tutulan post-hipoksik kültüre ekilmiş endotel hücre mono tabakalarında ve post-iskemik venüllerde hafifletilmiş oksidan stresi tanımlayan çalışmalarla desteklenmektedir. Ksantin oksidaz'ın reperfüzyondan birkaç dakika sonra venüllerde ortaya çıkan ilk oksidan strese katkıda bulunduğu görünse de, yapışık lökositlerin bundan sonra meydana gelen çok daha büyük oksidan stresi açıkladığı görünür (33).

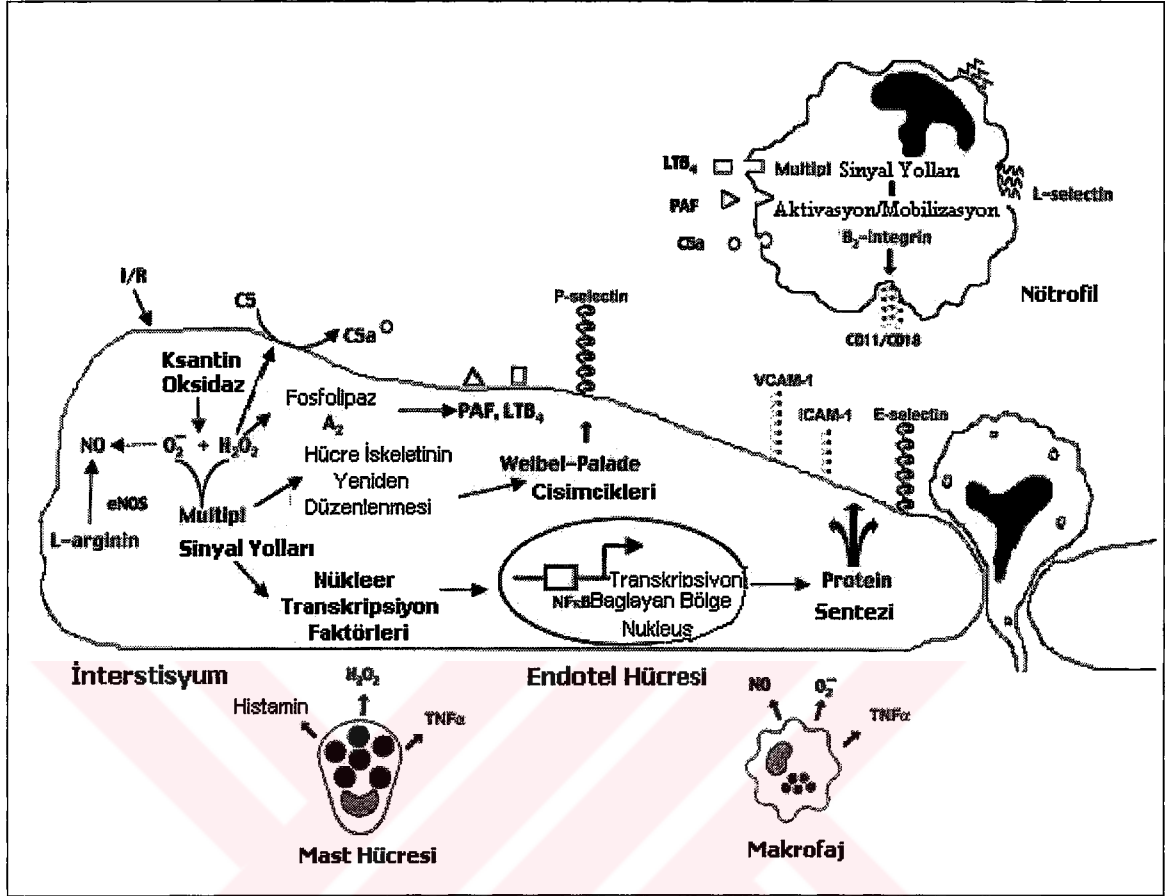
Belki I/R'a karşı en geniş çaplı incelenen venül yanıtı artan vasküler permeabilitedir. Endotelial bariyerin kısıtlayıcı özelliklerinde bir azalmayı yansıtan bu yanıt, post-kapiller venüllerde intravital mikroskopik FITC-albumin ekstravazasyon ölçümleriyle ve tüm organda radyo-işaretli albumin birikim hesaplamaları kullanarak veya plasma proteininin ozmotik akış katsayısında bir azalmayla tespit edilmiştir (34). Venüler permeabilitede I/R'a bağlı artış post-iskemik venüllerde meydana gelen diğer inflamatuvar olaylara (oksidan stres, lökosit-endotel hücre adezyonu) bağlanmıştır. Ya endotel hücrelerince oksidan üretimini (süperoksid dismutaz gibi) ya da/ve lökositlerin vasküler endotele adezyonunu (ICAM-1 spesifik antikor gibi) hedef alan ajanlar genellikle mikrovasküler permeabilitede I/R'a bağlı artışı azaltmada etkilidir (34). Mezenterik venüllerdeki çalışmalar venüllerdeki lökositlerin sıkışmasının I/R'a bağlı endotel bariyer disfonksiyonunun hız kısıtlayıcı faktörü olduğunu gösterir (35). Post-iskemik venüllerde albumin kaçağının büyüklüğü ile yapışık ve göç eden lökosit sayısı arasında büyük bir ilişki olduğu ve etkili bir biçimde lökosit yapışmasını/göçünü azaltan, adezyon molekülünü hedef alan antikorların I/R'a bağlı albumin kaçağı üzerine azaltıcı bir etki gösterdiği de bildirilmiştir (36).

NO'nin etkisini, I/R sonrası venüllerde (ve diğer vasküler kompartmanlarda) gözlemlenen inflamatuvar yanıtların önemli bir faktörü olarak gösteren bir dizi kanıtlar vardır. Bunlar 1-) post-iskemik dokularda Ca^{+2} bağımlı NO sentaz izoform aktivitesinde bir azalma, buna karşılık venöz kanda nitrat/nitrit düzeylerinde bir düşüş ; 2-) NO sentaz inhibitörlerinin normalde I/R'un meydana getirdiği

mikrovasküler (ve perimikrovasküler) değişikliklerin çoğunu taklit edebilmesi, örneğin lökosit yapışması ve göçü, trombosit-lökosit agregasyonu, mast hücre degranülasyonu ve artan albumin kaçağı ; ve 3-) post-iskemik dokularda, doku NO düzeylerini yeniden arttıran, NO salıcı bileşiklerin yapabileceği, I/R'a bağlı mikrovasküler disfonksiyona karşı korumayı kapsar.

iv- Reperfüzyona Bağlı Mikrovasküler Disfonksiyonda Nitrik Oksid-Süperoksid İmbalans Teorisi

I/R'a bağlı mikrovasküler disfonksiyon çalışmalarından çıkan verilerin pekçoğu değişen endotel bağımlı yanıtlarda katılımcı olarak gerek süperoksid gerekse NO'in rolüyle tutarlıdır (27). Gerçekten, mevcut veriler I/R'un endotel hücrelerinde NO ile süperoksid arasındaki dengeyi değiştirerek hem arteriyollerde bozulmuş endotel bağımlı vazodilatasyonu hemde venüllerde akut inflamatuvar yanıtı sebep olduğunu ileri sürer. Hakim olan görüş, normal şartlar altında, NO akışının süperoksid üretim hızını çok fazla geçmesidir. Bu NO'e 1-) etkili bir biçimde düşük intrasellüler süperoksid düzeylerini temizlemeye ; 2-) düz kasa guanilat siklaz aracılığıyla arteriyoler tonusu düşürmeye ; 3-) trombosit agregasyonu ve trombüs formasyonunu önlemeye ; ve 4-) lökositler ile endotel hücre yüzeyi arasında adeziv etkileşimleri en aza indirmeye olanak tanır. Bununla birlikte, iskemik dokuların reperfüzyonundan sonra dakikalar içerisinde NO ile süperoksid arasındaki denge süperoksid lehine doğru eğilir. Bu dengesizlik endotel hücrelerince (ve yapışık lökositlerce) süperoksid üretiminde çok büyük bir artışa ve buna karşılık endotelial NO sentaz'a bağlı NO sentezinde bir düşüşe yol açar. Endotel hücrelerince üretilen çok düşük seviyelerdeki NO, bol miktardaki süperoksid ile reaksiyona girerek geride kan hücresi ile endotel hücresi arasındaki etkileşimleri engel olacak veya optimum doku kan akımını sürdürecektir çok az biyoaktif NO bırakır veya hiç bırakmaz. Ayrıca, belirli endojen vazodilatatörler (asetilkolin) kendi endotel reseptörleri ile etkileşime girdiğinde ikinci mesajcı olarak işlev görecektir NO olmadığı için endotel bağımlı vazodilatasyon tehlikeye girer.



Şekil-8 : İskemi ve reperfüzyona maruz kalan post-kapiller venüllerde görülen inflamatuvar yanıtları açıklayan endotel bağımlı mekanizmalar. İskemi-reperfüzyon, ksantin oksidaz enzimi tarafından artan bir süperoksit (O_2^-) ve hidrojen peroksit (H_2O_2) üretimine, buna karşılık endotelial NO sentaz (eNOS) tarafından nitrik oksid (NO) üretiminde bir düşüşe sebep olur. Artan oksidan üretimi, komplemanın aktivasyon ve birikimi ve fosfolipaz A_2 aracılı LTB_4 ve PAF üretimiyle sonuçlanır. Oksidanlar, lökosit yuvarlanma reseptörünü endotel hücrelerindeki ön şekillendirme havuzundan (Weibel-Palade cisimcikleri) harekete geçirerek ilk P-selectin ekspresyonuna da aracılık eder. β_2 -integrin'lerin (CD11/CD18) aracılık ettiği lökositlerin sıkı adezyonuna aktive olmuş kompleman, LTB_4 ve PAF' ın yuvarlanan lökositler üzerindeki reseptörleriyle birleşmesi sebep olur. Endotel hücreleri üzerinde lökositlerin sürekli yuvarlanması ve adezyonu, E-selectin ve ICAM-1 gibi oksidan bağımlı endotel hücre adezyon moleküllerinin senteziyle sağlanır. Ya endotel hücreleri ya da lökositlerden salınan oksidanlar, bu adezyon molekülleri için genlere bağlanan spesifik nükleer transkripsiyon faktörlerini (NF κ B gibi) aktive ederek bu biyosentetik yanıtı meydana getirir. İskemi-reperfüzyona karşı verilen inflamatuvar yanıtlar, normalde post-kapiller venüllerin yakın komşuluğunda bulunan mast hücreleri ve makrofajlardan salınan mediyatörlerce büyütülür.

I/R sonrası NO yokluğunda meydana gelen süperoksid birikimi artan bir hidrojen peroksid (süperoksid, NO ile süperoksid dismutasyon hızından çok daha hızlı reaksiyona girer) üretimine imkan verir. İki reaktif oksijen metaboliti (O_2^- ve H_2O_2) venüllerde 1-) fosfolipaz aktivasyonu aracılığıyla trombosit aktive edici faktörün üretimine yol açarak ; 2-) komplemanın aktivasyonuna ve endotel hücre yüzeyinde birikimine yardımcı olarak ; 3-) depolanmış P-selectin havuzunu lökosit yuvarlanmasına aracılık ettiği endotel hücre yüzeyine göndererek süratle inflamatuvar yanıtı başlatabilir veya abartabilir. Reaktif oksijen metabolitleri, E-selectin (lökosit yuvarlanmasını sürdürür) ve ICAM-1 (lökositlerin sıkıca yapışmasını ve göç etmesini sürdürür) gibi adezyon moleküllerini kodlayan genleri aktive ederek reperfüzyondan birkaç saat sonra meydana gelen lökosit-endotel hücre adezyonunu sürdürmeye de yardımcı olur. Spesifik endotel hücre adezyon moleküllerinin genleri için oksidan bağımlı genlerin aktivasyonuna, sırasıyla oksidan stres ile aktive edilen NF κ B ve AP-1 gibi nükleer transkripsiyon faktörleri aracılık eder. Endotel hücre adezyon moleküllerinin transkripsiyon bağımlı sentezi, I/R'un sebep olduğu inflamatuvar yanıtların, reperfüzyon ve NO-süperoksid imbalansının başlangıcından birkaç saat sonra meydana gelebileceğini kesinleştirir (Şekil-8).

C- I/R Sonrası Uzak Organ Hasarı

Doku reperfüzyonunun yıkıcı bir sonucu, ilk iskemik hasara katılmayan organlarda hasarın gelişmesidir. Bugün bilindiği gibi, multipl organ disfonksiyon sendromu (MODS), ağır hastalarda başlıca ölüm sebebidir.

MODS ile sonuçlanan hasarlar çeşitli olmakla birlikte yoğun splanknik vazokonstriksiyon ve göreceli mezenterik iskemi ile ilişkili olabilir. Bu yoğun splanknik vazokonstriksiyon gerçekten MODS'un patogeneze katkıda bulunabilir, çünkü kısa sürelerde enterik iskemi bile intestinal mukozal bariyer bütünlüğünün kaybı ve intestinal lümeninden mezenterik lenf nodlarına ve portal kana enterik flora veya lipopolisakkarid'in (LPS) hareketi veya 'translokasyonu' ile ilişkilidir. Enterik makrofajların bu bakteriyel ürünlerce uyarılması veya reperfüzyon sırasında dolaşıma salıverilen diğer mediyatörler hemen hemen her organda makrofaj aktivasyonuna ve vasküler endoteli aktive edebilen inflamatuvar sitokinlerin (TNF α gibi) üretimine sebep olabilir. Üstelik, reperfüzyonun bir sonucu olarak

salınan inflamatuvar mediyatörler dolaşan lökositleri ve vasküler endotel hücrelerini aktive edebilir, adezyon moleküllerinin ekspresyonunu arttırabilir ve pekçok vasküler yatakta nötrofil-endotel hücre etkileşimlerine yardımcı olabilir.

i- Organ Sistemi Tutulumu

MODS ile ilişkili akciğer hasarı, akut akciğer hasarı (ALI) denilen hafif disfonksiyondan ağır solunum yetmezliği veya akut respiratuvar distres sendromuna (ARDS) kadar değişen bir dizi akciğer hasarını temsil eder. ARDS ve MODS ile ilişkili akciğer hasarının ayırt edici özelliği pulmoner mikrovasküler permeabilitede ve nötrofilden zengin alveolar sıvı birikiminde artıştır. Solunum yetmezliğinin ardından hepatik, renal ve gastrointestinal disfonksiyon, ayrıca santral sinir sistemi tutulumu ve myokard yetmezliği gelir. Diffuz organ sistem tutulumuna ek olarak, MODS, koagülasyon kaskadı ve immun sistemde disfonksiyon ile karakterize olup tromboz, dissemine intravasküler koagülasyon ve immun yetmezlik ile sonuçlanır (37).

ii- Reperfüzyona Bağlı MODS

I/R'a bağlı *lokal* organ disfonksiyonunu açıklayacak birkaç mekanizma önerilmiştir ; fakat reaktif oksijen türevleri ve inflamatuvar lökositlerin rolüne çok ilgi odaklanmıştır. Şaşırtıcı olmayan bir biçimde, oksidanlar ve aktive olmuş lökositler I/R'a bağlı *uzak* organ hasarının mediyatörleri olarak da gösterilir.

iii- Ksantin Oksidaz

Ksantin oksidazın geniş endotelial lokalizasyonu ve bu enzimin süperoksid (O_2^-) ve H_2O_2 üretme kapasitesi göz önünde bulundurulursa, ksantin oksidaza I/R'a bağlı uzak organ hasarına katkıda bulunan bir faktör olarak çok ilgi gösterilmiştir. Plazma ksantin oksidaz aktivitesi aortik oklüzyon-reperfüzyon, ayrıca hepatik veya intestinal I/R'u takiben hızla artar (38, 39, 40). Bu artış uzak pulmoner, hepatik ve myokardiyal hasar ile ilişkilidir. Ksantin oksidaz inhibisyonunun uzak akciğer ve karaciğer disfonksiyonunu azaltması ksantin oksidaz veya ürünlerinin reperfüzyona bağlı uzak organ hasarına katkıda bulunabildiğini gösterir (38, 40, 41).

Ksantin oksidaz kökenli oksidanlar, primer iskemik hasar bölgesinden başka organlarda inflamatuvar lökositlerin toplanmasına sebep olan kemotaktik faktörler de üretebilir. Plazmanın ksantin oksidaz kökenli O_2^- 'ye maruziyeti hem *in vitro* hem *in vivo* kemotaktik faktörler meydana getirir (42). Üstelik, ya uzamış intestinal I/R'a yanıt olarak üretilen dolaşan ksantin oksidaz'ın ya da pürifiye edilmiş ksantin oksidaz'ın akciğerde inflamatuvar lökositlerin birikimine sebep olduğu bildirilmiştir (38). Bu veriler ksantin oksidaz'ın kemotaktik fonksiyonunu destekleyip ksantin oksidaz kökenli oksidanlar veya kemotaktik maddelerin intravasküler üretiminin pekçok organda inflamatuvar lökositlerin sıkışmasını düzenleyebileceği konusunda bir mekanizma ileri sürer.

iv- Lökositler

Nötrofillerin, O_2^- ve H_2O_2 ürettiği ve H_2O_2 ve klorür iyonlarından hipoklorik asid oluşumunu katalizleyen myeloperoksidaz salgıladığı bilinmektedir (34). Aktive olmuş nötrofiller, neredeyse tüm endoteliyal bazal membran bileşenlerini ayrıca endoteliyal bariyer fonksiyonunu sürdüren bileşke proteinlerini parçalayabilen güçlü proteaz'lar da üretir. İskemik dokularla karşılaşmış lökositler reperfüzyonu takiben aktive olmuş bir halde tekrar sistemik dolaşıma girebilir. Bu aktive olmuş nötrofiller I/R'a bağlı uzak organ hasarının mediyatörleri olarak gösterilmiştir.

Nötrofil yapışmasını önlemenin I/R'a bağlı uzak organ hasarını azaltması MODS'da nötrofil aktivasyonunun önemli bir rolü olduğu konusuna kuvvetli destek verir. Bu gözlem, uzak organ hasarını başlatmak için reperfüzyonun dolaşan lökositleri aktive etmesi ve bunların uzak bölgelerde yapışmasına sebep olması gerektiğini ileri sürer. Gerçekten, aortik reperfüzyonu takiben alınan plazmanın nötrofil adezyonu ve aktivasyonuna yol açtığı bildirilmiştir. Üstelik, SIRS'ta olduğu belgelenmiş hastalardan alınan nötrofiller artmış oksidan üretimi ve CD11b ekspresyonu gösterir. Sonunda, aortu çapraz biçimde klemplemenin bir sonucu olarak meydana gelen uzamış visseral iskemi yalnız nötrofil aktivasyonu ve adezyon molekül ekspresyonu ile sonuçlanmaz aynı zamanda çoklu organ yetmezliğine bağlı artan mortaliteyle de sonuçlanır (43). Bu sonuçlar doku iskemisinin yalnız lökosit aktivasyonu ve adezyon molekül ekspresyonuna yol açmadığını aynı zamanda uzak bölgeleri vasküler hasara daha duyarlı kıldığını da ileri sürer.

