

T.C.
SÜLEYMAN DEMİREL ÜNİVERSİTESİ
TIP FAKÜLTESİ
RADYODİAGNOSTİK ANABİLİM DALI

**RATLARDA GADOBUTROLÜN, FARKLI KÜMÜLATİF
DOZLARA VE UYGULAMA ŞEKLİNE BAĞIMLI BÖBREK YAN
ETKİLERİNİN, KAN VE BÖBREKTE
OKSİDAN - ANTİOKSİDAN DURUMLAR ÜZERİNE
ETKİLERİNİN ARAŞTIRILMASI**

Dr. Önem LÖKER ALTINTAŞ

**RADYODİAGNOSTİK ANABİLİM DALI
UZMANLIK TEZİ**

Tez Danışmanı

Doç. Dr. Ahmet YEŞİLDAĞ

**Bu tez Süleyman Demirel Üniversitesi Araştırma Fonu tarafından
TU-1693-08 proje numarası ile desteklenmiştir.**

2009-İSPARTA

KABUL VE ONAY
Tıp Fakültesi Dekanlığına,

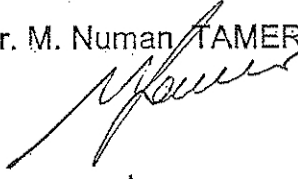
Süleyman Demirel Üniversitesi Tıp Fakültesi
Radyoloji Anabilim Dalı Başkanlığı
çerçevesinde yürütülmüş olan bu çalışma, aşağıdaki Jüri tarafından
Uzmanlık tezi olarak kabul edilmiştir.

Uzmanlık Tez Savunma Tarihi : 02 / 07 / 2009

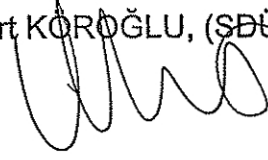
Tez Danışmanı :Doç.Dr. Ahmet YEŞİLDAĞ, (SDÜ. TIP FAKÜLTESİ)



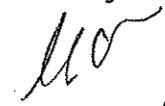
Üye :Prof. Dr. M. Numan TAMER, (SDÜ. TIP FAKÜLTESİ)



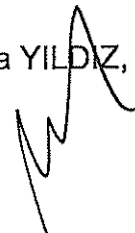
Üye :Doç. Dr. Mert KOROĞLU, (SDÜ. TIP FAKÜLTESİ)



Üye :Doç. Dr. Meltem ÇETİN, (SDÜ. TIP FAKÜLTESİ)

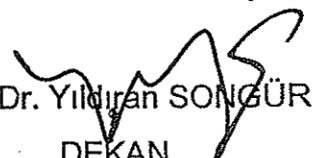


Üye :Doç. Dr. Mustafa YILDIZ, (SDÜ. TIP FAKÜLTESİ)



ONAY : Bu uzmanlık tezi, Fakülte Yönetim Kurulunca belirlenen yukarıdaki jüri üyeleri tarafından uygun görülmüş ve Fakülte Yönetim Kurulu Kararıyla kabul edilmiştir.

Prof. Dr. Yıldırım SONGÜR
DEKAN



ÖNSÖZ

İhtisas sürem boyunca eğitimimde büyük emekler veren hocalarımdan eski bölüm başkanımız sayın hocam Prof. Dr. Orhan OYAR'a, tez hocam ve Radyodiagnostik Anabilim Dalı Başkanımız olan Doç. Dr. Ahmet YEŞİLDAĞ'a, Doç. Dr. Mert KÖROLU'na, Doç. Dr. Meltem ÇETİN'e, bölümümüzden ayrılan Dr. Bahattin BAYKAL'a, Dr. Harun YILDIZ' a teşekkürlerimi bir borç bilirim.

Patoloji Anabilim Dalında görev yapan Yrd. Doç. Dr. İ. Metin ÇİRİŞ'e, tezimin her aşamasında uzakta olmasına rağmen desteğini esirgemeyen hocam Prof. Dr. Eser ÖZ OYAR'a, Gazi Üniversitesi Tıp Fakültesinden Dr. Ayhan KORKMAZ'a, sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

Birlikte çalıştığım asistan arkadaşlarıma, teknisyenlerimizden Adnan ONAR'a teşekkür ederim.

İÇİNDEKİLER

KABUL ve ONAY	i
ÖNSÖZ.....	ii
İÇİNDEKİLER	iii
SİMGELER ve KISALTMALAR	vi
ŞEKİLLER DİZİNİ	vii
TABLolar DİZİNİ	viii
RESİMLER DİZİNİ	ix
1. GİRİŞ ve AMAÇ	1
2. GENEL BİLGİLER.....	3
2.1. MRG Hakkında Genel Bilgiler	3
2.2. MRG'nin Tarihçesi	3
2.3. MRG Çalışma Prensipleri	4
2.4. Relaksasyon Zamanları	6
2.4.1. T1 Relaksasyon Zamanı	6
2.4.2. T2 Relaksasyon Zamanı	6
2.4.3. T2* Relaksasyon Zamanı	6
2.5. MRG Sekansları	6
2.5.1. SE sekansı	7
2.5.2. GRE Sekansları	7
2.5.3. IR Sekansları	7
2.5.4. SR Sekansları	8
2.6. MRG Kontrast Ajanları.....	8
2.6.1. Retiküloendotelial Sisteme (RES) Yönelik Kontrast Maddeler.....	10
2.6.2. Hepatobilier Sisteme Yönelik Kontrast Maddeler	10
2.6.3. Kan Havuzu Kontrast Maddeleri	11
2.6.4. Oral Kontrast Maddeler	11
2.6.5. Ekstrasellüler Boşluk Kontrast Maddeleri	11
2.7. Gadobutrol İle İlgili Temel Bilgiler	12
2.8. Kontrast Ajanlarının Yan Etkileri	14
2.9. MRG Kontrast Maddelerinin Yan Etkileri İle İlgili Yapılan Çalışmalar.....	17
2.10. Oksidan - Antioksidan Sistem.....	19

