

T.C.
ESKİŞEHİR OSMANGAZİ ÜNİVERSİTESİ
TIP FAKÜLTESİ

MELATONİNİN DENEYSEL AORTİK İSKEMİ REPERFÜZYON
MODELİNDE AKCİĞER HASARINA ETKİSİ

Dr.M.Fatih YILMAZ

Kalp Damar Cerrahisi Anabilim Dalı
TIPTA UZMANLIK TEZİ

ESKİŞEHİR
2010

T.C.
ESKİŞEHİR OSMANGAZİ ÜNİVERSİTESİ
TIP FAKÜLTESİ

MELATONİNİN DENEYSEL AORTİK İSKEMİ REPERFÜZYON
MODELİNDE AKCİĞER HASARINA ETKİSİ

Dr.M.Fatih YILMAZ

Kalp Damar Cerrahisi Anabilim Dalı
TIPTA UZMANLIK TEZİ

TEZ DANIŐMANI
Prof.Dr.Recep ASLAN

ESKİŞEHİR
2010

TEZ KABUL VE ONAY SAYFASI

T.C.
ESKİŞEHİR OSMANGAZİ ÜNİVERSİTESİ
TIP FAKÜLTESİ DEKANLIĞINA,

Dr.M.Fatih YILMAZ' a ait "Melatoninin Deneysel Aortik İskemi Reperfüzyon Modelinde Akciğer Hasarı Üzerine Etkisi" adlı çalışma jürimiz tarafından Kalp ve Damar Cerrahisi Anabilim Dalı'nda Tıpta Uzmanlık Tezi olarak oy birliği ile kabul edilmiştir.

Tarih: 02.03.2010

Jüri Başkanı: Prof.Dr.Recep ASLAN

Üye: Prof.Dr.Yavuz BEŞOĞUL

Üye: Doç.Dr.Murat İKİZLER

Eskişehir Osmangazi Üniversitesi Tıp Fakültesi Fakülte Kurulu'nun
..... tarih vesayılı kararı ile onaylanmıştır.

Prof.Dr.Zübeyir KILIÇ
Dekan

TEŞEKKÜR

Uzmanlık eğitimim süresince ve bu tezin başından sonuna kadar desteklerini esirgemeyen, bizlere cerrahiyi öğretene ve sevdiren hocam Prof.Dr.Recep ASLAN' a ve bölümümüzdeki tüm hocalarıma, histopatolojik değerlendirmemizi yapan Patoloji Anabilim Dalı Öğretim Üyesi Prof.Dr.Emine Kasapoğlu DÜNDAR' a, Farmakoloji Anabilim Dalı Öğretim Üyesi Prof.Dr.İpek CİNGİ' ye, istatistiksel değerlendirmemizi yapan Biyoistatistik Anabilim Dalı Arş. Gör. Ahmet MUSMUL' a, değerli asistan arkadaşlarıma teşekkür eder, sonsuz sevgi ve şükranlarımı sunarım.

ÖZET

Yılmaz, F. Melatoninin Deneysel Aortik İskemi Reperfüzyon Modelinde Akciğer Hasarı Üzerine Etkisi. Eskişehir Osmangazi Üniversitesi Tıp Fakültesi Kalp ve Damar Cerrahisi Anabilim Dalı Tıpta Uzmanlık Tezi, Eskişehir, 2010. Bu çalışmanın amacı, sıçan infrarenal abdominal aortasında oklüzyon-reperfüzyon sonrası akciğerlerde oluşan iskemi reperfüzyon hasarına melatoninin etkisini araştırmaktır. 30 adet Sprague-Dawley cinsi dişi sıçan randomize olarak, eşit sayıda (n=10) üç gruba ayrıldı. Kontrol grubuna laparotomi ve infrarenal abdominal aorta (İAA) diseksiyonu yapıldı ancak iskemi uygulanmadı. İskemi reperfüzyon (İ-R) grubunda laparotomi ve İAA diseksiyonu yapıldı, İAA'ya mikrovasküler klemp konularak 60 dakika iskemi, ardından klemp kaldırılarak 120 dakika reperfüzyon sağlandı. İ-R+Melatonin grubuna İAA'ya klemp konularak 60 dakikalık iskemi periyodu esnasında 45.dakikada Melatonin 10 mg/kg dozunda Vena Cava Inferior'(VCI) dan i.v. bolus olarak yapıldı. 60. dakikada klemp kaldırılarak 120 dakikalık reperfüzyon süreci tamamlandı. Sıçanlar kurban edilerek akciğer dokusunda histopatolojik inceleme yapıldı. Histopatolojik incelemede kontrol grubu ile iskemi reperfüzyon grubunda anlamlı patolojik değişiklik tesbit edildi. İ-R+Mel grubunda İ-R grubuna kıyasla alveoler ödem, konjesyon, Polimorfonükleer Lökosit varlığı, fibrin-platelet-trombüs varlığı ve intraalveoler kanama parametrelerinde anlamlı azalma saptandı. Kronik inflamasyon yönünden istatistiksel olarak anlamlı değişiklik saptanmadı. Bu çalışmanın sonucunda, Melatonin'in nötrofil infiltrasyonunu azaltarak, lipid peroksidasyonunu engelleyerek ve hem suda hemde yağda çözünabilir olmasından dolayı hücrenin tüm komponentlerine etki ederek güçlü serbest radikal süpürücü ve antioksidan özellik göstermesine bağlı olarak, alt ekstremité iskemi reperfüzyonuna bağlı olarak gelişen akciğer hasarını azalttığını söylemek mümkündür.

Anahtar Kelimeler: Alveoler ödem, Konjesyon, PMNL varlığı, İntraalveoler kanama, Melatonin

ABSTRACT

Yılmaz, F. The Effect of Melatonin on Lung Injury in Experimental Aortic Ischemia Reperfusion Model. Eskisehir Osmangazi University Faculty of Medicine Department of Cardiovascular Surgery Specialization Thesis, Eskisehir, 2010. The aim of this study was investigate the effect of melatonin on ischemia reperfusion damage that occurred lungs following occlusion-reperfusion on rat infrarenal abdominal aorta. Thirty Sprague-Dawley female rats were randomized to three groups equal in number (n=10). The control group underwent laparotomy and infrarenal abdominal aorta (IAA) dissection without ischemia application. The laparotomy and IAA dissection were performed on ischemia reperfusion (I-R) group, 60 min of ischemia by clamping of the IAA with a microvascular clamp and then 120 min of reperfusion after removal of clamp was provided. In I-R + Melatonin group, 10 mg/kg bolus Melatonin was given intravenously from the Vena Cava Inferior (VCI) at the forty-fifth minute of the 60 min of ischemia period with clamping IAA. The 120 min of reperfusion process was finished after removal of clamp at the sixtieth minute of clamping. Rats were sacrificed and histopathological evaluation was performed on lung tissue. There was a significant pathological difference on histopatological investigation between ischemia reperfusion and control groups. The alveolar edema, congestion, PMNL presence, fibrine-platelet-thrombus presence and intraalveolar hemorrhage parameters were lower in I-R + Mel group compared to I-R group. No statistically significant difference was determined for chronic inflammation. As a conclusion, according to this study, it is possible to say that Melatonin reduces lung damage result from lower extremity ischemia reperfusion with decreasing neutrophil infiltration preventing lipid peroxidation, and it exhibits potent free radical scavenger and antioxidant properties on all components of cell, because it's soluble both water and oil.

Key Words: Alveolar edema, Congestion, PMNL presence, intraalveolar hemorrhage, Melatonin

İÇİNDEKİLER

TEZ KABUL VE ONAY SAYFASI	iii
TEŞEKKÜR	iv
ÖZET	v
ABSTRACT	vi
İÇİNDEKİLER	vii
SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ	ix
ŞEKİLLER DİZİNİ	xi
TABLolar DİZİNİ	.xii
1.GİRİŞ.	1
2.GENEL BİLGİLER	.4
2.1. İskemi	4
2.2. Reperfüzyon Hasarı	7
2.2.1. Akciğer İskemi Reperfüzyon Hasarı	11
2.3. Serbest Radikaller	13
2.3.1. Serbest Radikallerin Hücresel Etkileri	15
2.3.2. Serbest Radikallerin Toksik Etkileri	16
2.4. Serbest Radikallere Karşı Savunma Mekanizmaları	17
2.4.1. Serbest Radikal Temizleyiciler	17
2.4.2. Serbest Radikal Üretiminin İnhibisyonu	20
2.5. Antioksidanlar	20
2.6. İskemi Reperfüzyon Hasarını Önlemek İçin Tedavi Stratejileri	21
2.7. Aortik Kros Klempin Akciğerler Üzerine Etkisi	21
2.8. Melatonin	23
2.8.1. Melatoninin Antioksidan Etkinliği	26
3. GEREÇ VE YÖNTEM	29
3.1. Deneklerin Hazırlanması ve Operasyon Tekniği	29
3.2. Deney Grupları	30
3.3. Akciğer Dokularının Histopatolojik İncelenmesi	31
3.4. İstatistiksel Değerlendirme	31
4. BULGULAR	32

5. TARTIŞMA	39
6. SONUÇ VE ÖNERİLER	45
KAYNAKLAR	46

SİMGELER VE KISALTMALAR

AA	Araşidonik asit
ADP	Adenozin di fosfat
AKK	Aortik Kros Klemp
ATP	Adenozin tri fosfat
Ca ⁺	Kalsiyum
cAMP	Siklik adenozin mono fosfat
C _{5a}	Kompleman faktör 5 a
DNA	Deoksi ribo nükleik asit
GPx	Glutasyon Peroksidaz
GRd	Glutasyon Redüktaz
G-6-PDH	Glukoz-6-Fosfat Dehidrogenaz
HOCl	Hipoklorik asit
H ₂ O ₂	Hidrojen Peroksit
H+E	Hemotoksilen Eozin
HOMT	Hidroksiindol-O-metil Transferaz
ICAM ₁	İntersellüler hücre adezyon molekülü
IL ₁ β	İnterlökin 1 beta
IL	İnterlökin
İAA	İnfrarenal Abdominal Aorta
iNOS	İndüklenebilir nitrik oksit sentaz
K ⁺	Potasyum
LT B ₄	Lökotrien B 4
Mel	Melatonin
Na ⁺	Sodyum
Na-K ATPaz	Sodyum potasyum ATPaz
NADPH	Nikotinamid adenin dinükleotid fosfat hidrojen
NAT	N-asetil Transferaz
NOS	Nitrik oksit sentaz
O ₂ ⁻	Süperoksit radikali
OH ⁻	Hidroksil radikali

PARS	Poli-ADP-Riboz Sentaz
PgE ₂	Prostoglandin E 2
PMNL	Polimorfon�kleerl�kosit
SOR	Serbest oksijen radikalleri
SR	Serbest radikaller
SOD	Süperoksit Dismutaz
TXA ₂	Trombaksan A ₂
TNF �	Tümör nekrozis faktör alfa

ŞEKİLLER

	Sayfa
2.1. Hücre zedelenmesinde sitoplazmik kalsiyum artışının kaynakları ve sonuçları	5
2.2. İskemide membran hasarının mekanizmaları	7
2.3. İskemi reperfüzyon hasarının patofizyolojisi	9
2.4. Pineal gland'da melatonin sentezinin kontrolü	25
4.1. İskemi-reperfüzyon grubunda intraalveoler kanama	35
4.2. İ-R grubunda fibrin-trombüs (Kapiller damar içerisinde eritrositler ve fibrinden oluşan trombüs yapısı)	36
4.3. İ-R grubunda alveol duvarında ödem ve konjesyon	36
4.4. İ-R grubunda PMNL infiltrasyonu	37
4.5. İ-R grubunda Kronik İnflamasyon	37
4.6. İ-R+Melatonin grubunda minimal derecede ödem ve konjesyon	38
4.7. İ-R+Melatonin grubunda minimal derecede konjesyon içeren akciğer parankimi	38

TABLOLAR

	Sayfa
2.1. Antioksidanlar	18
4.1. Kontrol grubu histopatolojik skorlaması	32
4.2. İskemi-Reperfüzyon (İ-R) grubu histopatolojik skorlaması	33
4.3. İ-R+Mel grubu histopatolojik sınıflaması	33
4.4. Kontrol ve İ-R gruplarının ikili karşılaştırması	34
4.5. Kontrol ve İ-R+Mel gruplarının ikili karşılaştırılması	35
4.6. İ-R ve İ-R+Mel gruplarının ikili karşılaştırılması	35

1. GİRİŞ

İskemi-reperfüzyon hasarı, iskemi ve onu izleyen reperfüzyon periyodu sonucu oluşur. İskemi; dokuya giden kan miktarındaki azalmaya bağlı olarak dokunun oksijen ve diğer metabolitlere olan ihtiyacının sağlanamaması ve oluşan atık ürünlerin uzaklaştırılamaması olarak tanımlanır. İskemiye bağlı doku hasarında, hücresel enerji depolarının boşalması ve toksik metabolitlerin birikmesi hücre ölümüne neden olur (1). İskemik dokuda irreversible hücre hasarını önlemek ve toksik metabolitlerin temizlenmesi için dokuya yeniden kan akımının sağlanması gerekir. Bu olaya reperfüzyon denilir. Reperfüzyonun gerçekleştirilmesi hücre içine moleküler oksijen sunulması ile birlikte dokuya toksik etki yapan serbest oksijen radikallerini hızla ortaya çıkarmakta ve iskemik dokuda iskeminin oluşturduğu hasardan daha fazla bir hasara sebep olmaktadır (2).

İskemi-reperfüzyon peryotları sırasında, mikrovasküler fonksiyonların bozulması ile hem direkt olarak etkilenen organda hemde sistemik enflamatuvar yanıtı harekete geçirerek uzak organlardaki arteriyollerde bozulmuş endotel bağımlı dilatasyon oluşur. Bu patolojik süreçte, kapiller yatakta artmış sıvı filtrasyonu ve lökosit tıkaçları, postkapiller venüllerde plazma proteinleri ve lökosit ekstravazasyonu oluşur. Bu etkiler mikrosirkülasyonun her kademesinde artmış oksijen radikal üretimi ile ortaya çıkmaktadır (3). Oluşan serbest oksijen radikalleri lipid peroksidasyonu ile hücre zarı yapısını bozar ve hücre zarı transport sisteminin çalışmasını engeller. Proteinlerin oksidatif modifikasyonu ile hücresel enzimlerin işlevlerini kaybetmesine neden olur. DNA üzerinde oluşturdukları hasar ile hücre ATP üretimini engelleyerek enerji üretiminin bozulmasına sebep olur. Enerji üretiminin azalması sonucu, hücre membranının ATP'ye bağımlı iyonik pompa fonksiyonu bozulur ve hücre içindeki fazla sodyumu (Na^+) dışarı çıkarmak için Na-Ca antiporter sistemi çalışır ve hücre içi kalsiyum (Ca^+) artar. Sitoplazma ve mitokondride aşırı miktarda Ca^+ birikmekte ve Ca^{++} un toksik etki göstermesine neden olmaktadır. Artan Ca^+ düzeyleri fosfolipazları, proteazları active ederek serbest radikal ve yağ asidi oluşumunu artırır. Bu da hücreyi ölüme sürükleyebilir (4).

Alt ekstremitte iskemi-reperfüzyonu sık karşılaşılan ve klinik açıdan önemli sonuçları olan bir olaydır. Akut arter tıkanıklığının olduğu çeşitli vasküler patolojiler, iskemiye neden olmuş vasküler travmalar, arterlere klemp koymanın gerekli olduğu vasküler cerrahi girişimler, transplantasyon ve şok gibi durumlarda alt ekstremitte iskemi-reperfüzyonuna sıkça rastlanır. İskemi sonrası reperfüzyonla birlikte serbest oksijen radikalleri ve inflamatuvar mediatörlerin etkisiyle hem lokal hemde sistemik hasar oluşumu başlamış olur (5). Kan akımının yeniden sağlanması ekstremitteyi kurtarmasına karşın, multisistem organ disfonksiyonu gelişimine ve mortaliteye neden olabilmektedir. Lokal etkiler iskelet kası ve damar endotelinde gözlenirken sistemik etkiler özellikle miyokard dokusunda, akciğer ve böbrekte gözlenir (6). Akciğer dokusu alt ekstremitte iskemi-reperfüzyon hasarından en çok etkilenen hedef organ olup, oluşan hasar sonucu bazı olgularda uzamış ventilatör ve inotropik destek gereksinimine, dolayısıyla da mortaliteye neden olabilmektedir (7). Abdominal aort cerrahisi sonrası iskemi-reperfüzyon hasarına bağlı akciğerlerde nonkardiyojenik pulmoner ödem geliştiği (8, 9), Akut Respiratuvar Distres Sendromu (ARDS) benzeri etki gösterdiği rapor edilmiştir (10).

Akciğerde oluşan bu hasara lenfositler, pulmoner arterial endotel hücreleri, alveoler makrofajlar, pulmoner alveoler tip II hücreleri aracılık etmektedir (11). Polimorfonükleer lökositlerin (PMNL) alt ekstremitelerin iskemi-reperfüzyonu nedeniyle oluşan akciğer hasarında esas role sahip olduğu gösterilmiştir ve azalmaları akciğerler üzerinde koruyucu etki gösterir (12). Reperfüzyon sürecinde nötrofil adezyonu ve agregasyonu stimüle olmakta (13) ve meydana gelen lökosit aktivasyonu serbest oksijen radikali üretimine neden olmaktadır (14).

Melatonin; beyinde bulunan nöroendokrin bir organ olan pineal bezden salgılanır. Melatonin sentezi ve salıverilmesi karanlık ile uyarılır, aydınlıkta baskılanır. Öncü maddesi bir indol esansiyel aminoasit olan Triptofandır. Yapılan in vivo ve in vitro çalışmalarda, melatoninin güçlü bir serbest radikal süpürücü ajan olduğu gösterilmiştir (15, 16, 17). Oldukça toksik olan hidroksil radikali başta olmak üzere, diğer serbest oksijen radikallerinin neden olduğu

oksidatif hasardan makromolekülleri özellikle DNA' yı koruyabilir. DNA hasarı oluşturan radikaller hücrede nükleer bir enzim olan poli-ADP-riboz sentaz'ı (PARS) aktive ederler. Bu enzim, DNA tek zincirinin kırılması ile aktive olur ve hücrede şiddetli enerji tüketimine yol açarak sonuçta nekrotik tipte hücre ölümüne neden olur. Melatoninin PARS aktivitesini inhibe ederek şok, inflamasyon ve organ hasarını önleyebileceği bildirilmektedir (16, 18). Serbest radikal yakalayıcı etkisi bakımından bilinen tüm antioksidanlardan daha güçlüdür. Yapılan çalışmalarda E vitaminine göre iki kat, glutatyona göre beş kat daha etkili olduğu gösterilmiştir (19, 20). Bunun en önemli nedeni melatoninin hem suda hemde yağda çözünebilir olmasından dolayı, hücrenin tüm komponentlerine etki edebilmesidir (16, 21).

Melatoninin birçok biyolojik etkisinin yanı sıra, güçlü bir radikal süpürücü (hidroksil radikali, süperoksit anyon radikali, peroksil radikali, singlet oksijen ve peroksinitrit anyonuna güçlü etkili) ve antioksidan (Süperoksit Dismutaz (SOD), Glutasyon Peroksidaz(GPx) Glutasyon Redüktaz(GRd) Gukoz-6-Fosfat Dehidrogenaz(G-6-PDH) stimülasyonu ve Nitrik Oksit Sentaz inhibisyonu) özelliğinin olması iskemi-reperfüzyon hasarında etkili bir koruyucu olabileceğini düşündürmektedir (15, 16, 17). Melatoninin antioksidan etkinliği ile ilgili birçok çalışma yapılmıştır. Bu çalışmanın amacı rat infrarenal abdominal aortasında okluzyon-reperfüzyon sonrası, akciğerlerde oluşan iskemi-reperfüzyon hasarına melatoninin etkisini araştırmaktır. Bu nedenle rat infrarenal abdominal aortasında okluzyon-reperfüzyon sonrası akciğer doku örnekleri histopatolojik olarak hemotoksilen-eosin boya ile boyanarak ışık mikroskopisi ile değerlendirildi.