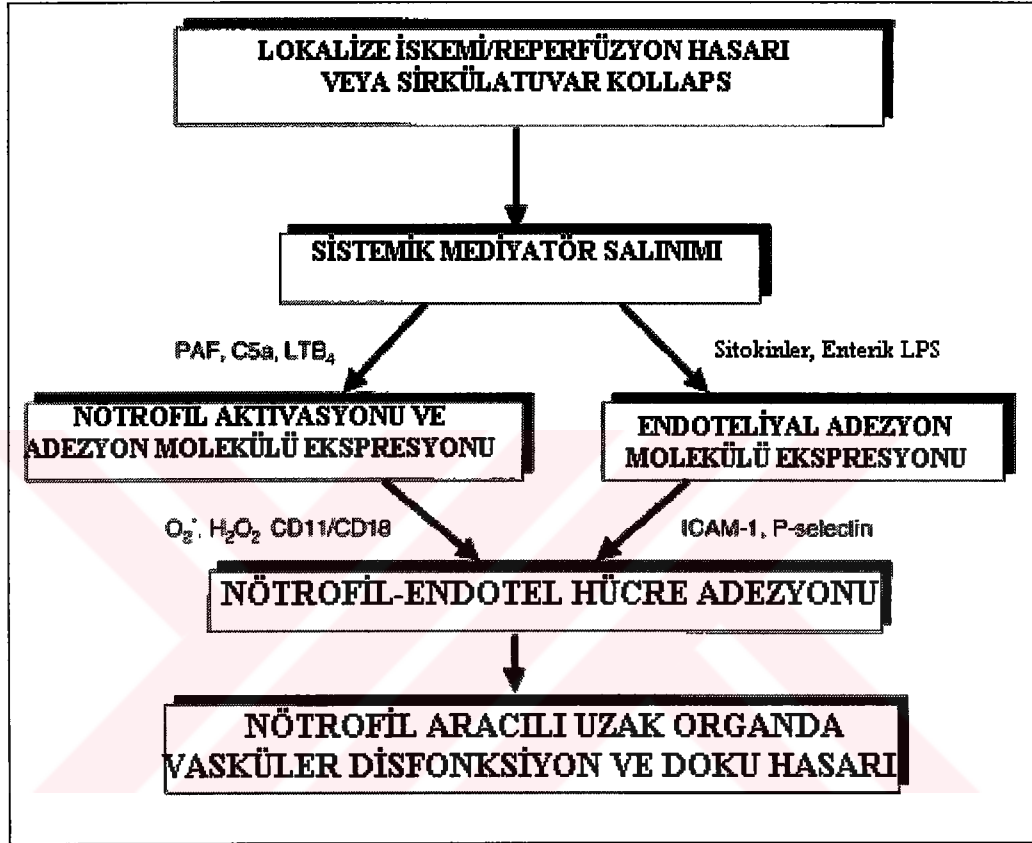
Pekçok bölgede reperfüzyona bağlı lökosit sıkışması en azından kısmen endotel hücre adezyon moleküllerinin (ECAM'lar) ekspresyonuyla düzenlenebilir. Aorta çapraz biçimde klemp koyduktan sonra alınan plazma endoteliyal ICAM-1 ekspresyonunu başlatır ve hepatik I/R ICAM-1'in yalnız karaciğerde değil aynı zamanda uzak organlarda da ekspresyon artışına (up-regulation) sebep olur. Bu yüzden, post-iskemik dokulardan inflamatuvar mediyatörlerin üretimi ve salınımı hem lokal olarak hem de uzak bölgelerde ECAM ekspresyonuna yol açıp böylece nötrofil-endotel hücre adezyonunu ve nötrofil aracılı vasküler ve doku hasarını kolaylaştırır.

v- İnflamatuvar Mediyatörler

Post-iskemik dokular dolaşan nötrofilleri aktive edebilen ve/veya çekebilen inflamatuvar mediyatörler üretir. I/R'un bu inflamatuvar mediyatörlerin sistemik salınımına sebep olup böylece nötrofil aktivasyonuna destek olduğu, yaygın lökosit ve endotel adezyon molekül ekspresyonuna yol açtığı ve lökosit-endotel hücre etkileşimi için fırsatları arttırdığı olasılığını destekleyen çok sayıda kanıt vardır. Örnek olarak, hemorajik şok sonrası alınan mezenterik lenf, endotel hücrelerine sitotoksik olan ve nötrofil aracılı endotel hasarı şiddetlendiren nötrofil O_2^- üretimini artırır, oysa aorta çapraz biçimde klemp koyduktan sonra alınan plazma hem nötrofil hem de endotel adezyon molekül ekspresyona yol açar. Ayrıca, Barry ve arkadaşları, aorta çapraz biçimde klemp koyduktan sonra hem $TNF\alpha$ hem de tromboksan B_2 'nin sistemik dolaşıma salındığını ve bu mediyatörlerin artmış plazma konsantrasyonlarının pulmoner vasküler disfonksiyon ile ilişkili olduğunu göstermiştir (44). Böylece, bir organın I/R'u inflamatuvar mediyatörlerin sistemik etkisini artırıp hem lökosit aktivasyonuna hem de uzak organlarda nötrofil ve ECAM ekspresyonu ve vasküler disfonksiyona yol açar (Şekil-9).

Tespit edilebilir bir enfeksiyon kaynağı olan septik hasta ile sistemik inflamasyon ve MODS'da olan hastalar arasındaki benzerlikler, MODS'lu hastalarda enfeksiyona yönelik ampirik bir araştırmanın 1980 öncesi kabul edilebilir klinik uygulama olacak kadar dikkat çekicidir. Bununla beraber, MODS'lu travma hastalarının sadece % 30'unda tespit edilebilir bir enfeksiyon kaynağı olduğunun ve

MODS'lu hastalarda infeksiyon eredikasyonunun progresif organ yetmezliğini geri döndürmeye yeterli olmadığının anlaşılması sistemik inflamatuvar yanıt ile infeksiyon arasındaki ilişkinin sorgulanmasına sebep oldu. Bu gözlemler araştırmacıları, hem septik hem de sistemik inflamatuvar yanıtı sebep olabilen endojen mediyatörleri de araştırmaya sevketti.



Şekil-9 : İlk, lokalize iskemi-reperfüzyon olayını takiben uzak organ hasarı gelişmesinin altında yatan mekanizmaların şematik örneği. I/R inflamatuvar mediyatörlerin sistemik etkisini artırarak hem lökosit aktivasyonuna hem de nötrofil ve endotel hücre adezyon molekül ekspresyonu ve vasküler disfonksiyona yol açar.

Hayvanlarda ve gönüllü insanlarda TNF α 'nın verilmesi sepsis ve MODS'un klinik belirtilerini meydana getirmesi nedeniyle, bu sitokin doğrudan sistemik inflamasyon ve MODS'u başlatabilen inflamatuvar bir mediyatör olarak kabul edilir. Kanıtlar, I/R'un başlattığı sistemik inflamatuvar yanıtta TNF α 'nın bir rolü olduğunu da destekler. I/R, sistemik TNF α salınımına yol açarak akciğerde nötrofil toplanmasına ve hasara sebep olur. Ayrıca, TNF α antiserumu hepatik I/R'a bağlı

pulmoner kapiller kaçağı azaltır. Colletti, hepatik kökenli TNF α 'nın akciğerde epiteliyal nötrofil aktive edici protein (ENA) üretimine yol açarak akciğer hasarını kolaylaştırdığını ileri sürmüştür, çünkü ENA antiserumu karaciğer iskemisi sonrası akciğer hasarı ve nötrofil retansiyonunu engelleme açısından TNF α antiserumu kadar etkilidir (11). Bu yüzden, post-iskemik bir organdan salınan TNF α 'nın uzak bölgelerde inflamatuvar mediyatörlerin üretimine sebep olup bu uzak organlarda artan nötrofil sıkışması ve nötrofil aracılı hasara zemin hazırlayabildiği görünür.

Çeşitli organlardaki reperfüzyon, kompleman kaskadını aktive ederek mikrovasküler sistemde yaygın biçimde kompleman fragmanları birikimine yol açar. Kompleman aktivasyon ürünleri yalnız lökositler için kemotaktik olmayıp aynı zamanda nötrofil aktivasyonu, oksidan üretimi ve adezyon molekül ekspresyonuna da sebep olur. Ayrıca, kompleman aktivasyonunu çözülebilir kompleman reseptör 1 (sCR1) kullanarak engelleme, C_{5a}'nın immunnötralizasyonu veya genetik olarak C₅'den yoksun fareler çeşitli deneysel I/R'a bağlı uzak organ hasarı modellerinde inflmasyona bağlı vasküler hasarı önler. Bu bildiriler, I/R aracılı lökosit sıkışması ve vasküler disfonksiyonda kompleman aktivasyon ürünlerinin bir rolü olduğunu destekler.

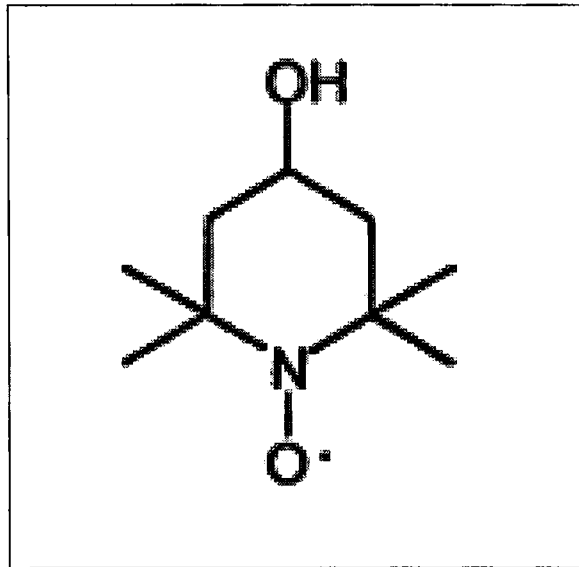
NO'nin tükenmesi ve/veya inaktivasyonu da I/R'a bağlı uzak organ hasarının patogenezinde katkıda bulunan bir faktör olarak görülmüştür. NO üretiminin deneysel inhibisyonu, hepatik I/R ve endotoksin verilmesini takiben akciğerde süperoksid üretimini ve hasarı artırır, oysa NO vericileri humoral inflamatuvar mediyatörlerin birikimini azaltır, endotel hücre disfonksiyonunu azaltır ve splanknik arter oklüzyonu sonrası kısa vadede sağkalımı artırır. Bu yüzden I/R'u takiben azalan NO varılığı, nötrofil-endotel hücre etkileşimlerini kolaylaştırarak ve uzak organlarda oksidatif stres başlatarak MODS'un patogenezinde katkıda bulunabilir (45).

Deneysel ve klinik çalışmalar PAF'ın MODS'daki organ disfonksiyonunda majör endojen mediyatör olabileceğini ileri sürer, çünkü şok sonrası biyolojik sıvılarda ve I/R sonrası plazmada bu fosfolipidin düzeyleri yükselir. Üstelik, PAF verilmesi MODS'da gözlenen kardiyak depresyon, hipotansiyon, artmış vasküler

permeabilite ve trombosit agregasyonunu taklit eder. PAF'ın hem intestinal I/R'a bağılı hem de ARDS'deki nötrofil aktivasyonu, adezyonu ve lökosit aracılı hasara katkıda bulunduğu bilinmektedir. Kümülatif olarak, PAF'ın bu etkileri multipl organ iskemisi veya yetmezliğini başlatabilir veya sürdürebilir. PAF reseptör antagonistlerinin intestinal I/R'u takiben myokardı deprese edici faktörün ve TNF α 'nın salınımını bloke ettiği ve organ sistem hasarını azalttığı ve hemorajik ve travmatik şokta sağkalımı arttırdığı gözlemiyle PAF'ın MODS'da rol oynadığı konusunda doğrudan kanıtlar sunulur. Bu sonuçlar, reperfüzyon ve sirkülatuvar kollapsın başlattığı sistemik inflamatuvar kaskad içerisinde PAF'ın önde gelen bir rol oynayabileceğini ileri sürer.

V- TEMPOL

Tempol (4 – hidroksi - 2, 2, 6, 6 – tetrametilpiperidin – N - oksil), elektron spin rezonans spektroskopide geniş çapta kullanılan spin label Tempo'nun suda çözünen bir analogudur. Spin label, mikroskopik çevresine ilgi duyan ve spin label'ın elektron spin rezonans (ESR) spektrumuyla açığa çıkarılan moleküler bir yapının bir parçasına bağlı stabil bir paramanyetik gruptur (genellikle bir nitril radikali). Tempol, biyolojik membranları geçen düşük moleküler ağırlıklı (moleküler ağırlığı, 172 Dalton) stabil bir piperidin nitroksid'tir (Şekil-10) (3).



Şekil-10 : Tempol'ün kimyasal yapısı

A-) Tempol'ün Etki Mekanizması

Biyolojik membranları geçemeyen rekombinant süperoksid dismutazın (SOD) aksine, Tempol biyolojik membranları geçip sitozolde birikir (46).

i- Tempol ile ROS'lar Arasındaki Etkileşimler:

Tempol ve diğer stabil nitroksidlerin SOD taklitçileri mi olduğu yoksa süperoksid anyonlarının temizleyicileri olarak mı işlev gördüğü konusunda bazı tartışmalar vardır (47,48) . Kesin etki mekanizmasına bakmaksızın, Tempol'ün süperoksid anyonlarının etkilerini *in vitro* azalttığını belgeleyen pekçok çalışma vardır (49-52). Tempol'ün Fenton reaksiyonunda hücre içi ferröz demir seviyelerini düşürerek meydana gelen hidroksil radikallerinin oluşumunu azalttığı da ileri sürülmüştür. Son zamanlarda, Tempol'ün, sıçan kalp myoblastlarında H_2O_2 'e bağlı mitokondriyal solunumda bozulmayı konsantrasyon bağımlı bir şekilde azalttığı gösterilmiştir (53). Bu hücrelerde H_2O_2 'e bağlı mitokondriyal solunumdaki azalmaya hidroksil radikallerinin üretimi aracılık eder ve herhangi peroksinitrit oluşumundan bağımsızdır. Tempol'ün yararlı etkilerinin pekçoğunun bu ajanın hidroksil radikallerini temizleyebilmesine bağlı olduğu hipotezi aşağıdaki bulgularla desteklenir. Tempol, kontraktiledaki bozulmayı da azaltır ve hemen izole edilmiş sıçan kardiyak myozitlerinde H_2O_2 'e bağlı laktat dehidrojenaz salınımını da azaltır ve bu hasar deferoksamin ile azaltılır (49). Tavşanın lens epitel hücrelerinde H_2O_2 'e bağlı hücre hasarı deferoksamin ile azaltılır. Tempol, süperoksid anyonların ve hidroksil radikallerin üretimine sekonder olan, adriyaminin kardiyotoksik etkilerini azaltır (46). Tempol gibi, Tempo da (1 mM) geniş çapta myokardiyal iskemi ve reperfüzyona tabi tutulan sıçan kalplerinde hidroksil radikallerinin (2,5-dihidrobenzoik asit oluşumu olarak ölçülen) oluşumunu ve laktat dehidrojenaz salınımını azaltır. 1999'da, bu nedenle Tempol'ün koruyucu etkilerinin, bu stabil nitroksid radikalın hücre içi süperoksid anyonlarının özellikle hidroksil radikallerinin temizleyicisi olarak işlev görebilmesine bağlı olduğu ileri sürülmüştür (53).

ii- Tempol ile Peroksinitrit Arasındaki Etkileşimler:

Tempol gibi nitroksidler, süperoksit ile reaksiyona girebilmesiyle gösterildiği üzere, biyolojik sistemlerde analoğu hidroksilamin anyonu ve oksamonyum katyonu olan redoks reaksiyonları geçirip H_2O_2 ve moleküler oksijen oluşumuna yol açabilir. Tempol, çok fazla molar peroksinitrit varlığında fenolik bileşiklerin peroksinitrit aracılı nitrasyonunu inhibe edip bu katalitik benzeri bir mekanizmayı düşündürür. Bu deneylerde Tempol pH 6.5-8.5 arasında peroksinitrit aracılı nitrasyonu inhibe etmiştir. Bu inhibisyon nitrasyona özgü olup hidroksilasyona etkisi olmamıştır. Peroksinitrit aracılı nitrasyonun inhibisyonundan sonra Tempol değişmeden reaksiyon karışımlarından çıkarılmıştır. Ayrıca, Tempol feokromositoma (PC-12) hücrelerini peroksinitrit üreten bir bileşik olan 3-morfolinozidonimin'e (SIN-1) bağlı ölümden korumada etkilidir. Tempol'ün peroksinitrit ile etkileşiminin kesin mekanizması belli değildir ; fakat bu reaksiyonda ara kademenin nitrojen dioksit radikali-Tempol kompleksi olabileceği ileri sürülür. Bu kompleks ya nitrit ya da nitrat oluşturmak üzere suyla reaksiyona girebilir ya da nitrofenol veya nitrozofenol ürünleri oluşturmak ve tekrar nitroksit meydana getirmek üzere fenol radikaliyle reaksiyona girebilir (54).

iii- Tempol ve DNA Hasarı :

ROS ve peroksinitrit DNA zincir kırılmalarına sebep olabilir ve bu etki Tempol ile ortadan kaldırılır. Örneğin aktive olmuş mürin nötrofilleri hedef plazmasitom hücrelerinde (RIMPC 2394) DNA zincir kırıklarına neden olur. Bu hedef hücrelerde aktive olmuş nötrofillere bağlı DNA hasarı, konsantrasyona bağlı bir şekilde Tempol ile azaltılır. Bununla birlikte, Tempol aktive olmuş nötrofillerden H_2O_2 oluşumunu azaltmaz. Tavşan gözünün (lens) x-ışınlarına maruz kalması katarakt oluşumuna (yarık lamba muayenesiyle belirlenen) ve DNA zincir kırıklarına sebep olur. Tempol verilmesi humor aköz sıvısında Tempol birikimine yol açar ve DNA zincir kırıklarını önler ve katarakt oluşum derecesini azaltır (55).

iv- Tempol ve PARP :

DNA'daki zincir kırıkları, her yerde bulunan kromatine bağlı PARP (poli(adenozin 5' - difosfat riboz) sentetaz, PARS ; E.C.2.4.2.30 olarak da bilinen) enziminin aktivasyonuna sebep olur. PARP'ın aktivasyonu, adenozin 5'-difosfat (ADP)-riboz parçacıklarının nikotinamid adenin dinükleotid'den histonlar ve PARP'ın (otomodifikasyon bölgesi) kendisi gibi çeşitli nükleer proteinlere kadar olan transferini katalizler. Sürekli ve aşırı PARP aktivasyonu, nükleer proteinlerde uzamış ADP-riboz zincirleri (PAR zincirleri) meydana getirir ve hücre içi nikotinamid adenin dinükleotidde ve sonradan, eninde sonunda hücre ölümüne sebep olabilen adenozin trifosfatta büyük bir eksilmeye sebep olur. Kültüre ekilmiş hücrelerde süperoksid anyonları, H_2O_2 veya hidroksil radikalleri gibi radikaller DNA'da zincir kırıklarına, PARP'ın aktivasyonuna ve nikotinamid adenin dinükleotid ve adenozin trifosfattükenmesine sebep olur (56). PARP aktivitesi inhibitörleri kalpte, beyinde, barsakta ve böbrekte iskemi-reperfüzyona bağlı doku hasarını azaltır. Ayrıca bu ajanlar hemorajik şokla ilişkili multipl organ hasarını azaltır. Yakın zamanda, Tempol'ün kültüre ekilmiş insan kardiyomyoblastlarında H_2O_2 'e bağlı PARP aktivitesindeki artışı önlediği bulunmuştur (3).

v- Tempol ile NO Arasındaki Etkileşimler :

Tempol'ün sistemik verilmesi sistemik bir vazodilatasyona da sebep olur (50). Bu hipotansiyona -en azından kısmen- Tempol'ün potent bir vazodilatatör olan hidroksilamine metabolize olmasının aracılık etmesi olasıdır. Tempol'ün NO etkisini arttırdığı konusunda da kanıtlar vardır. Örneğin Zöllner ve arkadaşları Tempol'ün, ya SIN-1 ya da kültüre ekilmiş endotel hücrelerinden salınan tespit edilebilir miktarlardaki NO üzerine etkisini araştırmıştır (57). Kültüre ekilmiş sıgır aort ve atrium hücreleri (uyarılmış kalsiyum iyonoforu A23187) NO kemilüminesans ile saptanan stabil bir NO akımı salgılamıştır. Tempol (10 μM) kemilüminesans sinyalini arttırmıştır. SIN-1 solüsyonlarında elektron paramanyetik rezonans spin tuzağı, süperoksid anyonlarının spontan dismutasyonu ve aynı anda H_2O_2 ile reaksiyonundan meydana gelen hidroksil radikali oluşumunu göstermiştir. Gerek SOD gerekse Tempol, süperoksid anyonlarının dismutasyonunu hızlandırarak hidroksil radikalının sinyal şiddetini arttırmıştır. Bu bulgular, ilk kez, Tempol ve

diğer nitroksidlerin *in vitro* NO etki miktarını arttırdığını göstermiştir (57). Böylece, Tempol'un *in vivo* sağladığı vazodilatatör etkiler, hidroksilamin metabolitinin oluşumuna ve artan NO etkinliğine bağlı olabilir.

vi- Tempol ve Sitokinler :

Endotel hücrelerinin, proinflamatuvar sitokinler gibi pekçok uyarıya yanıt olarak ROS ürettiği bilinmektedir. Volk ve arkadaşları reaktif oksijen yükünün ölçüsü olarak 2,7-dikloroflüoresein (DCF)-flüoresans'da zamana bağımlı artışlar kullandı ve tek endotel hücrelerini TNF α , interlökin (IL)-1 ve interferon- γ ile enkübe ettikten sonra DCF-flüoresansı ölçtü. DCF-flüoresans'daki artışlar Tempol ile ortadan kaldırıldı, fakat NO sentaz inhibitöründen (L-NMMA) etkilenmedi (58). Sitokine bağlı endotelial DCF-flüoresansı nikotinamid adenin dinükleotid varlığında arttı, oysa nikotinamid adenin dinükleotid fosfat veya ksantin ile birlikte enkübasyon etkisizdi. Flavoenzim inhibitörü difeniliyodonyum yukarıdaki sitokinlere bağlı DCF-flüoresansındaki artışı ortadan kaldırdı. Ayrıca TNF α , IL-1 ve interferon- γ endotel hücrelerinin, Tempol ile ortadan kaldırılan fakat L-NMMA ile ortadan kaldırılmayan bir etki olan, monosit kemotaktik protein (MCP)-1 ve IL-6 üretimini uyardı. Böylece, endotel hücrelerinin TNF α , IL-1 ve interferon- γ ile uyarılması ROS oluşumuna (muhtemelen nikotinamid adenin dinükleotid oksidaz yoluyla) sebep oldu. Bu radikallerin oluşması MCP-1 ve IL-6 üretimini uyarır. En dikkati çeken, hücre içi radikal temizleyicisi Tempol, TNF α , IL-1 ve interferon- γ 'ya bağlı hem ROS oluşumunu hem de MCP-1 ve IL-6 oluşumunu azalttı. Bu sonuçlar, hayvanlarda inflamasyon ve iskemi-reperfüzyon hasarı modellerinde Tempol'un bazı yararlı etkilerinin, MCP-1 gibi kemokinlerin veya IL-6 gibi pro-inflamatuvar sitokinlerin oluşumunun Tempol ile önlenmesine ikincil olduğu görüşünü destekler.

vii- Tempol ve Sempatik Sinir Sistemi :

Tempole bağlı kardiyovasküler yanıtlarda sempatik sinir sisteminin rolü üreten ile anestezi uygulanmış normotansif sıçanlarda araştırılmıştır. Tempol renal sempatik sinir aktivitesi, ortalama arteriyel kan basıncı ve kalp hızında doza bağımlı (30-300 μ mol/kg) düşüslere sebep olmuştur. Sino-aortik denervasyon ve servikal agronomi

sonrası benzer yanıtlar alınmıştır. Bu yanıtlar, NO sentaz inhibitörü N^G-nitro-L-arjinin (2.6 mg.kg⁻¹.min⁻¹ intravenöz 5 dakikada) veya α_2 -adrenerjik reseptör antagonisti Idohan (0.3 mg/kg intravenöz bolus) ile tedavi sonrası bloke edilmemiştir. Idohan, kalp hızı, ortalama arteriyel kan basıncı ve renal sempatik sinir aktivitesi üzerine coniline'nin (10 µg/kg intravenöz) etkilerini bloke etmiştir. Hekzametonyum (30 mg/kg intravenöz) renal sempatik aktiviteyi inhibe etmiştir ve Tempol hekzametonyum sonrası renal sempatik sinir aktivitesini azaltmamıştır. Tempol'ün kalp hızı ve kan basıncı üzerine etkileri hekzametonyum tarafından azaltılmıştır. Sonuç olarak, üretan ile anestezi uygulanmış normotansif sıçanlarda Tempol' e bağlı depressör yanıtlara kısmen sempatoinhibisyon aracılık eder. NO bu yanıtta katkıda bulunmaz ve Tempol'ün sempatoinhibitör etkilerine α_2 -adrenerjik reseptörler aracılık etmez. Son olarak, Tempol doğrudan kalp hızını düşürür, bu kan basıncı düşüşüne katkıda bulunabilir (59).