2.10.1. Serbest Radikaller	19
2.10.1.1. Reaktif Oksijen ve Nitrojen Türleri	20
2.10.1.1.1. Süperoksit Radikali (O_2^-)	20
2.10.1.1.2. Hidrojen Peroksit (H_2O_2)	20
2.10.1.1.3. Hidroksil Radikali (OH^-).....	21
2.10.1.1.4. Peroksil (ROO^-) ve Alkoksil (RO^-) Radikalleri	21
2.10.1.1.5. Nitrik Oksit (NO).....	21
2.10.2. Oksidatif Stres.....	22
2.10.3. Hüresel Hasar	23
2.10.3.1. Proteinlerin Etkilenimi	23
2.10.3.2. DNA Hasarı.....	23
2.10.3.3. Karbonhidrat Hasarı	23
2.10.3.4. Lipit Peroksidasyonu.....	23
2.10.4. Serbest Radikallere Bağlı Hastalıklar	25
2.10.5. Korunma ve Regülasyon.....	25
2.10.6. Hücre İçi Antioksidanlar ve Hücre Dışı Sıvılardaki Antioksidanlar	26
2.10.7. Enzimatik Antioksidanlar	27
2.10.7.1. Süperoksit Dismutaz (SOD).....	27
2.10.7.2. Glutasyon Peroksidaz (GPx)	27
2.10.7.3. Katalaz (CAT).....	28
2.10.8. Non-Enzimatik Antioksidanlar	29
2.10.8.1. Glutasyon (GSH).....	29
2.10.8.2. C Vitamini (Askorbik Asit).....	30
2.10.8.3. E Vitamini	31
2.10.8.4. Karotenoitler	31
2.10.8.5. Ürik Asit.....	31
2.10.8.6. A Vitamini.....	31
2.10.8.7. Seruloplazmin	32
2.10.8.8. Transferin	32
3. MATERYAL - METOD	33
3.1. Deneye Hazırlık	33
3.2. Anestezi.....	33

3.3. Başlangıçta MRG Tetkiki	33
3.4. Enjeksiyon İşlemleri.....	33
3.5. Son MRG Tetkiki.....	35
3.6. Deneyin Sonlandırılması	35
3.7. Histopatolojik İnceleme	36
3.8. Biyokimyasal İnceleme	36
3.8.1. Plazmada NO Çalışılması	36
3.8.2. Böbrek Dokusunda NO Çalışılması	37
3.8.3. Plazmada MDA Değerlerinin Çalışılması.....	37
3.8.4. Plazmada GSH Değerlerinin Çalışılması	37
3.8.5. Dokuda GSH ve MDA Tayini	38
3.9. MRG Değerlendirmesi	38
4. SONUÇLAR	39
4.1. MRG Sonuçları	39
4.2. Histopatoloji.....	42
4.3. Serbest Radikal Düzeyleri.....	44
5. TARTIŞMA	51
ÖZET.....	59
SUMMARY	61
KAYNAKÇA	63

SİMGELER ve KISALTMALAR

- MRG** : Manyetik Rezonans Görüntüleme
NSF : Nefrojenik Sistemik Fibrozis
IV : İntravenöz
IP : İntraperitoneal
NO : Nitrik oksit
GSH : Glutatyon
MDA : Malondialdehit
BT : Bilgisayarlı Tomografi
NMR : Nükleer Magnetik Rezonans
RF : Radyofrekans
SE : Spin Eko
GE : Gradient Eko
IR : İnversion Recovery
SR : Saturation Recovery
TR : Time Repetition
TE : Time Echo
FA : Flip angle
S/N : Signal/noise
RES : Retiküloendotelial sistem
SPIO : Süperparamanyetik Demir Oksit
MRA : Manyetik Rezonans Anjiyografi
LD50 : Lethal doz 50
KMN : Kontrast Madde Nefropatisi
ABY : Akut Böbrek Yetmezliği
NSF : Nefrojenik Sistemik Fibrozise
NFD : Nefrojenik Fibrozan Dermopati

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 1: Gadobutrol'ün formülü (3 numaralı kaynaktan alınmıştır).....	13
Şekil 2: Nitrik Oksit sentezi.....	22
Şekil 3: Lipit peroksidasyonu ve MDA oluşumu.	24
Şekil 4: Serbest radikallerin oluşumu ve enzimatik detoksifikasyonu	27
Şekil 5: Glutasyon sentezi.....	30
Şekil 6: Tüm Grupların deney sonu plazma MDA değerlerinin karşılaştırması	45
Şekil 7: Grup 5 ve 6'da deney sonunda plazmada ölçülen GSH ve NO değerlerinin karşılaştırılması.....	46
Şekil 8: Grup 2 ve 6'da deney sonunda plazmada ölçülen MDA ve GSH değerlerinin karşılaştırması	47
Şekil 9: Tüm gruplarda deney başında ve sonrasında elde edilen plazma örneklerinde MDA değerlerinin değişimlerinin kıyaslanması.....	48
Şekil 10: Tüm gruplarda deney başında ve sonrasında elde edilen plazma örneklerinde GSH değerlerinin değişimlerinin kıyaslanması	49
Şekil 11: Tüm gruplarda deney başında ve sonrasında elde edilen plazma örneklerinde NO değerlerinin değişimlerinin kıyaslanması	49