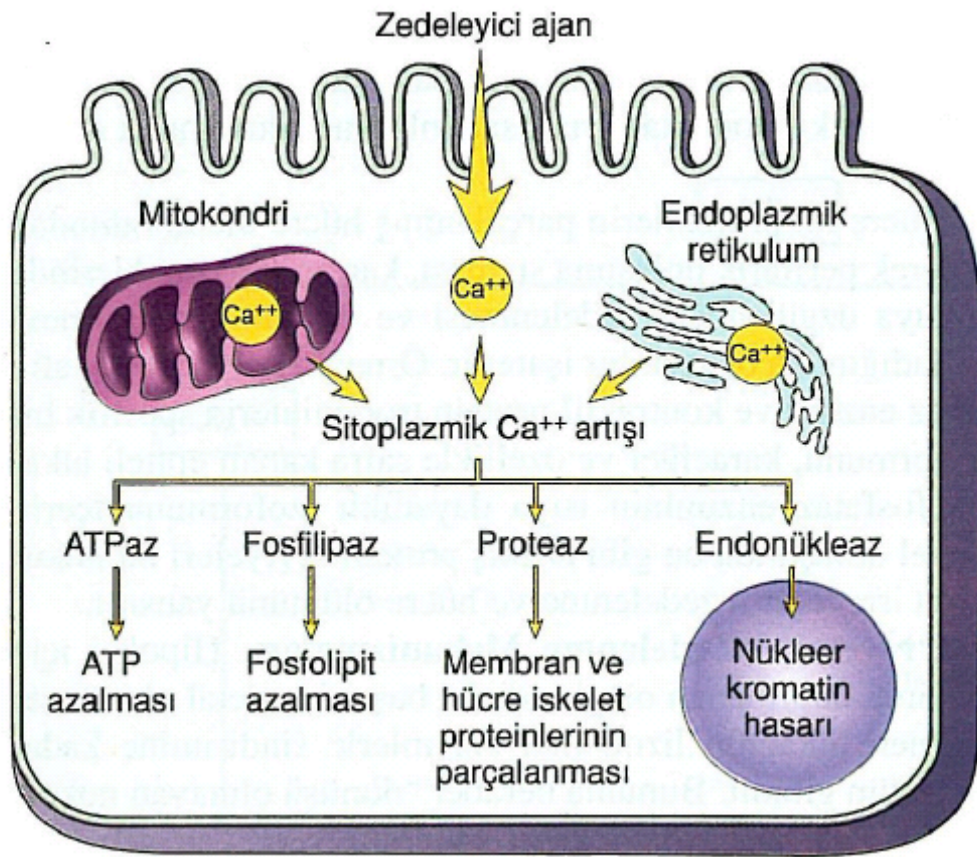
2. GENEL BİLGİLER

2.1. İskemi

İskemi tanım olarak dolaşım tarafından dokunun oksijen ve diğer metabolitlere olan ihtiyacının sağlanamaması ve oluşan atık ürünlerin uzaklaştırılamamasıdır. İskemiye bağlı doku hasarında hücresel enerji depolarının boşalması ve toksik metabolitlerin birikmesi hücre ölümüne neden olur (1).

İskemide hücre zedelenmesinin patogeneğinde oksijen yetersizliğinin önemi belirtilmekle birlikte kısmen azalmış reaktif oksijen türevleride hücre ölümünün önemli araçlarındandır. İleride ayrıntılı olarak anlatılacağı gibi bu serbest radikal türevleri hücre üzerinde lipid peroksidasyonu ve diğer zararlı etkilere neden olur (22).

İskemi klinik tıpta hücre zedelenmesinin en sık görülen tipidir. Glikolitik enerji üretiminin devam edebildiği hipoksinin aksine, iskemi glikoliz için gerekli maddelerin salınmasına olanak sağlar. Sonuç olarak iskemik dokularda anaerobik enerji üretimide yeterli maddelerin tükenmesi veya normalde kan akımı ile temizlenen metabolitlerin birikimiyle glikolizin engellenmesinden sonra durur. İskemi dokuları hipoksinin zedelediğinden daha çabuk zedeler. Hipoksinin ilk etkisi hücrenin aerobik solunumu yani mitokondrilerdeki oksidatif fosforilasyonu üzerinedir. Oksijen basıncının azalması sonucu hücre içi ATP üretimi belirgin olarak azalır. ATP azalmasının hücre içindeki birçok sistemler üzerinde etkisi olur. Yukarıda tanımlandığı gibi sitoplazmik serbest Ca^{+} da bir artış vardır. Ayrıca plazma membranının ATP enerjili sodyum pompasının aktivitesi azalır. Bunu sodyumun hücre içinde birikimi ve potasyumun hücre dışına çıkışı izler. Sodyum eriyiğinin net artışı, suyun izoozmotik artışı ile birlikte olup akut hücresel şişmeye neden olur. Bu şişme inorganik fosfatlar, laktik asit ve purin nükleozitleri gibi diğer metabolitlerin birikimi ile artan ozmotik yükü daha da artar (22).



Şekil 2.1. Hücre zedelenmesinde sitoplazmik kalsiyum artışının kaynakları ve sonuçları

Hücrel ATP de azalma ile birlikte adenozin monofosfatta artma da fosfofruktokinaz enzimini uyararak glikojenden ATP üretimi ile hücrenin enerjisini temin amacıyla gelişen anaerobik glikoliz hızını artırır. Sonuç olarak glikojen hızla tükenir. Bu durum histolojik olarak karbonhidratların boyanmasının azalması ile gösterilebilir. Artan glikolizde fosfat esterlerinin hidrolizi ile laktik asit ve inorganik fosfatların birikimine neden olarak hücre içi pH'nın düşmesine yol açar (22). Sonraki olay ribozomların granüllü endoplazmik retikülumdan ayrılması ve polizomlardan monozomların oluşumu ile protein sentezinin azalmasıdır. Hipoksi düzelmez ise mitokondrial fonksiyonun daha da kötüleşmesi ve membran permeabilitesinin artması daha fazla morfolojik bozulmaya neden olur. Osmotik regülasyon kaybından dolayı tüm hücreler şişmiş gibi görünür. Eğer oksijen eski haline dönerse yukardaki tüm bozukluklar reverzibldir. Bununla beraber iskemi devam ederse

irreverzibl zedelenme gelişir. Morfolojik olarak irreverzibl zedelenmeye mitokondrilerin daha şiddetli vakuolizasyonu ve mitokondri matriksinde şekilsiz ve Ca^{+} dan zengin yoğunlukların birikimi, plazma membranlarının geniş hasarı ve lizozomların şişmesi eşlik eder (22).

Membran hasarının birçok potansiyel nedeni vardır (22) (şekil 2.2.).

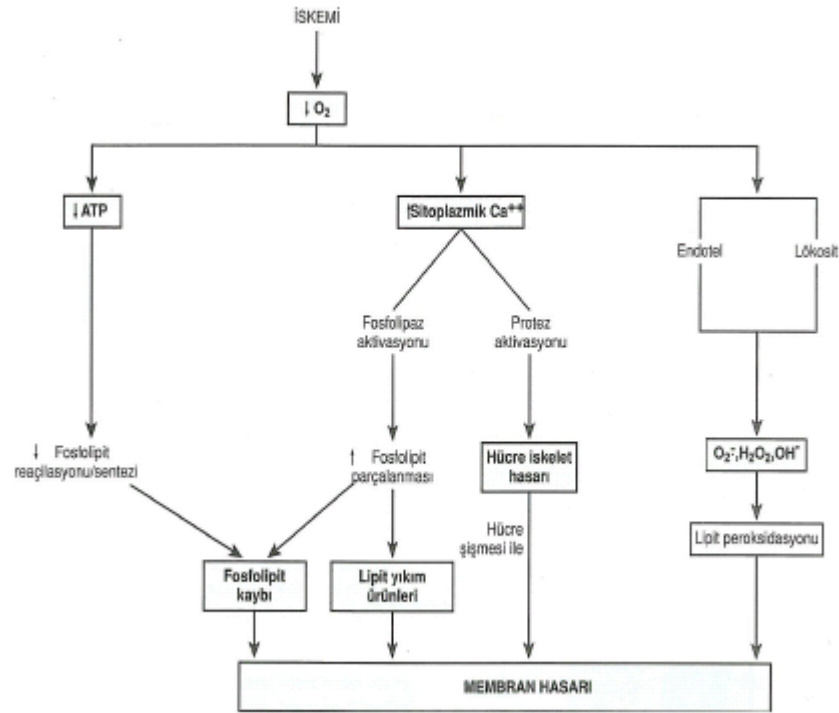
1- Membran fosfolipitlerinin ilerleyici kaybı: iskekiye bağılı Ca^{+} artışı ile endojen fosfolipazların aktivasyonu artan parçalanmaya yol açabilir.

2- Hücre iskelet anormallikleri: Hücre içi Ca^{+} artması ile aktive olan proteazlar hücre çatısına zarar verebilirler. Hücre şişmesinde, bazı zedeleyiciler hücre membranının hücre iskeletinden ayrılmasına neden olarak membranı gerilmeye ve yırtılmaya hassas kılabilir.

3- Toksik oksijen radikalleri: İndirgenmiş oksijen türevleri hücre membranına ve elemanlarına zarar verirler. Bu gibi oksijen radikalleri iskemik dokularda, özellikle kan akımının düzelmesinden sonra artar. Toksik oksijen türevlerinin büyük ölçüde reperfüzyon sırasında zedelenme alanına gelen PMNL tarafından oluşturulduğu düşünülmektedir.

4- Lipid yıkım ürünleri: Fosfolipit parçalanması sonucu iskemik hücrelerde biriken bu katabolik ürünler membranlar üzerinde yıkıcı etki yapar.

Membran hasarının mekanizmaları ne olursa olsun sonuç, yukarıda tanımlanan olaylarla Ca^{+} nın bol miktarda hücre içine girmesidir (22) (şekil 2.1.). Hücre içi Ca^{+} un artması hücreye potansiyel zararlı etkilere sahip çok sayıda enzimi aktif hale getirir. Ca^{+} un aktive ettiği enzimler fosfolipazlar (membran hasarına yol açar), proteazlar (membran ve sitoiskeletal proteinleri parçalar), ATP' azlar (ATP tüketilmesini hızlandırırlar) ve endonükleazlardır (kromatin parçalanması yapar) (22).



Şekil 2.2. İskemide membran hasarının mekanizmaları

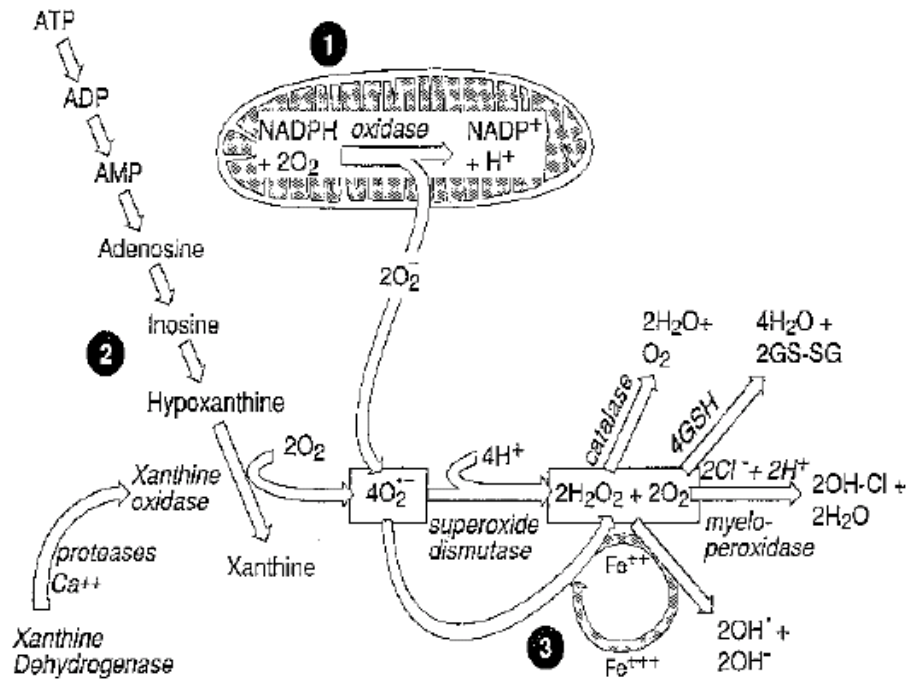
2.2.Reperfüzyon Hasarı

İskemik dokuya hem hücrenin rejenerasyonu hemde toksik metabolitlerin temizlenmesi için yeniden kan akımı gerekir. Ancak iskemik dokunun reperfüzyonu bir dizi olayın başlaması ile paradoksal olarak doku hasarına yol açar. İskemi döneminde dokuda biriken ksantin oksidaz dokuya aniden sunulan oksijeni kullanarak hipoksantini ürik asite çevirirken bu reaksiyon esnasında bol miktarda serbest radikal (SR) oluşumuna neden olur (1). Reperfüzyon döneminde dokuda nötrofil infiltrasyonu, kopleman sisteminin aktivasyonu, Ca^{+} aracılı proteazların aktivasyonu, arasidonik asit (AA) metabolizması gibi pek çok sistem de SR oluşumunu artırarak hasara neden olmaktadır (1). Günlük uygulama içerisinde tıbbın pek çok dalında iskemik ve reperfüzyonun yer aldığı olgular vardır. Şok, yanık, sepsis, pankreatit gibi olgularda ortaya çıkan hipovolemi ile iskemik ve bu durumların resusite edilmesi ile de reperfüzyon hasarı ortaya çıkmaktadır (1). Serebrovasküler olaylarda, myokard infarktüsünde, mezenteriyovasküler olaylarda uygulanan trombolitik tedavi veya revaskülarizasyon ameliyatları da yine reperfüzyon hasarına neden olmaktadır. Travmalarda ve travma

cerrahilerinde hipovolemi yada kanama kontrolü nedeniyle yapılan klemp, tampon uygulamaları iskemiye neden olurken resusitasyon sonrası mutlak bir reperfüzyon ile yine İ-R hasarı gündeme gelmektedir (1). Kardiovasküler cerrahide aort yada periferik arter klemp uygulaması sonrası ortaya çıkan tablo İ-R hasarı ile karakterizedir.

Reaktif Oksijen Türevlerinin Rolü

İskemik dokuların reperfüzyonu toksik ROS oluşumuna yol açar. Bunlar süperoksit anyonlar (O_2^-), hidroksil radikalleri ($OH^\cdot$), hipoklorik asit ($HOCl$), hidrojen peroksit (H_2O_2) ve nitrik oksitten derivate peroksinitrittir (23). Oksijen kökenli SR aracılığı ile oluşan injuride başlangıç olay ksantin oksidaz kökenli O_2^- anyonlarının üretilmesidir (24). İskemi sırasında sellüler ATP hipoksantin oluşturmak üzere indirgenir. Normal koşullarda hipoksantin, ksantin dehidrogenaz yardımıyla ksantine oksidize edilir. Bununla birlikte iskemi sırasında ksantin dehidrogenaz, ksantin oksidaza dönüştürülür. Substrat olarak nikotinamid adenin dinükleotid kullanan ksantin dehidrogenazın tersine ksantin oksidaz oksijeni kullanır ve bundan dolayı iskemi sırasında hipoksantin ksantine dönüşümünü katalize edemez ve buda hipoksantin dokuda aşırı seviyelere çıkmasına yol açar. Reperfüzyonla oksijen tekrar sunulduğunda fazla miktardaki hipoksantin ksantin oksidaz ile dönüştürülmesi toksik ROS oluşumu ile sonuçlanır (23) (şekil 2.3.).



Şekil 2.3. İskemi-Reperfüzyon hasarının patofizyolojisi

Sellüler ve subsellüler membranların lipid peroksidasyonu da oksijen kökenli SR'nin artırdığı hücre injurisinde önemli bir mekanizmadır (25). Hücre membranları içerisinde poliansatüre yağ asitlerinin lipid peroksidasyonu, hücresel bütünlük ve fonksiyon kaybı ile sonuçlanabilir. Bu durum tek başına $OH^\cdot$ radikalleri ile başlatılabileceği gibi, uygun bir şelatör varlığında O_2^- ile de başlatılabilir. Lipid peroksidasyonu bitişik yağ asiti moleküllerinde otokatalitik (22) bir zincir reaksiyonu yaygınlaştırmak suretiyle lipid peroksil radikallerinin oluşumuna neden olabilir. $OH^\cdot$ radikalleri ilave olarak proteinler ve deoksiribonükleik asitin (DNA) direk oksidasyonuna neden olabilir. Bu aşamada enzim inaktivasyonu ve DNA ipliklerinin kırılması söz konusudur (25). Bu gibi DNA hasarı hem hücre ölümü hemde hücrelerin malign değişiminde rol alır. SR'ler ayrıca sülfidril aracılı protein çapraz bağları oluşturarak parçalanmanın artmasına veya enzimatik aktivitenin kaybolmasına neden olur. SR reaksiyonları direkt olarak polipeptid parçalanmasına da yol açabilir (22).

Lökositlerin Rolü

Grisham ve arkadaşları iskemi-reperfüzyon (İ-R) etkisinin dokuda nötrofil birikimi ile doğrudan ilişkili olduğunu ve bu akümüülasyonun normal hemostaza göre iskemi döneminde 5 kat ve reperfüzyon döneminde ise 18 kat daha fazla gerçekleştiğini tespit etmişlerdir (26) Nötrofil bağımlı reperfüzyon hasarında nötrofil adezyonu en önemli basamaktır (27).

İ-R lökosit aktivasyonuna, kemotaksise, lökosit–endotelial hücre adezyonuna ve transmigrasyona neden olur (14, 28). Extravasküler kompartmana ulaşıldığında aktive edilmiş lökositler toksik ROS, proteazlar ve elastazlar salarlar ve buda mikrovasküler permeabilite de artışa, ödeme, tromboza ve parankimal hücre ölümüne neden olur (14, 28). PMNL hücreler myeloperoksidaz ve nikotinamid adenin nükleotid fosfat (NADPH) oksidaz yoluyla SR' ler oluşturabilir (29). Oksijen metabolitlerinin oluşumu lökosit NADPH oksidazın hızlı aktivasyonuna bağlıdır. Bu, NADPH'ı oksidasyona ugratır ve prosesde oksijen, O_2^- iyonuna indirgenir.



Süperoksit çoğu kez spontan dismutasyonla ($O_2^- + 2H^+ \rightarrow H_2O_2$) hidrojen peroksite dönüşür. Nötrofil lizozomları (azurofilik granüller) myeloperoksidaz enzimi içerirler ve klor gibi bir halid varlığında myeloproksidaz, H_2O_2 'yi HOCl' ye dönüştürür. HOCl kuvvetli bir oksidandır (22) (şekil 3). PMNL, H_2O_2 ve HOCl sekresyonu yoluyla hasarı indükleyebilir. Nötrofil granülleri ayrıca çok fazla sayıda enzim içerir. Bunlardan bazıları; serin proteaz, elastaz, kollojenaz ve jelatinaz'dır. Sonuç olarak bu enzimler ve ROS mikrovasküler permeabilite de artışa yol açarak yapısal matrix proteinlerinde lizise neden olur (29).

AA 20 karbonlu poliansatüre bir yağ asididir. Vücutta yalnızca hücre membran proteinlerinin bir komponenti olarak bulunur. AA bu fosfolipidlerden hücrel fosfolipazlar yoluyla salınır. Hücrel fosfolipazlar mekanik, kimyasal, fiziksel uyarı veya kompleman-5a (C5a) gibi iltihabi mediatörlerce

aktive edilirler. Daha sonra siklooksijenaz enzimi ile prostoglandinler (PG) ve TXA_2 oluşturulur. Nötrofillerde baskın olarak lipooksijenaz enzimi ile de 5-HPETE oluşur. 5-HPETE oldukça kararsızdır; ya nötrofiller için kemotaktik olan 5-HETE' ye, yada Lökotrienlere (LT) dönüşür. LT'lerdende özellikle LTB_4 nötrofiller için kemotaktiktir (22). Oksijen radikallerinin salınımı sonucunda intra sellüler Ca^{++} 'da bir artış olur ve bu Ca^{++} artışının plazma membran fosfolipaz aktivasyonunun artışında çok önemli olduğu düşünülür. Fosfolipaz aktivasyonu ile de AA metabolizma ürünleri oluşmaktadır (25). Bu ürünler nötrofil aracılı İ-R hasarını şu üç yoldan biriyle etkiler.