B- Tempol ve İntestinal I/R

ROS'ların intestinal iskemi-reperfüzyon patofizyolojisine katkıda bulunduğu konusunda yeterince kanıt olmasına karşın, çeşitli antioksidanlarla müdahalelerinin etkisi sınırlı olmuştur. Aksine, Tempol'ün intestinal iskemi-reperfüzyona bağlı doku hasarını azalttığı konusunda kanıtlar vardır. Sıçanda süperior mezenterik arterin oklüzyonu ve reperfüzyonu, Tempol ile bariz bir şekilde azaltılan, intestinal permeabilitede büyük bir artışa yol açmıştır. En dikkat çekici olanı, nitroksidin reperfüzyondan hemen önce verildiğinde etkili olmasıdır (60). Splanknik arter oklüzyonuna (SAO) tabi tutulan sıçanlar ortalama arteriyel kan basıncında anlamlı bir düşüş, doku myeloperoksidaz aktivitesinde anlamlı bir artış ve distal ileumda ağır bir hasar göstermiştir. SAO şoku reperfüzyondan 2 saat sonra % 100 mortalite ile sonuçlanmıştır. Reperfüzyondan 60 dakika sonra SAO'lu sıçanların nekrotik ileumunda nitrotirozin ve PARP immunreaktivitesinde belirgin bir artış gözlenmiştir. SAO şokuna uğramış sıçanlardan alınan ileum kesitlerinin anti-intersellüler adezyon molekülü ve anti-P-selectin antikolları ile boyanması diffuz boyanma paterniyle sonuçlanmıştır. Tempol (reperfüzyondan 5 dakika önce 30 mg/kg bolus injeksiyon, ardından 30 mg.kg⁻¹.saat⁻¹ intravenöz infüzyon) 1-) reperfüze edilen barsağın

nötrofillerle infiltrasyonunu, 2-) lipid peroksidasyonunu, 3-) peroksinitrit üretimini, 4-) SAO şokuna uğramış sıçanlardan alınan doku kesitlerinde P-selectin ve anti-intersellüler adezyon molekülü 1'in boyanma derecesini, 5-) barsak hasarının histolojik bulgularını ve 6-) reperfüzyondan 2 saat sonraki mortaliteyi azaltmıştır (61). Birlikte ele alındığında bu sonuçlar açıkça hücre içi radikal temizleyicisi Tempol'ün SAO şokuna tabi tutulan sıçanların barsak hasarını azalttığını gösterir.



GEREÇ VE YÖNTEM

I- HAYVANLAR

Çalışmada Pamukkale Üniversitesi Tıp Fakültesi Deney Hayvanları Laboratuvar'ında yetiştirilen ağırlıkları 250-350 gr. arasında değişen toplam 36 adet Wistar Albino cinsi erkek rat kullanıldı. Ratlar randomize olarak 3 gruba ayrıldı. Çalışma boyunca hayvanların tümü 24°C oda ısısında, %50 nem ortamında, 12 saat aydınlık, 12 saat karanlık siklus içerisinde, her kafeste 2 hayvan olacak şekilde korundu. Hayvanlar deney süresince operasyondan bir gece öncesine kadar standart hayvan yemi ve su ile beslendi. Operasyondan 12 saat öncesinde hayvan yemi kesilerek sadece su içmelerine izin verildi. Operasyon öncesi anestezi, invaziv girişim ve cerrahi işlemler, Amerikan Ulusal Sağlık Enstitüsü'nün "Deney Hayvanları" rehber kitabına uygun olarak yürütüldü. Pamukkale Üniversitesi Tıbbi Etik Kurul Başkanlığı'ndan 27.04.2005 tarihli ve 2005/042 sayılı yazı ile "Tıbbi Etik Kurul İzni" alındı.

II- İLAÇLAR

Ketamine: Ketalar flakon (50 mg/ml, Eczacıbaşı İlaç ve Ticaret A.Ş. İstanbul – Türkiye). 50 mg/kg dozunda intramusküler olarak anestezi sağlamak amacıyla verilmiştir.

Xylazine: Rompun flakon (23.32 mg/ml, Bayer Türk Kimya San. Ltd. Şti. İstanbul – Türkiye). 10 mg/kg dozunda intramusküler olarak analjezi ve kas gevşetici amacıyla verilmiştir.

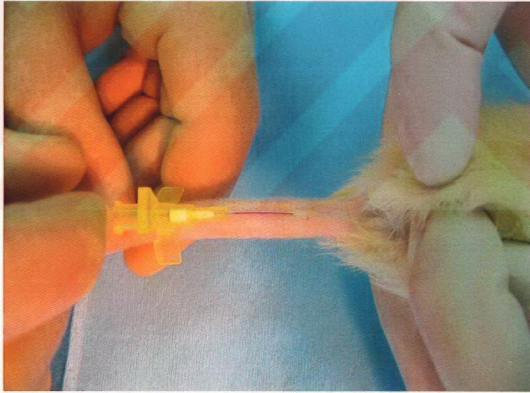
Heparin: Nevparin flakon (25000 IU/5 ml, Mustafa Nevzat İlaç San. A.Ş. Mecidiyeköy, İstanbul – Türkiye)

Evans Blue: Fluka, 46160 – 5 gr. toz. Evans Blue Dye, % 0,9 NaCl solüsyonu içerisinde çözündürülüp 30 mg/kg dozunda intravenöz olarak verilmiştir.

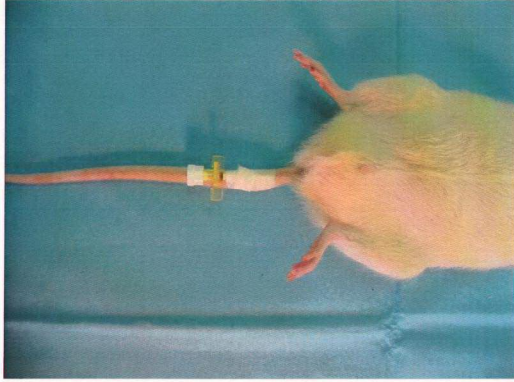
Tempol: Fluka, 56516 – 5 gr. granül. (4 – Hydroxy – 2, 2, 6, 6 – tetramethyl – piperidine 1 – oxyl). Tempol, % 0,9 NaCl solüsyonu içerisinde çözündürülüp 30 mg/kg dozunda intravenöz olarak verilmiştir.

III- İNTESTİNAL İ/R OLUŞTURULMASI

Ratlara 12 saatlik açlığı takiben 50 mg/kg ketamine (Ketalar flakon, Parke-Dawis, Eczacıbaşı İlaç ve Ticaret A.Ş. İstanbul - Türkiye) ve 10 mg/kg xylazine hidroklorür (Rompun flakon, Bayer, Leverkusen, Almanya) ile intramuskuler yoldan genel anestezi uygulandı. Sonra 24-gauge intraket kullanılarak kuyruk venası kateterize edilip intraket flaster ile kuyruğa tespit edildi. Çalışma süresince tüm ratların spontan olarak solunum yapmasına izin verildi. Çalışmaya alınan her rata operasyon öncesi dehidratasyonu önlemek amacıyla subkutan olarak 10 ml Ringer Laktat solüsyonu enjekte edildi.

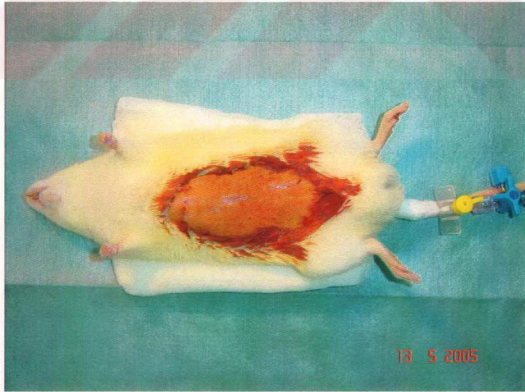


Şekil-11 : Ratlarda kuyruk venasından 24-gauge intraket ile damar yolu açılması

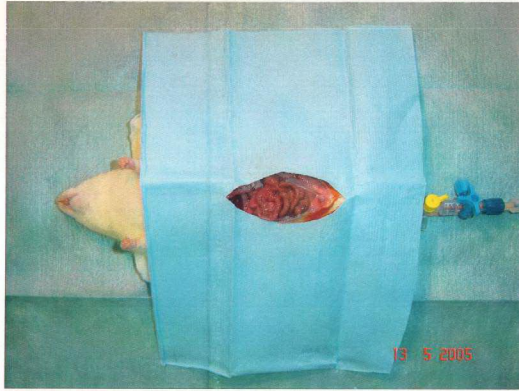


Şekil-12 : Ratlarda kuyruk venasından 24-gauge intraket ile damar yolu açıldıktan sonra intraketin kuyruğa tespiti

Anestezi derinliği kontrol edildikten sonra ratlar vücut ısını yaklaşık 37 C'de tutmak amacıyla ısıtıcı lamba altına alınıp ısıtıcı ped üzerine yatırıldı. Ratların karın bölgeleri tıraşlandı ve % 10 Povidone-iodine solüsyonu ile temizlenerek steril şartlar altında 4 cm'lik orta hat insizyonu ile laparotomi yapıldı.

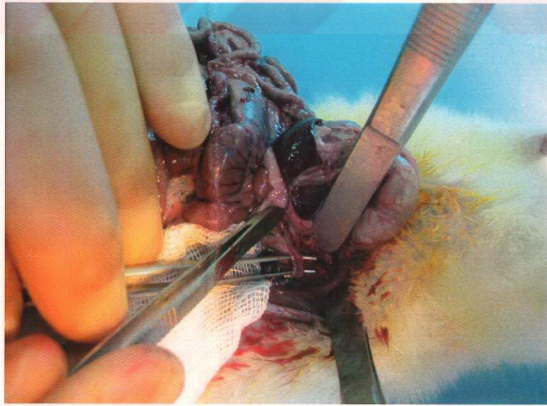


Şekil-13 : Ratların karın bölgesinin tıraşlanıp % 10 Povidone-iodine solüsyonu ile temizlenmesi



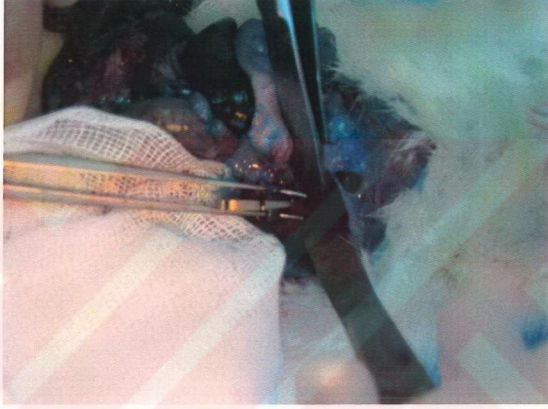
Şekil-14 : Ratlarda yaklaşık 4 cm'lik orta hat kesi ile laparotomi yapılması

İnce barsaklar karın dışına alındıktan sonra sıvı kaybını azaltmak için ılık % 0,9 NaCl solüsyonu emdirilmiş steril gaz kompres bezleri ile sarıldı ve sık sık ılık % 0,9 NaCl solüsyonu ile ıslatıldı. Süperior mezenterik arteri (SMA) ortaya koymak amacıyla Trietz ligamanı kesildi. Süperior mezenterik arter (SMA), Süperior mezenterik arter (SMA) ve Çölyak aksis arasındaki kollateral branşlar, İnförior mezenterik arter (İMA) disseke edildi.



Şekil-15 : Ratlarda SMA'nın disseke edilerek ortaya konulması

Heparinizasyon (200 IU/kg, Nevparin flakon, Mustafa Nevzat İlaç San. A.Ş. Mecidiyeköy, İstanbul – Türkiye) sonrası SMA'ya oklüzyon amacıyla abdominal aortadan çıktığı yerin hemen distalinden süperior mezenterik venin oklüzyonundan kaçınarak atravmatik mikrovasküler klemp (World Precision Instruments, Inc., Sarasota, Florida, USA - 14120) konuldu. Ayrıca süperior mezenterik arter (SMA) ve çölyak aksis arasındaki kollateral branşlarda oklüde edildi. Fakat inferior mezenterik arter (İMA) oklüde edilmedi.



Şekil-16 : Ratlarda SMA'ya mikrovasküler klemp konulması

Bu işlem ile terminal ileum, çekum ve sağ kolon iskemik hale getirildi. Mezenterik iskemi, mezenterik pulsasyon kaybı ve barsakların soluk renge dönmesi ile doğrulandı. Barsaklar karın boşluğuna yerleştirildikten sonra karın insizyonu 4/0 atravmatik ipek sütürlü (Boz Tıbbi Malzeme ve San. A.Ş. Ankara – Türkiye) ile aralıklı olarak kapatıldı. 60 dakikalık iskemi sonrası relaparotomi yapıldı ve SMA üzerindeki mikrovasküler klemp çıkartılıp 120 dakikalık reperfüzyon periyodu başlatıldı. Mezenterik reperfüzyon, pulsasyon ve rengin normale dönmesi ile doğrulandı. Barsaklar, daha sonra tekrar karın boşluğuna yerleştirilip karın insizyonu 4/0 atravmatik ipek sütürlü ile aralıklı olarak tekrar kapatıldı. Barsaklar iskemi/reperfüzyon süresince karın içersinde bırakıldı.

IV- ÇALIŞMA GRUPLARI

Çalışmaya alınan ratlar randomize olarak 5 gruba ayrıldı.

A-Sham grubu : 12 adet rat

B-Kontrol grubu : 12 adet rat (I/R grubu)

C-Tedavi grubu : 12 adet rat (I/R + Tempol grubu)

A) Sham Grubu: (n=12)

Sham grubunda yer alan 12 adet rat randomize olarak 6'şarlı 2 subgruba ayrıldı. Ratlara anestezi uygulandıktan sonra 24-gauge intraket kullanılarak kuyruk venası kateterize edildi.

i-Sham-A: (n=6)

Sham-A'daki ratlara kuyruk venasından 30 mg/ kg dozunda Evans Blue Dye intravenöz bolus enjekte edildi. 30 dakika sonra steril şartlarda laparotomi yapıp iskemi/reperfüzyon modeli oluşturmaksızın sadece SMA mobilize edilerek bırakıldı. Barsaklar karın boşluğuna yerleştirildikten sonra karın insizyonu 4/0 atravmatik ipek sütürler ile aralıklı olarak kapatılıp deney süresi kadar beklendi. Daha sonra sakrifiye edilen ratların akciğerleri ve terminal ileum segmenti alındı.

ii-Sham-B: (n=6)

Sham-B'deki ratlara kuyruk venasından Evans Blue Dye enjekte edilmedi. Steril şartlarda laparotomi yapıp iskemi/reperfüzyon modeli oluşturmaksızın sadece SMA mobilize edilerek bırakıldı. Barsaklar karın boşluğuna yerleştirildikten sonra karın insizyonu 4/0 atravmatik ipek sütürler ile aralıklı olarak kapatılıp deney süresi kadar beklendi. Daha sonra sakrifiye edilen ratların akciğerleri ve terminal ileum segmenti alındı.

B) I/R Grubu: (n=12)

Kontrol grubunda yer alan 12 adet rat randomize olarak 6'şarlı 2 subgruba ayrıldı. Ratlara anestezi uygulandıktan sonra 24-gauge intraket kullanılarak kuyruk venası kateterize edildi.

i-I/R-A: (n=6)

I/R-A'daki ratlara kuyruk venasından 30 mg/ kg dozunda Evans Blue Dye intravenöz bolus enjekte edildi. 30 dakika sonra steril şartlarda laparotomi yapıp iskemi/reperfüzyon modeli oluşturularak reperfüzyon periyodunun 120. dakikasında sakrifiye edilen ratların akciğerleri ve terminal ileum segmenti alındı.

ii-I/R-B: (n=6)

I/R-B'deki ratlara steril şartlarda laparotomi yapıp iskemi/reperfüzyon modeli oluşturularak reperfüzyon periyodunun 120. dakikasında sakrifiye edilip akciğerleri ve terminal ileum segmenti alındı.

C) I/R + Tempol Grubu : (n=12)

Tedavi grubunda yer alan 12 adet rat randomize olarak 6'şarlı 2 subgruba ayrıldı. Ratlara anestezi uygulandıktan sonra 24-gauge intraket kullanılarak kuyruk venası kateterize edildi.

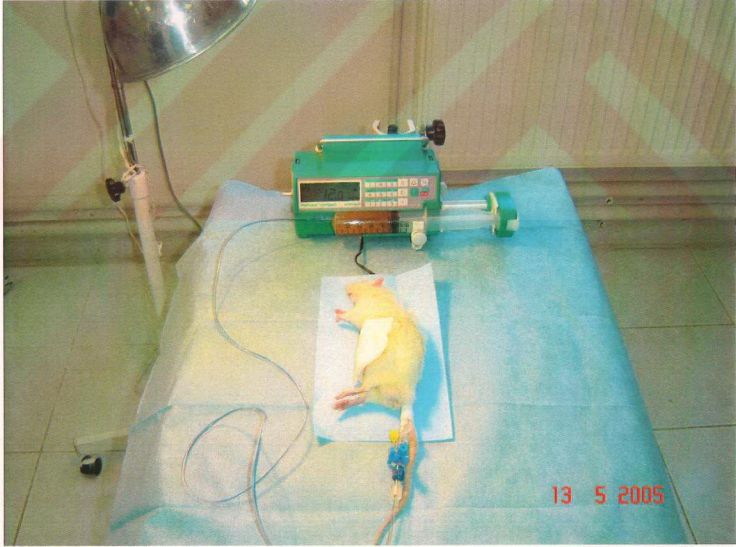
i-I/R + Tempol-A: (n=6)

I/R + Tempol-A'daki ratlara kuyruk venasından 30 mg/kg dozunda Evans Blue Dye intravenöz bolus enjekte edildi. 30 dakika sonra steril şartlarda laparotomi yapıp SMA'ya mikrovasküler klemp konuldu. İskemi periyodunun 55. dakikasında, yani reperfüzyon periyodunun başlamasından 5 dakika önce Tempol 30 mg/kg dozunda intravenöz bolus enjeksiyon ile verildi. İskemi periyodunun 60. dakikasında SMA'ya konulan mikrovasküler klemp çıkartıldı. Tempol, 120 dakikalık reperfüzyon periyodu boyunca 30 mg/kg/h dozunda bir perfüzör (Braun, Perfusor-

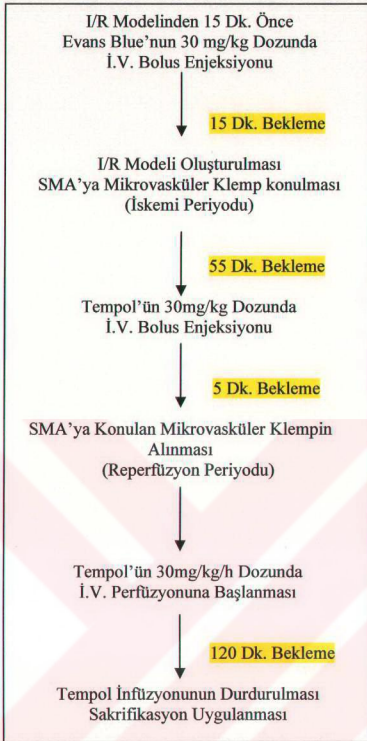
Compact, Germany) ile intravenöz perfüzyon şeklinde verilmeye devam edildi. Reperfüzyon periyodunun 120. dakikasında intravenöz perfüzyon işlemi durdurulup sakrifiye edilen ratların akciğerleri ve terminal ileum segmenti alındı.

ii- I/R + Tempol-B : (n=6)

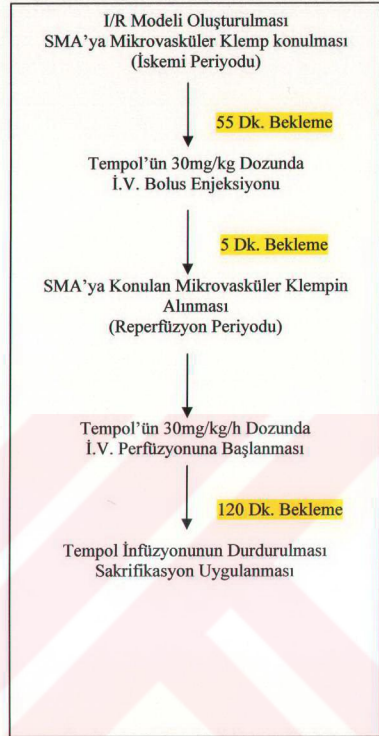
I/R + Tempol-B'deki ratlara steril şartlarda laparotomi yapıp SMA'ya mikrovasküler klemp konuldu. İskemi periyodunun 55. dakikasında, yani reperfüzyon periyodunun başlamasından 5 dakika önce Tempol 30 mg/kg dozunda intravenöz bolus enjeksiyon ile verildi. İskemi periyodunun 60. dakikasında SMA'ya konulan mikrovasküler klemp çıkartıldı. Tempol, 120 dakikalık reperfüzyon periyodu boyunca 30 mg/kg/h dozunda bir perfüzör (Braun, Perfusor-Compact, Germany) ile intravenöz perfüzyon şeklinde verilmeye devam edildi. Reperfüzyon periyodunun 120. dakikasında intravenöz perfüzyon işlemi durdurulup sakrifiye edilen ratların akciğerleri ve terminal ileum segmenti alındı.