TABLolar DİZİNİ

Tablo 1: Gadolinyumlu kontrast ajanlara örnekler	12
Tablo 2: Gadovist 1M özellikleri	14
Tablo 3: Hücre içi antioksidan ajanlar	26
Tablo 4: Gruplardaki böbrek dokularında saptanan histopatolojik bulguların sayısal dağılımı	44
Tablo 5: Grup 1 ve Grup 2 arasında deney sonunda plazmada ölçülen parametrelerin karşılaştırılması	45
Tablo 6: Grup 3 ve Grup 4 arasında deney sonunda plazmada ölçülen parametrelerin karşılaştırılması	45
Tablo 7: Grup 5 ve Grup 6 arasında deney sonunda plazmada ölçülen parametrelerin karşılaştırılması	46
Tablo 8: Grup 2 ve Grup 6 arasında deney sonunda plazmada ölçülen parametrelerin karşılaştırılması	47
Tablo 9: Grup 4’de plazmada ölçülen parametrelerin deney başlangıç ve sonuç değerleri açısından karşılaştırması	48
Tablo 10: Grup 6’da plazmada ölçülen parametrelerin deney başlangıç ve sonuç değerleri açısından karşılaştırması	50

RESİMLER DİZİNİ

Resim 1: İntraperitoneal enjeksiyon.....	34
Resim 2: İntravenöz enjeksiyon	34
Resim 3: Batın içi fotoğrafları.....	35
Resim 4: IP kontrast madde enjeksiyonu sonrası elde olunan koronal T1 ağırlıklı MRG incelemesi; periferik parlaklaşma gösteren nodüler oluşum (boyun apsisi)....	39
Resim 5: IP kontrast madde enjeksiyonu sonrası elde olunan koronal T1 ağırlıklı MRG incelemesi; peritonda milimetrik nodüler oluşumlar izlenmekte.....	40
Resim 6: Makroskopik incelemede periton ve omentumda izlenen multipl sayıda nodüler oluşum.....	40
Resim 7: Omentumda inflamasyon (HE x400)	41
Resim 8: a) IP ve b) IV yolla kontrast madde verilen 2 Grupta alınan T1 ağırlıklı MRG imajlarda böbrek parlaklaşmasında belirgin farklılığın olmadığı izlenmektedir.....	41
Resim 9: Normal görünümde kuyruk kesiti (HEx400).	42
Resim 10: Ülsere kuyruk (HEx 400).....	42
Resim 11: Tübül içinde cast (HEx400)	43
Resim 12: a ve b de intratubuler eritrositler (HEx400).....	43

1. GİRİŞ ve AMAÇ

Tıp teknolojisi çok büyük bir hızla gelişmektedir. Bunun sonucunda en zor klinik problemlerin bile tanısına ulaşmak günden güne daha da kolaylaşmaktadır. Radyoloji departmanları bu değişim ve gelişimle iç içedir.

Radyolojide kullanılan radyokontrast maddeler, şüphesiz tanısal başarıyı artırmaktadır. Fakat oluşabilecek bazı yan etkiler de mevcuttur. Ve hastanın yaşam kalitesini etkilemektedir.

Manyetik Rezonans Görüntüleme (MRG) kontrast ajanları günlük radyoloji pratiğinde sıkça kullanılan, tanıya gitmede önemli faydalar sağlayan ajanlardır. Bu ajanlar olabildiğince güvenli olarak değerlendirilmekle birlikte, böbrek yetmezlikli hastalarda kullanıldığında Nefrojenik Sistemik Fibrozis (NSF)'e neden olabildiği belirtilmektedir (1,2).

Çalışmamızda kontrast madde olarak kullandığımız Gadobutrol, (Gadovist, Schering, Almanya), yapılan çalışmalarda MRG kontrast ajanları arasında, güvenilirlik açısından oldukça iyi bir yerdedir. Ratlarda yapılan çalışmalarda, özellikle yüksek doz uygulamalarında veya kronik yüksek doz uygulamaların sonucunda bir takım yan etkilerden bahsedilmektedir. Gadobutrol ile ratlarda subkronik toksisite ile ilgili bazı çalışmalar yapılmıştır. Sonuçta da böbrek ağırlığında doz bağımlı bir artış ve renal proksimal epitelyumun doz bağımlı vakualizasyonu gibi sonuçlara ulaşılmıştır(3,4).

Gadobutrol ekstrasellüler MRG kontrast ajanıdır. Ekstrasellüler boşluk; intravasküler ve interstisyel boşlukların toplamından oluşur. Ekstrasellüler MRG kontrast ajanları, enjeksiyonu takiben önce pulmoner dolaşıma, buradan da sistemik arterlere dağılırlar. Ekstrasellüler boşluk kontrast maddeleri glomerüllerden renal tübüllere geçer ve suyun reabsorpsiyonu ile idrarda konsantre edilirler. Bu ajanlar renal parankimin ve toplayıcı sistemin değerlendirilmesinde de etkili olarak kullanılır (5). Bu nedenlerle çalışmamızda yan etkilerini araştırmak maksadı ile böbrek dokusunu tercih ettik.