1- Bu ürünlerden özellikle TXA_2 ve LTB_4 kemo-atraktan etkilidir (30, 31). Myokardial iskemide AA metabolizma ürünleri inhibe edildiğinde nötrofil akümüülasyonu azaltılmıştır (32).

2- AA ürünleri aynı zamanda nötrofil aktivatörleri gibi çalışabilirler. LTB_4 nötrofil aracılı artmış kapiler permeabiliteyi in vivo ve in vitro indükleyebilir (33). TXA_2 'nin nötrofillerden H_2O_2 yapımını artırdığı bilinmektedir (34).

3- LT'ler ve TX mikrovaskülerizasyon düzeyinde kan akımını ve böylelikle direkt etkiyle doku perfüzyonunu etkiler (35). Bu yolla TX'in etkilerine bağlı reperfüzyon sırasındaki yavaş akımı ağırlaştırabilir (36).

Selektin ve adezyon molekülleri nötrofil aracılı hasarda önemli rol oynarlar. Selektinler; L-, P-, E-selektin olarak üçe ayrılır. P-selektin monoklonal antikörlerinin hayvan İ-R hasar modelinde, reperfüzyondan 10 dakika önce verildiğinde myokardial hasarı azalttığı gösterilmiştir (37). Hem P-, hemde E-selektin reperfüzyonda saatler içinde endotel üzerinde gösterilmişlerdir. Monoklonal antikörler ile açığa çıkmış nötrofil L-selektinin blokajıda nekroz alanlarında nötrofil infiltrasyonunu azalttığı gösterilmiştir (38).

2.2.1. Akciğer iskemi Reperfüzyon Hasarı

Akciğerlerde İ-R hasarı kardiyopulmoner bypas, pulmoner tromboendarterektomi ve akciğer transplantasyonundan sonra sıklıkla oluşmaktadır (39). Akciğerlerde oluşan bu hasara lenfositler, pulmoner arteriyal endotel hücreleri, alveolar makrofajlar, pulmoner alveolar tip II

hücreleri aracılık etmektedir (11). Pulmoner arter tromboendarterektomisini takiben reperfüzyon sonrasında görülen pulmoner ödem, endotel hücrelerinin İ-R'ye maruz kalması sonucu değişen vasküler denge, reperfüzyon sırasında azalan NO, siklik guanozin monofosfat düzeylerine bağlı olarak gelişen vasküler disfonksiyon sonucu bozulan koagülasyon, vasküler permeabilite, vazomotor tonus, lökositlerin adezyon ve agregasyon fonksiyonunda artış klinikte akciğerlerde iskemiye takiben reperfüzyonla karşılaşılan en önemli sorunlar olarak değerlendirilmektedir (40, 41).

Akciğerlerde iskemik doku hasarının patolojik tablosu inflamatuvar yanıt ile ortak özellikler göstermektedir. İskemiye bağlı olarak akciğerlerde proinflamatuvar sitokinlerin üretimi artmakta, mononükleer ve PMNL aktivasyonu ve dokuya invazyonu görülmektedir. Akciğer inflamasyon yanıtında İL-1 β ve İL-6 en çok üzerinde durulan sitokinlerdir. Transdermal growth faktör- β 1'in İ-R ve akciğer transplantasyonundaki önemi, İL-10 ile birlikte akut akciğer reddi ve reperfüzyon hasarını azaltmasının gösterilmesi ile gündeme gelmiştir (42). İ-R hasarı sırasında sitokin üretimi ile makrofaj, lenfosit ve nötrofil aktivasyonu paralel olarak gelişmektedir. İskemi, makrofajlardan proinflamatuvar sitokinlerin salınımını tetiklemekte ve erken reperfüzyon hasarı oluşturmaktadır. İL-8, İL-12, İL-18, TNF- α , interferon gama gibi sitokinler ise geç dönemde nötrofil ve T- lenfosit aktivasyonuna yol açmakta ve beraberinde geç dönem reperfüzyon hasarı oluşturmaktadır. Adezyon molekülerinin de iskemi sırasında pulmoner damar endotel hücrelerinde arttığı bilinmektedir. Bu moleküllerden P-selektin, intrasellüler adezyon molekülü (İCAM)-1 gibi moleküllerin deneysel olarak reperfüzyon sırasında bloke edilmelerinin de akciğer reperfüzyon hasarını azalttığı gösterilmiştir (43).

Oksidatif stres ROS oluşması ile karakterize bir durumdur. Bu türevler O_2^- , H_2O_2 ve OH^- dir. Bu türevler kararsız ürünler olup hücre permeabilitesinin artmasından hücre zarının erimesine kadar çeşitli derecelerde lipid peroksidasyonuna yol açmaktadır (44). Akciğerde bir çok hücre tipi (endotel hücreleri, tip II pnömositler, klara hücreleri) ROS oluşturabilmektedir (45). Akciğerlerde iki ana mekanizma ROS oluşumuna katkı sağlamaktadır. Bu

mekanizmalardan biri reperfüzyon yada solunum sırasında ortama oksijen yeniden sunulması ile O_2^- oluşumuna yol açan hipoksantin birikimidir. Anoksi sırasında ksantin dehidrogenaz enzimi ksantin oksidaz formuna dönüşmektedir. Enzimin oksidaz formu, ortamdaki oksijenin artışı ile hipoksantini O_2^- ye dönüştürmektedir. Diğer mekanizma ise iskemi ile aktive olan ve oksijenin O_2^- ve H_2O_2 ye dönüşümünü katalizleyen NADPH oksidaz sistemidir (46, 47). Bu sistem yoğunlukla nötrofillerin, monositlerin ve makrofajların yüzey membranlarında bulunmaktadır.

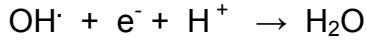
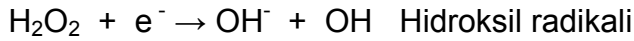
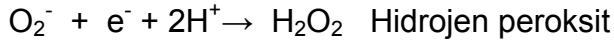
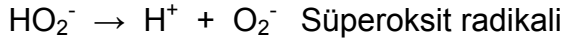
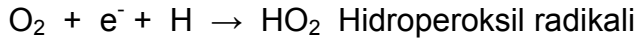
Akciğerde reperfüzyon hasarını önlemek amacıyla farklı klinik stratejiler uygulanmaktadır. Bunlara örnek olarak iskemiden önce NO inhalasyonu, PG'lerin saklama solüsyonlarına eklenmesi, reperfüzyon sırasında kandaki kompleman faktörlerinin inhibisyonu, trombosit aktive edici faktör antagonistlerinin kullanılması ve sürfaktan tedavisi verilebilir (48).

2.3. Serbest Radikaller

Oksijen; sekiz atom numaralı, doğada dioksijen (O_2) olarak bulunan kararsız bir elementtir ve kararsız durumu enerji düzeylerinde bulunan elektronların yapısına bağlıdır. Oksijen molekülündeki aynı yönde dönen iki elektrona sahip son orbitali önemlidir. Bu orbitallerden herhangi birindeki elektron, bir orbitalden diğerine geçtiğinde veya farklı orbitallerde farklı yönlerde döndüğünde 'singlet oksijen' (O_2) oluşur. Orbitalden birine ters dönüşlü bir elektron veya ikisine ters dönüşlü iki elektron gelirse 'oksijen radikali' elde edilir.

SR'ler organizmada hem metabolizma sırasında endojen olarak sürekli oluşurlar, hemde radyasyon, ilaçlar ve zararlı kimyasallar gibi etkenlere bağlı eksojen olarak ortaya çıkabilirler. Aerobik organizmalarda yaşamın sürdürülebilmesi için oksijene mutlak gereksinim vardır. Solunan oksijenin % 95'inden fazlası mitokondrilerde ATP şeklinde enerji oluşumunda kullanılırken, yaklaşık % 5'ide oldukça toksik SR'lere dönüşmektedir (1). Oksijenin bir elektron alarak indirgenmesi ile O_2^- radikali, iki elektron alarak indirgenmesi ile H_2O_2 oluşur. Üçüncü elektron ilavesi ile yüksek derecede reaktif OH^- radikali oluşur. Dördüncü elektron ilavesi ile de su oluşmaktadır .

Serbest radikallerin olusumu:



Memelilerde serbest radikaller başlıca anaerobik metabolizma sırasında üretilir (49, 50, 51). Fakat O_2 kaynaklı serbest radikallerden farklı olarak karbon ve kükürt bazlı radikaller de oluşabilmektedir. Hücre içinde oksijenin varlığı, toksik oksijen türlerinin uygunsuz olusumuna neden olabilir. Bunlardan de en önemlileri; hidrojen peroksit (H_2O_2), süperoksit (O_2^-) ve hidroksil ($\text{OH}^\cdot$) iyonlarıdır. Hücrenin bir çok yerinde (örneğin: plazma membranı, mitokondri, sitozol, lizozom ve peroksizom) oksidatif enzim aktivitesi sonucu meydana gelebilirler.

Oluşan SR' ler hücre membranı ve hücre içi organelleri etkilerken ekstrasellüler komponente de geçer ve uzak etkiler oluşturur. Burada SR' nin çözünürlüğü ile difüzyon hızı önem kazanmaktadır. Oksijen merkezli SR' ler incelendiğinde $\text{OH}^\cdot$ radikali çok potent olmasına rağmen difüzyon hızı yavaştır. Bu yüzden ancak oluştuğu yerde veya yakınında etki gösterir. Buna karşın H_2O_2 çok az potent olmasına rağmen plazma membranını, mitokondrial ve peroksizomal membranları rahatlıkla geçerek uzak etki gösterebilirler (52, 53).

Fizyolojik ve patolojik durumlarda, organizma yüksek oranda oksidanlarla ve serbest radikallerle karşı karşıya gelebilir. Bu radikallerin önemli bir kısmı enzimatik sistemler tarafından etkisiz hale getirilirler. Oksidan maddelerin oluşumu ile savunma mekanizmalarının işleyisi arasında

bir denge vardır ve bu dengenin oksidan baskı yönünde artması hücre hasarı ile sonuçlanır. Oksidan etki sonucunda oluşan hasarın büyüklüğü, hasarın oluşma hızı ve oksidatif hasarı önleyen koruyucu mekanizmalar arasındaki dengeye bağlıdır (53,54, 55, 56).

Serbest radikaller, hücrenin tüm organellerinde oluşabilirler. Hücre zarına bağlı yada serbest olarak bulunan bir çok enzimin etkisi ile de serbest radikaller oluşmaktadır. Doymamış yağ asitlerinin ve ksénobiyotiklerin oksidasyonunda rol oynayan hücre organeli endoplazmik retikulumdur ve bu sistem sitokrom P-450 ve sitokrom b5 içermektedir. Detoksifikasyon sırasında serbest radikaller meydana gelir. Dokuda bulunan peroksizomlar yüksek düzeyde oksidaz (örneğin; D-amino asit oksidaz, ürat oksidaz, açıl koenzim-A oksidaz) içerdiklerinden dolayı güçlü bir hidrojen peroksit kaynağıdır (57). Oksidazlar, hidrojen akseptörü olarak oksijeni kullanarak substrattan hidrojen ayrılmasını katalize ederler. Plazma membranında bulunan lipoksijenaz ve siklooksijenaz, radikal üretime yol açan reaksiyonlardan sorumludur. Bu enzimlerin katalizlediği reaksiyonlar sonucunda prostaglandinler, tromboksanlar ve lökotrienler meydana gelir.

2.3.1. Serbest Radikallerin Hücresel Etkileri

SR' ler çevredeki tüm biyomoleküllere (nükleik asitler, membran lipidleri, enzimler, reseptörler gibi) zarar verirler. Hücresel hasar oluşumunda üç tip reaksiyon önemlidir.

Lipid peroksidasyonu: SR'lerin lipidler üzerindeki en önemli etkileri lipid peroksidasyonunu uyarmasıdır. Lipid peroksidasyonu SR' ler tarafından başlatılan ve hücre zarlarında bulunan çok doymamış yağ asitlerinin oksidasyonuna yol açan kimyasal bir olaydır. Süperoksit radikali, hidroksil radikali, peroksil radikali, alkoksil radikali, lipid peroksidasyonunu başlatan başlıca radikallerdir (1).

Hücre zarlarında lipid peroksidasyonu sonucu zar transport sistemi etkilenmekte, hücre içi ve dışı iyon dengeleri bozulmaktadır. Bunun sonucunda hücre içi Ca^{+} konsantrasyonu artmakta ve Ca^{+} bağımlı proteazlar aktive olmaktadır. Bu olaylar hücre hasarında önemli role sahiptir. Nitekim hücrede aşırı Ca^{+} birikmesinin sitotoksik olduğu gösterilmiştir (1). Öte yandan

lipid peroksidasyonunun son ürünü olan aldehitler de sitotoksik özelliğe sahiptirler.

Proteinlerin oksidatif modifikasyonu: SR' ler aminoasit yan zincirlerinin oksidasyonuna neden olarak protein-protein bağlarının oluşmasına yol açarlar. Ayrıca protein ana zincirini okside ederek protein parçalanmasına neden olurlar. Böylece hücrede fonksiyonel öneme sahip enzimlerde bozulmalar ortaya çıkmaktadır. (1).

DNA hasarı: SR'ler, nükleer ve mitokondrial DNA'da timin ile reaksiyona girerek tek zincir kırılmaları oluşturur. Bu durumda DNA onarım mekanizmasının uyarılması ile poli (ADP-riboz) polimeraz (PARS) enzimi aktive olur (1). PARS nükleusta bulunan, protein modifikasyonu ve nükleotid polimerizasyonu yapan bir enzimdir. Fizyolojik rolü tam bilinmemekle birlikte gen ekspresyonu, gen amplifikasyonu, hücresel farklılaşma, malign transformasyon, hücre bölünmesi ve DNA replikasyonunda rolü olduğuna dair veriler vardır. PARS'ın aktivasyonu sonucu bu enzimin substratı olan nikotinamid dinükleotid (NAD) düzeyi düşer. NAD ise glikoliz ve trikarboksilik asit sikluslarında kofaktör olduğundan bu sikluslar durur ve böylece ATP oluşumu azalır. Sonuçta hücrelerin enerji kaybetmeleriyle nekrotik tip hücre ölümü olur (1).

2.3.2. Serbest Radikallerin Toksik Etkileri

Serbest oksijen radikalleri hücrede aerobik metabolizma sırasında üretilir ve hücredeki tüm moleküller ile reaksiyona girebilirler ve en çok lipitler saldırıya uğrar (58). Üretim miktarı metabolizma hızına bağlı olarak artar (59). Normal şartlarda metabolik reaksiyonlarda kullanılan oksijenin sadece %5-10 'u kuvvetli toksik ürünlere dönüşür. Aerob organizmalar intrasellüler ve ekstrasellüler antioksidan savunma sistemleri ile bu toksik metabolitleri etkisiz hale getirerek kendilerini korur ve zararı minimum seviyede tutarlar. Antioksidan defans sisteminin gücünün zayıfladığı yada SR üretiminin bu savunma sisteminin gücünü aştığı hallerde hücreler zarar görür (60). Oksijen radikalleri çok kısa süreli oluştukları halde bu süre içinde etkin olarak detoksifiye edilmezlerse nükleik asitler, proteinler, lipitler, karbonhidratlar ve

glikoproteinleri içine alan bütün biyolojik materyal ile reaksiyona girerek reversibl yada irreversibl değişikliklere yol açarlar (59).

SR' lerin hücredeki başlıca zararlı etkileri; proteinlerin zarar görmesi, enzimlerin inaktivasyonu, membran ve serum lipitlerinde peroksidasyon, hücre yüzeyindeki reseptörlerde değişiklik, Na-K-ATPaz, Ca-ATPaz gibi hücre iyon transport proteinlerinin tahrip olması, DNA'nın zarar görmesi, bağ dokusu harabiyeti, ekstrasellüler etkiler olarak bildirilmektedir (58, 60).

Bir kısım O_2^- vücutta nötrofil, monosit, makrofaj, eozinofil gibi inflamatuvar hücrelerden, hücrelerin yüzeylerinde bulunan redükte NADPH oksidaz sistemi ile kasten yapılmaktadır. Bu büyük miktardaki O_2^- yapımının amacı yabancı mikroorganizmaların öldürülmesidir. Kronik inflamasyonda bu normal koruyucu mekanizma hasara neden olabilir. Solunum yolu ile almış olduğumuz oksijenin yaklaşık %1-3 'ü O_2^- yapımı için kullanılır (61).

Bir diğer fizyolojik SR olan NO, vasküler endotel tarafından bir relaksing faktör olarak yapılır. Ayrıca beyinde ve fagositlerde de yapılır (62). NO pek çok fizyolojik fonksiyonlar için yararlı olmakla birlikte aşırısı toksik olabilir (65, 66). O_2^- ve NO kimyasal olarak aşırı reaktif olmamakla birlikte bazı durumlarda daha toksik ürünler üretebilirler (63).

2.4. Serbest Radikallere Karşı Savunma Mekanizmaları

2.4.1. Serbest Radikal Temizleyiciler

SR temizleyicileri, reaktif oksijen parçaları ile reaksiyona girerek bunları zararsız maddeler haline dönüştüren ajanlardır. Bu ajanlardan enzimatik olanlar SOD, KAT, glutatyon (GSH), Gprx ve GSH redüktazdır.

Tablo 2.1. Antioksidanlar

Antioksidanlar		
Endojen		Eksojen
Enzim olanlar	Enzim olmayanlar	
1) Süperoksit dismutaz 2) Glutasyon peroksidaz (GSH-Px) 3) Glutasyon S-Transferazlar (GST) 4) Katalaz (CAT) 5) Mitokondriyal sitokrom oksidaz sistemi 6) Hidroperoksidaz	1) Melatonin 2) Seruloplazmin 3) Transferrin 2) 4) Myoglobin 5) Hemoglobin 6) Ferritin – 7) Bilirubin 8) Glutasyon 9) Sistein 10) Metiyonin 11) Ürat 12) Laktoferrin 13) Albümin	1) Vitaminler * α -tokoferol (Vit E) * β -karoten(Pro-vit A) * Askorbik asit (Vit C) * Folik asit (folat) 2) İlaçlar * Ksantin oksidaz inhibitörleri -Allopürinol -Oksipürinol NADPH oksidaz inhibitörleri -Adenozin -Lokal anestezikler -Kalsiyum kanal blokerleri -NSAİD * Mannitol * Albümin *Demir selatörleri *Desferoksamin *Barbitüratlar *Sitokinler(IL-1, TNF) *N-asetil sistein(NAC) 3) Gıdalar

Süperoksit Dismutaz

SOD, in vivo olarak dokuları SR' lere, özellikle O_2^- ' ye karşı koruyan endojen bir enzimdir (64). İnsanlarda SOD' un Cu-Zn ve Mn kapsayan iki izoenzimi vardır. Cu-Zn içeren tipi sitozolde, Mn içeren tipi mitokondride yerleşmiştir (1). Bu izoenzimlerin her ikisi de O_2^- ' nin H_2O_2 ' ye ve moleküler oksijene dönüşümünü katalizler (1, 64). O_2^- ' i metabolize etme yeteneğine sahip sirkulatuar proteinler, seruloplazmin ve ekstrasellüler SOD'dir. Bununla birlikte bu sirkulatuar ajanların temizleyici etkisi aşıkardır değildir. Çünkü bu proteinlerin plazmadaki aktiviteleri oldukça azdır (64).

Katalaz

KAT vücutta doğal olarak oluşan bir metalloproteindir. İn vivo olarak SOD ile kombine bir şekilde etki eder (64). H_2O_2 peroksizomlarda KAT ile su ve oksijene indirgenir (65). KAT' ın canlı organizmanın eritrosit, karaciger, böbrek, kemik iliği ve çeşitli dokularında da bulunur (66). KAT enzimi eritrosit

içinde çözünür bir şekilde bulunmuştur (67). KAT enzimi için optimum pH 7.6'dır (68).