Şekil-17 : Ratlarda Tempol'ün perfüzör ile kuyruk venasından intravenöz perfüzyon şeklinde verilmesi



Şekil-18: I/R+Tempol-A Grubu
Deney Protokolü Akış Şeması



Şekil-19: I/R+Tempol-B Grubu
Deney Protokolü Akış Şeması

Tablo-VII : Çalışmaya Alınan Rat Grupları

Grup-I	Sham grubu (n=12): I/R modeli oluşturmaksızın SMA mobilize edilip bırakıldı.
Grup-II	Kontrol grubu (n=12): I/R modeli oluşturuldu. 60 dk. İskemi periyodu, 120 dk. Reperfüzyon periyodu.
Grup-III	Tedavi grubu (n=12): I/R modeli oluşturuldu, İskemi periyodunun 55. dk.da 30 mg/kg Tempol intravenöz bolus enjeksiyon, sonra 120 dk. lık reperfüzyon periyodu boyunca 30 mg/kg/h Tempol intravenöz perfüzyon ile verildi.

V- DOKU ÖRNEKLERİNİN ALINMASI

Sham grubunda I/R modeli oluşturmaksızın sadece SMA mobilize edildikten sonra deney süresi sonunda, kontrol ve tedavi gruplarında ise I/R modeli oluşturulup reperfüzyon periyodunun 120. dakikasında ratlar servikal dislokasyon ile sakrifiye edildi. Sakrifikasyon sonrası ratların göğüs ve karın boşlukları açıldı. Evans Blue Dye (+) olan subgruplarda, uzak organda yaş/kuru ağırlık ve pulmoner mikrovasküler disfonksiyon tayini için sol akciğer, histopatolojik inceleme için ise sağ akciğer eksize edildi. Evans Blue Dye (+) olan subgruplarda, lokal organda yaş/kuru ağırlık ve histopatolojik inceleme için 2'şer cm'lik iki ayrı parça halinde terminal ileum segmenti eksize edildi. Evans Blue Dye (-) olan subgruplarda, uzak organda biyokimyasal MDA ve GSH tayini için sol akciğer, yaş/kuru ağırlık ve histopatolojik inceleme için ise sağ akciğer iki ayrı parça halinde eksize edildi. Evans Blue Dye (-) olan subgruplarda, lokal organda biyokimyasal MDA ve GSH tayini, yaş/kuru ağırlık ve histopatolojik inceleme için 2'şer cm'lik üç ayrı parça halinde terminal ileum segmenti eksize edildi.

VI- HİSTOPATOLOJİK İNCELEME

Akciğer ve terminal ileum doku örnekleri, % 10 nötral tamponlu formaldehid içerisinde fikse edildi. Fikse dokular, PAÜTF Patoloji A.D. Laboratuvarında önce dereceli etanolde dehidrate edilip (Shandon Pathcentre, UK) sonra parafine (Leica EG 1160, Germany) gömüldü. Kesitler 5 mikrometre kalınlığında kesilip (Sliding Microtome, Lecia RM 2265, Germany) xylene ile parafin uzaklaştırıldı. Sonra doku kesitleri ışık mikroskopunda (Olympus BX50, Japan) incelenmek üzere hematoxylin-eosin ile boyanıp, iki patolog tarafından kör bir şekilde yapılan histopatolojik incelemeye alındı.

Terminal ileum dokusundaki mukozal lezyonlar Chiu ve arkadaşları tarafından tanımlanan 0 – 5 arası değişen bir skalaya göre derecelendirildi (Tablo-VIII) (62).

Tablo-VIII : İleum Dokusunda Mukozal Hasar Skoru (Chiu Skorlaması)

Grade-0	Normal mukozal villus
Grade-1	Subepitelyal Gruenhagen aralığının oluşması, genellikle villusun apeksinde, sıklıkla kapiller konjesyonla birlikte
Grade-2	Subepitelyal aralığın büyümesi ve epitelyal tabakanın lamina propria' dan orta derecede ayrışması
Grade-3	Yoğun epitelyal ayrışma ve birkaç çıplaklaşmış villus
Grade-4	Çıplaklaşmış villus ve açığa çıkmış dilate kapillerler
Grade-5	Lamina propria' nın bozulması ve parçalanması, hemoraji ve ülserasyon

Akciğer dokusundaki histolojik değişiklikler kantitatif biçimde doku hasarı şiddet indeksi olarak incelendi. Akciğer doku kesitlerinde rasgele seçilmiş 10 büyük büyütme alanı interstisyel polimorfonükleer nötrofil (PMN) sayısı sayılıp ortalaması alınarak *PMN sekestrasyonu* hesaplandı. Akciğer doku kesitlerinde *vasküler konjesyon* varlığı 0-3 arası değerler verilerek hesaplandı (Tablo-IX) (63). Akciğer doku kesitlerinde perialveoler konjesyon, mononükleer hücre infiltrasyonu, interstisyel ödem, interstisyel kalınlaşma, intraalveoler ödem-eksudasyon-fibrin birikimi- polimorfonükleer nötrofil (PMN) sekestrasyonuna 0-3 arası değerler verilerek toplamı alınıp *akut akciğer hasar skoru* hesaplandı (Tablo-X).

Tablo-IX : Akciğer Vasküler Konjesyon Skoru

Grade - 0	Vasküler konjesyon yok
Grade - 1	Hafif derecede vasküler konjesyon var
Grade - 2	Orta derecede vasküler konjesyon var
Grade - 3	Şiddetli derecede vasküler konjesyon var, ancak alveolar hemoraji yok
Grade - 4	Şiddetli derecede vasküler konjesyon var, ancak birlikte alveolar hemorajide var

Tablo-X : Akut Akciğer Hasar Skoru

Perialveoler konjesyon	0	Yok
	1	Hafif derecede var
	2	Orta derecede var
	3	Şiddetli derecede var
Mononükleer hücre infiltrasyonu	0	Yok
	1	İnterstisyumda dağınık tarzda tek tük
	2	Az sayıda lenfoid agregat oluşturmuş
	3	Çok sayıda lenfoid agregat oluşturmuş
İnterstiyel ödem	0	Yok
	1	Hafif derecede var
	2	Orta derecede var
	3	Şiddetli derecede var
İnterstiyel kalınlaşma	0	Yok
	1	Hafif derecede var
	2	Orta derecede var
	3	Şiddetli derecede var
İntraalveoler ödem, eksudasyon, fibrin birikimi, polimorfonükleer nötrofil (PMN) sekestrasyonu	0	Yok
	1	Hafif derecede var
	2	Orta derecede var
	3	Şiddetli derecede var

VII- BİYOKİMYASAL İNCELEMELER

Biyokimyasal MDA ve GSH tayini için sakrifikasyondan hemen sonra alınan akciğer ve terminal ileum doku örnekleri, -196°C 'deki sıvı azota daldırılıp çıkartıldıktan sonra analizin yapılacağı güne kadar -78°C 'deki derin dondurucu içerisinde muhafaza edildi. Sonra derin dondurucudan çıkarılan akciğer ve terminal ileum doku örnekleri, -80°C 'deki kuru buz konteynerine konuldu. Soğuk zincir ile biyokimyasal parametrelerin çalışılacağı Aydın Adnan Menderes Üniversitesi Tıp Fakültesi Hastanesi Biyokimya A.D. Laboratuvarına gönderildi.

A- MALONDİALDEHİD (MDA) ÖLÇÜMÜ

Lipid peroksidasyon ürünü olarak doku malondialdehid (MDA) düzeyi, Ohkawa ve arkadaşlarının yöntemine göre, malondialdehidin (MDA) asidik ortamda

tiyobarbitürik asitle oluşturduğu rengin 532 nm'de absorbansının ölçülmesi prensibine dayanarak tayin edildi (64). 0,5 ml örnek üzerine 0,2 ml % 8,1 sodyum dodesil sulfat, 1,5 ml pH'sı 3,5 olan % 20 asetik asit ve 1,5 ml % 0,8 tiyobarbitürik asit solüsyonu eklenerek 95°C'de 60 dakika ısıtıldı. Soğutulduktan sonra 4000 rpm'de 10 dakika santrifüj edildi. Üst tabakanın absorbansı 532 nm'de ölçüldü. Standart olarak 1,1, 3,3- tetraetoksipropan kullanılarak çizilen kalibrasyon grafiğinde numunedeki MDA miktarı hesaplandı ve nmol/gr.doku olarak ifade edildi (65).

B- REDÜKTE GLUTATYON (GSH) ÖLÇÜMÜ

Doku redükte glutatyon (GSH) ölçümü, antioksidan savunmada önemli bir mediatör olan redükte glutatyonun (GSH) ölçümünü amaçlamaktadır. Moron ve arkadaşlarının kolorimetrik ölçüm yöntemine göre doku homojenatlarından elde edilen süpernatandaki redükte glutatyonun (GSH), DTNB [5,5'-Ditiyobis (2-nitrobenzoik asit)] ile renklendirilmesi temeline dayanarak oluşan kompleks, 412 nm'de spektrofotometre ile ölçüldü. Çalışmada metafosforik asit, disodyum etilendiamintetraasetik asid (EDTA), NaCl, Na₂ HPO₄, sodyum sitrat, DTNB [5,5'-Ditiyobis (2-nitrobenzoik asit)] (Ellman's reagent), homojenazatör, çözeltilerin hazırlanması için çeşitli büyüklüklerde mezür, erlen, beher, santrifüj tüpü, 10-100 ve 100-1000 µL'lik otomatik pipet, tek kullanımlık pipet uçları, santrifüj cihazı ve spektrofotometre kullanıldı. 0,15 N KCl tamponu hazırlandı. Bu çözelti içine 1 gr doku 10 ml'ye tamamlanacak şekilde alınan dokular homojenize edildi. 1,67 g metafosforik asit, 0,2 g disodyum etilendiamintetraasetik asit (EDTA), 30 g NaCl 100 ml distile suda çözüldü. 1 gr sodyum sitrat ve 40 mg DTNB [5,5'-Ditiyobis (2-nitrobenzoik asit)] 100 ml distile suda çözüldü. 10,65 g Na₂ HPO₄ 250 ml distile suda çözüldü. 0,5 ml homojenata 1,5 ml KCl ve 3 ml protein çöktürme solüsyonunu eklendikten sonra 1000 g'de 10 dakika santrifüj edildi. Santrifüj sonrası 0,5 ml süpernatana, 2 ml fosfat tamponu ve 0,5 ml DTNB [5,5'-Ditiyobis (2-nitrobenzoik asit)] solüsyonu eklendi. Sonra spektrofotometrik olarak örnek ve standartların absorbansları köre karşı 412 nm'de ölçüldü. Herbir numunedeki redükte glutatyon (GSH) içeriği, mg / gram.doku ağırlığı olarak ifade edildi. (66,67).

VIII- I/R'a BAĞLI MİKROVASKÜLER DİSFONKSİYONUN ANALİZİ

İntestinal reperfüzyona bağlı pulmoner mikrovasküler disfonksiyon *in vivo* plazma proteinlerinin akciğere ekstrasvazasyonunu ölçerek incelenir (68, 69). Evans Blue Dye (EBD) hızlıca albümine bağlanır ve yıllardır inflamatuvar doku hasarı modellerinde protein ekstrasvazasyon göstergesi olarak kullanılmaktadır.

I/R veya Sham indüksiyonundan 15 dakika önce 30 mg/kg EBD kuyruk veninden intravenöz enjekte edildi. Reperfüzyon tamamlandığında atmakta olan sağ ventrikül içine nazikçe 10 ml serum fizyolojik enjekte edilerek kan pulmoner damarlardan uzaklaştırıldı. Sonra sol akciğer eksize edildi, tartıldı ve 5 ml formamide içersine konuldu. Doku 30 saniye homojenize edildikten sonra formamide içersinde 16 saat 37°C'de enkübe edildi ve süpernatantı +4°C'de 45 dakika 14000_g'de santrifüj edilerek ayrıldı. Ekstre içersindeki boya konsantrasyonu 620 nm'de spektrofotometrik olarak ölçüldü. Herbir örneğin Evans Blue içeriği, µg.boya / gram.kuru doku ağırlığı olarak ifade edildi. Kuru doku ağırlığı fonksiyonu olarak sonuçlarımızın ifadesinde ödem formasyonuna bağlı değişikliklerin eksik tahmin edilmesinden kaçınıldı.

IX- ORGAN YAŞ/KURU AĞIRLIK ORANLARI

Pulmoner ve intestinal ödem formasyonunun ayrı bir ölçüsü olarak organ yaş/kuru ağırlık oranları belirlendi (70, 71). Ratlar sakrifiye edildikten sonra Evans Blue Dye (+) olan subgruplarda sol akciğer ve 2 cm'lik terminal ileum segmenti, Evans Blue Dye (-) olan subgruplarda sağ akciğer ve 2 cm'lik terminal ileum segmenti eksize edildi, önceden darası alınmış tabaklar üzerinde tartıldı ve sonra sıcak etüve konuldu. Organlar 60°C'de 5 gün sıcak etüvede inkübasyon sonrası tekrar tartıldı. Kurutma öncesi ve sonrası organ ağırlıklarına göre yaş/kuru ağırlık oranı hesaplandı.

X- İSTATİSTİKSEL METOD

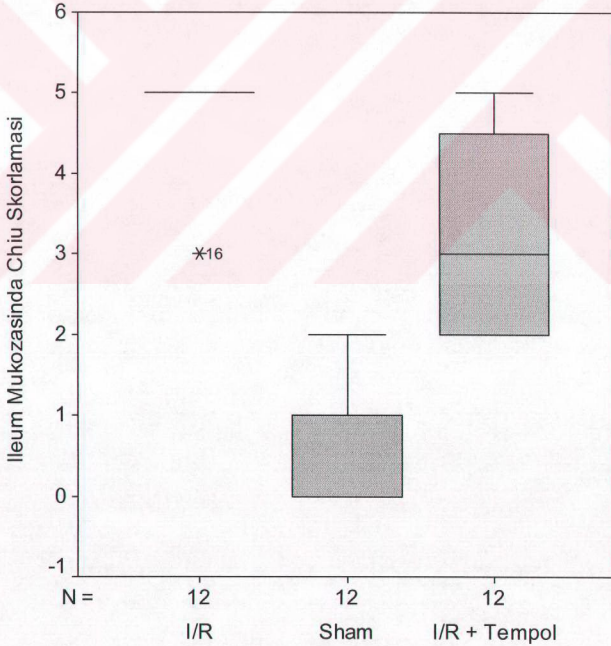
Bu çalışmadaki değerler ortalama $\pm$ ortalama standart hata olarak verilmiştir. İstatistiksel analizler için SPSS 11.5 bilgisayar programı kullanılmıştır. Gruplar arası çoklu karşılaştırmalar tek yönlü varyans analizi (ANOVA) ve Post Hoc Tukey testi kullanılarak yapılmıştır. Gruplar arası farklar için $p<0,05$ değeri istatistiksel olarak anlamlı kabul edilmiştir.

BULGULAR

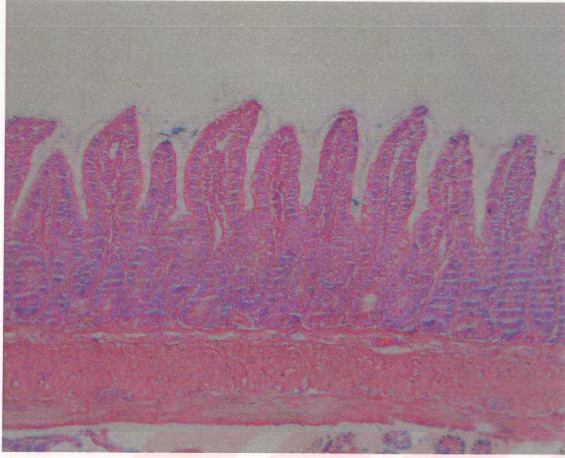
I-HİSTOPATOLOJİK İNCELEMELER

A- İleum hasarı :

İleum dokusunda mukozal hasar açısından (Chiu skorlaması) gruplar arasında anlamlı fark bulunmuştur ($F=75,69$, $df=2$, $p=0,0001$). I/R hasarı, ileum dokusunda mukozal lezyonları sham grubuna göre anlamlı olarak artırmıştır ($p=0,0001$). Tempol, I/R hasarını anlamlı derecede azaltmıştır ($p=0,0001$). Ortalama ileum dokusunda mukozal hasar (Chiu skorlaması), I/R grubunda $4,83 \pm 0,16$, sham grubunda $0,50 \pm 0,19$ ve I/R + Tempol grubunda $3,66 \pm 0,39$ olarak bulunmuştur (Şekil-24).



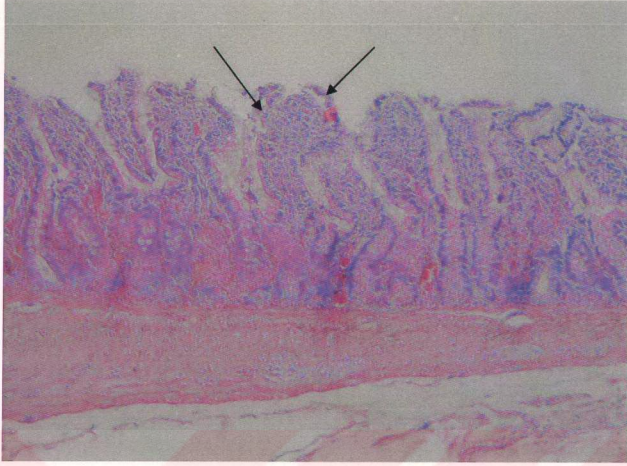
Şekil-20 : Chiu skorlamasının gruplar arasındaki ortalama değeri



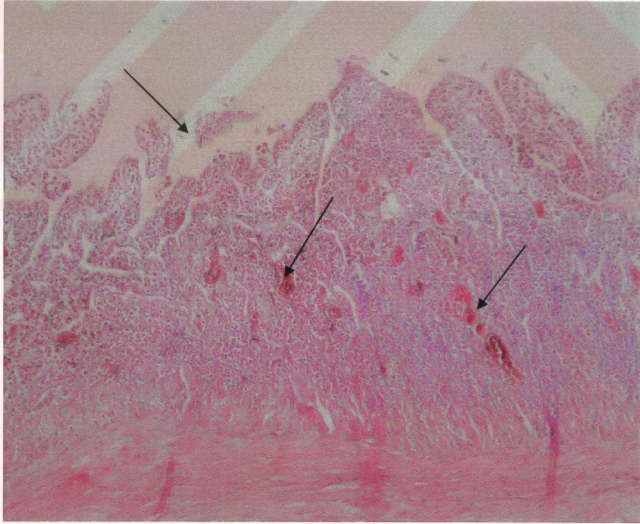
Şekil-21 : İleum dokusunda Chiu skoru Grade-0 normal mukozal villus yapısının mikroskopik görüntüsü (HE x 100)



Şekil-22 : İleum dokusunda Chiu skoru Grade-1 mukozal lezyonun mikroskopik görüntüsü ; Subepitelyal Gruenhagen aralığı (Oklar) (HE x 100)



Şekil-23 : İleum dokusunda Chiu skoru Grade-2 mukozal lezyonun mikroskopik görüntüsü ; Subepitelyal aralığın büyümesi (Okular) (HE x 100)

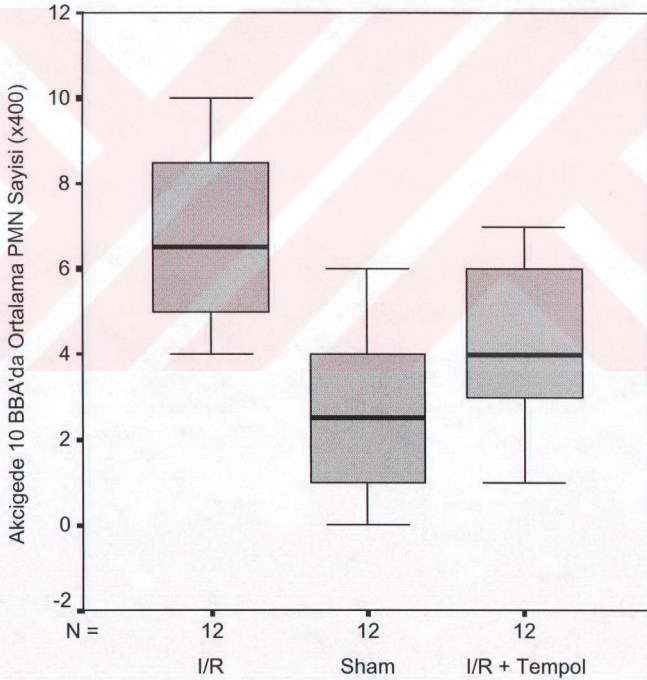


Şekil-24 : İleum dokusunda Chiu skoru Grade-5 mukozal lezyonun mikroskopik görüntüsü ; Lamina propria' nın bozulması ve parçalanması, hemoraji ve ülserasyon (Okular) (HE x 100)

B- Akciğer hasarı :

i- Akciğer nötrofil sekestrasyonu :

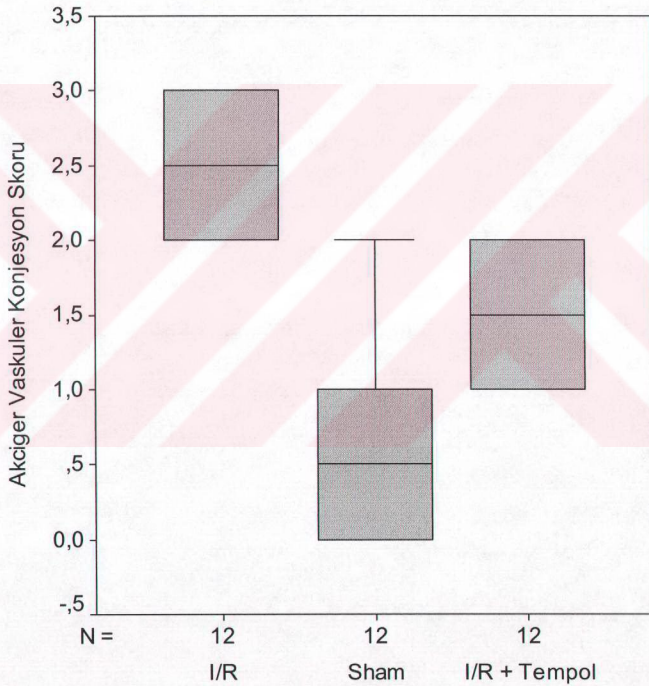
Akciğer nötrofil sekestrasyonu açısından gruplar arasında anlamlı fark bulunmuştur ($F=15,07$, $df=2$, $p=0,0001$). I/R hasarı, akciğer nötrofil sekestrasyonunu sham grubuna göre anlamlı olarak artırmıştır ($p=0,0001$). Tempol, akciğer nötrofil sekestrasyonunu I/R grubuna göre anlamlı derecede azaltmıştır ($p=0,01$). Ortalama akciğer nötrofil sekestrasyonu I/R grubunda $6,66 \pm 0,58$, sham grubunda $2,58 \pm 0,49$ ve I/R + Tempol grubunda $4,33 \pm 0,49$ olarak bulunmuştur (Şekil-25).