Oksidan ürünler ile antioksidan savunma sistemleri arasındaki ilişkinin oksidan ürünler lehine değişmesi sonucu oksidatif stres ortaya çıkar. Oksidatif stres

dokularda istenmeyen hasarlara neden olur. Antioksidanlar ise serbest radikaller için kolay bir elektron hedefi oluşturur. Serbest radikaller nötralize edilmezlerse vücutta ciddi hasarlara neden olabilirler. Yapılan literatür taramalarında, son derece güvenilir kabul edilen Gadobutrol uygulamasından sonra, kanda ve dokulardaki oksidan-antioksidanlar üzerine etkilerinin araştırıldığı bir yayına rastlanmadı.

Bizim araştırmamızda Gadobutrolü intravenöz (IV) ve intraperitoneal (IP) yöntemlerle, farklı kümülatif dozlarda uygulayarak, bu ajanın böbrek üzerinde yan etki oluşturup oluşturmadığına, kanda ve böbrek dokusunda serbest radikallerden nitrik oksit (NO), antioksidan yolakta görevli glutatyon (GSH) ve oksidatif stres göstergelerinden malondialdehit (MDA) düzeylerinde herhangi bir değişikliğe neden olup olmadığına bakılmıştır. Böylelikle oluşabilecek serbest radikal düzeylerindeki değişikliklerin, böbrek hasarı ile ilişkisi de araştırılmak istenmiştir.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. MRG Hakkında Genel Bilgiler

MRG, yumuşak doku çözümü gücü en yüksek olan radyolojik görüntüleme yöntemidir. MRG' nin multiplanar görüntüleme imkanı sağlaması, yumuşak doku çözünürlüğünün daha yüksek olması, iyonize radyasyon kullanmaması gibi üstünlükleri mevcuttur. Lezyonların değerlendirilmesinde ek bilgiler verebilir. Ayrıca kontrast madde kullanmadan bile vasküler yapılar incelenebilir. MRG'de kullanılan kontrast maddelerin yan etkileri Bilgisayarlı Tomografi (BT)'de kullanılanlardan daha azdır.

2.2. MRG'nin Tarihçesi

MRG nin fiziksel temelleri ikinci dünya savaşı zamanlarında yavaş yavaş atılmaya başlanmıştı. New York'da Colombia Üniversitesinde Isidor Isaak Rabi ve Cornelius Jacobus Gorter tarafından yapılan çalışmalar sonucunda nükleer magnetik momentin ölçülmesi mümkün olmuştur. Rabi 1938 yılında yayınladığı 'Anew Method of Measuring Nuclear Magnetic Moment' adlı makalesinde Nükleer Magnetik Rezonans (NMR) ifadesini ilk olarak kullanmıştır (6). 1946 yılında Amerika Birleşik Devletlerinde Felix Bloch ve Edward M.Purcell adlı bilim adamları, birbirlerinden bağımsız olarak, periyodik sistemdeki bazı atom çekirdeklerinin manyetik özelliklerini gözlemleyerek tanımladılar (7). Daha sonrasında pek çok araştırmacı atom fiziği konusunda yoğun olarak çalışmışlardır. 1980 yılında Hawkens, MRG'nin multiplanar görüntüleme özelliğini ortaya çıkarmıştır. Daha sonra yıllarca süren pek çok başarılı çalışma, günümüz MRG tetkikinin gelişmesinde faydalı adımlar oluşturmuştur.

Avrupa'da ilk klinik hizmete sokulan MRG cihazı, 1983 yılında Manchester Üniversitesinde kullanılırken sonrasında hızla yaygınlaşmıştır. Ülkemizde ise ilk kez 1989 yılında, İzmir'de 9. Eylül Üniversitesi Tıp Fakültesinde kullanılmaya başlanmıştır (8).

2.3. MRG Çalışma Prensipleri

MRG'de, NMR fenomeni kullanılır. Bu, kuantum teorisi ile anlaşılabilen bir fiziksel fenomendir.

Atomlar bir nükleus ve bunun çevresinde değişik yörüngelerde yer alan elektron bulutundan oluşurlar. Nükleus içerisinde ise + yüklü protonlar ve yüksüz nötronlar yer almaktadır. Proton, nötron ve elektron gibi partiküllerin spin denilen intrinsek anguler momentum taşıdığı varsayılır (kendi çevrelerinde dünya benzeri dönmeleri). Hareket eden elektrik yükü elektrik akımı oluşturur. Fiziksel olarak nerede hareketle yönü değişen bir elektrik akımı varsa, orada manyetik alan oluşmaktadır. Kendi ekseninde dönen ve + elektriksel yüke sahip protonların çevresinde bir manyetik alan oluşur. Protonlar spin hareketi yaparak dağınık bir halde bulunurlar. Bu protonlar güçlü bir manyetik alan içine konulacak olursa, manyetik alan ile iletişime girerek manyetik alan yönüne paralel ya da antiparalel bir dizilim gösterirler. Manyetik alan yönünde paralel dizilim gösteren protonların miktarı antiparalel dizilim gösterenlerden sayıca çok az bir fazlalık gösterirler. Az da olsa bu farklılık net manyetizasyon açısından önemlidir (9).

Protonların spin hareketini eğimli bir eksen ile gerçekleştirdiklerini ve bu eksen çevresinde de döndüklerini görüyoruz. Bu harekete ise presesyon (salınım) hareketi adı verilir (topaç benzeri). Dönüş hızının frekansı dış ortamdaki manyetik alanın gücüne bağlıdır.