Glutatyon

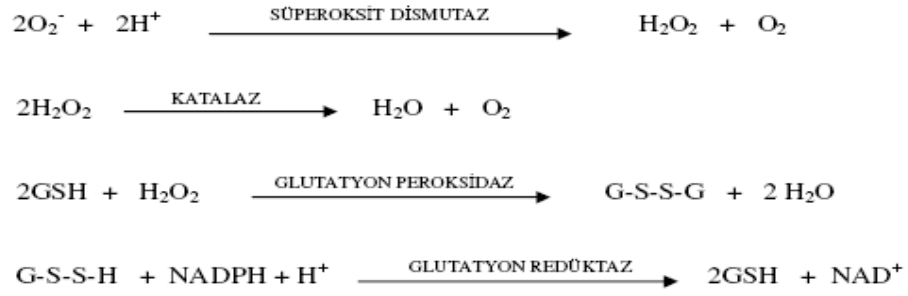
Birçok hücrede bulunabilen GSH tripeptid (gama glutamil sisteinilglisin) yapıdadır. Glutamat, sisteine gama-karboksil aracılığı ile bağlanır. Molekülün aktif kısmı sisteinin sülfidril grubudur. Gama-glutamil kısmı hücre içi stabilizeyi ve peptidazlara direnci sağlamaktadır. GSH hücre zarında aminoasitlerin taşınmasında rol alır ve koenzim olarak enzim yapısına girer. Proteinlerin sülfidril yapılarını korur, toksik maddelerin etkilerinin ortadan kaldırılmasında rol oynar (69).

Glutatyon Peroksidaz

GSH peroksidaz enzimi hücreleri organik hidroperoksitler ve H_2O_2 tarafından oluşturulan oksidatif tahribata karşı GSH'ı kullanarak korur (70). İndirgenmiş GSH, bol miktarda tiyol ihtiva eden, düşük moleküler ağırlıklı bir maddedir. GSH, sahip olduğu sülfhidril grubu ile oksidatif hasar ve toksik maddelere karşı hücreleri korur. GSH dokularda açığa çıkan lipid peroksitleri, H_2O_2 'yi, askorbik asiti ve SR'leri indirger ve Gprx enzimi için kofaktör olarak görev yaparak sonuçta okside olur (71, 72). Gprx, H_2O_2 varlığında redükte GSH'nin okside glutatyona (GSSG) yükseltgenmesini katalize eder (73). Ayrıca H_2O_2 mitokondri ve sitoplazmada Gprx ile su ve oksijene indirgenir.

Glutatyon Redüktaz

GSH redüktaz bir flavin enzimidir ve koenzimi NADPH ve prostetik grubu flavinadenin dinükleotiddir. Hem sitozol hemde mitokondride bulunmaktadır. GSSG hücreyi oksidanlara karşı koruyamaz. Hücre elektron kaynağı olarak NADPH'ı kullanan GSH redüktazın katalizlediği bir reaksiyonla GSSG tekrar indirgenmiş GSH'a çevrilir (74).



Bu enzimlerin dışında ayrıca dimetilthioüre, dimetil sülfoksit ve merkaptopropionil glisin hidroksil radikalının tahmin edilen temizleyicileridir. Mannitol klinik olarak uzun yıllardan beri hidroksil radikal temizleyici etkisi nedeniyle kullanılmaktadır (59). Ayrıca N-asetilsistein ve kaptopril gibi tiol içeren bileşiklerin serbest oksijen radikalleriyle reaksiyona girdikleri ve NO oluşumuna yol açtıkları ileri sürülmektedir (75).

2.4.2. Serbest Radikal Üretiminin İnhibisyonu

SR hasarını azaltmak için kullanılan diğer bir yaklaşım SR üretiminde rol oynayan enzimlerin inhibisyonudur. Ksantin oksidaz inhibitörü allopurinol hipoksantin yapısı bir analogudur. Allopurinol ksantin oksidazı kompetitif olarak inhibe ederek O_2^- anyonunun üretimini azaltır (76).

2.5. Antioksidanlar

Antioksidanlar, SR oluşumunu sınırlandırma, tetiklenen biyokimyasal reaksiyonların kırılmasını sağlama, oluşan radikalleri ortadan kaldırma ve hasarlı molekülleri tamir etme ve temizleme gibi çeşitli mekanizmalarla etkilerini gösterirler. Antioksidan sistem grubuna giren enzimler; SOD, KAT, Gprx, glutatyon redüktaz, glutatyon transferazdır. Suda çözünen radikal tutucular; GSH, vitamin C, ürik asit, glikoz ve sisteindir. Yağda çözünen radikal tutucular; vitamin E, β -karoten, bilirubin, ubikinol ve flavanoidlerdir (1). Hem suda hem yağda çözünebilen; Melatonin. Metal iyonlarını bağlayan proteinler; ferritin, transferin, haptogloblin, seruloplazmin ve albumindir (1). Ayrıca propranolol, kalsiyum kanal blokerleri, kaptopril ve lipoksigenaz

inhibitörü olan nafazotromunda deneysel olarak değişik sitoprotektif etkileri gösterilmiştir (76).

2.6. İskemi Reperfüzyon Hasarını Önlemek İçin Tedavi Stratejileri

Kontrollü deneysel modellerde İ-R hasarını başarıyla önleyen veya sınırlayan birçok tedavi stratejileri klinik pratik kullanımda süpheli sonuçlar vermektedir veya insan klinik araştırmalarında kullanılmamaktadır. İ-R hasarını azaltmada kombine stratejilerin etkinliğini bulan az sayıda çalışma vardır (77).

İR hasarını azaltmak için tedavi stratejileri (77):

- 1-Kontrollü, dereceli reperfüzyon (controlled, graded reperfusion)
- 2-İskemik önkoşullama (preconditioning)
- 3-Aspirin-triggered Lipoxin Analogları
- 4-Antioksidan tedavi
 - a-Süperoksit dismutaz
 - b-N-asetilsistein
 - c-Allopurinol
 - d-Demir selatörleri
 - e-Vitamin E
 - f-Katalaz
 - g-Mannitol
 - h-Tioller
- 5-Kalsiyum antagonistleri
- 6-Anjiotensin konverting enzim inhibitörleri
- 7-Anti-kompleman tedavi
- 8-Lökosit deplesyonu / filtrasyonu
- 9-Anti-sitokin veya lökosit adezyon molekülü mAb
- 10-Endotelin reseptör antagonistleri
- 11-Platelet aktivasyon faktör antagonistleri
- 12-LTB4 antagonistleri

2.7. Aortik Kros Klempin Akciğerler Üzerine Etkisi

Abdominal ve özellikle torakal aorta cerrahisi sonrası pulmoner

komplikeasyonlar sıklıkla gözlenir. Yakın bir çalışmada 1414 hastaya torakoabdominal anevrizma tamiri yapılmış ve sonuçları analiz edilmiş (78). % 8 oranında ciddi pulmoner komplikeasyon görülmüş ve uzamış respiratuar destek ve trakeotomi uygulanmış. Torasik aortanın klemplenmesi ve sonrasında pulmoner vasküler direncin artması yaygın bir bulgudur (79, 80). İAA' dan klemp kaldırılmasında insanlarda pulmoner arter basıncında ve pulmoner vasküler dirençte artışa yol açmaktadır (79, 81, 82, 83, 84). Bu tip artışların mekanizması açık değildir fakat pulmoner mikroembolizm buna sebep olabilir (83, 84). AKK sırasında ve klemp kaldırıldıktan sonra pulmoner dolaşım bozukluklarında PG' lerin rolü açık olarak gösterilmiştir. İskemi pulmoner arter basıncını artıran TX yapımına neden olur (85). Bu da akciğerlerde nötrofil tutulmasını indükler ve pulmoner mikrovasküler permeabiliteyi artırır. İnfrarenal AKK konulması insanlarda TXA₂ sentezinde artışa ve ortalama pulmoner arter basıncında ve pulmoner vasküler dirençte zaman bağımlı artışa yol açar (80). Bundan başka TX sentezinin inhibisyonu veya TX reseptörlerinin blokajı pulmoner hipertansiyonu, lökopeniyi, akciğerlerde lökosit sekestrasyonu ve akciğerde mikrovasküler permeabilite artışını engeller (86). Arka bacak iskemisi sonrası akciğerlerde sekestre olan nötrofiller büyük olasılıkla hem elastaz hemde serbest oksijen radikalleri salınımı yoluyla akciğerde permeabilite ödemeine yol açar (87). Bu nedenle vücudun iskemik alt yarısının reperfüzyonu TXA₂ sentezine ve nötrofil ve platelet aktivasyonu ve pulmoner disfonksiyona neden olmaktadır (88, 89).

Aortik cerrahi sonrası tanımlanan pulmoner komplikeasyonlar iskemik dokulardan salınan ve daha sonra akciğerlerde yakalanan anaerobik metabolik ürünlere ve mikroagregatlara bağlanır (90). Nötropenik hayvanlar reperfüzyonla pulmoner permeabilitede veya plasma veya akciğer lenf TX konsantrasyonlarında artış göstermedi. Nötrofillerin serbest oksijen radikalleri ve proteazları içeren toksik bileşikler salgıladığı olasıdır. Pulmoner mikroembolizasyon da akciğer dokularından vazoaktif (esas olarak vazokonstriktif) maddelerin salınımı ile ilişkilidir (91, 92, 93).

Pulmoner dolaşımda gözlenen bu değişiklikler (artmış basınç ve vasküler direnç) aortik cerrahi sırasında gösterilmiş olan anafilatoksin

aktivitesindeki artış ile kısmen açıklanabilir (94). C3a ve C5a pulmoner vasküler tonusu artırır (95), immün yanıtı suprese eder (96) ve bu nedenle pulmoner enfeksiyon riskini artırabilir.

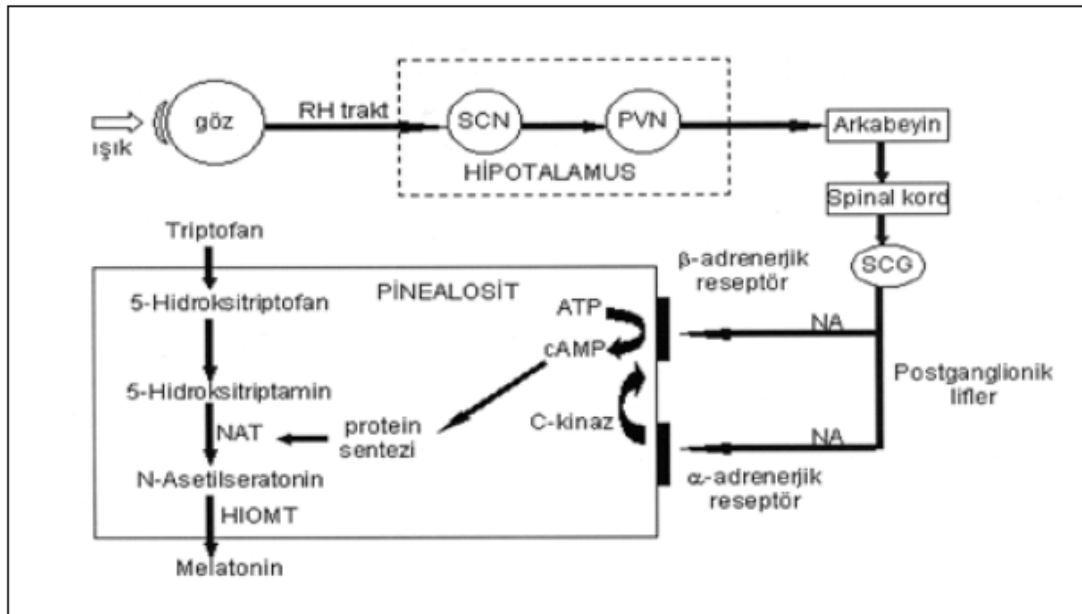
2.8. Melatonin

Beyinde bulunan nöroendokrin bir organ olan pineal bez, dış çevrenin aydınlık ve karanlık olmasına göre organizmanın başta endokrin sistem olmak üzere birçok sistemin fonksiyonundaki değişiklikleri düzenler. Pineal bez beyin orta hattında üçüncü ventrikülün arkasında yer alır. Bu merkezi konumu nedeniyle beynin sagittal düzleminin belirleyicisi olarak kullanılır. Pineal bez pinealositler ve nöroglialardan oluşur. Pinealositler norepinefrin, histamin, serotonin, melatonin, dopamin gibi biyolojik aminleri ve LHRH, TRH, somatostatin, arginin, vasopressin gibi peptidleri sentez ederler (97). Pineal bez böbreklerden sonra damarsal yapıdan (kan akımı 4 ml/dk/gr) en zengin organdır. Bezin uyarımında sempatik sistem baskındır ve superior sempatik gangliondan kaynaklanan sinir lifleri internal karotid sinir ile beze ulaşır. Radyolojik çalışmalarda pineal bez hacminin yaşamın ikinci yaşında doğuma göre iki kat arttığı ve sonrada sabit seyrettiği gösterilmiştir.(98)

Pineal bezin suprakiazmatik nükleus (SCN) ile birlikte aktivitelerimizi doğa ile senkronize bir şekilde yapmamızı sağlayan biyolojik saat olduğu düşünülmektedir. (99) Bu bezden salgılanan ana madde Melatonin'dir. Melatoninin sirkadiyen ritimler, uyku, ruhsal durum, üreme, tümör gelişimi ve yaşlanma gibi birçok olayın biyolojik regülasyonunda rolü olabileceğine dair kanıtlar bulunmaktadır (97).

Melatonin salgılanma hızını belirleyen en önemli faktör çevrenin ışık düzeyidir. Genel olarak, ışık melatonin yapımını azaltırken, karanlık artırır. Karanlığın başlaması ile fotoreseptörler hipotalamustaki suprakiazmatik ekirdeği uyarır. Suprakiazmatik çekirdek memelilerde biyolojik sirkadiyen saattir. Uyarılar buradan torasik spinal kordun intermediolateral kolonuna, buradan da superior servikal gangliona ulaşır, daha sonra postganglionik sinirlerle pineal beze iletilir. Bez içindeki postganglionik sinir uçlarından salınan norepinefrin ile pinealosit membranındaki α_1 ve β_1 adrenerjik reseptörleri uyarılarak hücre içi cAMP yapımı artar. Bu da melatonin yapım

hızını düzenleyen NAT aktivitesini artırır, sonuçta serotoninden melatonin sentezi ve salgılanması artar. (şekil 2.4.) Melatonin sentezinde önemli rol oynayan NAT ve HOMT enzim aktiviteleri gece daha yüksektir (100). Gün ışığının bulunduğu saatlerde retina fotoreseptör hücreleri hiperpolarizedir ve retinahipotalamik-pineal sistem sessizdir, bu dönemde çok az melatonin salgılanır. İnsanlarda melatonin düzeyindeki artışı karanlık çökmesinden hemen sonra başlar (20:00-23:00), gecenin ortasında (01:00 ile 05:00 arasında) doruk düzeyine ulaşır, daha sonra gecenin ikinci yarısında melatonin düzeyi giderek azalır. Melatonin sentezinde başlangıç maddesi, plazmadan alınan ve bir indol aminoasit olan “triptofan” dır. Triptofan, esansiyel bir aminoasit olup, besinlerle dışarıdan alınması gerekmektedir. Triptofan pinealositlerde triptofan hidroksilaz enzimi ile 5-hidroksitriptofana hidroksillenir. 5-hidroksitriptofan, aromatik-L-aminoasit dekarboksilaz ile 5-hidroksitriptamine (seratonin) dekarboksillenir. Seratonin, N-asetil Transferaz (NAT) ile N-asetil seratonine ve bu da Hidroksiindol-O-metil transferaz (HOMT) ile Melatonine (N-asetil-5-metoksitriptamin) dönüşür. (şekil 2.4.) Serotoninin melatonin dönüşümünü sağlayan NAT ve HOMT aktivitelerinin geceleri daha yüksek olduğu belirlenmiştir. Melatonin sentezi için gerekli enzimlerin, pinealositler dışında, SCN, retina ve ince bağırsakta da bulunduğu, immünohistokimyasal yöntemlerle gösterilmiştir. Dolaşımdaki melatonin konsantrasyonu pineal bezdeki melatonin üretimini yansıtır (101, 102).



Şekil 2.4. Pineal gland'da melatonin sentezinin kontrolü

Melatonin, pineal bezde sentezlenip depolanmadan hızlı bir şekilde komşu kapiller damarlara geçer. Lipofilikliğinin çok yüksek olmasından dolayı, tüm biyolojik doku ve sıvılara dağılır. Plazmada yaklaşık %70'i albumine bağlı olarak taşınır. Çoğu karaciğer de olmak üzere, böbrekte de metabolize edilir. Karaciğerde 6-hidroksimelatonine dönüşür; bu da, böbrekte sülfat ve glukuronik aside bağlanarak idrarla atılır. Serum melatonin konsantrasyonu, yaşa göre de anlamlı olarak değişir. Yaşlanma ile birlikte melatonin düzeyinin de giderek azaldığı bilinmektedir (97, 99, 103,). Pineal bez melatonin yapımından sorumlu tek organ değildir. Diffüz nöroendokrin sistem içinde kabul edilen APUD (amine precursor uptake and decarboxilation) hücrelerinde melatonin sentez edildiği gösterilmiştir. Bu hücreler retina, lakrimal bezler, beyin diğer bölgeleri ile bronş, karaciğer, böbrek, adrenal bezler, gastrointestinal sistem, timus, plasenta, over, testis ve endometriumda yer alır. Ayrıca mast hücresi, lökosit ve naturel killer hücrelerinde melatonin sentezlenmektedir.

İnsanda iki melatonin reseptörü klonlanmıştır: MT1 (Mel1a) ve MT2 (Mel1b) (100, 104, 105). Ancak üçüncü bir bağlayıcı bölgenin varlığı da kabul edilmektedir: MT3 (ML2). Bu reseptör ve bağlayıcı bölgelerin farklı dağılımları bireysel fizyolojik fonksiyonları etkiler.

2.8.1. Melatoninin Antioksidan Etkinliği

Yapılan in vivo ve in vitro çalışmalarda, melatoninin gl bir serbest radikal süpürücü ajan olduğu gösterilmiştir.(15, 16, 17) Oldukça toksik olan hidroksil radikali başta olmak üzere, diğer serbest oksijen radikallerinin neden olduğu oksidatif hasardan makromolekülleri özellikle DNA yı koruyabilir. DNA hasarı oluşturan radikaller hücrede nükleer bir enzim olan poli-ADP-riboz sentaz'ı (PARS) aktive ederler. Bu enzim, DNA tek zincirinin kırılması ile aktive olur ve hücrede şiddetli enerji tüketime yol açarak sonuçta nekrotik tipte hücre ölümüne neden olur. Melatoninin PARS aktivitesini inhibe ederek şok,inflamasyon ve organ hasarını önleyebileceği bildirilmektedir.(16, 18) Serbest radikal yakalayıcı etkisi bakımından bilinen tüm antioksidanlardan daha gldr. Yapılan alışmalarda E vitaminine göre iki kat, glutatyona göre beş kat daha etkili olduğu gösterilmiştir.(19, 20) Bunun en önemli nedeni melatoninin hem suda hemde yağda çözünebilir olmasından dolayı, hücrenin tüm komponentlerine etki edebilmesidir.(16, 21) Ayrıca, indirekt olarak, spesifik melatonin reseptörleri aracılığı ile, antioksidan enzim seviyelerini artırarak da doku koruyucu etki gösterir.

Melatoninin birçok biyolojik etkisinin yanı sıra, gl bir radikal süpürücü (hidroksil radikali, süperoksit anyon radikali, peroksil radikali, singlet oksijen ve peroksinitrit anyonuna gl etkili) ve antioksidan (Süperoksit Dismutaz (SOD), Glutasyon Peroksidaz(GPx) Glutasyon Redüktaz(GRd) Gukoz-6-Fosfat Dehidrogenaz(G-6-PDH) stimülasyonu ve Nitrik Oksit Sentaz inhibisyonu) zelliğinin olması iskemi-reperfüzyon hasarında etkili bir koruyucu olabileceğini düşündürmektedir (15, 16, 17). Süperoksit radikaline en önemli etkisi, süperoksidin dismutasyonunda rol oynayan SOD'ın mRNA'sını artırmasıdır (16). H₂O₂, hücrelerde KAT ve GPx ile toksik olmayan ürünlere dönüştürülür.GPx ve GRd aktivitesi melatonin ile uyarılmaktadır (16). Ayrıca melatonin, H₂O₂'nin hücre içi konsantrasyonunu azaltır.GRd aktivitesinde kofaktör olan NADPH, G-6-PDH ile oluşturulur.Melatonin G-6-PDH aktivitesinide uyarır (16). Melatonin, indol nükleusun yan zincirindeki metoksi ve asetil grupları OH⁻ radikalinin giderilmesinde rol oynar. Melatonin bir elektron vererek hidroksili nötrale

eder ve toksik olmayan indolil katyon radikaline (melatonil) dönüşür. Bu nitrojen merkezli melatonil radikalinin de süperoksit anyon radikali ile etkileşip 5-acetyl-N-formyl-5-methoxykynuramine (5-MAFK) oluştururken bu radikali de süpürdüğü bildirilmektedir (111). Melatonin singlet oksijeni direkt olarak nötralize edebilmektedir (17, 111).