Şekil-25 : Akciğer nötrofil sekestrasyonun gruplar arasındaki ortalama değeri

ii-Akciğer vasküler konjesyonu :

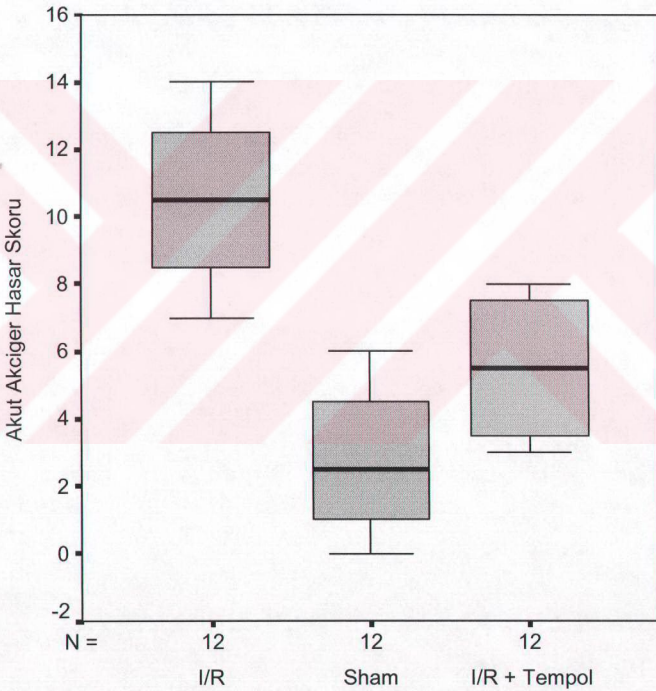
Akciğer vasküler konjesyonu açısından gruplar arasında anlamlı fark bulunmuştur ($F=33,33$, $df=2$, $p=0,0001$). I/R hasarı, akciğer vasküler konjesyonunu sham grubuna göre anlamlı olarak artırmıştır ($p=0,0001$). Tempol, akciğer vasküler konjesyonunu I/R grubuna göre anlamlı derecede azaltmıştır ($p=0,0001$). Ortalama akciğer vasküler konjesyonu I/R grubunda $2,50 \pm 0,15$, sham grubunda $0,58 \pm 0,19$ ve I/R + Tempol grubunda $1,50 \pm 0,15$ olarak bulunmuştur (Şekil-26).



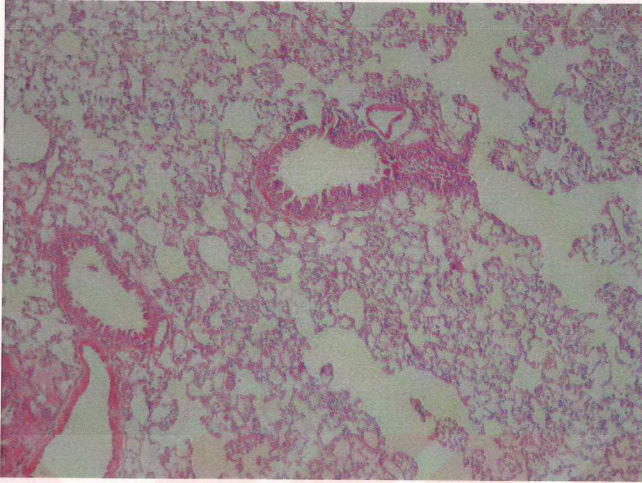
Şekil-26 : Akciğer vasküler konjesyon skorunun gruplar arasındaki ortalama değeri

iii-Akut akciğer hasar skoru :

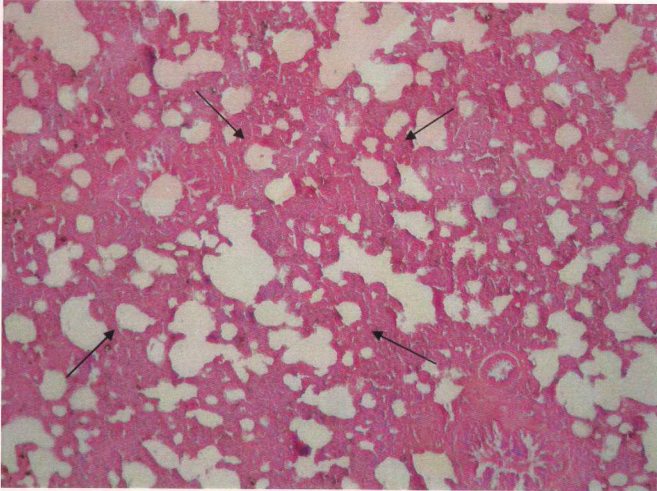
Akut akciğer hasar skoru açısından gruplar arasında anlamlı fark bulunmuştur ($F=39,14$, $df=2$, $p=0,0001$). I/R hasarı, akut akciğer hasar skorunu sham grubuna göre anlamlı olarak artırmıştır ($p=0,0001$). Tempol, akut akciğer hasar skorunu I/R grubuna göre anlamlı derecede azaltmıştır ($p=0,0001$). Ortalama akut akciğer hasar skoru I/R grubunda $10,41 \pm 0,65$, sham grubunda $2,91 \pm 0,59$ ve I/R + Tempol grubunda $5,50 \pm 0,57$ olarak bulunmuştur (Şekil-27).



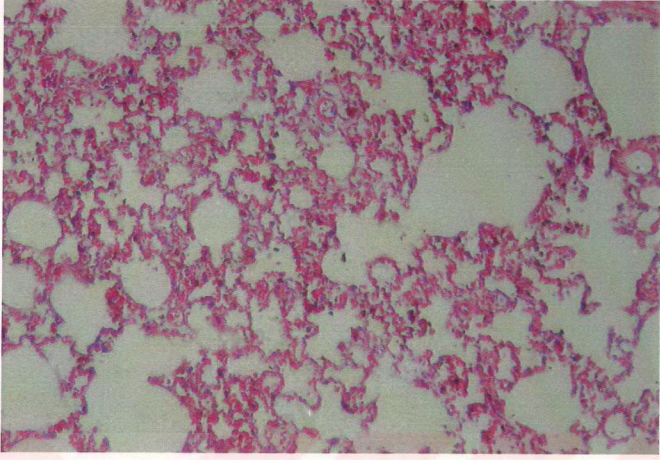
Şekil-27 : Akciğer hasar skorunun gruplar arasındaki ortalama değeri



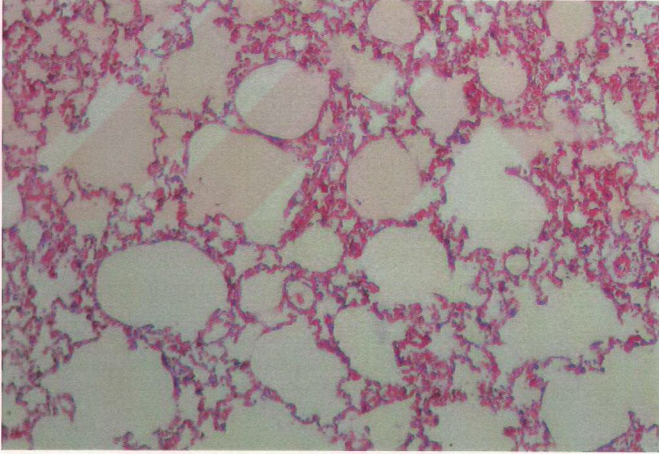
Şekil-28 : Sham grubuna ait akciğer parankim dokusunun mikroskopik görüntüsü (HE x 100)



Şekil-29 : I/R grubuna ait akciğer parankim dokusunun mikroskopik görüntüsü ; İnterstisyel ödem ve interstisyel kalınlaşma alanları (Oklar) (HE x 100)



Şekil-30 : I/R + Tempol grubuna ait akciğer parankim dokusunun mikroskopik görüntüsü (HE x 100)



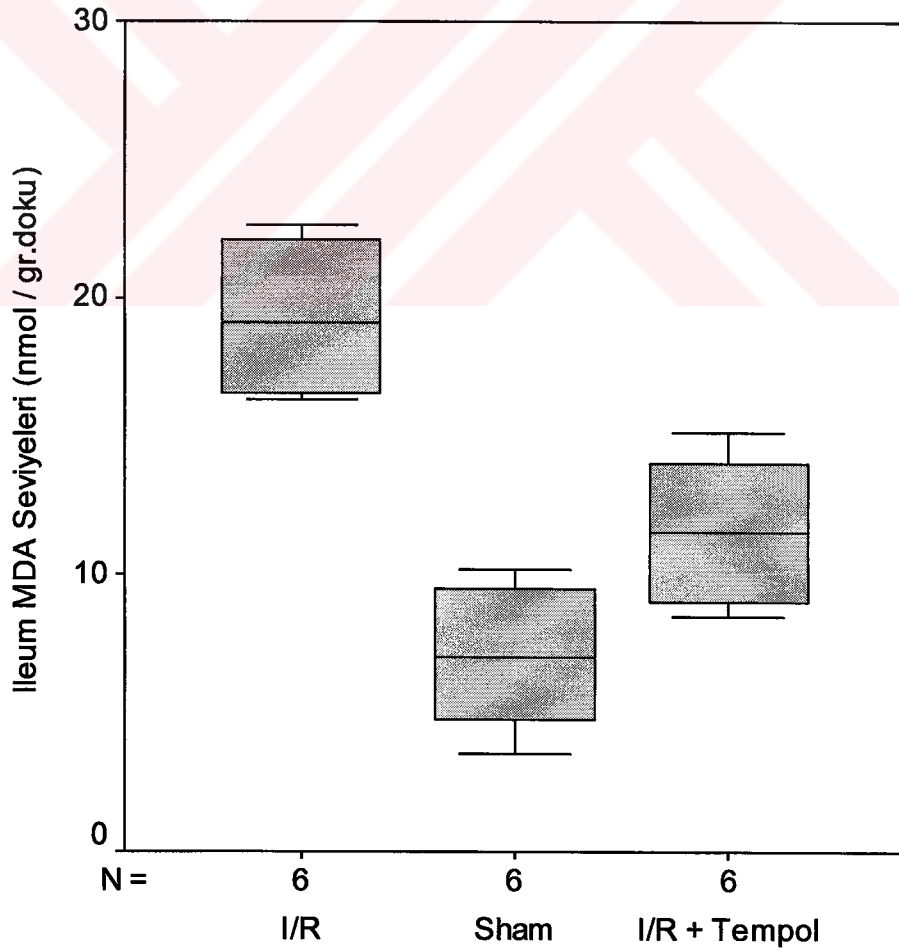
Şekil-31 : I/R + Tempol grubuna ait akciğer parankim dokusunun mikroskopik görüntüsü (HE x 100)

II- BİYOKİMYASAL İNCELEMELER

A- İleum Dokusu :

i- İleum MDA seviyeleri :

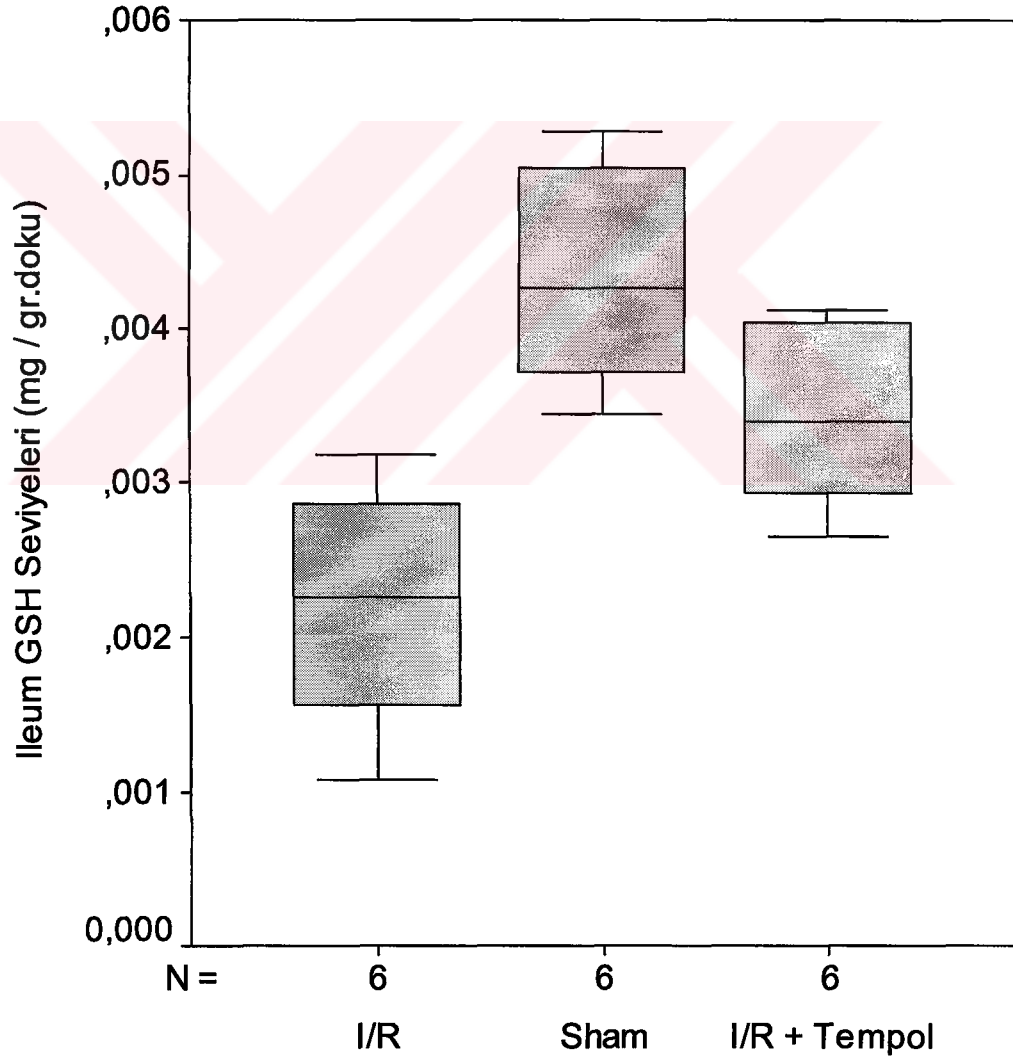
İleum dokusunda MDA seviyeleri açısından gruplar arasında anlamlı fark bulunmuştur ($F=28,72$, $df=2$, $p=0,0001$). I/R hasarı, ileum dokusunda MDA seviyelerini sham grubuna göre anlamlı olarak artırmıştır ($p=0.0001$). I/R + Tempol grubunda, akciğer dokusunda MDA seviyeleri I/R grubuna göre anlamlı derecede azalmıştır ($p=0,001$). Ortalama ileum dokusunda MDA seviyeleri, I/R grubunda $19,29 \pm 1,19$, sham grubunda $6,99 \pm 1,20$ ve I/R + Tempol grubunda $11,64 \pm 1,07$ olarak bulunmuştur (Şekil-32).



Şekil-32 : İleum MDA seviyelerinin gruplar arasındaki ortalama değeri

ii- İleum GSH seviyeleri :

İleum dokusunda GSH seviyeleri açısından gruplar arasında anlamlı fark bulunmuştur ($F=11,40$, $df=2$, $p=0,001$). I/R hasarı, ileum dokusunda GSH seviyelerini sham grubuna göre anlamlı olarak azaltmıştır ($p=0.0001$). Tempol, ileum dokusunda GSH seviyelerini anlamlı derecede artırarak I/R hasarını azaltmıştır ($p=0,008$). Ortalama ileum dokusunda GSH seviyeleri, I/R grubunda $0,0022\pm0,00036$, sham grubunda $0,0043\pm0,00032$ ve I/R + Tempol grubunda $0,0034\pm0,00026$ olarak bulunmuştur (Şekil-33).

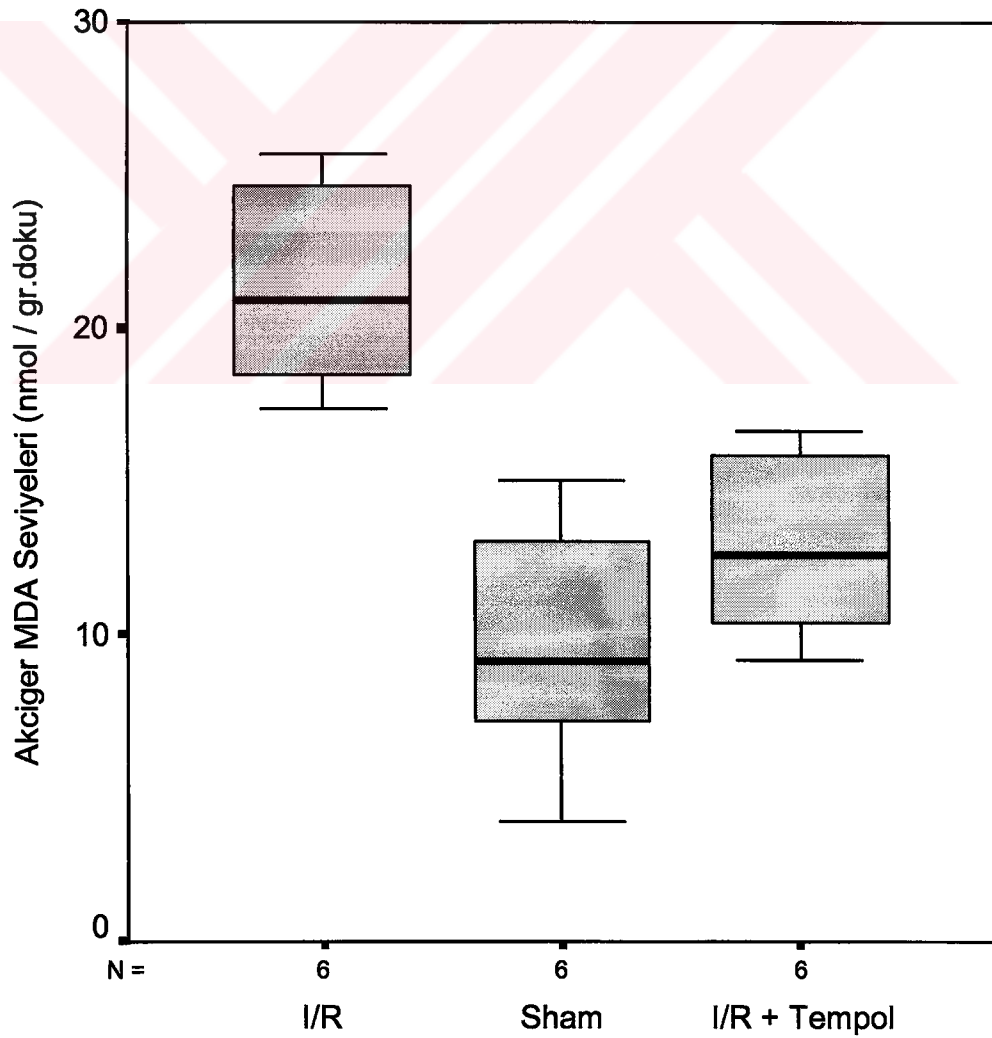


Şekil-33 : İleum GSH seviyelerinin gruplar arasındaki ortalama değeri

B- Akciğer Dokusu :

i- Akciğer MDA seviyeleri :