Manyetik rezonans; manyetik momente sahip atomik nükleusların veya elektronların, eksternal manyetik alanda etkileşip karakteristik bir rezonans frekansında sinyal üretmesidir. Bu, uygulanan manyetik alan gücü ile orantılıdır.

$$\omega = \gamma B_0$$

ω : larmor frekansı (hertz veya megahertz), γ : gyromanyetik oran (birimi teslada megahertz), B_0 : uygulanan manyetik alan gücü (birimi tesla)

Manyetik momentlerin, vektörel toplamına net manyetizasyon denir (M). Bir manyetik alanda düşük enerji durumundan yüksek enerji durumuna geçen protonların sayısı, aksi taraftakilerin sayısına eşitse denge durumu söz konusudur.

Buradaki manyetizasyon M_0 , denge manyetizasyonu olarak adlandırılır. Yönü B_0 'a paraleldir, longitudinal manyetizasyon adı verilir.

Manyetik rezonans sadece B_0 'a dik transvers manyetizasyon varsa oluşabilir. Transvers manyetizasyon zamana bağlı olduğundan alıcı sarmalda Faraday kanununa göre bir akım oluşturur. Longitudinal manyetizasyon denge durumunda akım oluşturamaz. Denge durumundaki manyetizasyon, eksternal radyofrekans (RF) pulsu ile uyarıldığında enerji absorbe eder. Eski konumuna dönerken ise bu enerjiyi geri verir. Bu da alıcı sarmalda elektrik akımına neden olur. Elde edilen sinyalin amplitüdü hızla azalmaktadır. Bu olaya free induction decay (FID; serbest indüksiyon kaybı) denmektedir. Transvers manyetizasyon azalırken longitudinal manyetizasyon artmaktadır. Yayılan sinyalin yoğunluğu dokuya ve puls sekansına bağlıdır; bu da kontrastı etkiler.

Kontrastı oluşturan faktörler: proton yoğunluğu, T1 relaksasyon, T2 relaksasyon, manyetik duyarlılık, manyetizasyon transfer, difüzyon ve akım etkileridir.

Vücuttaki yüksek miktardaki varlığına bağlı olarak klinik MRG görüntüleme \Rightarrow Hidrojen ($1H^+$) çekirdek kullanılmaktadır. Her bir H^+ çekirdeği dış manyetik alana maruz kalana kadar aksisleri rastgele sıralanır. Dış manyetizasyon varlığında ise H^+ çekirdek aksisleri, bazıları paralel bazıları antiparalel olmak üzere dizilirler. Çekirdeklerin manyetik momentlerinin kümülatif etkisi net manyetizasyon vektörüdür. Radyofrekans darbesi uygulanması durumunda bu vektör, longitudinal manyetizasyon ve transvers manyetizasyon olmak üzere iki manyetik vektör oluşturacak şekilde açı yapar. Transvers manyetizasyon varsa alıcı sarmalda Faraday kanununa göre bir akım oluşturur. Bu akım MRG sinyali haline gelir. Hasta güçlü bir elektromagnet içeren silindir içerisinde yatarken, gönderilen radyofrekans dalgalarının uyardığı hücrelerdeki hidrojen atomlarının ürettiği enerji, sargı olarak adlandırılan özel arabirimler sayesinde sayılara dönüştürüldükten ve bilgisayarca işlendikten sonra görüntüye dönüştürülür.

MRG; ana magnet (manyetik alanı oluşturan birim), gradient sargılar, radyofrekans kaynağı, görüntü işlemcisi ve bilgisayar sisteminden oluşan başlıca 5 ana parçadan ibarettir (10).

2.4. Relaksasyon Zamanları

2.4.1. T1 Relaksasyon Zamanı

Dokudaki protonlarla aynı frekansta RF pulsu gönderildiğinde, bazı protonlar gönderilen bu enerjiyi alarak eksternal manyetik alana paralel hale geçer. Bu süre zarfında longitudinal manyetizasyon giderek azalarak transvers manyetizasyona döner. RF pulsu kesildiğinde ise yüksek enerjideki protonlar yüklenmiş oldukları enerjilerini geriye, sinyal şeklinde vererek başlangıç durumlarına geri dönerler. Transvers manyetizasyon hızla kaybolurken, longitudinal manyetizasyon yeniden kazanılır. İşte 90° RF pulsu verildikten sonra, eksternal manyetik alan yönündeki longitudinal manyetizasyonun, % 63' ünün yeniden kazanılması için gereken süre T1 relaksasyon zamanı olarak adlandırılır. T1 relaksasyon zamanı ana manyetik alanın gücüne ve dokuların iç yapı özelliklerine bağlı değişiklik gösterir (yağlı dokularda çok düşük olduğundan hızlı T1 süresi nedeniyle parlak görülürler) (11).

2.4.2. T2 Relaksasyon Zamanı

90° RF pulsu verildikten sonra maksimum düzeye ulaşan transvers manyetizasyonun % 37 seviyesine inmesine kadar geçen süreye T2 relaksasyon zamanı denir (11).

2.4.3. T2* Relaksasyon Zamanı

Dokuların fiziksel özelliklerinden kaynaklanan ve eksternal manyetik alanın inhomojenitelerinden kaynaklanan relaksasyona denir. T2* GE sekansındaki, transvers manyetizasyon azalışının süresini belirtir (11).

2.5. MRG Sekansları

MRG'de görüntü elde etmede temel olarak spin eko (SE), gradient eko (GE), inversion recovery (IR), saturation recovery (SR) gibi başlıca dört ana puls sekansı kullanılmaktadır. Her geçen gün yeni geliştirilen inceleme parametreleri ve sekanslar temel sekansların modifiye şekilleridir.