Nitrik oksit tek başına değil O_2 varlığında peroksinitrite dönüşerek toksik etkilere aracılık eder. $ONOO^-$, peroksinitröz asit ve hidroksil radikaline dönüşebilmektedir. NO inhibisyonunun $ONOO^-$ oluşumunu engelleyeceği ve kardiyak performansı artırabileceği gösterilmiştir (106, 107). Bu nedenle, NO sentezini gerçekleştiren NOS'un (özellikle iNOS) pro-oksidatif bir enzim olabileceği düşünülmektedir. Melatoninin iNOS aktivitesini inhibe edebileceği bildirilmiştir (15, 17).

Serbest radikal süpürücü etkisine ek olarak, melatonin membran Ca^{+2} pompası aktivesini etkileyip, aşırı Ca^{+2} yüklenmesini önleyerek hücre içi Ca^{+2} düzeyini ayarlayabilir (108). Hücre içi Ca^{+2} 'un aşırı artması ve diğer iyon dengesizlikleri miyokardiyal elektriksel instabilite, kardiyak aritmiler ve miyokardiyal nekroz gibi hasarlarla sonuçlanabilir. Na^+/H^+ değiş-tokuş sistemi de hücrede aşırı Ca^{+2} yükünden sorumlu tutulmaktadır. Müteakibinde hücre şişmesi ve nekroz oluşmaktadır. Bu sistemin bloke edilmesiyle de nekroz oluşumu engellenebilmektedir (108).

Programlı hücre ölümü olarak tanımlanan apoptozis oluşumunda önemli mekanizmalar arasında, serbest radikal oluşumu ve aşırı kalsiyum birikimi öne çıkmaktadır. İskemi-reperfüzyon esnasında oluşan serbest radikaller ve artan kalsiyum apoptozisi tetikleyerek hücrel hasar oluşturur. Melatoninin apoptozisi, apoptotik DNA kırıklarını azaltarak önemli ölçüde engellediği rapor edilmiştir (16, 109).

Melatoninin iskemik dokudaki önemli bir etkiside lökosit adezyonunu azaltmasıdır (15). İskemi nötrofil migrasyonuna neden olur ve yoğun nötrofil infiltrasyonu serbest radikal üretir. Melatonin platelet agregasyonunu ve lipid peroksidasyonunu da azaltabilir (16, 17, 110). İnsanda serum antioksidan kapasitesinin melatonin düzeyi ile ilişkili olduğu rapor edilmiştir (16, 17). Melatonin hem yağda, hem de suda çözünebildiğinden vücudun her

hücresine ve hücre içindeki diğer yapılara kolaylıkla girebilir (21). Bu nedenle de vitamin ve mineral antioksidanlara göre çok daha fazla etkilidir. Sahip olduğu bu özelliklere bağlı olarak dejeneratif ve proliferatif değişikliklere neden olan hastalıklara karşı nükleer DNA, membran lipidleri ve sitozolik proteinleri koruyabilir (15, 17, 111). Melatoninin hücre içine hızlıca girebilme özelliği VF gibi klinik acillerde oldukça önemli olabilir. Yapılan çalışmalarda; reperfüzyonun hemen başında melatonin uygulamasının reperfüzyonun indüklediği VF, mortalite ve infarkt alanı üzerine koruyuculuğu rapor edilmiştir (112, 113, 121).

3. GEREÇ VE YÖNTEM

Eskişehir Osmangazi Üniversitesi Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu'nun 10.03.2009 tarih 106/2009 kayıt numaralı onayı sonrasında çalışmaya başlandı. Deney hayvanları Tıbbi ve Cerrahi Deneysel Araştırma Merkezi'nden (TİCAM) temin edildi. Ortalama ağırlıkları 250-300gr. olan 30 adet Sprague-Dawley cinsi dişi sıçan randomize olarak eşit sayıda ($n = 10$) 3 gruba ayrıldı. Sıçanlar deney süresince 12'şer saatlik aydınlık-karanlık ışıklandırması olan ısı 20-22 C ve nemi %45-%50 otomatik olarak ayarlanan odalarda yaşatıldı. Bu süreçte tüm sıçanlar şeffaf kafeslerde tutuldu, standart sıçan yemi ile beslendi ve çeşme suyu verildi.

3.1. Deneklerin Hazırlanması Ve Operasyon Tekniği

Deneyde kullanılacak tüm sıçanlar yapılacak işlemler öncesinde tartılarak vücut ağırlıkları kaydedildi. Tüm sıçanlara 8 saat açlık sonrasında intramusküler olarak 50mg/kg ketamine Hidroklorür (Ketalar® 50mg/ml flakon, Pfizer) anestezisi verildi. Gerekli olduğunda deney süresince bir kez olmak üzere ek doz yapılması planlandı. Sıçanlar ısıtıcı lamba altında supin pozisyonda masaya yatırıldı. Ciltleri aseptik olarak hazırlanan sıçanlara ksifoidin hemen altından pubisin 0,5 cm. üstüne kadar orta hat median laparotomi yapıldı. Laparotomi sonrası barsaklar nemli gazlı bez yardımı ile sağa deviye edildi. Sıvı resüsitasyonu amacıyla peritoneal boşluğa yaklaşık 10ml. serum fizyolojik enjekte edildi. İnfrarenal abdominal aorta künt diseksiyonla explore edildi. Tüm sıçanlara antikoagülan amaçlı düşük doz (100ü/kg) heparin (Nevparin 25000 IU 5ml. flakon, Mustafa Nevzat) yapıldı. İnfrarenal abdominal aortaya atravmatik mikrovasküler klemp kondu. (Nova® 12 mm. Angle) Isı ve sıvı kaybını en aza indirmek amacıyla batın 3 adet ipek dikiş ile yaklaştırıldı. 60 dakikalık iskemiye takiben 120 dakika reperfüzyon periyodu uygulandı. Aortik iskemi klempleme işlemi sonrasında aortada pulsasyon kaybı, reperfüzyon ise klempin kaldırılmasından sonra aortada pulsasyon varlığı ile takip edildi. Kontrol grubuna ait ratlara laparotomi ve eşit sürede İAA diseksiyonu uygulandı ancak bu gruba İ-R uygulanmadı.

Reperfüzyon sonrası tüm ratlar sakrifiye edildi ve akciğerleri toraks boşlugundan çıkartıldı. Akciğer dokusu histopatolojik inceleme yapıncaya kadar %10'luk formaldehit solüsyonu içinde saklandı.

3.2. Deney Grupları

Kontrol Grubu (Grup K) (n=10) :

Genel cerrahi hazırlık ve anestezi indüksiyonu sonrasında median laparotomi yapılarak infrarenal aort explore edildi. Aort oklüde edilmedi. Batın içine serum fizyolojik enjekte edilerek batın 3 adet ipek ile yaklaştırıldı. Diğer gruplara uygulanan 1saat iskemi, 2saat reperfüzyon süresi tamamlandı. İşlem sonunda sıçanların akciğerleri blok halinde alınarak sakrifiye edildi.

İskemi Reperfüzyon Grubu (Grup İR) (n=10) :

Genel cerrahi hazırlık ve anestezi indüksiyonu sonrasında median laparotomi yapılarak infrarenal aort explore edildi. Aort künt diseksiyonla dönüldü ve atravmatik mikrovasküler klemp yerleştirildi. Batın içine serum fizyolojik enjekte edilerek batın 3 adet ipek ile yaklaştırıldı. 1saatlik iskemi ardından ipekler alındı. Mikrovasküler klemp kaldırıldı. Batın içine serum fizyolojik verildi. Batın katları tekrar yaklaştırıldı. 2 saatlik reperfüzyon periyodunun ardından akciğerler blok halinde alınarak sıçanlar sakrifiye edildi.

Melatonin Grubu (Grup İR+Mel) (n=10)

Genel cerrahi hazırlık ve anestezi indüksiyonu sonrasında median laparotomi yapılarak infrarenal aorta explore edildi. Aort künt diseksiyonla dönüldü ve atravmatik mikrovasküler klemp yerleştirildi. Batın içine serum fizyolojik enjekte edilerek batın 3 adet ipek ile yaklaştırıldı. 1saatlik iskemi periyodu sırasında iskeminin 45. dakikasında batın açılarak 10 mg/kg dozunda Melatonin (Melatonin, Sigma Chemical Co, USA firmasından toz halinde getirtilip farmakoloji laboratuvarında Prof.Dr.İpek Cingi tarafından İ.V. forma dönüştürüldü.) Vena Cava İnferiordan İ.V. bolus olarak yapıldı. İskemi periyodu tamamlanınca mikrovasküler klemp kaldırıldı. Batın içine serum fizyolojik enjekte edildi. Batın tekrar kapatılarak 2 saatlik reperfüzyon

periyodunun ardından akciğerler blok halinde çıkarılarak sıçanlar kurbanı edildi.

3.3 Akciğer Dokularının Histopatolojik İncelenmesi:

Ratların akciğer biopsileri ayrı ayrı formalin solüsyonunda tespit edilerek rutin takip işlemleri sonrası parafine gömülerek bloklandı. 5 mikrometrelik kesitler yapılarak hematoksilin eosin boyasıyla boyandı ve ışık mikroskopu ile incelendi. Tüm örnekler deney gruplarından habersiz aynı patolog tarafından değerlendirildi. Her örnekte en az iki farklı kesit incelendi. Akciğer hasarı kesitlerde saptanan ödem, alveolar konjesyon, PMNL varlığı,

Fibrin-Platelet-Trombüs varlığı, Kronik İnflamasyon ve intraalveoler kanama varlığına göre aşağıdaki skalaya uygun olarak semikantatif olarak skorlandı (12,164,165).

Skorlama sistemi:

0 (-) : Değişiklik yok

1 (+) : Fokal, hafif değişiklikler

2 (++) : Multifokal orta derecede değişiklikler

3 (+++) : Multifokal ileri derecede değişiklikler

3.4. İstatistiksel Değerlendirme

İstatistiksel analizin yapılmasında, tüm veri analizleri SPSS 15.0 ve SigmaStat 3.1 paket programları ile yapıldı. Nitel ve skor değerlerinden oluşan veriler n ve oran olarak ifade edildi. Bağımsız gruplardan ve skor değerlerinden oluşan verilere Kruskal-Wallis analiz ile test edildi. Bu testin çoklu karşılaştırmalarında Student-Newman-Keuls method'undan yararlanıldı. $P < 0.05$ olasılık değerleri istatistiksel olarak anlamlı kabul edildi.

4. BULGULAR

Tüm akciğer doku kesitleri ısık mikroskopunda 10X , 20X ve 40X büyütmelemlerle ödem, alveolar konjesyon, PMNL varlığı, fibrin-platelet-trombüs varlığı, kronik inflamasyon ve intraalveolar kanama yönünden değerlendirildi.

Gruplara ait histopatolojik skorldama Tablo 4.1, Tablo 4.2, Tablo 4.3 de gösterilmiştir

Tablo 4.1. Kontrol grubu histopatolojik skorldaması

GRUP K	Denek	Ödem	Konjesyon	PMNL varlığı	Fibrin-platelet-trombüs	Kronik inflamasyon	Intraalveolar kanama
	1	+	+	0	0	+	0
	2	+	++	0	0	++	0
	3	+	+	0	0	+	0
	4	0	+	0	0	+	0
	5	0	+	0	0	+	0
	6	0	+	0	0	++	0
	7	+	+	0	0	+	0
	8	0	+	0	0	+	0
	9	+	++	0	0	+	0
	10	0	+	0	0	+	0

Tablo 4.2. İskemi-Reperfüzyon (İ-R) grubu histopatolojik skorlaması

GRUP İ-R	Denek	Ödem	Konjesyon	PMNL varlığı	Fibrin-platelet-trombüs	Kronik İnflamasyon	İntraalveoler Kanama
	1	++	+++	++	+	+	++
	2	+	++	++	0	+	+
	3	0	++	+	0	+	+
	4	++	+++	+	+	+	+
	5	++	+++	+	+	+	+
	6	++	+++	++	+	+	+
	7	+++	+++	+	+	++	++
	8	+++	+++	++	+	+	+
	9	+++	+++	++	++	+	+
	10	+++	+++	+	+	+	0

Tablo 4.3. i-R+Mel grubu histopatolojik sınıflaması

GRUP İ-R+MEL	Denek	Ödem	Konjesyon	PMNL varlığı	Fibrin-platelet-trombüs	Kronik İnflamasyon	İntraalveoler Kanama
	1	+	++	+	0	+	+
	2	+	+	0	0	+	0
	3	+	+	0	0	++	0
	4	+	+	0	0	+	0
	5	++	+	+	+	+	0
	6	+	++	+	+	+	+
	7	+	+	+	0	+	0
	8	+	+	0	0	++	0
	9	++	+	+	+	+	0
	10	++	+	0	+	+	0

Kontrol grubuna ait akciğer doku kesitlerinin mikroskopik değerlendirilmesinde ödem, PMNL varlığı, fibrin-platelet-trombüs varlığı ve intraalveoler kanama yönünden değişiklik görülmedi (skor -) Alveoler konjesyon ve kronik inflamasyon yönünden fokal hafif değişiklikler (skor +) görüldü.

İ-R grubunda PMNL varlığı, fibrin-platelet-trombüs varlığı, kronik inflamasyon ve intraalveoler kanama yönünden fokal hafif değişiklikler (skor +) görüldü. Ödem yönünden multifokal orta derecede değişiklikler (skor ++), alveoler konjesyon yönünden multifokal ileri derecede değişiklikler (skor+++) görüldü.

İ-R+Mel grubunda PMNL varlığı, fibrin-platelet-trombüs varlığı ve intraalveoler kanama yönünden değişiklik görülmedi (skor -) Ödem, alveoler konjesyon ve kronik inflamasyon yönünden fokal hafif değişiklikler (skor +) görüldü.

Histopatolojik bulguların Kruskal-Wallis yöntemiyle istatistiksel analizinde ortalama skorları alınan gruplarda ödem ($p<0.05$), alveoler konjesyon ($p<0.05$), PMNL varlığı ($p<0.05$), intraalveoler kanama ($p<0.05$), fibrin-platelet-trombüs varlığı ($p<0.05$) yönünden anlamlı fark saptandı. Kronik inflamasyon yönünden anlamlı fark saptanmadı.

İkili gruplar arası değerlendirmede Student-Newman-Keuls yönteminden yararlanıldı ve sonuçlar Tablo 4.4, Tablo 4.5, Tablo 4.6 da gösterildi. $P<0.05$ istatistiksel olarak anlamlı kabul edildi.

Tablo 4.4. Kontrol ve İ-R gruplarının ikili karşılaştırması

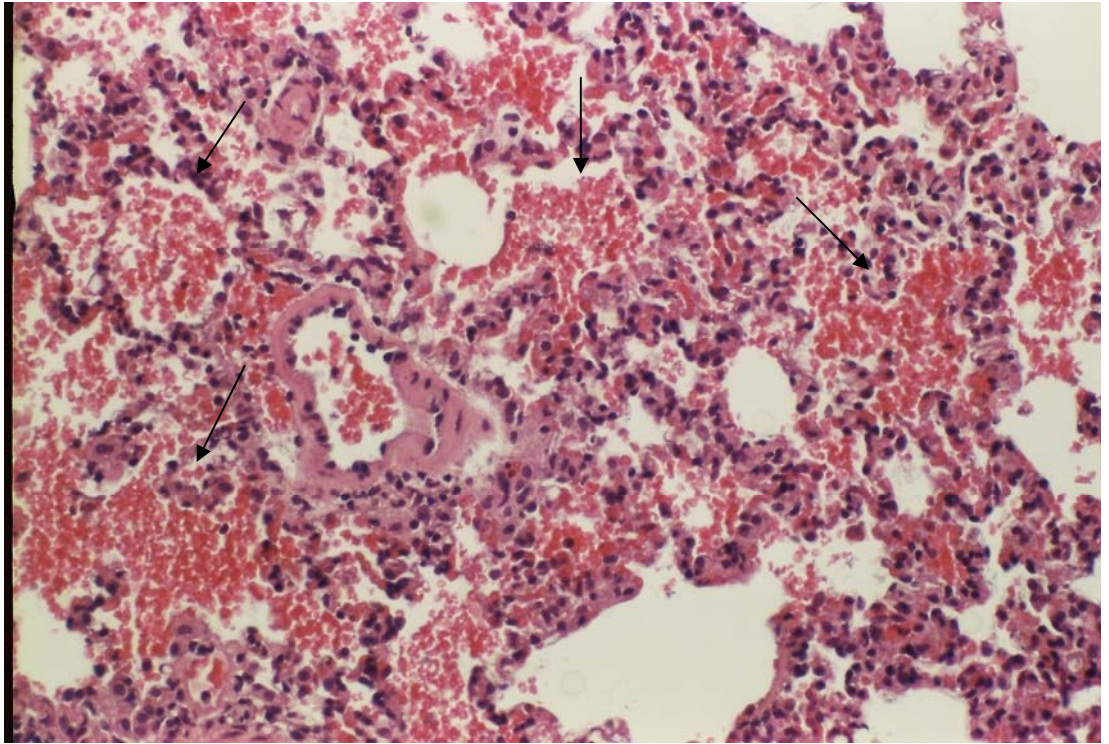
	Ödem	Alveoler konjesyon	PMNL varlığı	Fibrin-platelet-trombüs	Kronik İnflamasyon	İntraalveoler kanama
Kontrol	$P<0.05$	$P<0.05$	$P<0.05$	$P<0.05$	$P>0.05$	$P<0.05$
İ-R	Anlamlı	Anlamlı	Anlamlı	Anlamlı	Anlamlı değil	Anlamlı

.Tablo 4.5. Kontrol ve İ-R+Mel gruplarının ikili karşılaştırılması

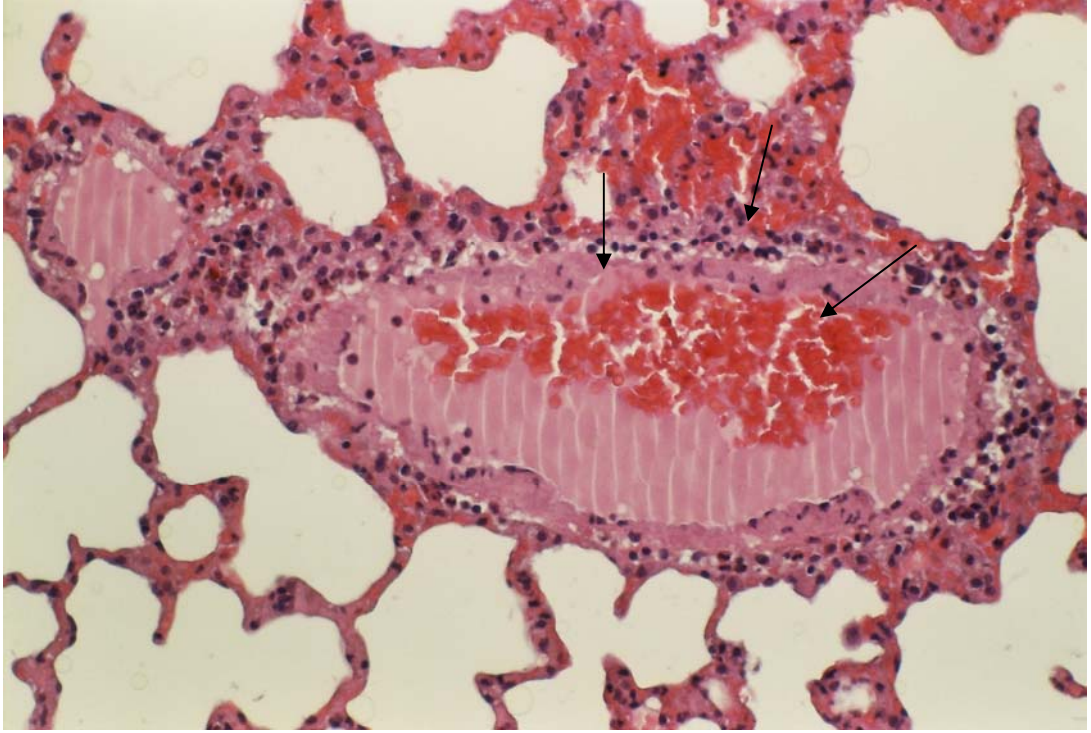
	Ödem	Alveoler konjesyon	PMNL varlığı	Fibrin- platelet- trombüs	Kronik İnflamasyon	İntraalveoler kanama
Kontrol İ-R+Mel	P<0.05 Anlamlı	P>0.05 Anlamlı değil	P>0.05 Anlamlı değil	P<0.05 Anlamlı	P>0.05 Anlamlı değil	P>0.05 Anlamlı değil