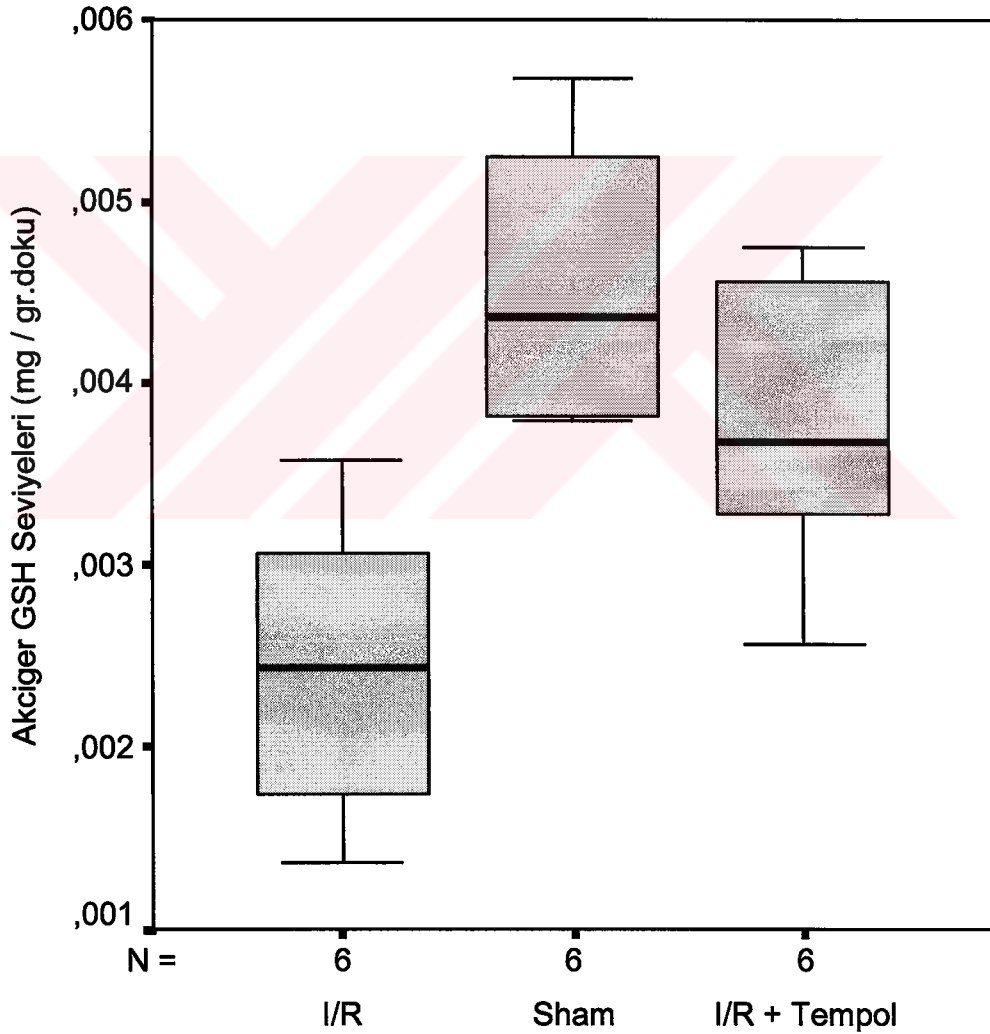
Akciğer dokusunda MDA seviyeleri açısından gruplar arasında anlamlı fark bulunmuştur ($F=17,29$, $df=2$, $p=0,0001$). I/R hasarı, akciğer dokusunda MDA seviyelerini sham grubuna göre anlamlı olarak artırmıştır ($p=0,0001$). I/R + Tempol grubunda, akciğer dokusunda MDA seviyeleri I/R grubuna göre anlamlı derecede azalmıştır ($p=0,003$). Ortalama akciğer dokusunda MDA seviyeleri, I/R grubunda $21,34 \pm 1,48$, sham grubunda $9,56 \pm 1,64$ ve I/R + Tempol grubunda $12,88 \pm 1,22$ olarak bulunmuştur (Şekil-34).



Şekil-34 : Akciğer MDA seviyelerinin gruplar arasındaki ortalama değeri

ii- Akciğer GSH seviyeleri :

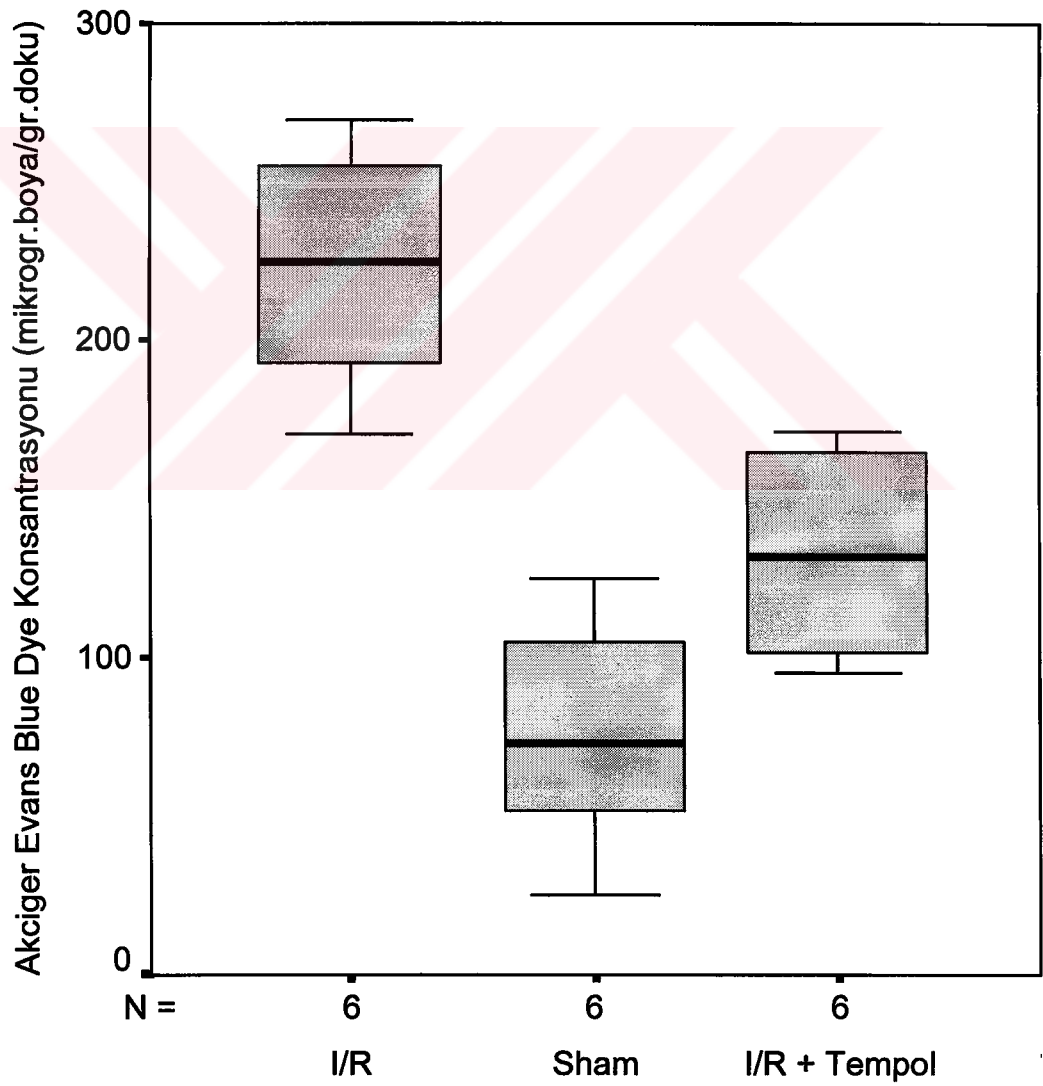
Akciğer dokusunda GSH seviyeleri açısından gruplar arasında anlamlı fark bulunmuştur ($F=10,27$, $df=2$, $p=0,002$). I/R hasarı, akciğer dokusunda GSH seviyelerini sham grubuna göre anlamlı olarak azaltmıştır ($p=0,001$). Tempol, akciğer dokusunda GSH seviyelerini anlamlı derecede artırarak I/R hasarını azaltmıştır ($p=0,034$). Ortalama akciğer dokusunda GSH seviyeleri, I/R grubunda $0,0024 \pm 0,00035$, sham grubunda $0,0045 \pm 0,00031$ ve I/R + Tempol grubunda $0,0037 \pm 0,00033$ olarak bulunmuştur (Şekil-35).



Şekil-35 : Akciğer GSH seviyelerinin gruplar arasındaki ortalama değeri

III- PULMONER MİKROVASKÜLER DİSFONKSİYON ANALİZİ

Akciğer Evans blue konsantrasyonu açısından gruplar arasında anlamlı fark bulunmuştur ($F=23,46$, $df=3$, $p=0,0001$). I/R hasarı, pulmoner mikrovasküler disfonksiyonu sham grubuna göre anlamlı olarak artırmıştır ($p=0,0001$). Tempol, pulmoner mikrovasküler disfonksiyonu I/R grubuna göre anlamlı derecede azaltmıştır ($p=0,022$). Ortalama akciğer Evans blue konsantrasyonu I/R grubunda $222,79 \pm 16,96$, sham grubunda $75,40 \pm 14,71$ ve I/R + Tempol grubunda $132,63 \pm 14,20$ olarak bulunmuştur (Şekil-36).

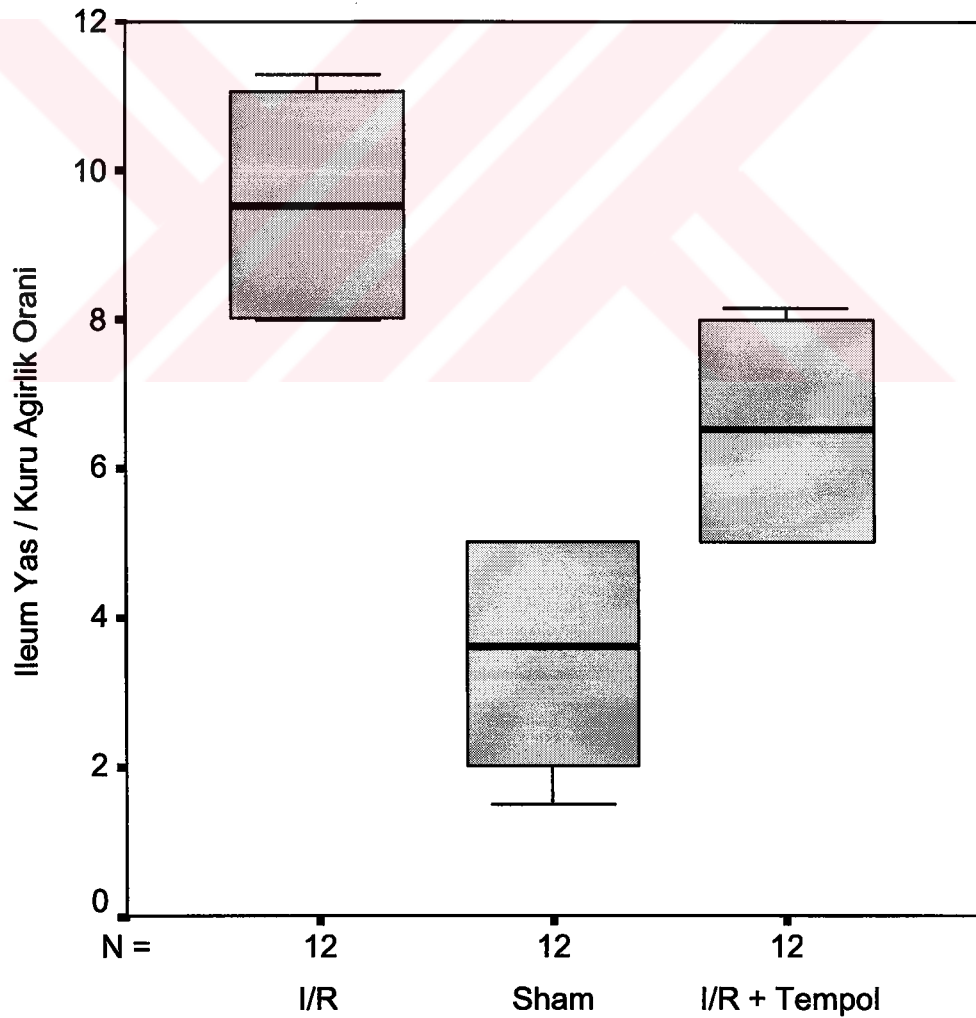


Şekil-36 : Akciğer Evans blue konsantrasyonunun gruplar arasındaki ortalama değeri

IV- ORGAN YAŞ/KURU AĞIRLIK ORANLARI

A- İleum Dokusu Yaş/Kuru Ağırlık Oranı :

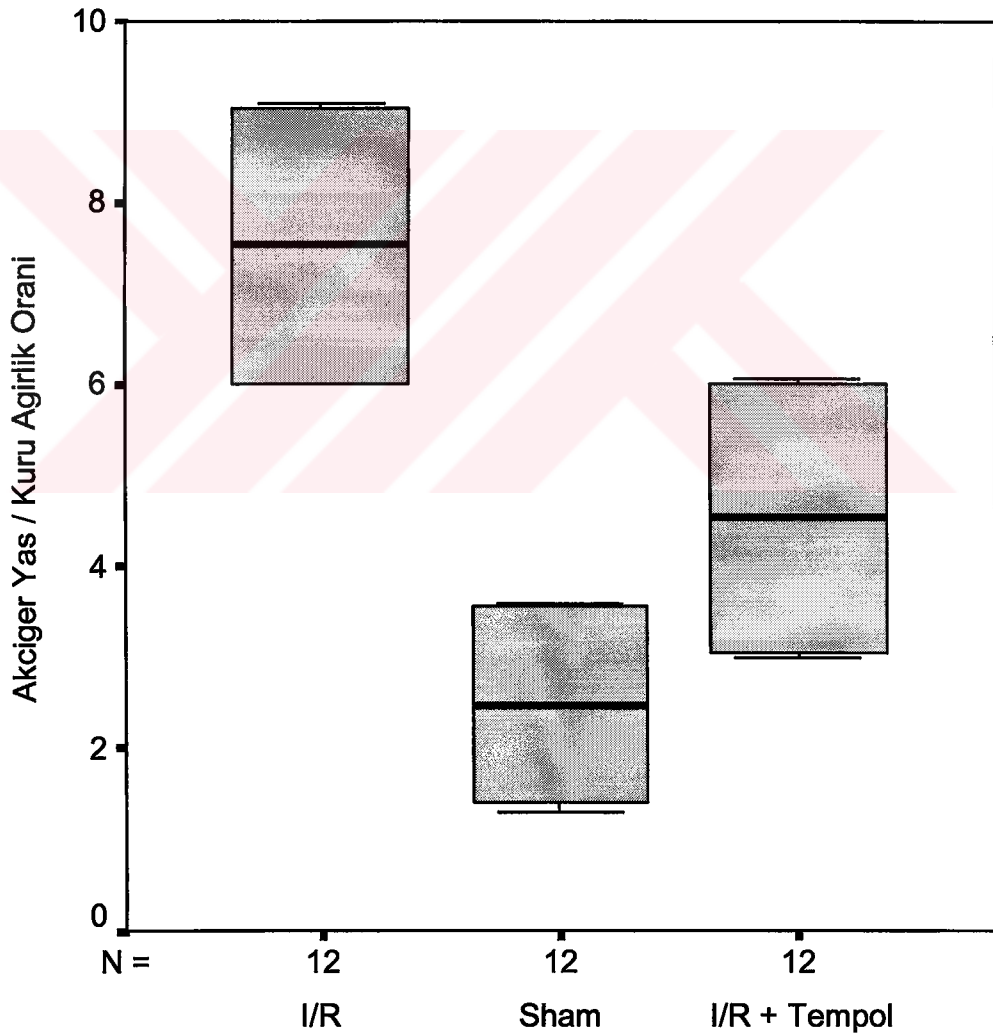
İleum dokusunda yaş/kuru ağırlık oranı açısından gruplar arasında anlamlı fark bulunmuştur ($F=43,57$, $df=2$, $p=0,0001$). I/R hasarı, ileum dokusunda yaş/kuru ağırlık oranını sham grubuna göre anlamlı olarak artırmıştır ($p=0,0001$). Tempol, I/R hasarı sonrası ileum dokusunda yaş/kuru ağırlık oranını I/R grubuna göre anlamlı derecede azaltmıştır ($p=0,0001$). Ortalama ileum dokusunda yaş/kuru ağırlık oranı, I/R grubunda $9,55 \pm 0,46$, sham grubunda $3,48 \pm 0,45$ ve I/R + Tempol grubunda $6,51 \pm 0,45$ olarak bulunmuştur (Şekil-37).



Şekil-37 : İleum dokusu yaş/kuru ağırlık oranının gruplar arasındaki ortalama değeri

B- Akciğer Dokusu Yaş/Kuru Ağırlık Oranı :

Akciğer dokusunda yaş/kuru ağırlık oranı açısından gruplar arasında anlamlı fark bulunmuştur ($F=37,53$, $df=2$, $p=0,0001$). I/R hasarı, akciğer dokusunda yaş/kuru ağırlık oranını sham grubuna göre anlamlı olarak artırmıştır ($p=0,0001$). Tempol, I/R hasarı sonrası akciğer dokusunda yaş/kuru ağırlık oranını I/R grubuna göre anlamlı derecede azaltmıştır ($p=0,0001$). Ortalama ileum dokusunda yaş/kuru ağırlık oranı, I/R grubunda $7,52 \pm 0,45$, sham grubunda $2,47 \pm 0,32$ ve I/R + Tempol grubunda $4,52 \pm 0,44$ olarak bulunmuştur (Şekil-38).



Şekil-38 : Akciğer dokusu yaş/kuru ağırlık oranının gruplar arasındaki ortalama değeri

TARTIŞMA

İskemi/reperfüzyona (I/R) bağlı mikrovasküler disfonksiyon, günümüz modern tıbbında her geçen gün artan sayıda uygulanan trombolitik tedaviler, akut mezenterik arteriyel oklüzyonda yapılan embolektomiler, ince barsak transplantasyonu gibi çeşitli organ nakilleri, koroner anjioplastiler, kardiyopulmoner bypass, aorta cross klemp konulması, torasik ve abdominal aort cerrahisi gibi çeşitli standart tıbbi ve cerrahi müdahaleler sırasında rastlanılan potansiyel olarak ciddi bir sorun olarak kabul edilmektedir. Doku reperfüzyonunun katastrofik bir sonucuda iskemik hasara katılmayan organlarda da hasarın gelişmesidir. Bugün bilindiği gibi, multipl organ disfonksiyon sendromu (MODS), hem barsak, karaciğer ve iskelet kası reperfüzyonu hem de aortik oklüzyon-reperfüzyon ve sirkülatuvar şokun belgelendirilmiş bir sonucudur. Reperfüzyon hasarının omurgasını oluşturan serbest oksijen radikali kaynaklı hücre zedelenmesini azaltmak ve/veya önlemek üzere bugün serbest oksijen radikallerini hedef alan çok çeşitli deneysel I/R modelleri üzerinde çalışılmaktadır.

Tempol (4 – hidroksi - 2, 2, 6, 6 – tetrametilpiperidin – *N* - oksil), elektron spin rezonans spektroskopide geniş çapta kullanılan spin label Tempo'nun suda çözünen bir analogudur. Tempol, biyolojik membranları geçen düşük moleküler ağırlıklı (moleküler ağırlığı, 172 Dalton) stabil bir piperidin nitroksid'tir (3). Tempol'ün süperoksid anyonlarının etkilerini *in vitro* azalttığını belgeleyen pekçok çalışma vardır. Tempol'ün Fenton reaksiyonunda hücre içi ferröz demir seviyelerini düşürerek meydana gelen hidroksil radikallerinin oluşumunu azalttığı da ileri sürülmüştür. Tempol'ün hücre içinde H_2O_2 'e bağlı mitokondriyal solunumda bozulmayı konsantrasyon bağımlı bir şekilde azalttığı gösterilmiştir (53). 1999'da, bu nedenle Tempol'ün koruyucu etkilerinin, bu stabil nitroksid radikalın hücre içi süperoksid anyonlarının özellikle hidroksil radikallerinin temizleyicisi olarak işlev görebilmesine bağlı olduğu ileri sürülmüştür (53). Tempol, çok fazla molar peroksinitrit varlığında fenolik bileşiklerin peroksinitrit aracılı nitrasyonunu inhibe ettiğinden katalitik benzeri bir mekanizmayı düşündürür. Tempol verilmesi biyolojik sıvılarda tempol birikimine yol açar ve DNA zincir kırıklarını önler (55). Yakın zamanda, Tempol'ün kültüre ekilmiş insan hücrelerinde H_2O_2 'e bağlı PARP

(poli(adenozin 5' - difosfat riboz) aktivitesindeki artışı önlediği bulunmuştur (3). Tempol'ün NO etkisini arttırdığı konusunda da kanıtlar vardır. Tempol'ün bazı yararlı etkilerinin, MCP-1 gibi kemokinlerin veya IL-6 gibi pro-inflamatuvar sitokinlerin oluşumunun tempolle önlenmesine ikincil olduğu görüşünde hakimdir. Tempol'ün, renal sempatik sinir aktivitesi, ortalama arteriyel kan basıncı ve kalp hızında doza bağlı düşüşlere sebep olduğu gösterilmiştir.