2.5.1. SE sekansı

SE sekansı, transvers manyetizasyonun sağlanması için 90° RF pulsu uygulanarak ve defaze spinleri yeniden faz durumuna getirmek için 90° derece pulstan yaklaşık 1-10 msn sonrasında 180° RF pulsu gönderilerek eko sinyallerinin toplandığı bir yöntemdir. 90° RF pulsları arası zaman aralığına time repetition (TR), 90° RF pulsundan maksimum eko sinyali elde edilene kadar geçen süreye Time Echo: eko sinyali dinleme süresi (TE) olarak tanımlanır. 90° RF pulsu ile 180° RF arasındaki zaman dilimi $TE/2$ 'dir. 180° RF pulsu ile maksimum eko sinyalinin alındığı nokta arası ise yine $TE/2$ kadar sürmektedir.

TR ve TE değerleri değiştirilerek görüntülerin T1, T2 ve proton ağırlıkları kontrol edilebilir. TR, görüntünün T1 ağırlığından sorumludur. TE değeri ise görüntünün T2 ağırlığından sorumludur. T2 ağırlığı doku karakterizasyonu açısından önemlidir (12).

2.5.2. GRE Sekansları

MRG görüntülemenin kısa sürede elde edilmesine yönelik GRE sekansı geliştirilmiştir. Bilindiği gibi klasik SE sekansta 90° ve arkasından verilen 180° pulslar görüntüleme süresini artırmaktadır. GRE sekansta 180° puls yerine gradient çeviriciler konulmuştur. 90° puls ise flip angle (FA) ya da vuruş açısı adı verilen ve transvers manyetizasyonu daha küçük açı değerlerinde oluşturan açılarla gerçekleştirilmektedir. Bu da tetkik süresini kısaltmaktadır (13).

2.5.3. IR Sekansları

Spin eko sekansının tersine IR sekansında 90° darbesinden önce 180° darbesi kullanılarak longitudinal manyetizasyon tersine çevrilir. 180° ve 90° darbesi arasında geçen süreye bağlı olarak sinyal elde edilir.

TI: İnversiyon zamanı 180° ve 90° darbeleri arasındaki zaman

IR görüntüsündeki sinyal intensitesi, longitudinal manyetizasyonun orijinal durumuna dönüş hızını belirleyen T1 zamanına bağlıdır.

2.5.4. SR Sekansları

Yalnızca 90° darbeleri kullandığımız ve uzun TR zamanları seçtiğimiz sekanslara saturation recovery sekansları adı verilir. Kısa TR zamanı seçilecek olursa dokuların T1 farklılıkları önem kazanır. Partiel recovery sekans adı verilir (protonlar kısmen sature oluyor).

2.6. MRG Kontrast Ajanları

MRG'de kontrast madde kullanılması ilk kez 1981 yılında denenmiştir. Berlin'de 1983 yılında, 0.35 Tesla gücündeki ilk süperkondüktif manyetli MRG cihazı ile gönüllülere 0.8 ml gibi çok düşük dozlarda gadolinyum dietilen triamin pentaasetik asit (Gd-DTPA) kullanılarak çekimler gerçekleştirilmiş ve mesane içeriğinin koyu sinyal özelliğinin parlaklaştığı, beyaza dönüştüğü izlenmiştir (14).

Sonrasında MRG'de kullanılacak kontrast maddelerle ilgili uluslararası bir klinik araştırma programı başlatılmıştır. 1988 yılında Amerika Birleşik Devletleri, Japonya ve Batı Almanya'da insanlar üzerinde kullanılması için lisans alan Gd-DTPA piyasaya sürülmüştür.

Önceleri, MRG'de kontrastsız görüntülerde mükemmel yumuşak doku kontrastı sağladığı için kontrast madde kullanımına ihtiyaç olmadığı düşünülmüş, fakat kontrast madde kullanılarak yapılan MRG uygulamalarında, ekstraaksiyal beyin tümörlerinden menenjiom ve akustik nörinomları saptamanın daha kolay olduğu izlenmiştir. Kontrast maddelerin tanıda duyarlılığı ve özgüllüğü arttırdığı saptanmıştır.

MRG kontrast ajanları, kontrastsız görüntülerde yeterli doku ayrımının yapılamadığı durumlarda tercih edilirler. Burada temel amaç, hem patolojik doku ile normal dokuların, hem de değişik karakterdeki lezyonların birbirinden ayrımının yapılmasıdır.

MRG'de doku kontrastı T1 ve T2 özelliklerinden oluşur. T1 ve T2 özellikleri dört faktörden etkilenir;

1. Manyetik alan (değiştirilemeyen)
2. TR ve TE süreleri (değiştirilebilir)

3. Komşu moleküllerin nükleer spinlere etkisi
4. Kontrast ajanlar (T1 ve T2 relaksasyon sürelerini değiştirmektedirler) (14).

Çoğu atomun son yörüngesinde tek sayıda elektron vardır. Bu atomlarda elektronlar birbirlerinin oluşturdukları manyetizmayı nötralize edemezler ve ortamda manyetik alan olmadan manyetizma oluştururlar. Atomları bu özelliği gösteren maddelere paramanyetik maddeler denir. Ortamda paramanyetik bir iyonun bulunması çevredeki protonların relaksasyon özelliklerini çok güçlü bir şekilde etkiler.