Tablo 4.6. İ-R ve İ-R+Mel gruplarının ikili karşılaştırılması

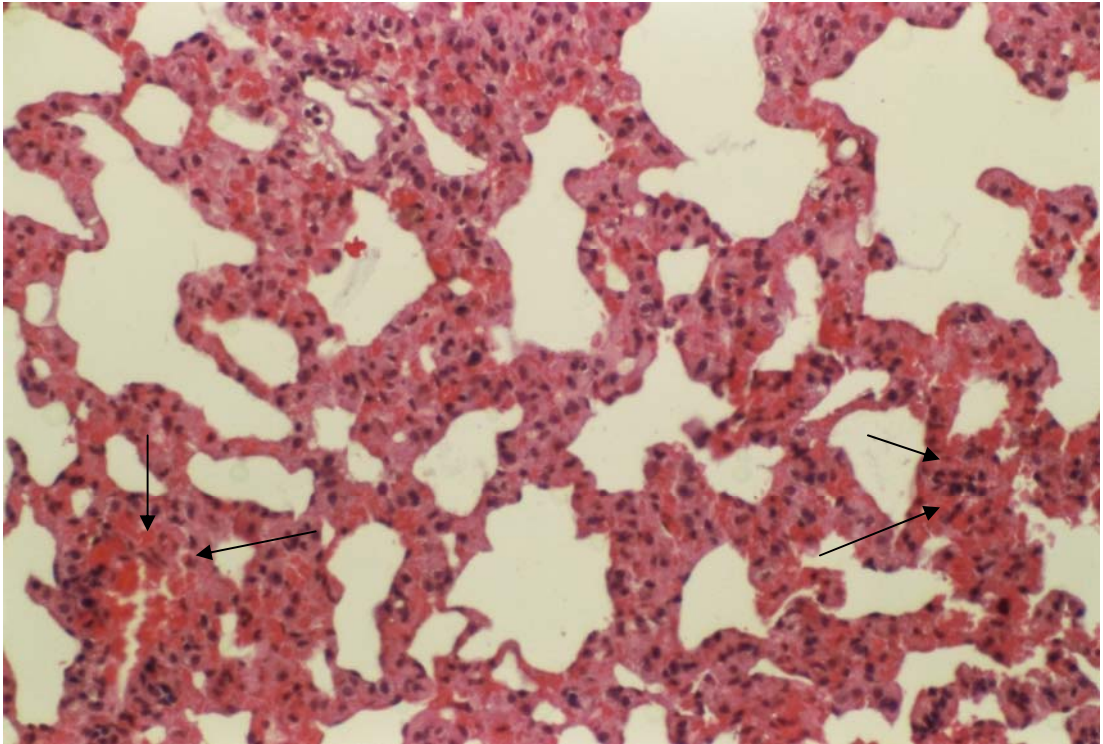
	Ödem	Alveoler konjesyon	PMNL varlığı	Fibrin- platelet- trombüs	Kronik İnflamasyon	İntraalveoler kanama
İ-R İ-R+Mel	P<0.05 Anlamlı	P<0.05 Anlamlı	P<0.05 Anlamlı	P<0.05 Anlamlı	P>0.05 Anlamlı değil	P<0.05 Anlamlı



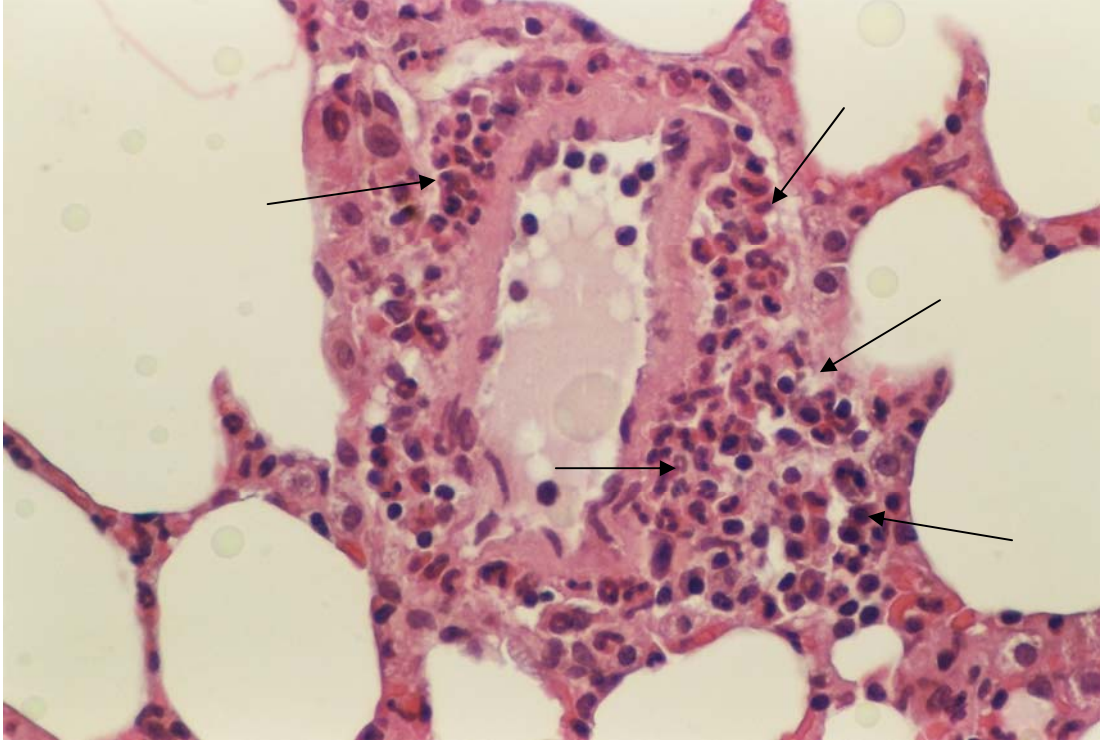
Şekil 4.1. İskemi-Reperfüzyon grubunda intraalveoler kanama (H+EX20)



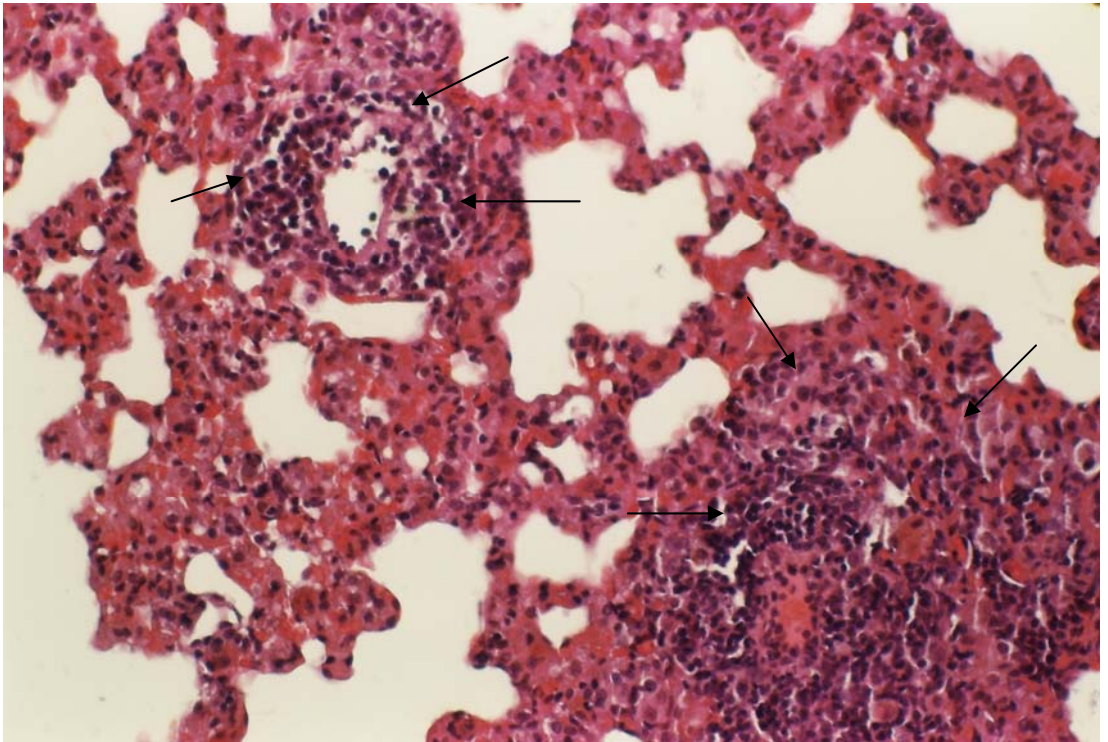
Şekil 4.2. İ-R grubunda fibrin-trombüs (Kapiller damar içerisinde eritrositler ve fibrinden oluşan trombüs yapısı) (H+EX40)



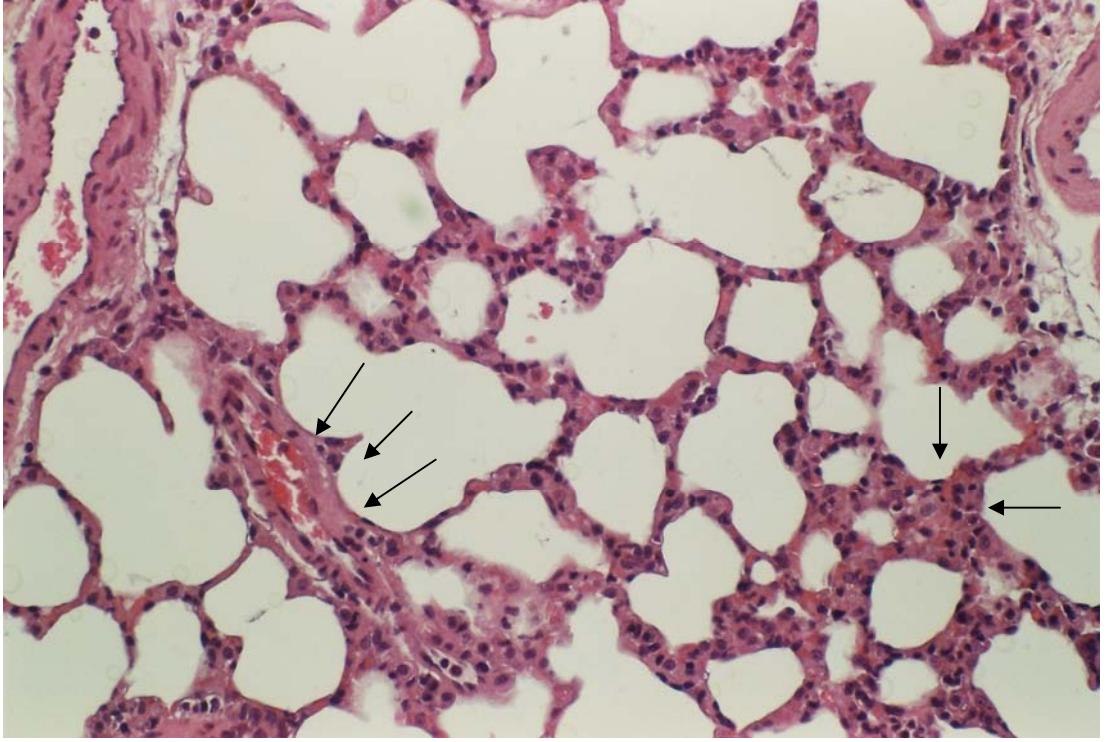
Şekil 4.3. İ-R grubunda alveol duvarında ödem ve konjesyon (H+EX20)



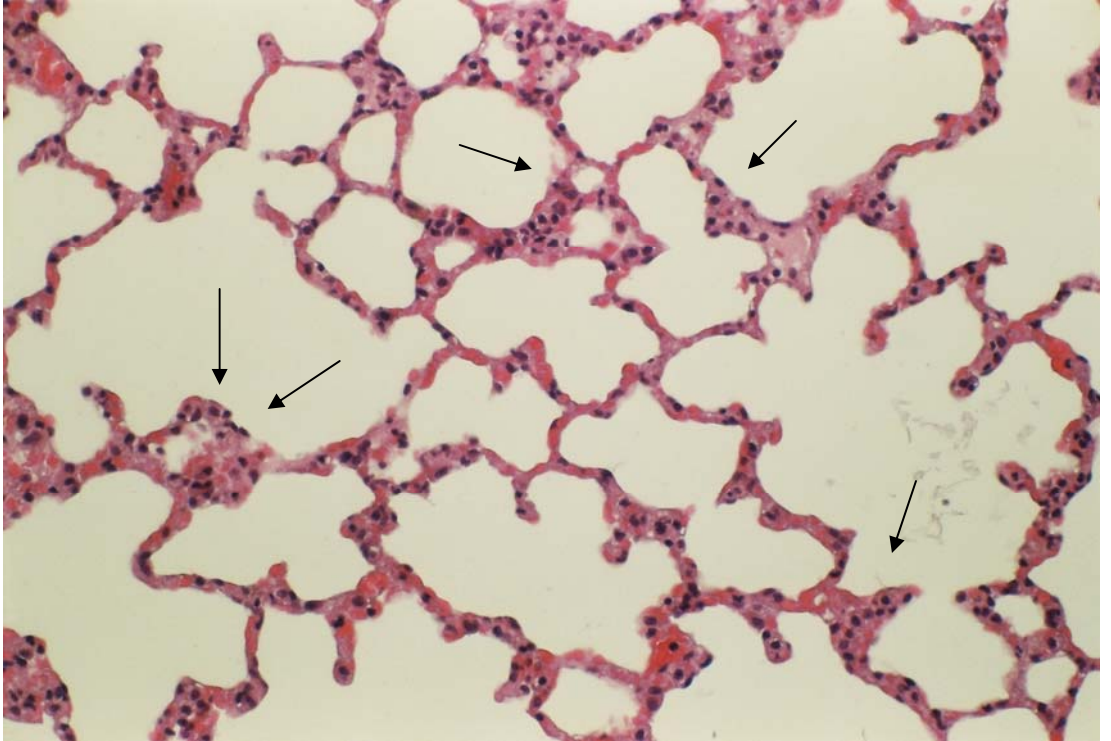
Şekil 4.4. i-R grubunda PMNL infiltrasyonu (H+EX40)



Şekil 4.5. İ-R grubunda Kronik İnflamasyon (H+EX20)



Şekil 4.6. İ-R+Melatonin grubunda minimal derecede ödem ve konjesyon (H+EX20)



Şekil 4.7. İ-R+Melatonin grubunda minimal derecede konjesyon içeren akciğer parankimi (H+EX20)

5.TARTIŞMA

Çalışmamızda antioksidan etkinliği çeşitli çalışmalarda kanıtlanmış olan melatoninin, vücutta nötrofil havuzunun %50-60'ını ihtiva etmesi nedeniyle alt ekstremite iskemi-reperfüzyon hasarından en çok etkilenen uzak organ olan akciğerler üzerine koruyucu etkisinin olup olmadığı araştırıldı. Bu amaçla ratlarda infrarenal abdominal aorta oklüzyonu ile deneysel iskemi-reperfüzyon modeli oluşturuldu. Histopatolojik preparatlar hematoxilen-eozin ile boyandıktan sonra ışık mikroskobu ile incelendi.

Histopatolojik incelemede ödem, alveoler konjesyon, PMNL varlığı, fibrin-platelet-trombüs varlığı, kronik inflamasyon ve intraalveoler kanama değişikliklerine bakıldı. Kontrol grubuna ait akciğer doku kesitlerinin mikroskopik değerlendirilmesinde ödem, PMNL varlığı, fibrin-platelet-trombüs varlığı ve intraalveoler kanama yönünden değişiklik görülmedi (skor -) Alveoler konjesyon ve kronik inflamasyon yönünden fokal hafif değişiklikler (skor +) görüldü. İ-R grubunda PMNL varlığı, fibrin-platelet-trombüs varlığı, kronik inflamasyon ve intraalveoler kanama yönünden fokal hafif değişiklikler (skor +) görüldü. Ödem yönünden multifokal orta derecede değişiklikler (skor ++), alveoler konjesyon yönünden multifokal ileri derecede değişiklikler (skor+++) görüldü. İ-R+Mel grubunda PMNL varlığı, fibrin-platelet-trombüs varlığı ve intraalveoler kanama yönünden değişiklik görülmedi (skor -) Ödem, alveoler konjesyon ve kronik inflamasyon yönünden fokal hafif değişiklikler (skor +) görüldü. Histopatolojik bulguların Kruskal-Wallis yöntemiyle istatistiksel analizinde ortalama skorları alınan gruplarda ödem ($p<0.05$), alveoler konjesyon ($p<0.05$), PMNL varlığı ($p<0.05$), intraalveoler kanama ($p<0.05$), fibrin-platelet-trombüs varlığı ($p<0.05$) yönünden anlamlı fark saptandı. Kronik inflamasyon yönünden anlamlı fark saptanmamıştır. Grupların her biri kendi arasında karşılaştırılıp değişikliklerin istatistiki anlamlılığı incelendiğinde, grup 1 ve 2 arasında ödem, alveoler konjesyon, PMNL varlığı, fibrin-platelet-trombüs varlığı ve intraalveoler kanama yönünden anlamlı fark saptandı. Kronik inflamasyon yönünden anlamlı fark saptanmadı. Grup 1 ve 3 arasında ödem, fibrin-platelet-trombüs yönünden

anlamli fark saptandi. Alveoler konjesyon, PMNL varligi, kronik inflamasyon ve intraalveoler kanama yönünden anlamli fark saptanmadı. Grup 2 ve 3 arasında ödem, alveoler konjesyon, PMNL varligi, fibrin-platelet-trombüs varligi ve intraalveoler kanama yönünden anlamli fark saptandi, kronik inflamasyon yönünden anlamli fark saptanmadı.

İskemi-reperfüzyon sendromunun yol açtiğı lokal ve sistemik etkiler vasküler cerrahide sıklıkla karşımıza çıkmakta, ameliyat sonrası morbidite ve mortaliteyi etkilemektedir. Bir çok dokuda, örneğın; kalp (114), akciğer (93), iskelet kası (115), santral sinir sistemi (116), böbrek (117) ve gastrointestinal sistemde (118) iskemi-reperfüzyon hasarı geliştiğı bilinmektedir. Alt ekstremitelerde akut iskemi-reperfüzyon hasarı özellikle aort cerrahisinde abdominal aortaya geçici süre kros klemp uygulanmasında ve tek veya çift taraflı akut femoral arter tıkanıklıklarında ortaya çıkmaktadır. Abdominal aort cerrahisi sırasında iskemik kalan ekstremitelerde lokal doku hasarı, iskemik alanın dışındaki bölgelerde de uzak organ hasarı oluşabilir. Lokal etkiler klemp distalinde damarlarda ve kas dokusunda görülürken, sistemik etkiler de baslıca beyin, kalp, akciğer, böbreklerde ve diğer organlarda görülür. Klinik uygulamada da abdominal aort anevrizması, Leriche sendromu ve aortailiak hastalıklarda infrarenal aortaya klemp konulmakta ve anastomozlar tamamlanana kadar alt ekstremitelerde iskemik kalmakta, anastomozun tamamlanması ile aortik klempin kaldırılması ile iskemik dokuların reperfüzyonu gerçekleşmektedir.