Bu çalışma ratlarda intestinal I/R hasarına bağlı lokal ve uzak organ hasarında Tempol'ün koruyucu etkisi olduğunu göstermiştir. Tempol ile I/R alanında yapılan çalışmalarda, Tempol'ün myokard, böbrek, beyin, karaciğer, ince barsak ve cilt gibi organ ve dokularda koruyucu etkisinin olduğu gösterilmiştir (3). Ayrıca Tempol'ün deneysel artrit, kolit, plörezi, hemorajik şok, multipl organ disfonksiyon sendromu (MODS), intraperitoneal sepsis modellerinde koruyucu etkisinin olduğu da gösterilmiştir. Bu çalışmalardan farklı olarak bizim çalışmamız intestinal I/R sonrası uzak bir organ olan akciğerde meydana gelen hasarın Tempol ile azaltıldığını göstermiştir. Bu konuyla ilgili olarak yaptığımız literatür taramasında benzer bir model ile yapılan herhangi bir çalışmaya rastlamadık.

Serbest oksijen radikallerinin intestinal I/R patofizyolojisine katkıda bulunduğu konusunda yeterince kanıt olmasına karşın, çeşitli antioksidanlarla müdahalelerinin etkisi sınırlı olmuştur. Tempol'ün intestinal iskemi-reperfüzyona bağlı doku hasarını azalttığı konusunda kanıtlar vardır. Sıçanlarda süperior mezenterik arterin (SMA) oklüzyonu ve reperfüzyonu, distal ileumda ağır bir hasar meydana getirir. Özden, Tetik ve arkadaşlarının yaptıkları intestinal I/R çalışmalarında distal ileumdaki mukozal lezyonlar Chiu sınıflamasına göre kategorize edilmiş, 60 dakikalık iskemi ve 120 dakikalık reperfüzyon periyodu sonucunda distal ileumda grade 3-5 arasında değişen mukozal lezyonlar saptanmıştır (72, 73). Distal ileumda meydana gelen bu hasarın Tempol ile belirgin bir şekilde azaltıldığı Thiernemann ve arkadaşları tarafından gösterilmiştir (3). Tempol (reperfüzyondan 5 dakika önce 30 mg/kg bolus enjeksiyon, ardından 30 mg.kg⁻¹.saat⁻¹ intravenöz infüzyon) 1-) reperfüze edilen barsağın nötrofillerle infiltrasyonunu, 2-) lipid peroksidasyonunu, 3-) peroksinitrit üretimini, 4-) splanknik arter oklüzyonu (SAO) şokuna uğramış sıçanlardan alınan doku kesitlerinde P-selectin ve anti-intersellüler adezyon molekülü 1'in boyanma derecesini, 5-) barsak hasarının histolojik bulgularını ve 6-) reperfüzyondan 2 saat

sonraki mortaliteyi azaltmıştır (61). Birlikte ele alındığında bu sonuçlar açıkça hücre içi radikal temizleyicisi Tempol'ün SAO şokuna tabi tutulan sıçanların barsak hasarını azalttığını gösterir. Bizim çalışmamızda, ileum mukozasında I/R sonrası meydana gelen mukozal lezyonlar Chiu skorlaması ile derecelendirilmiş ve Tempol ile bu hasarın belirgin bir şekilde azaltıldığı bulunmuştur.

İntestinal I/R hem lokal organlarda hem de akciğer, böbrek ve karaciğer gibi uzak organlarda hasar meydana getirir. İntestinal I/R sonrası akciğer hasarının patogenezi açıklamak üzere birkaç mekanizma önerilmesine karşın en çok ilgiyi inflamatuvar lökositler çekmiştir. Köksoy ve arkadaşları, intestinal I/R'a bağlı akciğer hasarı konusunda yaptıkları bir çalışmada intestinal I/R sonrası akciğerlerde polimorfonükleer lökosit (PMN) sekestrasyonunda anlamlı bir artış olduğunu göstermişlerdir (74). Kalia ve arkadaşlarının intestinal I/R sonrası lokal ve uzak organ hasarı konusunda yaptıkları bir çalışmada akciğer interstisyumunda belirgin nötrofil sekestrasyonunun meydana geldiği gösterilmiştir (75). Liaw ve arkadaşlarının intraperitoneal sepsise bağlı organ hasarı üzerine Tempol'ün etkilerini incelediği bir çalışmada ise akciğerde polimorfonükleer lökosit (PMN) infiltrasyonu ve sekestrasyonunda belirgin bir artış olduğunu ve bunun Tempol verilen tedavi grubunda anlamlı derecede azaltıldığı gösterilmiştir (76). Yine Zhang ve arkadaşları, polinitroksil-albumin (PNA) ve Tempol'ün uzamış intestinal I/R sonrası akciğerde kapiller kaçağı ve akciğer nötrofil retansiyonunu anlamlı derecede azalttığını göstermişlerdir (4). Bizim çalışmamızda, akciğer dokusunda intestinal I/R sonrası meydana gelen polimorfonükleer lökosit (PMN) infiltrasyonu ve sekestrasyonunun Tempol verilen tedavi grubunda anlamlı olarak azaltıldığının bulunması, Tempol'ün hem lokal hem de uzak organ nötrofil aktivasyonunu ve infiltrasyonunu azalttığını göstermektedir.

Post-iskemik barsak, portal ve sistemik dolaşıma herbiri direkt doku hasarına sebep olabilen hidrojen peroksit, süperoksit radikalleri, sitokinler (TNF α) ve arasidonik asit metabolitleri gibi pro-inflamatuvar metabolitler salgılar. Bununla birlikte, bu moleküller lökositlerin potent aktivatörleri de olduğundan akciğer alveoler kapiller yatağı gibi lökosit aracılı hasara duyarlı organlarda bunların sekestrasyonunu artırıp endotel hücre hasarı, artan vasküler permeabilite ve pulmoner hipertansiyonun gelişmesine yol açar (77, 78). İntestinal I/R sonrası

akciğer parankiminde yukarıdaki mekanizmalarla açıklanabilecek bazı histopatolojik değişiklikler meydana gelmektedir. Kalia ve arkadaşları, intestinal I/R sonrası akciğer parankiminin histopatolojik incelemesinde alveollerin ya kollabe olduğunu ya da distandü olmadığını, interstisyumdaki kapiller kan damarlarının genellikle eritrositlerle konjesyona uğradığını ve belirgin nötrofilik infiltratın geliştiğini göstermiştir. Toplu olarak değerlendirildiğinde, bu gözlemlerin dens bir interstisyum görünümü verdiğini, bazen, alveol boşlukları içerisinde hemorajiyi işaret eden nötrofiller ve eritrositler görüldüğünü belirtmişlerdir (75). Liaw ve arkadaşlarının intraperitoneal sepsise bağlı organ hasarı üzerine Tempol'un etkilerini incelediği çalışmada, akciğer dokularının histopatolojik incelemesinde polimorfonükleer lökosit (PMN) infiltrasyonu ve sekestrasyonunun, interstisyel ödem ve/veya konjesyonun belirgin bir şekilde arttığını ve bunun Tempol verilen tedavi grubunda anlamlı derecede azaltıldığı gösterilmiştir (76). Demling ve arkadaşlarının yanık hasarının endotoksine bağlı lipid peroksidasyonu üzerine etkisini konu alan çalışmasında akciğer histolojik bulguları vasküler konjesyon skoru kullanılarak incelenmiştir (63). Bizim çalışmamızda, akciğer dokusunda intestinal I/R sonrası meydana gelen histopatolojik değişiklikler 1) vasküler konjesyon skoru, 2) perialveoler konjesyon , mononükleer hücre infiltrasyonu, interstisyel ödem, interstisyel kalınlaşma, intraalveoler ödem-eksudasyon-fibrin birikimi- hemoraji-polimorfonükleer (PMN) lökosit infiltrasyonu varlığına dayanan akut akciğer hasar skoruna göre derecelendirilmiş ve Tempol verilen tedavi grubunda hem vasküler konjesyon skorunun hem de akut akciğer hasar skorunun belirgin bir şekilde azaltıldığı bulunmuştur.

Son zamanlarda süperoksid, hidroksil radikalleri ve hidrojen peroksid gibi serbest oksijen radikallerinin iskemik doku hasarını oluşturmadaki rolü üzerine dikkatler çekilmiştir. Serbest oksijen radikallerinin kalp, karaciğer, böbrek, beyin ve ince barsakta I/R hasarının patogeneğinde önemli bir rol oynadığı gösterilmiştir. Ayrıca serbest radikallerin neden olduğu lipid peroksidasyonunun özellikle hücre membranı hasarının en önemli nedenlerinden biri olduğu düşünülmektedir. Lipid radikalleri radyasyon veya pek çok radikal reaksiyonları ile oluşabilir. Lipid radikali, memeli hücre membranlarında bol miktarda doymamış yağ asitlerinin peroksidasyonuna sebep olarak hücre hasarına neden olmaktadır. Lipid radikali oksijen ile reaksiyona girer ve lipid peroksid radikalini yapar. Tüm biyolojik

membranlar lipid peroksidasyonuna duyarlıdır. Geçirgenlik değişkenliklerinden başlayarak membranda yapısal ve fonksiyonel bozukluklar oluşabilir. Membran bütünlüğü bozulabilir. Lipid peroksid radikali diğer lipid hidroperoksidlerini oluşturur. Hidroperoksidler yüksek derecede toksik ürünlere dönüşür. En toksik ürünler “aldehid”lerdir (79). Serbest oksijen radikalleri çok kısa ömürlü olduğundan dolayı direkt yöntemlerle ölçümleri zor olmakta bu yüzden indirekt yöntemler tercih edilmekte ve genellikle lipid peroksidasyon ürünü olan malondialdehid (MDA) düzeyine bakılmaktadır (64). Otamiri ve arkadaşlarının intestinal I/R çalışmalarında, I/R hasarı sırasında lipid peroksidasyon süreçlerinin meydana geldiği teorisini destekler bir şekilde, I/R grubunda MDA seviyelerinde anlamlı bir artış olduğu gösterilmiştir (65). Nathens ve arkadaşlarının endotoksine bağlı akut akciğer hasarı konusunda yaptıkları çalışmada, akciğer dokusunda lipid peroksidasyonu değerlendirmesinde malondialdehid (MDA) düzeyi ölçülmüştür (80). Bizim çalışmamızda, intestinal I/R sonrası meydana gelen intestinal ve pulmoner dokulardaki lipid peroksidasyonu, malondialdehid (MDA) düzeyi ölçülerek tayin edilmiş ve Tempol verilen tedavi grubunda intestinal ve pulmoner dokularda malondialdehid (MDA) düzeyinin belirgin bir şekilde azaltıldığı gösterilmiştir.

Redükte glutatyon (GSH), tüm hücrelerde bulunan endojen bir antioksidan ve sistein’in fizyolojik bir rezervuarıdır. Redükte glutatyon (GSH), DNA sentezi, protein sentez regülasyonu ve detoksifikasyon gibi olaylarda önemli rol oynar. Hücrel redükte glutatyon (GSH) eksikliği, mitokondriyal ve sitozolik redükte glutatyon (GSH) havuzunu etkiler. Mitokondriyal redükte glutatyon (GSH), solunum zincirinde meydana gelen serbest oksijen radikallerinin detoksifikasyonu, ksenobiyotiklerin konjugasyonu, tiol grubu içeren protein yapılarının korunması ve mitokondriyal membran potansiyelinin regülasyonunda önemli rol oynar. (81, 82). I/R hasarına karşı hücrel savunma mekanizmaları arasında, redükte glutatyon (GSH) serbest oksijen radikallerinin intrinsek temizleyicisidir. Zhao ve arkadaşları, redükte glutatyonun (GSH) serbest oksijen radikalleri ile tepkimeye girerek doğal oksijen (O_2), hidroksil radikali ($OH^\cdot$) ve süperoksid’ten ($O_2^\cdot$) korunma sağlayabileceğini göstermiştir (83). Bazı çalışmalar çeşitli uyaranlara bağlı doku hasarının glutatyon depleksiyonuna sebep olduğunu göstermiştir (84). Sola ve arkadaşları, I/R periyodu boyunca hücre içi redükte glutatyonun (GSH) tükendiğini ve bunun serbest oksijen radikallerine bağlı oksidatif stresin bir göstergesi olarak

kullanılabileceğini göstermiştir (85). Wu ve arkadaşları, rat ince bağırsağında iskemik önkoşullama konusunda yaptıkları bir çalışmada, intestinal I/R sonrası reaktif oksijen türevlerinin anlamlı derecede mitokondriyal okside glutatyon (GSSG) seviyelerini artırdığını, mitokondriyal redükte glutatyon (GSH) seviyelerini ve GSH/GSSG oranını azalttığını ve mitokondriyal lipid peroksidasyonunu artırdığını göstermiştir (86). Glutamin, glutatyonun prekürsörüdür. Glutamin, glutatyonun aksine hücre içine girebilir. Salehi ve arkadaşları, intestinal I/R hasarını azaltmak üzere lümenal olarak glutamin içeren aminoasit bazlı solüsyon kullanmışlar ve intestinal dokuda redükte glutatyon (GSH) seviyelerinin yaklaşık 2 misli arttığını tespit etmişlerdir (87). Bizim çalışmamızda, I/R periyodu boyunca ileum ve akciğer dokusunda meydana gelen redükte glutatyon (GSH) seviyelerindeki düşüş Tempol verilmesi ile önlenmiştir. Tempol, serbest oksijen radikallerini temizleme etkisiyle ilişkili olabilen bir mekanizmayla reperfüzyon periyodu boyunca redükte glutatyon (GSH) seviyelerinin azalmasını önleyip serbest oksijen radikallerinin miktarını azaltmakta, enzimlerle sinerjik etki göstermekte ve bunların aktivitelerini normale getirmektedir. Literatür taramasında, Tempol'un I/R periyodu boyunca doku redükte glutatyon (GSH) seviyelerindeki düşmeyi önleyici bir etkisinin olduğu konusunda herhangi bir bildiriye rastlamadık.

Evans blue ekstravazasyonu kapiller permeabilite ve doku ödemindeki değişikliklerin bir göstergesi olarak kullanılmaktadır. İntestinal reperfüzyona bağlı pulmoner mikrovasküler disfonksiyon *in vivo* plasma proteinlerinin akciğere ekstravazasyonunu ölçerek incelenir (68, 69). Evans Blue Dye (EBD) hızlıca albümine bağlanır ve yıllardır inflamatuvar doku hasarı modellerinde protein ekstravazasyonu göstergesi olarak kullanılmıştır. Aytekin ve arkadaşlarının mesenterik I/R'a bağlı pulmoner doku hasarı konusunda yaptıkları bir çalışmada intestinal I/R sonrası pulmoner ödem ve permeabilite analizinde Evans blue ekstravazasyonunun anlamlı derecede daha yüksek olduğu gösterilmiştir (70). Turnage ve arkadaşları, intestinal reperfüzyona bağlı pulmoner ödemin pulmoner indüklenebilir nitrik oksid sentaz (iNOS) artışına bağlı olduğunu göstermişler ve intestinal reperfüzyona bağlı pulmoner mikrovasküler disfonksiyonu Evans blue ekstravazasyonunu ölçerek değerlendirmişlerdir (88). Yine Narita ve arkadaşları intestinal I/R sonrası akciğer hasarının lokal organda üretilen sitokinlerin emilimini azaltarak önlenebileceğini ileri sürmüşler ve akciğer permeabilite incelemesinde

intestinal I/R sonrası akciğer parankiminde Evans blue ekstrevasiyonunun arttığını göstermişlerdir (89). Bizim çalışmamızda, intestinal I/R sonrası meydana gelen pulmoner mikrovasküler disfonksiyon akciğer dokusunda Evans blue konsantrasyonu ölçülerek tayin edilmiş ve Tempol verilen tedavi grubunda pulmoner mikrovasküler disfonksiyonun belirgin bir şekilde düzeldiği gösterilmiştir.

Pulmoner ve intestinal ödem formasyonunun ayrı bir ölçüsü olarak organ yaş/kuru ağırlık oranları da kullanılmaktadır. Aytekin ve arkadaşları, intestinal I/R sonrası meydana gelen akciğer ödemi, akciğer yaş/kuru ağırlık oranını hesaplayarak incelenmiş ve bu oranın intestinal I/R sonrası anlamlı derecede yükseldiğini göstermişlerdir (70). Scott ve arkadaşları akciğer transplantasyonu sonrası akciğer reperfüzyon hasarına sekonder gelişen pulmoner ödemin bir göstergesi olarak akciğer dokusu yaş/kuru ağırlık oranını kullanmışlar ve bu oranın akciğer reperfüzyon hasarı sonrası belirgin bir şekilde yükseldiğini bulmuşlardır (71). Bizim çalışmamızda, intestinal I/R sonrası meydana gelen pulmoner ve intestinal ödem formasyonu, akciğer ve ileum dokusunda yaş/kuru ağırlık oranı hesaplanarak ölçülmüş ve bu oranın I/R grubunda anlamlı derecede yükseldiği, Tempol verilen tedavi grubunda ise belirgin bir şekilde düştüğü gözlenmiştir.

Sonuç olarak, ratlarda intestinal I/R'a bağlı olarak gelişen lokal ve uzak organ hasarında Tempol'ün etkinliği GSH ve MDA düzeyleri ölçülerek biyokimyasal olarak gösterilmiştir. Lipid peroksidasyonunun göstergesi olan MDA düzeyleri hasarın fazla olduğu kontrol grubunda yüksek, Tempol verilen tedavi grubunda anlamlı derecede düşük olarak saptanmıştır. Yine doku redükte glutatyon (GSH) seviyeleri, hasarın fazla olduğu kontrol grubunda düşük, Tempol verilen tedavi grubunda anlamlı derecede yüksek olarak bulunmuştur. Biyokimyasal parametrelere paralel olarak histopatolojik incelemede mikroskopik değerlendirmede Tempol verilen tedavi grubunda, ileum dokusunda mukozal lezyonlar, akciğer dokusunda nötrofil sekestrasyonu, vasküler konjesyon ve akut akciğer hasar skoru anlamlı olarak düşük izlenmiştir. Pulmoner mikrovasküler disfonksiyonun bir göstergesi olan akciğer dokusunda Evans blue ekstrevasiyonu Tempol verilen tedavi grubunda anlamlı olarak düşük bulunmuştur. Pulmoner ve intestinal doku ödem formasyonunun bir göstergesi olan organ yaş/kuru ağırlık oranları Tempol verilen tedavi grubunda anlamlı olarak düşük izlenmiştir.

Tempol'ün intestinal I/R hasarında lokal etkileri deneysel olarak incelenmesine karşın, bu modelde uzak bir organ olan akciğer dokusundaki etkileri incelenmemiştir. Bu çalışmada, intestinal I/R hasarında Tempol'ün hem lokal bir organ olan distal ileumda hem de uzak bir organ olan akciğerde etkisi araştırılmıştır. Serbest oksijen radikallerine etkilerinden dolayı çok geniş endikasyonlarla, geniş bir çalışma popülasyonunun kullandığı bu maddenin, özellikle uzak organ üzerine olan etkileri araştırmaya açık bir konudur ve bu konuyla ilgili olarak daha ileri çalışmalara gereksinim vardır.



SONUÇLAR

Bu çalışmada, ratlarda intestinal iskemi/reperfüzyona bağlı gelişen lokal ve uzak organ hasarında Tempol'ün etkisi incelenmiş ve şu sonuçlar elde edilmiştir.

1. İntestinal I/R'a bağlı olarak lokal bir organ olan distal ileumda meydana gelen hasar histopatolojik olarak Chiu skorlamasına göre ve uzak bir organ olan akciğerde meydana gelen hasar histopatolojik olarak akciğer nötrofil sekestrasyonu, akciğer vasküler konjesyon skoru ve akut akciğer hasar skoruna göre Tempol verilmesi ile anlamlı derecede azaltılmaktadır ($p<0,05$).

2. İntestinal I/R'a bağlı olarak lokal bir organ olan distal ileumda ve uzak bir organ olan akciğerde meydana gelen hasarda, biyokimyasal açıdan lipid peroksidasyonunun göstergesi olarak kullanılan malondialdehid (MDA) düzeyleri ve redükte glutatyon (GSH) seviyeleri, Tempol verilmesi ile anlamlı derecede azaltılmaktadır ($p<0,05$).

3. İntestinal I/R'a bağlı olarak uzak bir organ olan akciğerde meydana gelen ödem formasyonunun bir göstergesi olarak kullanılan Evans blue ekstravazasyonu, Tempol verilmesi ile anlamlı derecede azaltılmaktadır ($p<0,05$).

4. İntestinal I/R'a bağlı olarak lokal bir organ olan distal ileumda ve uzak bir organ olan akciğerde meydana gelen ödem formasyonunun bir başka göstergesi olan organ yaş/kuru ağırlık oranları, Tempol verilmesi ile anlamlı derecede azaltılmaktadır ($p<0,05$).

ÖZET

I/R hasarı konusunda deneysel çalışmalarda etkili olduğu gösterilen pekçok etken maddenin klinik çalışmalarda yararının olmadığı görülmüştür. I/R hasarının patofizyolojisinin anlaşılmasında büyük ilerlemeler kaydedilmesine karşın I/R hasarının gelişmesini önleyebilecek veya seyrini hafifletebilecek etken bir madde tanımlanmamıştır.