Paramanyetik maddeler, özellikle pozitif T1 relaksasyon kontrast maddeleri olarak kullanılırlar. MRG'de kullanılan kontrast maddeler, çevrelerindeki su moleküllerinin relaksasyon zamanlarını kısaltarak etki gösterirler (5,13). Bu nedenle paramanyetik kontrast maddeler diğer tüm radyografik kontrast maddelerden farklı bir mekanizma ile etki ederler.

Kontrast maddeler sinyal intensitesini arttırıyorsa pozitif, sinyal intensitesini azaltıyorsa negatif kontrast maddeler olarak adlandırılırlar. Çoğu kontrast madde hem T1 hem de T2 relaksasyon zamanlarını kısaltarak etki eder ancak bazı kontrast maddelerin bir etkisi daha baskın olabilir. Süperparamanyetik ve ferromanyetik maddeler ise net pozitif manyetik momentleri nedeniyle dokuda spinlerin defaze olmasına neden olurlar ve sinyal kaybı oluştururlar. Bu yüzden negatif kontrast maddeler olarak adlandırılırlar.

MRG'de kullanılan kontrast maddeler biyo-dağılımlarına bağlı olarak beş grupta incelenirler (5,15).

- a. Retiküloendotelyal sisteme yönelik kontrast maddeler
- b. Hepatobiliyer sisteme yönelik kontrast maddeler
- c. Kan havuzu kontrast maddeleri
- d. Oral kontrast maddeler
- e. Ekstrasellüler boşluk kontrast maddeleri

2.6.1. Retiküloendotelyal Sisteme (RES) Yönelik Kontrast Maddeler

RES'e yönelik kontrast maddeler içeriklerinde demir oksit ihtiva ederler. RES hücrelerine, hücre duvarındaki reseptörlere veya kan havuzuna yönelik olarak etki ederler (5,15). AMI-25 (Feridex, Berlex Laboratories ve Endorem, Laboratoire Guerbet) ve AMI-227 (Combidex, Advanced Magnetics, Inc.), SHU-555A (Resovist, Schering AG) örnek olarak gösterilebilir.

Süperparamanyetik olan bu maddeler, manyetik alan içinde kazandıkları yüksek manyetik moment nedeni ile güçlü lokal alan heterojenitesi yaratarak, T1 ve T2 ağırlıklı görüntülerde sinyal intensitesi kaybına neden olurlar.

RES'e yönelik kontrast maddeler öncelikle kan havuzunda dağılırlar. Bu kontrast maddeler verildikten sonra, karaciğer Kupffer hücrelerinde tutuldukları için genellikle karaciğer görüntülenmesinde kullanılır. Normal karaciğer RES'e yönelik kontrast maddelerin uygulanmasından sonra T2 ağırlıklı görüntülerde sinyal kaybına uğrarken, RES hücresi içermeyen lezyonlar (metastaz veya kötü differansiye hepatosellüler karsinom gibi) sinyal kaybına uğramaz ve daha belirgin hale gelirler. RES hücresi içeren fokal nodüler hiperplazi, hepatik adenomlar ve iyi diferansiye hepatosellüler karsinom gibi hepatosellüler tümörler, bu tür kontrast maddeleri tutarak değişik derecelerde sinyal kaybına uğrayabilirler. RES'e yönelik kontrast maddelerin kan havuzu etkilerine bağlı olarak, hemanjiyomlar da T2 ağırlıklı görüntülerde sinyal kaybına uğrayabilir (15).

Süperparamanyetik demir oksit (SPIO)'ların dalak görüntülenmesinde, benign splenomegali ile metastaz veya lenfoma gibi patolojilerin ayrımının yapılmasında faydalı olduğu bildirilmiştir. Benign splenomegalide, dalakta SPIO tutulumu izlenirken, infiltratif hastalıklarda tutulum izlenmez.

2.6.2. Hepatobilier Sisteme Yönelik Kontrast Maddeler

Hepatositler tarafından aktif olarak tutulan çeşitli şelat kompleksleridir. Örneğin: Manganez-dipiridoksildifosfat (Mn-DPDP) (Teslascan, Nycomed AS), Gadolinyum etoksibenzildietilentriaminpentaasetik asid (Gd- EOB-DTPA) (Eovist, Schering AG) ve gadolinyum benziloksiopropioniktetraasetat dimeglumin (Gd-BOPTADimeg) (MultiHance, Bracco Diagnostics).

Bütün bu maddeler karaciğer hücreleri tarafından tutularak karaciğerde uzun süren T1 kısalmasına neden olurlar. Bu nedenle lezyon ile karaciğer arasındaki kontrastın artmasına neden olurlar. Hepatosellüler sisteme yönelik kontrast maddeler karaciğerde saatler süren kontrast tutulumu sağlarlar (5).

2.6.3. Kan Havuzu Kontrast Maddeleri

Manyetik rezonans anjiyografi (MRA) günümüzde yaygın olarak uygulanmaktadır. Kan havuzu kontrast maddeleri, kan havuzunda uzun süre kalacak şekilde geliştirilmişlerdir (5, 15). Böylece MRA yapılması için uzun bir zaman periyodu sağlanmış olur.

İdeal bir kan havuzu kontrast maddesi toksik olmamalı, intravasküler boşlukta sabit konsantrasyonda uzun süre kalmalıdır. Görüntüleme için yeterli bir süre sonra biyokimyasal olarak yıkılıp, vücuttan atılabilmelidir (16). Bu ajanların çoğu gadolinyumun kan havuzu dışına çıkmasına imkan vermeyen maddelerle bileşimi ile elde edilir. Örneğin; MS-325 (MS-325, Epix Medical ve Mallinckrodt Medical Inc.), Gd-DTPA-polilizin, Gd-DTPAdekstran (Nycomed AS), Gd-DTPAkaskad- polimer (Gadomer-17, Schering AG) ve Gd-DTPA'dır.