Akciğer hasarına neden olan süreçler akciğerden tamamen uzak bir alanda başlar. İskemi reperfüzyon hasarının temelinde reperfüzyon sırasında dokunun oksijenizasyonu sonucu ortaya çıkan oksijen radikalleri bulunmaktadır (119). Reaktif oksijen radikalleri birçok kaynaktan salınabilirken bunların arasında en önemli olan aktive olmuş nötrofillerdir (120). Akciğerde oluşan İ-R hasarına alveoler makrofajlar (11) aracılık etmektedir ve makrofajlar proinflamatuvar sitokinlerin salınımını tetiklemekte ve erken reperfüzyon hasarı oluşmaktadır (43). PMNL'nin alt ekstremitenin İ-R'u nedeniyle olan akciğer hasarında esas role sahip olduğu gösterilmiştir ve azalmaları akciğerler üzerinde koruyucu etki gösterir (12). Reperfüzyon

süreci, iskemik alanda oluşan serbest radikallerin sistemik dolaşıma karışmasına neden olur. Bunlar da ya direkt olarak hasarı başlatır ya da indirekt olarak nötrofillerin aktivasyonu ve sitokinlerin üretimi için bir stimulan etki gösterir. Bu mediatörlerin çoğu nötrofil-endotel etkileşimini sağlayarak nötrofillerin dokulara migrasyonuna yol açmakta ve göç eden nötrofiller degranüle olarak dokuya hasar vermektedir (10, 121, 122). Degranülasyon sonrasında artan serbest oksijen radikalleri ile proteazlar akciğer endotel hasarına ve buna bağlı olarak artmış pulmoner kapiller permeabiliteye sebep olurlar (123).

Alt ekstremitte iskemi-reperfüzyonu sonucu oluşan akciğer hasarını azaltmak için çeşitli çalışmalar yapılmıştır. Berkan ve ark. (124) alt ekstremitelerdeki geçici iskemi-reperfüzyon hasarına bağlı akciğerlerde oluşan patolojik değişiklikleri ve bunları önlemede askorbik asidin koruyucu etkisini araştırmışlar. Histopatolojik değerlendirmede askorbik asit verilen grupta PMNL sayısının, interstisyel ödem ve konjesyonun İ-R grubuna kıyasla daha az olduğunu göstermişlerdir. Histopatolojik sonuçları çalışmamızla uyumludur. Çalikoğlu ve ark. (125) yaptıkları çalışmada alt ekstremitte İ-R sonrası akciğer hasarına kafeik asit fenilesterin koruyucu etkini araştırmışlar ve gruplar arası peribronşial ve perivasküler lökosit infiltrasyonu bakımından anlamlı fark olduğunu ve İ-R grubunda lökosit infiltrasyon artışının ilaç grubunda azaldığını saptamışlardır. Köksel ve ark. (126) İ-R sonrası gelişen akciğer hasarına α -lipoik asidin etkisini araştırmışlar ve İ-R grubuna kıyasla tedavi edilen grupta PMNL sayısında anlamlı ölçüde azalma olduğu tespit edilmiş olup çalışmamızla uyumludur. Wu ve ark. (127) İ-R'nin indüklediği akciğer hasarına eritropoetinin etkisini araştırmışlar. Histopatolojik olarak ilaç verilen grupta İ-R grubuna kıyasla alveoler ödem ve nötrofil infiltrasyonunda anlamlı azalma tespit edilmiştir. Şirin ve ark. (128) İ-R'ye sekonder akciğer hasarına aprotininin etkisini araştırmışlar. Aprotinin verilen grupta İ-R grubuna kıyasla PMNL sayısında ve ödemde belirgin azalma saptamışlardır. Tekeli ve ark. (129) yaptıkları çalışmada akciğer hasarına takrolimus'un (FK 506) etkisini araştırmışlar ve takrolimus alan grupta nötrofil infiltrasyonu ve akciğer hasarı bulgularının daha az olduğunu saptamışlardır.

Melatoninin fizyolojik ve farmakolojik konsantrasyonlarının İ-R'nin neden olduğu miyokardiyal hasarı (mortalite, aritmiler, infarkt alanı ve apoptozis) azaltabildiği bildirilmiştir. Tan ve ark. (112) melatoninin kalpteki etkilerini araştırdıkları bir çalışmada 10 dakikalık miyokardiyal iskemiye takiben 10 dakika reperfüzyon uygulamışlar ve melatonin verilen grupta prematüre ventriküler kontraksiyonlar ve ventriküler fibrilasyonu önemli derecede azalttığını göstermişlerdir. Kaneko ve ark. (130) 30 dakika iskemi, 30 dakika reperfüzyon uygulamışlar ve melatonin verilen grupta hem ventriküler taşikardi hemde ventriküler fibrilasyonu azalttığı aynı zamanda sol ventrikül fonksiyonunu önemli derecede azalttığını bildirmişlerdir. Bu etkileri melatoninin serbest radikal süpürücü aktivitesine ve lipid peroksidasyonunu azaltmasına bağlamışlardır.

Şahna ve ark. (113) fizyolojik konsantrasyonlardaki melatoninin etkisini araştırmak amacıyla sıçanlara pinealektomi uygulamışlardır. Pinealektomi sonrası iki ay beklenen sıçanlarda in vivo 7 dakika iskemi 7 dakika reperfüzyon uygulanmış ve pinealektomili sıçanlarda kardiyak aritmilerin derecesinin ve mortalitenin kontrol grubuna göre anlamlı derecede yüksek olduğunu göstermişlerdir. Aynı çalışmanın devamında (121) 30 dakika iskemi, 120 dakika reperfüzyon uygulamışlar ve pinealektomili ratların kalplerinde infarkt alanının anlamlı olarak artmış olduğunu göstermişlerdir. Bu çalışmada dışarıdan verilen melatoninin (4 mg/kg) pinealektomili ratlarda hasarı anlamlı azaltırken, pinealektomisiz ratlarda hasarı azaltmasına karşın istatistiksel olarak anlamsız çıkmasını melatoninin dozunun düşük olmasına bağlamışlardır. Devam eden çalışmada (132) daha yüksek doz (10 mg/kg) melatonin kullanılmış ve infarkt alanını, MDA düzeyini anlamlı azalttığını, antioksidan savunma sisteminde önemli rolü olan GSH seviyesini artırdığını belirtmişlerdir. Lee ve ark. (133) iskemik kalpte melatoninin koruyucu etkinliğini araştırmışlar ve melatonin verilen grupta ventriküler taşikardiyi, ventriküler fibrilasyonu baskıladığı, total prematüre ventriküler kontraksiyon sayısını düşürdüğünü göstermişlerdir. Melatoninin İ-R sırasında oksijen üretimini ve miyeloperoksidaz aktivitesini önemli ölçüde azalttığını bildirmişler ve melatoninin İ-R uygulanan dokularda nötrofil aktivasyonunu azalttığını

ayrıca antioksidan özelliklerine bağlı olarak koruyucu özellik gösterdiği sonucuna varmışlardır.

Programlı hücre ölümü olarak tanımlanan apoptozis oluşumunda da önemli mekanizmalar arasında serbest radikal oluşumu ve aşırı kalsiyum birikimi öne çıkmaktadır. İ-R neticesinde oluşan serbest radikaller ve artan kalsiyum apoptozis kaskadını tetikleyerek hücrel hasar oluşturur. Şahna ve ark.nın (115) melatoninin miyokardiyal İ-R' nin tetiklediği apoptotik değişiklikler üzerine yaptığı çalışmada melatonin verilen grupta apoptotik DNA kırıklarının önemli ölçüde azaldığını göstermişlerdir. Bu çalışmadan da anlaşıldığı üzere melatonin apoptozis ve DNA hasarını etkili biçimde azaltabilir.

Okutan ve ark. (134) oluşturdukları deneysel aortik iskemi-reperfüzyon (AİR) modellerinde melatonin verdikleri sıçanlarda akciğerlerde nötrofil infiltrasyonunun göstergesi olan miyeloperoksidaz ve doku MDA düzeylerinin AİR grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı derecede düşük olduğunu saptamışlardır. Çelik ve ark. (135) deneysel adneksiyal iskemi-reperfüzyon çalışmalarında, reperfüzyondan hemen önce melatonin uyguladıkları guinea piglerde, kontrol grubuna göre PMNL sayısında istatistiksel olarak anlamlı şekilde azalma olduğu saptanmış olup çalışmamızla uyumlu bulunmuştur. İnci ve ark. (136) ise sıçanlarda deneysel akciğer iskemi-reperfüzyon çalışmalarında reperfüzyondan 10 dakika önce intraperitoneal 10 mg/kg melatonin uygulanmasıyla doku MDA düzeylerinde azalma olduğunu göstermişlerdir. Uysal ve ark. (137) alt extremité İ-R' nin akciğer üzerindeki hasarını göstermek için kanda ve dokuda MDA düzeyi bakmışlardır. İ-R grubunda MDA'nın yükseldiğini ve melatonin verilen grupta MDA düzeyinin azaldığını saptamışlardır. Deneklere iskemi periyodu öncesi ve reperfüzyon periyodu öncesi ayrı ayrı melatonin verilmiş ancak iskemi öncesi melatonin verilen grupta istatistiksel olarak anlamlı sonuçlar elde edilmemiştir. Reperfüzyon öncesi melatonin verilen grupta histopatolojik olarak nötrofil sayısı ile interstisyel ödem ve konjesyonun daha az, alveoller arası septumların daha ince olduğu gösterilmiştir. Bu çalışmalara genel olarak bakıldığında İ-R ile akciğerde oluşan hasarı göstermek için bakılan

histopatolojik değişiklikler bizim çalışmamızdaki parametrelere benzemektedir ve sonuçlarımız sunulan tüm çalışmalarla uyumludur. Bizim çalışmamızda da melatonin verilen grupta İ-R grubuna kıyasla ödem, alveoler konjesyon, intraalveoler kanama, fibrin-platelet-trombüs varlığında ve PMNL sayısında istatistiksel olarak anlamlı azalma olduğu saptandı.

Yukarıda belirtildiği gibi akciğerde oluşan hasara alveoler makrofajlar aracılık etmekte ve PMNL'nin azalması akciğerler üzerine koruyucu etki göstermektedir (12). Çalışmamızda melatonin'in akciğer İ-R hasarını azalttığını ve bu etkiyi alveoler makrofajları azaltarak, lipid peroksidasyonunu önleyerek ve hücrenin bütün komponentlerine girebilmesi nedeniyle güçlü radikal süpürücü, antioksidan özelliği olmasına bağlayabiliriz.

6. SONUÇ VE ÖNERİLER

Bu çalışmanın sonucu göstermektedir ki alt ekstremitte iskemi-reperfüzyonu akciğerlerde konjesyon, lökosit infiltrasyonu ve interstisyel ödem ile karakterize incinmeye, lipid peroksidasyonunda artmaya yol açmakta ve reperfüzyon öncesi verilen melatonin bu hasarı azaltmaktadır. Melatoninin bu etkisi, lipid peroksidasyonunu önlemesine, lökosit infiltrasyonunu azaltmasına ve hem suda hem de yağda çözünür olmasından dolayı hücrenin tüm komponentlerine etki ederek antioksidan etkinlik göstermesine bağlanabilir. Bir diğer önemli husus ise, melatoninin uygun zamanda ve uygun dozda verilmesi gerektiğidir.

Gerek bizim çalışmamız, gerekse diğer çalışmalar melatoninin iskemi-reperfüzyon hasarına karşı çok etkili bir antioksidan olduğunu göstermektedir. Bu çalışmaların ışığı altında melatoninin klinik tıpta yaygın olarak kullanılmasının faydalı olacağı kanaatindeyiz.

KAYNAKLAR

1. Nuh Zafer Cantürk, İskender Sayek. Cerrahi araştırma kitabı. 2005 Nobel tıp kitabevleri
2. Parks DA, Granner DN: Contributions of ischemia and reperfusion to mucosal lesion formation. Am J Physiol 1986;250:G749-53.
3. Colletti LM, Kunkel SL, Walz A, Burdick MD, Kunkel RG, Wilke CA, Strieter RM. Chemokine expression during hepatic ischemia/reperfusion-induced lung injury in the rat. The role of epithelial neutrophil activating protein. J Clin Invest. 1995;95(1):134-41.
4. Harman AW, Maxwell MJ. An evaluation of the role of calcium in cell injury. Annu Rev Pharmacol Toxicol 1995;35:12944
5. Grace PA. İschaemia-reperfusion injury. Br J Surg 1994;81:637-47.
6. Blaisdell FW. The pathophysiology of skeletal muscle ischemia and the reperfusion syndrome: a review. Cardiovasc Surg 2002;10:620-30.
7. Rocker GM. İschaemia/reperfusion, inflammatory responses and acute lung injury. Thorax 1997;52:841-2.
8. İlan S. Paterson, FRCS., Joseph M. Klausner, Robert Pugatch, Paul Allen, John A. Mannick, FACS, David Shepro, PH.D.t, Herbert B. Hechtman, FACS. Noncardiogenic pulmonary edema after abdominal aortic aneurysm surgery. Ann Surg. February 1989 Vol.209 No.2
9. İlan S. Paterson, FRCS., Joseph M. Klausner, Gideon Goldman, Robert Pugatch, Holly Feingold, Paul Allen, John A. Mannick, Robert Valeri, David Shepro, PH.D.t, Herbert B. Hechtman. Pulmonary edema after aneurysm surgery is modified by mannitol Ann Surg. December 1989 Vol.210 No.6
10. R. Pararajasingam, M.L.Nicholson, P.R.F.Bell and R.D.Sayers Non-cardiogenic pulmonary oedema in vascular surgery

Eur.J.Vasc.Endovasc.Surg 17,93-105(1999) Article no.ejvs.
1998.0750

11. Crestani B., Cornillet P., Dehoux M., Rolland C., Guenounou M., Aubier M. Alveolar type II epithelial cells produce interleukin-6 in vitro and in vivo: regulation by alveolar macrophage secretory products. *J.Clin.Invest* 94,731-740 (1994)
12. Klausner JM, Anner H, Pateron IS, et al: Lower torso ischemia-induced lung injury is leukocyte dependent. *Ann Surg* 1998;208:761-767.
13. Jordan JE, Zhao ZQ, Vinten-Johansen J. The role of neutrophils in myocardial ischemia-reperfusion injury. *Cardiovasc Res.* 1999;43:860-78
14. Carden DL, Granger DN. Pathophysiology of ischemia-reperfusion injury. *J. Pathol.* 2000;190:255-66.
15. Reiter RJ, Tan DX. Melatonin: A novel protective agent against oxidative injury of the ischemic-reperfused heart. *Cardiovascular Research* 2003;58:10-9.
16. Russel Reiter, Lei Tang, Joaquin J.Garcia, and Antonio Mtiöz-Hoyos. Pharmacological actions of melatonin in oxygen radical pathophysiology. *Life Sciences.* Vol.60 no.25 DD.2255-2271.1997
17. Reiter DJ, Tan DX, Kim SJ, Wenbo QI, Melatonin as a pharmacological agent against oxidative damage to lipids and DNA. *Proc West Pharmacol Soc* 1998;41:229-36.
18. Salie R, Harper I, Cillie C, Genade S, Huisamen B, Moolman J, et al. Melatonin protects against ischemic-reperfusion myocardial damage. *J Mol Cell Cardiol* 2001;33:343-57.
19. Reiter R, , Garcia JJ, Tang L, Munoz-Hoyos A. Pharmacological actions of melatonin in oxygen radical pathophysiology. *Life Sci* 1997;60:2255-71

20. Pieri C, Marra M, Moroni F, Recchioni R, Marcheselli F. Melatonin: a peroxy radical scavenger more effective than vitamin E. *Life Sci.* 1994;55: PL271-6.
21. Costa EJ, Shida CS, Biaggi MH, Ito AS, Lamy-Freund MT. How melatonin interacts with lipid bilayers: A study by fluorescence and ESR spectroscopies. *F.E.B.S. Lett* 1997;416:103-6.
22. Kumar V, Cotran R, Robbins SL. *Temel patoloji (Basic Pathology)*, 6.edisyon, Temmuz 2000 (syf 6-10, 30-36)
23. Toyokuni S.: Reactive oxygen species-induced molecular damage and its application in pathology. *Pathol int.* 1999;49:91-102.
24. Granger DN. Role of xanthine oxidase and granulocytes in ischemia-reperfusion injury. *Am J Physiol* 1998;275:HI269-75.
25. Ernster L. Biochemistry of reoxygenation injury. *Crit Care Med.* 1988;16:947-53.
26. Grisham MD, Hernandez LA, Granger DN. Xanthine oxidase and neutrophil infiltration in intestinal ischemia. *Am J Physiol.* 1986;251(4 pt 1): G567-74.
27. Thiagarajan RR, Winn RK, Harlan JM. The role of leukocyte and endothelial adhesion molecules in ischemia-reperfusion injury. *Thromb Haemost.* 1997;78 (1): 310-4.
28. Panes J, Perry M, Granger DN. Leukocyte endothelial cell adhesion: Avenues for therapeutic intervention. *Br J Pharmacol* 1999;126:537-50
29. Wellbourn CRB, Goldman G, Paterson IS, Valeri CR, Shepro D, Hectman HB. Pathophysiology of ischemia-reperfusion: central role of the neutrophil. *Br J Surg.* 1991; 78: 651-5.
30. Gimbrone MA, Brock AF, Schafer AI. Leukotriene B₄ stimulates polymorphonuclear leukocyte adhesion to cultured vascular endothelial cells. *J Clin Invest* 1984;74:1552-55

31. Spagnuolo PJ, Ellner JJ, Hasid A, et al. Thromboxane A₂ mediates augmented polymorphonuclear leukocyte adhesiveness. *J Clin Invest* 1980;66:406-14.
32. Mullane KM, Read N, Salmon JA, et al. The role of leukocytes in acute myocardial infarction in anaesthetized dogs: relationship to myocardial salvage by antiinflammatory drugs. *J Pharmacol Exp Ther* 1984;228:510-22
33. Arfors KE, Lundberg C, Lindbom L, et al. A monoclonal antibody to the membrane glycoprotein complex CD18 inhibits polymorphonuclear leukocyte accumulation and plasma leakage in vivo. *Blood* 1987;69:338-40
34. Paterson IS, Klausner JM, Goldman G, et al. Thromboxane mediates the ischemia-induced neutrophil oxidative burst. *Surgery* 1989;106:224-29
35. Utsonomiya T, Krausz MM, Dunham Bea. Maintenance of cardiodynamics with aspirin during abdominal aortic aneurysmectomy. *Ann Surg* 1981;194:602-08.
36. Thornton MA, Winn R, Alpers CE, et al. An evaluation of the neutrophil as a mediator of in vivo renal ischemic reperfusion injury. *Am J Pathol* 1989;135:509-15.
37. Weyrich AS, Ma XY, Lefer DJ, Albertine KH, Lefer AM. In vivo neutralization of P-selectin protects feline heart and endothelium in myocardial ischemia and reperfusion injury. *J Clin Invest* 1993;91:2620-29.
38. Ma XL, Weyrich AS, Lefer DJ, et al. Monoclonal antibody to L-selectin attenuates neutrophil accumulation and protects ischemic reperfused cat myocardium. *Circulation* 1993;88:649-58.
39. Nakamura T, Vollmar B, Vinning J, Ueda M, Menger M.D, Schafers H.J. Heparin and the nonanticoagulant N-Acetyl heparin attenuate

- capillary no-reflow after normothermic ischemia of the lung. *Ann. Thorac. Surg.* 72,1183-1189 (2001)
40. Levinson RM, Shure D, Moser KM. Reperfusion pulmonary edema after pulmonary artery thromboendarterectomy. *Am. Rev. Respir. Dis.*, 134,1241-1245 (1986).
 41. Vural KM, öz MC. Endothelial adhesivity, pulmonary hemodynamics and nitric oxide synthesis in ischemia-reperfusion. *Eur. J. Cardiothorac. Surg.*, 18,348-352 (2000).
 42. Krishnadasan B, Naidu BV, Byrne K, et al. The role of proinflammatory cytokins in lung ischemia reperfusion injury. *J.Cardiothorac.Surg.*, 125,261-272 (2003).
 43. Siemionow M, Arslan E.: İschemia/reperfusion injury: A review in relation to free tissue transfers. *Microsurgery*,24,468-475(2004).
 44. McCord JM.: Oxygen derived free radicals in postischemic tissue injury. *N Engl J Med.*, 312,159-163 (1985).
 45. Al-Medi AB, Shuman H, Fisher AB.: Intracellular generation of reactive oxygen species during nonhypoxic lung ischemia. *Am.J.Physiol.* 272,L294-300 (1997).
 46. Kelly RF.: Current strategies in lung preservation. *J.Lab.Clin.Med.*,136,427-440 (2000).
 47. Zhao,G.,Al-Mehdi,A.B.,Fisher A.B.: Anoxia-reoxygenation versus ischemia in isolated rat lungs. *Am.J.Physiol.*,273,L1112-1117 (1997).
 48. De Perrot M, Liu M, Waddell TK, Keshavjee S.: İschemia-reperfusion-induced lung injury. . *Am.J.Respir.Crit.Care Med.* ,167,490-511(2003).
 49. Recknagel RO, Glende EA Jr, Dolak JA, Waller RL. Mechanisms of carbon tetrachloride toxicity. *Pharmacol.Ther.* 1989;43(1):139-54
 50. White MJ, Heckler FR. Oxygen free radicals and wound healing. *Clin.Plast.Surg.* 1990;17(3):473-84.