Bu çalışmada, ratlarda intestinal I/R'a bağlı oluşan lokal ve uzak organ hasarında Tempol'ün etkisi araştırılmıştır. Bu amaçla 36 adet Wistar-Albino cinsi erkek rat kullanılmış ve ratlar 12'şerli 3 randomize gruba ayrılmıştır. Her 3 gruptaki ratların yarısına I/R modeli öncesi Evans Blue enjekte edildi. Sham grubunda I/R modeli oluşturmaksızın sadece SMA mobilize edilerek bırakıldı. Kontrol grunda SMA mikrovasküler klemp konularak 60 dakika iskemi ve ardından mikrovasküler klemp çıkarılarak 120 dakika reperfüzyon oluşturuldu. Tedavi grubunda iskemi periyodunun 55. dakikasında Tempol İV bolus enjekte edilip reperfüzyon periyodu boyunca bir perfüzör ile İV perfüzyon şeklinde verilmeye devam edildi. Sham grubunda deney süresi kadar beklendikten sonra, kontrol ve tedavi grubunda reperfüzyon periyodunun sonunda sakrifiye edilen ratların akciğerleri ve terminal ileumu alındı. Histopatolojik olarak distal ileumda meydana gelen hasar Chiu skorlaması ve akciğerde meydana gelen hasar nötrofil sekestrasyonu, vasküler konjesyon skoru ve akut akciğer hasar skoru kullanılarak değerlendirildi. Biyokimyasal olarak distal ileum ve akciğer dokusunda MDA ve GSH düzeylerine bakıldı. Organ ödem formasyonunun bir göstergesi olarak akciğer dokusunda Evans blue konsantrasyonuna ve organ yaş kuru/ağırlık oranlarına bakıldı.

Sonuç olarak, intestinal I/R'a bağlı olarak meydana gelen lokal ve uzak organ hasarı, hem histopatolojik hem de biyokimyasal incelemelere göre, ayrıca akciğerde meydana gelen ödem formasyonunun bir göstergesi olarak kullanılan Evans blue ekstrevasyonu, organ ödem formasyonunun bir başka göstergesi olarak kullanılan organ yaş/kuru ağırlık oranlarına göre Tempol verilmesi ile anlamlı derecede azaltılmaktadır. Bu bulgular ışığında, ratlarda intestinal I/R'a bağlı oluşan lokal ve uzak organ hasarında Tempol'ün koruyucu etki gösterdiği sonucuna varılmıştır.

SUMMARY

It has been shown that many agents were proved to be effective in experimental I/R injury studies. But no agents seemed to be effective in clinical studies. For this purpose, many potential pharmacological agents are currently under investigation to prevent the development of or to alleviate the course of the I/R injury.

In this study, we have investigated the effects of Tempol on both local and remote organ injuries caused by intestinal I/R in rats. For this purpose, 36 male Wistar-Albino rats were allocated to three randomized groups (n=12 for each group). In the sham groups, the SMA and collateral branches were divided from the celiac axis and the inferior mesenteric artery was isolated but not occluded, and the animals were followed-up for 3 hours to simulate the I/R interval in the other groups. In the control and the treatment groups, ischemia was created by clamping of the SMA with collateral interruption for 60 min. with atraumatic microvascular clamps, followed by reperfusion for 120 minutes. By this procedure, the terminal ileum, cecum, and right colon were rendered ischemic. Evans blue dye was injected to half of rats in the groups before the induction of I/R. Tempol was bolus injected intravenously 5 min. before declamping and then continuously infused via a perfusor throughout the reperfusion period in the treatment group. Animals were sacrificed at the end of the reperfusion period and then the lungs and the distal ileal segments were removed for biochemical and histopathological examination. Histopathologically, the injury severity was assessed according to Chiu's grading system in the distal ileum and to pulmonary neutrophilic infiltration, vascular congestion grading system and acute lung injury scale in the lungs. Biochemically, MDA and GSH levels were determined in the intestinal mucosa and the lung parenchyma. Evans Blue Dye concentration and the organ wet/dry ratio were utilized as a marker of organ edema formation.

In conclusion, the present study suggests that Tempol significantly reduces local and remote organ injury caused by intestinal I/R before and throughout the reperfusion period. A significant attenuation of intestinal I/R-related local and remote organ injury with the use of Tempol warrants further studies to elucidate the potential role of this free radical scavenger in clinical settings.

KAYNAKLAR

1. Grace PA, Mathie RT. Ischemia-reperfusion Injury. Blackwell Science: London, 1999
2. Neary P, Redmond HP. Ischaemia-reperfusion injury and the systemic inflammatory response syndrome. In Ischemia-Reperfusion Injury, Grace PA, Mathie RT (eds). Blackwell Science: London, 1999; 123-136
3. Thiernemann C. Membrane-permeable radical scavengers (tempol) for shock, ischemia-reperfusion injury, and inflammation. Crit Care Med 2003; 31: No. 1 (Suppl.) 76-84
4. Zhang S, Li H, Ma L, Trimble CE, Kuppusamy P, Hsia CJC, Carden DL. Polynitroxyl-albumin (PNA) plus tempol attenuate lung capillary leak elicited by prolonged intestinal ischemia and reperfusion. Free Radical Biology & Medicine 2000; 29: 42-50
5. Ramzi S. Cotran, Ischemia-reperfusion damage. In: Robbins Stanley L, Kumar V, eds. Basic Pathology, Sixth Edition, Philadelphia: Saunders Company, 2000: 1-9
6. Halliwell B, Okezie IA. DNA damage by oxygen derived species. Its mechanism and measurment in mammalian systems. Journal of Biochemistry 1991; 281: 9-19
7. Freeman BA, Crapo JD. Biology of disease. Free radicals and tissue injury. Laboratory Investigation 1982; 47: 49-58
8. Slater TF. Free radical mechanisms in tissue injury. Journal of Biochemistry 1984; 222: 1-15
9. Halliwell B. Reactive oxygen species in living systems, source. Biochemistry and role in human disease. The Am J of Med 1991; 91: 14-22

10. Phillis JW. A radical view of cerebral ischemic injury. *Prog Neurobiol* 1994; 42: 441-448
11. Colletti LM, Kunkel SL, Walz A. Chemokine expression during hepatic ischemia/reperfusion-induced lung injury in the rat. The role of epithelial neutrophil activating protein. *J Clin Invest* 1995; 95: 134-141
12. Grace PA. Ischemia-reperfusion injury. *Br J of Surg* 1994; 81: 637-647
13. Hinder RA, Stein HJ. Oxygen derived free radicals. *Arch Surg* 1991; 126: 104-105
14. Zimmerman BJ, Granger DN. Reperfusion injury. *Surg Clin N* 1992; 72: 65-68
15. Granger DN, Hollwarth ME, Parks DA. Ischemia-reperfusion injury : role of oxygen derived free radicals. *Acta Physiol Scand* 1986; 548: 47-51
16. Hearse DJ, Huprey SM, Chain EB. Abrupt reoxygenation anoxic potassium-arrested perfused rat heart. A study of myocardial enzyme released. *Moll Cell Cardiol* 1973; 5: 395-407
17. Welbourn CRB, Goldman G, Paterson IS, Valeri CR, Shepro D, Hechtman HB. Pathophysiology of ischemia-reperfusion injury : central role of the neutrophil. *Br J Surg* 1991; 78: 651-655
18. Meisenberg G, Simsons WH. Extracellular messenger : in principles of medical biochemistry. Mosby Inc St Louis Missouri 1998; 547-597
19. Sussman MS, Bulkey GB. Oxygen-derived free radicals in reperfusion injury. *Methods in Enzymology* 1990; 186: 711-714
20. Carden DL, Korthuis RJ. Mechanisms of postischemic vascular dysfunction in skletal muscle : implications for therapeutic intervention. *Microcir Endoth Lymphatics* 1989; 5: 277-280

21. Carden DL, Smith JK, Korthuis RJ. Neutrophil-mediated microvascular dysfunction in postischemic canine skeletal muscle. (Role of granulocyte adherence). *Circulation Res* 1990; 66: 1436-1442
22. Purucker E, Egri L, Hamar H, Augustin AJ, Lutz J. Differences in glutathione status and lipid peroxidation of red and white muscle. Alterations following ischemia-reperfusion. *Res Exp Med* 1991; 191: 209-217
23. Grisotto PC, Santos ACD, Netto JC, Cherri J, Piccinato CE. Indicators of oxidative injury and alterations of the cell membrane in the skeletal muscle of rats submitted to ischemia-reperfusion. *J Surg Res* 2000; 92: 1-6
24. Choudhury NA, Sakaguchi S, Koyano K, Matin AFM, Muro H. Free radical injury in skeletal muscle ischemia and reperfusion. *J Surg Res* 1991; 51: 392-398
25. Mc Cord JM. Human disease, free radicals and the oxidant/antioxidant balance. *Clin Biochem* 1993; 26: 351-357
26. Erilaçın S, Sözmen YE. Biyolojik Oksidasyon. Onat T, Emerk K. Temel Biyokimya. İzmir : Saray Med Yayıncılık, 1997; 520-528
27. Grisham MB, Granger DN, Lefer DL. Modulation of leukocyte-endothelial Interactions by reactive metabolites of oxygen and nitrogen: relevance to ischemic heart disease. *Free Rad Biol* 1998; 25: 404-433
28. Harrison DG. Cellular and molecular mechanisms of endothelial cell dysfunction. *J Clin Invest* 1997; 100: 2153-2157
29. Banda MA, Lefer DJ, Granger DN. Postischemic endothelium-dependent vascular reactivity is preserved in adhesion molecule deficient mice. *Am J Physiol* 1997; 273: 2721-2725
30. Harris NR. Opposing effects of L-NAME on capillary filtration rate in the presence or absence of neutrophils. *Am J Physiol* 1997; 273: 1320-1325

31. Kubes P, Granger DN. Leukocyte-endothelial cell interactions invoked by mast cells. *Cardiovasc Res* 1996; 32: 699-708
32. Ichikawa H, Flores S, Kvietys PR. Molecular mechanisms of anoxia/reoxygenation-induced neutrophil adherence to cultured endothelial cells. *Circ Res* 1997; 81: 922-931
33. Granger DN. Ischemia-reperfusion: mechanisms of microvascular dysfunction and the influence of risk factors for cardiovascular disease. *Microcirculation* 1999; 6: 167-178
34. Granger DN. Role of xanthine oxidase and granulocytes in ischemia-Reperfusion injury. *Am J Physiol* 1988; 255: 1269-1275
35. Carden D. L., Granger D. N. Pathophysiology of ischaemia-reperfusion injury. *J Pathol* 2000; 190: 255-266
36. Kurose I, Anderson DC, Miyasaka M. Molecular determinants of reperfusion-induced leukocyte adhesion and vascular protein leakage. *Circ Res* 1994; 74: 336-343.
37. Bulkley GB. Mesenteric vascular insufficiency. *Curr Probl Surg* 1997; 34: 943-990
38. Terada LS, Dormish JJ, Shanley PF, Leff JA, Anderson BO, Repine JE. Circulation xanthine oxidase mediates lung neutrophil sequestration after intestinal ischemia-reperfusion. *Am J Physiol* 1992; 263: 394-401
39. Nielsen VG, Tan S, Baird MS, McCammon AT, Parks DA. Gastric intramucosal pH and multiple organ injury: impact of ischemia-reperfusion and xanthine oxidase. *Crit Care Med* 1996; 24: 1339-1344
40. Weinbroum AA, Nielson VG, Tan S. Liver ischemia-reperfusion increases pulmonary permeability in rat: role of circulating xanthine-oxidase. *Am J Physiol* 1995; 268: 988-996

41. Poggetti RS, Moore FA, Moore EE, Koeike K, Bannerjee A. Simultaneous liver and lung injury following gut ischemia is mediated by xanthine oxidase. *J Trauma* 1992; 32: 723-727
42. Petrone WF, English DK, Wong K, McCord JM. Free radicals and inflammation: Superoxide-dependent activation of a neutrophil chemotactic factor in plasma. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1980; 77: 1159-1163
43. Foulds S, Mireskandari M, Kalu P. Visceral ischemia and neutrophil activation in sepsis and organ dysfunction. *J Surg Res* 1998; 75: 170-176
44. Barry MC, Kelly C, Burke P, Sheehan S, Redmond HP, Bouchier-Hayes D. Immunological and physiological responses to aortic surgery: effect of reperfusion on neutrophil and monocyte activation and pulmonary function. *Br J Surg* 1997; 84: 513-519.
45. Niu XF, Smith CW, Kubes P. Intracellular oxidative stress induced by nitric oxide synthesis inhibition increased endothelial cell adhesivity for neutrophils. *Circ Res* 1994; 74: 1133-1140
46. Monti E, Cova D, Guido E. Protective effect of the nitroxide tempol against the cardiotoxicity of Adriamycin. *Free Radic Biol Med* 1996; 121: 463-470
47. Weiss RH, Flickinger AG, Rivers WJ. Evaluation of activity of putative superoxide dismutase mimics: Direct analysis by stopped-flow kinetics. *J Biol Chem* 1993; 268: 23049-23054
48. Krishna MC, Russo A, Mitchell JB, et al: Do nitroxide antioxidants act as scavengers of superoxide anions or as SOD mimetics? *J Biol Chem* 1996; 271: 26026-26031
49. Samuni A, Winkelsberg D, Pinson A: Nitroxide stable radicals protect beating cardiomyocytes against oxidative damage. *J Clin Invest* 1991; 87: 1526-1530

50. Reddan J, Sevilla M, Giblin F, et al: Tempol and deferoxamine protect cultured rabbit lens epithelial cells from H₂O₂ insult: Insight into the mechanism of H₂O₂-induced injury. *Lens Eye Tox Res* 1992; 9: 385–393
51. Laight DW, Andrews TJ, Haj-Yehia AI, et al: Microassay of superoxide anion scavenging activity *in vitro*. *Environ Tox Pharm* 1997; 3: 65–68
52. Laight DW, Kaw AV, Carrier MJ, et al: Interaction between superoxide anion and nitric oxide in the regulation of vascular endothelial function. *Br J Pharmacol* 1998; 124: 238–244
53. McDonald MC, Zacharowski K, Bowes J. Tempol reduces infarct size in rodent models of regional myocardial ischemia and reperfusion. *Free Radic Biol Med* 1999; 127: 493–503
54. Carroll RT, Galatsis P, Borosky S. 4-Hydroxy-2,2,6,6-tetramethylpiperidine-1-oxyl (tempol) inhibits peroxynitrite-mediated phenol nitration. *Chem Res Toxicol* 2000; 13: 294–300
55. Sasaki H, Lin LR, Yokohama T. Tempol protects against lens DNA strand breaks and cataract in the x-rayed rabbit. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 1998; 39: 544–552
56. Ueda K, Hayaishi O. ADP-ribosylation. *Annu Rev Biochem* 1985; 54:73–100
57. Zöllner S, Haseloff RF, Kirilyuk IA. Nitroxides increase the detectable amount of nitric oxide released from endothelial cells. *J Biol Chem* 1997; 272: 23076–23080
58. Volk T, Hensel M, Schuster H. Secretion of MCP-1 and IL-6 by cytokine stimulated production of reactive oxygen species in endothelial cells. *Mol Cell Biochem* 2000; 206:105–112

59. Xu H, Fink GD, Chen A. Nitric-oxide independent effects of tempol on lymphatic nerve activity and blood pressure in normotensive rats. *Am J Physiol* 2001; 281: 975–980
60. Udassin R, Haskel Y, Samuni A. Nitroxide radical attenuates ischemia/reperfusion injury to the rat small intestine. *Gut* 1998; 42: 623–627
61. Cuzzocrea S, McDonald MC, Mazzon E. Beneficial effects of tempol, a membrane permeable radical scavenger, in a rodent model of splanchnic artery occlusion and reperfusion. *Shock* 2000; 14: 150–156
62. Chiu CJ, McArdle AH, Brown R, Scott HJ, Gurd FN. Intestinal mucosal lesions in low-flow states. A morphological, hemodynamic, and metabolic reappraisal. *Arch Surg* 1970; 101: 478–483
63. Demling RH, LaLonde C. Effect of body burn on endotoxin-induced lipid peroxidation: Comparison with physiologic and histologic changes. *Surgery* 1990; 107 : 669-676
64. Okhawa H, Ohishi N, Yag K. Assay for lipid peroxidation in animal tissues by the reaction. *Anal Biochem* 1979; 95: 351-358
65. Otamiri T. Oxygen radicals, lipid peroxidation and neutrophil infiltration after small-intestine ischemia and reperfusion. *Surgery* 1989; 105: 593-597
66. Moron MS, Dipiome JW, Mannervik B. Levels of glutathione, glutathione reductase, glutathione-S-transferase activities in rat lung and liver. *Biochem Biophys Acta* 1979; 582: 67-78.
67. Fairbanks VF, Klee GG. Biochemical aspects of hematology. *Textbook of clinical chemistry*. Tietz NW (eds). Philadelphia, W.B.Saunders Company. 1986; 1508-1511.

68. Turnage RH, Kadesky KM, Bartula L, Myers SI. Intestinal reperfusion up-regulates inducible nitric oxide synthase activity within the lung. *Surgery* 1995; 118: 288-293
69. Patterson CE, Rhoades RA, Garcia JGN. Evans blue dye as a marker of albumin clearance in cultured endothelial monolayer and isolated lung. *J Appl Physiol* 1992; 72: 865-873
70. Aytekin FO, Tekin K, Kabay B, Erdem E, Güney Y, Fırat P, Sungurtekin U, Kaya ŞÖ, Özden A. Antithrombin III attenuates pulmonary tissue injury caused by mesenteric ischemia-reperfusion. *The American Journal of Surgery* 2005; 189 : 161-166
71. Scott DR, Kron IL, Gangemi JJ, Shockey KS, Stoler M, Kern JA, Tribble CG, Laubach VE. Attenuation of lung reperfusion injury after transplantation using an inhibitor of nuclear factor-kB. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 2000; 279 : 528-536
72. Özden A, Tetik C, Bilgihan A, Çallı N, Bostancı B, Yis Ö, Düzcan E. Antithrombin III prevents 60 min warm intestinal ischemia reperfusion injury in rats. *Res Exp Med* 1999; 198 : 237-246
73. Tetik C, Özden A, Çallı N, Bilgihan A, Bostancı B, Yis Ö, Bayramoğlu H. Cytoprotective effect of trimetazidine on 60 minutes of intestinal ischemia-reperfusion injury in rats. *Transpl Int* 1999;12 : 108-112
74. Köksoy C, Kuzu MA, Ergün H, Gürhan I. Role of tumour necrosis factor in lung injury caused by intestinal ischemia-reperfusion. *British Journal of Surgery* 2001; 88 : 464-468
75. Kalia N, Brown NJ, Hopkinson K, Stephenson TJ, Rood RFM, Pockley AG. FK409 inhibits both local and remote organ damage after intestinal ischemia. *J Pathol* 2002; 197 : 595-602

76. Liaw WJ, Chen TH, Lai ZZ, Chen SJ, Chen A, Tzao C, Wu JY, Wu CC. Effects of a membrane-permeable radical scavenger, tempol, on intraperitoneal sepsis induced organ injury in rats. *Shock* 2005; 23 : 88-96
77. Baue AE. The horror autotoxicus and multiple-organ failure. *Arch Surg* 1992; 127: 1451-1452
78. Koike K, Moorer FA, Moorer EE, Kim FJ, Carl VS, Banerjee A. Gut phospholipase A₂ mediates neutrophil priming and lung injury after mesenteric ischemia-reperfusion. *Am J Physiol* 1995; 269: 397-403
79. Cini M, Moretti A. Studies on lipid peroxidation and protein oxidation in the aging brain. *Neurobiol Aging* 1995; 16 : 53-57
80. Nathens AB, Bitar R, Davreux C, Bujard M, Marshall JC, Dackiw APB, Watson RWG, Rotstein OD. Pyrrolidine Dithiocarbamate attenuates endotoxin-induced acute lung injury. *Am J Respir Cell Mol Biol* 1997; 17 : 608-616
81. Kroemer G, Dallaporta B, and Resche-Rigon M. The mitochondrial death/life regulator in apoptosis and necrosis. *Annu Rev Physiol* 1998; 60: 619-642
82. Vercesi AE, Kowaltowski AJ, Grijalba MT, Meinicke AR, and Castilho RF. The role of reactive oxygen species in mitochondrial permeability transition. *Biosci Rep* 1997; 17: 43-52
83. Zhao X, Alexander JS, Zhang S, Zhu Y, Sieber NJ, Aw TY, Carden DL. Redox regulation of endothelial barrier integrity. *American Journal of Physiology : Lung Cellular and Molecular Physiology* 2001; 281: 879–886
84. Şener G, Tosun O, Şehirli AO, Kaçmaz A, Arbak S, Ersoy Y, Ayanoglu-Dülger G. Melatonin and N-acetylcysteine have beneficial effects during hepatic ischemia and reperfusion. *Life Sciences* 2003; 72: 2707–2718

85. Sola A, De Oca J, Gonzalez R. Protective effect of ischemic preconditioning on cold preservation and reperfusion injury associated with rat intestinal transplantation. *Ann Surg* 2001; 234: 98
86. Wu B, Ootani A, Iwakiri R, Fujise T, Tsunada S, Toda S, Fujimoto K. Ischemic preconditioning attenuates ischemia-reperfusion-induced mucosal apoptosis by inhibiting the mitochondria-dependent pathway in rat small intestine. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 2004; 286: 580-587
87. Salehi P, Madsen K, Zhu J, Castillo E, Avila J, Lakey JRT, Churchill TA. Alleviating Ischemia-Reperfusion Injury in Small Bowel. *American Journal of Transplantation* 2004; 4: 728-737
88. Turnage RH, Wright JK, Iglesias J, LaNoune JL, Nguyen H, Kim L, Myers S. Intestinal reperfusion-induced pulmonary edema is related to increased pulmonary inducible nitric oxide synthase activity. *Surgery* 1998; 124 : 457-463
89. Narita K, Kuwabara Y, Fuji Y. Lung injury after intestinal ischemia-reperfusion may be avoided by reduced absorption of locally produced cytokines. *Surg Today* 2004; 34 : 937-942