51. Angel MF, Ramasastry SS, Swartz WM, Basford RE, Futrell JW. Free radicals: basic concepts concerning their chemistry, pathophysiology, and relevance to plastic surgery. *Plast.Reconstr.Surg.* 1987;79(6):990-7.
52. Dutka AJ, Kochanek PM, Hallenbeck JM. Influence of granulocytopenia in canine cerebral ischemia induced by air embolism. *Stroke* 20:390-95,1989.
53. Slater TF. Free radicals mechanisms in tissue injury. *J.Biochem.* 222:1-15,1984.
54. Karwatowska-Prokopczuk E, Czarnowska E, Beresewicz A. Iron availability and free radical induced injury in the isolated ischaemic/reperfused rat heart. *Cardiovasc. Res.* 1992;26(1):58-66
55. Kehrer JP, Lund LG. Cellular reducing equivalents and oxidative stress. *Free Radic.Biol.Med.* 1994;17(1):65-75.
56. Weitberg AB, Weitzman SA, Clark EP, Stossel TP. Effects of antioxidants on oxidant-induced sister chromatid exchange formation. *J.Clin.Invest.* 1985;75(6):1835-41.
57. Freeman BA, Crapo JD. Biology of disease: free radicals and tissue injury. *Lab.Invest.* 1982;47(5):412-26.
58. Cheeseman KH, Slater TF. An introduction to free radical biochemistry. *British Medical Bulletin.* 1993;49(3):481-93.
59. Ceyhan A, Günel S, Çıkan T, Bababalım M, Ünal N. Serbest radikaller ve anestezi. *Sendrom*,1996;12(8):65-9.
60. Clark İA. Tissue damage caused by free oxygen radicals. *Pathology*, 1986;18:181-86.
61. Halliwell B. Free radical antioxidants and human disease: curiosity, cause or consequence? *The Lancet*, 1994;344:721-24.
62. Moncada S, Higgs A. The L-arginine-nitric oxide pathway. *N.Engl.J.Med.* 1993;329:200-212.

63. Beckman JS, Chen J, İschiropoulos H, Crow JP. Oxidative chemistry of peroxynitrite. *Meth.Enzymol* 1994;233:229-40.
64. Halliwell B. Superoxide, iron, vascular endothelium and reperfusion injury. *Free Radic.Res. Common.* 1989;5:315-18.
65. Jaeschke H. Mechanism oxidant stress induced acute tissue injury. *PSEBM.* 209:104-111, 1995.
66. Demir H, Akkoyun HT, Çimen Ç ve Çelik İ (2004): İnsan eritrositlerinden ve rat eritrositlerinden katalaz enzimi aktivitesi üzerinde bazı ilaç ve antibiyotiklerin (in vivo) inhibisyon kinetiğinin incelenmesi. 17.Ulusal Biyoloji Kongresi, Çukurova Üniveristesi, 21-24 Haziran Adana.
67. Percy ME (1984): Catalase an old enzyme with a new role?, *Can.J.Biochem.Cell Biol.*62:1006-1014.
68. Halliwell B. and Gutteridge JMC, (1990): Role of free radicals and catalytic metal ions in human disease: an overview. *Methods Enzymol.* 186:1-85.
69. Paglia DE, Valentine WN. Studies on the quantitative and qualitative characterization of erythrocyte glutathion peroxidase. *J.Lab.Clin.Med.* 1967;70(1):158-69.
70. Mates JM, Gomez CP, Castro İ. (1999): Antioxidant enzymes and human diseases. *Clinical Biochem.* 32,8,595-603.
71. Akkuş İ. (1995): Serbest radikaller ve fizyopatolojik etkileri. Mimoza Yayınları., Konya.
72. Halliwell B, Gutteridge JMC. (1996): Free radicals in biology and medicine. 2nd Edition Clarendon Pres, Oxford.
73. Kuş İ, Zararsız İ, Yılmaz HR, Türkoğlu AÖ, Pekmez H, Sarsılmaz M. Sıçan prefrontal korteksinde formaldehit maruziyetiyle oluşan oksidatif hasara karşı melatonin hormonunun koruyucu etkisi. *Ercites*

üniversitesi sağlık bilimleri dergisi (e.ü. journal of health sciences) 13(2) 1-7, 2004.

74. Wang NP, Bufkin BL, Nakamura M, Zhao ZQ, Wilcox JN, Hewan-Lowe KO, Guyton RA, Vinten-Johansen J.: İschemic preconditioning reduces neutrophil accumulation and myocardial apoptozis. *Ann.Thorac.Surg.* 1999;67;1689-95.
75. Chopra M, Scott N, Macmurray J.: Captopril. A free radical scavenger. *Br.J.Clin.Pharmacol.* 1989;27:396-9.
76. Kukreja RC, Hess ML. The oxygen free radical system: from equations though membran protein interactions to cardiovascular injury and protection. *Cardiovasc.Res.* 1992;26:641-55.
77. Collard C.D., Gelman S.: Pathophysiology, clinical manifestations and prevention of ischemia-reperfusion injury. *Anesthesiology*, 94,1133-1138 (2001).
78. Svensson LG, Hess KR, Coselli JS, Sfi HJ, Crawford ES.: A prospective study of respiratory failure after high-risk surgery of the thoracoabdominal aorta. *J.Vasc.Surg.* 14:271-282,1991.86.
79. Lunn JK, Dannemiller FJ, Stanley TH.: Cardiovascular responses to clamping of the aorta during epidural and general anesthesia. *Anesth.Analg.* 58:372-376, 1979.
80. Paterson İS, Klausner JM, Pugatch R, Allen P, Mannick JA, Shepro D, Hechtman HB.: Noncardiogenic pulmonary edema after abdominal aortic aneurysm surgery. *Ann.Surg.* 209:231-236,1989.
81. Bengston A, Heideman M,: Altered anaphylatoxin activity during induced hypoperfusion in acute and elective abdominal aortic surgery. *J.Trauma.* 26:631-637, 1986.
82. Carroll RM, Laravisco RB, Schauble JF.: Left ventricular function during aortic surgery. *Arch.Surg.* 111:740-743, 1976.

83. Bowald S, Gerdin B.: Pulmonary microembolization during and after aortic cross-clamping in heparinized and non-heparinized pigs. *Acta Chir.Scand.* 146:351-356, 1980.
84. Bowald S, Eriksson I, Wiklund L.: The influence of heparin on haemodynamics and blood gases during abdominal aortic surgery. *Acta Chirurgica Scandinavica* 146:333-341, 1980.
85. Mathieson MA, Dunham B, Huval WV, Lelcuk S, Stemp LI, Valeri CR, Shepro D, Hectman HB.: Ischemia of the limb stimulates thromboxane production and myocardial depression. *Surg.Gynecol.Obstet.* 157:500-504, 1983.
86. Klausner JM, Paterson IS, Goldman G, Kobzik L, Valeri CR, Shepro D, Hectman HB.: Thromboxane A2 mediates increased pulmonary microvascular permeability following limb ischemia. *Circ.Res.* 64:1178-1189, 1988.
87. Welbourn CRB, Goldman G, Paterson IS, Valeri CR, Shepro D, Hectman HB.: Neutrophil elastase and oxygen radicals: Synergism in lung injury after hindlimb ischemia. *Am.J.Physiol.* 260:H1852-H1856, 1991.
88. Paterson IS, Klausner JM, Goldman G, Kobzik L, Welbourn CR, Valeri CR, Shepro D, Hectman HB.: Thromboxane mediates the ischemia induced neutrophil oxidative burst. *Surgery* 106:224-229, 1989.
89. Klausner JM, Paterson IS, Mannick JA, Valeri CR, Shepro D, Hectman HB.: Reperfusion pulmonary edema. *JAMA* 261:1030-1035, 1989.
90. Blaisdell FW, Lim RC, Stallone RJ.: The mechanism of pulmonary damage following traumatic shock. *Surg.Gynecol.Obstet.* 130:15-22, 1970.
91. Tucker A, Weir EK, Reeves JT, Grover RF.: Pulmonary microembolism: Attenuated pulmonary vasoconstriction with prostiglandin inhibitors and antihistamines. *Prostoglandines*, 11:31-41, 1976.

92. Todd MH, Forrest JB, Cragg DB.: The effects of aspirin and methysergide on responses to clot-induced pulmonary embolism. *Am. Heart J.* 105:769-776, 1983.
93. Hyman AL, Spannhake EW, Kadowitz PJ.: State of the art: Prostaglandins and the lung. *Am.Rev.Respir.Dis.* 117:111-136, 1978.
94. Bengtson A, Lannsjö W, Heideman M.: Complement and anaphylatoxin responses to cross-clamping of the aorta. *Br.J.Anaesth.* 59: 1093-1097, 1987.
95. Marceau F, Hugli TE.: Effect of C3a and C5a anaphylatoxins on guinea-pig isolated blood vessels. *J.Pharmacol Exp.Ther.* 230:749-754, 1984.
96. Morgan EL, Weigle WO, Hugli TE.: Anaphylatoxin-mediated regulation of the immune response: C3a-mediated suppression of human and murine humoral immune responses. *J.Exp.Med.* 155:1412-1426, 1982.
97. Brzezinski A. Melatonin in humans. *N.Eng.J.Med.* 1997;336:186-95
98. Sumida M, Barkovich AJ, Newton TH. Development of the pineal gland: measurement with MR. *Am.J.Neuroradiol.* 1996;17:233-6.
99. Ölmez E, Şahna E, Ağkadir M, Acet A. Melatonin: emeklilik yaşı 80 olur mu? *Turgut Özal Tıp M.Derg.* 2000;7:177-87.
100. Boutin JA, Delagrangé P, Rettori MC. Melatonin: molecular pharmacology and therapeutic applications. *Medicographia* 2000;22:72-80.
101. Vanecek J. Cellular mechanisms of melatonin action. *Physiol Rev.* 1998;78:687-721.
102. Manev HT, Kharlamov A, Joo JY. Increased brain damage after stroke or excitotoxic seizures in melatonin deficient rats. *FASEB* 1996;10: 1546-51.

103. Reiter RJ. The aging pineal and its physiological consequences. *BioEssays* 1992; 14: 169-75.
104. Fourtillan JB, Brisson AM, Fourtillan M, Ingrand I, Decourt JP, Girault J. Melatonin secretion occurs at a constant rate in both young and older men and woman. *Am.J.Physiol-Endocrinology and Metabolism*. 2001; 280: E11-E22.
105. Paul P, Lahaye C, Delagrangé P, Nicolas JP, Canet E, Boutin JA. Characterization of 2-(125I) iodomelatonin binding sites in Syrian hamster peripheral organs. *J.Pharmacol.Exp.Ther.* 1999;290: 334-40.
106. Cuzzocrea S, Reiter RJ. Pharmacological action of melatonin in shock, inflammation and ischemia/reperfusion injury. *Eur.J.Pharmacol.* 2001; 426:1-10.
107. Schulz R, Wambolt R. Inhibition of nitric oxide synthesis protects the isolated working rabbit heart from ischaemia-reperfusion injury. *Cardiovasc.Res.* 1995;30:432-9.
108. Theroux P. Protection of the myocardial cell during ischemia. *Am.J.Cardiol.* 1999;83:3-9.
109. Parlakpınar H, Sahna E, Özgen U, Mizrak B, Acet A. Protective role of melatonin on myocardial ischemia-reperfusion-triggered apoptosis. *Proceedings of the Turkish Pharmacological Society, 17th National Congress of Pharmacology, 1st clinical pharmacology symposium, joint meeting of the Turkish&Dutch. Pharmacological societies; Oct 17-21,2003, Antalya,Turkey.*
110. Cardinali DP, Del Zar MM, Vacas MI. The effects of melatonin in human platelets. *Acta Physiol.Pharmacol.Ther.Latinoam* 1993;43:1-13.
111. Reiter RJ. Cytoprotective properties of melatonin: Presumed association with oxidative damage and aging. *Nutrition* 1998;14:691-6.

112. Tan DX, Manchester LC, Reiter RJ, Qi W, Kim SJ, El-Sokkary GH. Ischemia-reperfusion-induced arrhythmias in the isolated rat heart: Prevention by melatonin. *J.Pineal.Res.* 1998;25:184-91.
113. Sahna E, Olmez E, Acet A. Effects of physiological and pharmacological concentrations of melatonin on ischemia-reperfusion arrhythmias in rats: Can the incidence of sudden cardiac death be reduced? *J.Pineal Res.* 2002;32:194-8.
114. Okutan H, Ozcelik N, Yilmaz HR, Uz E. Effects of caffeic acid phenethyl ester on lipid peroxidation and antioxidant enzymes in diabetic rat heart. *Clin.Biochem.* 2005;38(2):191-6.
115. Walker PM, Lindsay TF, Labbe R, Mickle DA, Romaschin AD. Salvage of skeletal muscle with free radical scavengers. *J.Vasc.Surg.* 1987; 5(1): 68-75.
116. Ames A 3rd, Wright RL, Kowada M, Thurston JM, Majno G. Cerebral ischemia. II. The no-reflow phenomenon. *Am.J.Pathol.* 1968;52(2):437-53.
117. Fyman PN, Reynolds JR, Moser F, Avitable M, Casthely PA, Butt K. Pharmacokinetics of sufentanil in patients undergoing renal transplantation. *Can.J.Anaesth.* 1988;35(3)(Pt1): 312-5.
118. Ekingen G, Sonmez K, Ozen O, Demirogulları B, Karabulut R, Turkyılmaz Z, Yenidunya S, Ayayvacı S, Basaklar AC, Kale N. Effect of amrinone on mucosal permeability in experimental intestinal ischaemia/reperfusion injury. *ANZ J.Surg.* 2005;75(7): 608-13.
119. Prem JT, Eppinger M, Lemmon G, Miller S, Nolan D, Peoples J. The role of glutamine in skeletal muscle ischemia/reperfusion injury in the rat hind limb model. *Am.J.Surg.* 1999;178:147-50.
120. Cavanagh SP, Gough MJ, Homer-Vanniasinkam S. The role of the neutrophil in ischaemia-reperfusion injury: potential therapeutic interventions. *Cardiovasc.Surg.* 1998;6:112-8.

121. Carden D, Xiao F, Moak C, Willis BH, Robinson-Jackson S, Alexander S. Neutrophil elastase promotes lung microvascular injury and proteolysis of endothelial cadherins. *Am.J.Physiol.* 1998;275: H385-92.
122. Windsor AC, Mullen PG, Fowler AA, Sugerman HJ. Role of the neutrophil in adult respiratory distress syndrome. *Br.J.Surg.* 1993;80:10-7.
123. Bengisun J, Koksoy C, Bengisun JS, Bayraktaroglu G, Camur A, Aras N. Ischemia and reperfusion injury: prevention of pulmonary hypertension and leukosequestration following lower limb ischemia. *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids* 1997;56:117-20.
124. Öcal B, Nurkay K, İlhan G, Esin Y. Alt ekstremité iskemi reperfüzyonuna bağlı gelişen akciğer hasarında askorbik asidin etkisi. *Türk Göğüs Kalp Damar Cerrahisi Dergisi* Ekim 2001, Cilt 9, Sayı 4, Sayfa(lar) 238-241.
125. Çalikoğlu M, Ünlü A, Sucu N, Aktaş S, Tamer L, Çalikoğlu İ. Periferik iskemi reperfüzyonun akciğerdeki nitrozatif etkileri ve 'caffeic acid phenethylester'in koruyucu rolü. *Tüberküloz ve toraks dergisi* 2004;52(3):218-223.
126. Köksek O, Çekirdekçi A, Kükner A, İlhan N. The effect of alpha-lipoic acid on ischemia-reperfusion induced lung injury. *Mersin Üniversitesi Tıp Fakültesi Dergisi* 2001;4: 459-465.
127. Wu H, Ren B, Zhu J, Dong G, Xu B, Wang C, Zheng X, Jing H. Pretreatment with recombined human erthropoietin attenuates ischemia-reperfusion-induced lung injury in rats. *Eur.J.Cardiothorac.Surg.* 2006 Jun;29(6):902-7.
128. Hayrettin Şirin, Osman Sarıbulbul, Mustafa Cerrahoğlu, Ahmet Baltalarlı, Ragıp Ortaç, Mustafa Saçar, Ömer Aksoy. Alt ekstremité iskemi reperfüzyonunun yol açtığı pulmoner hasarda Aprotinin'in koruyucu etkinliği. *Türk Göğüs K. D. Cerr. Derg.* 2001,9:233-237.

129. Atike T, Serdar A, Ali C, Selim İ, Koray A, Gamze D, Serap Ş, Serap A, İlhan Y, Adnan Ç. Alt ekstremitte iskemi reperfüzyonu sonucunda gelişen akciğer hasarının önlenmesinde farklı bir ajan: FK506 (Takrolimus). *Türk Göğüs Kalp Damar Cer. Derg.* 2001;9: 242-246.
130. Kaneko S, Okumura K, Numaguchi Y, Matsui H, Murase K, Mokuno S, et al. Melatonin scavenges hydroxyl radical and protects isolated rat hearts from ischemic reperfusion injury. *Life.Sci.* 2000;67:101-12.
131. Sahna E, Acet A, Ozer MK, Olmez E. Myocardial ischemia-reperfusion in rats: Reduction of infarct size by either supplemental physiological or pharmacological doses of melatonin. *J.Pineal Res.* 2002;33:234-8.
132. Sahna E, Parlakpınar H, Türköz Y, Acet A. Effects of melatonin on myocardial ischemia-reperfusion-induced infarct size and oxidative stres. *Physiol. Res.* 2005;54:491-5.
133. Lee YM, Chen HR, Hsiao G, Sheu JR, Wang JJ, Yen MH. Protective effects of melatonin on myokardial ischemia/reperfusion injury in vivo. *J.Pineal Res.* 2002;33:72-80.
134. Okutan H, Savas C, Delibas N. The antioxidant effect of melatonin in lung injury after aortic occlusion-reperfusion. *Cardiovasc. and Thorac.Surg.* 2004;3:519-22.
135. Celik H, Ayar A, Tug N, Simsek M, Ozercan I, Cikim G, et al. Effects of melatonin on noncardiogenic pulmonary edema secondary to ednexial ischemia-reperfusion in guinea pig. *Neuro Endocrinol. Lett.* 2002;23: 115-8.
136. İnci İ, İnci D, Dutly A, Boehler A, Weder W. Melatonin attenuates posttransplant lung ischemia-reperfusion injury. *Ann.Thorac.Surg.* 2002;73:220-5.
137. A Uysal, İ Akar, KK Özsin, A Rahman, B Üstündağ, Hİ Özercan. Alt ekstremitte iskemi reperfüzyonunun yol açtığı akciğer hasarında melatoninin koruyucu etkinliği. *Türk Göğüs Kalp Damar Cerrahisi Dergisi* Ekim 2006, Cilt 14, Sayı 4, Sayfa(lar) 308-314.