2.6.4. Oral Kontrast Maddeler

Abdominal MRG'de gastrointestinal sistem MRG incelemelerinde değişik oral kontrast ajanlar geliştirilmiştir. Bu ajanlar T1 ve T2 ağırlıklı görüntülerde barsak lümeninin sinyal intensitesini arttırabilirler (pozitif oral kontrast maddeler), azaltabilirler (negatif oral kontrast maddeler) veya T1 ağırlıklı görüntülerde sinyal intensitesini artırırken T2 ağırlıklı görüntülerde azaltabilirler (17). T1 ağırlıklı görüntülerde sinyal intensitesini arttıran oral kontrast maddeler bu etkilerini paramanyetik özellikleri sayesinde gösterirler. Paramanyetik ajanlardan oral kontrast madde olarak kullanılan gadopentat dimeglumin (Magnevist Enteral, Schering AG) ve ferrik amonyum sitrat sayılabilir (FerriSelz, Otsuka Pharmaceuticals) (18,19).

2.6.5. Ekstrasellüler Boşluk Kontrast Maddeleri

Ekstrasellüler boşluk intravasküler ve interstisyel boşlukların toplamından oluşur. Gadolinyumlu bileşikler, IV. enjeksiyonu takiben önce pulmoner dolaşıma,

buradan da sistemik arterlere dağılırlar. Bunu takiben tüm intravasküler boşlukta dağılan ilaç hızlı bir şekilde kapillerlerden geçerek interstisyel boşluğa yayılır. Glomerüllerden süzülen kontrast madde idrar yolu ile vücuttan atılır. Ekstrasellüler boşluk kontrast maddelerinin biyo-dağılımlarına bağlı olarak arteriyel, kan havuzu ve ekstrasellüler fazlar olmak üzere üç fazda kontrast etkisi oluşturdukları kabul edilir.

Kan-beyin bariyeri ve kan-testis bariyeri, kontrast maddenin ekstrasellüler boşluğa geçmesine izin vermez. Bu nedenle bu lokalizasyonlarda interstisyel kontrast tutulumu, kan-beyin veya kan-testis bariyerinin bozulduğu inflamasyon veya neoplastik patolojilerde izlenir. Fibröz dokular hipovasküler olmalarına rağmen geniş interstisyel boşluklar içerirler bu nedenle fibröz dokular ekstrasellüler fazda iyi kontrast tutarlar. Pek çok metastaz da geniş interstisyel boşluk içermeleri nedeni ile ekstrasellüler fazda hiperintens olarak izlenir (5).

Serbest gadolinyum iyonu, intravenöz yolla verildiği zaman aşırı toksiktir. Biyo-dağılımı ve farmokinetik profili iyi değildir. Biyolojik ortamlarda MRG kontrast maddesi olarak verimliliği kötüdür (5). Bu yüzden bazı gadolinyumlu bileşikler geliştirilmiştir (Tablo1).

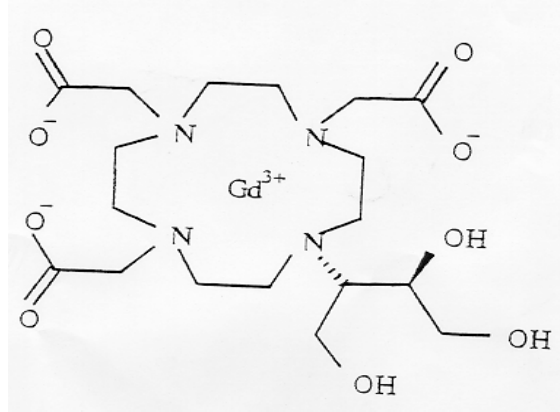
Tablo 1: Gadolinyumlu kontrast ajanlara örnekler

Jenerik İsim	Kısa İsim	Ticari İsim	Firma
Gadopentetat dimeglumin	Gd-DTPA	Magnevist	Berlex
Gadodiamide	Gd-DTPA-DMA	Omniscan	Nycomed-Amersham
Gadoteriol	Gd-HP-DO3A	ProHance	Bracco Diagnostic
Gadoversetamide	Gd-DTPA-BMEA	Optimark	Mallinckrodt
Gadoterate meglumine	Gd-DOTA	Dotarem	Guerbet
Gadobutrol	Gd-BT-DO3A	Gadovist	Shering Diagnostic

2.7. Gadobutrol İle İlgili Temel Bilgiler

Çalışmamızda kullandığımız Gadovist kontrast maddesinin formülü; Gd-BT-DO3A'dır. 1ml Gadovist 1.0 solüsyon aktif madde olarak (1.0 mmol'e eşdeğer) 604.72 mg gadobutrol içerir. 0.513 mg CaNa-butrol (Na-kalsobutrol), 1.211 mg Trometamol, ph ayarını 7.0-7.4 arasında tutmak için Hidroklorik asit 1.0 M, ve 1ml ye tamamlayacak oranda enjeksiyonluk su ile solüsyon tamamlanır.

Moleküler Formülü: C₁₈H₃₁N₄O₉Gd (Şekil 1)



Şekil 1: Gadobutrol'ün formülü (3 numaralı kaynaktan alınmıştır)

Gadobutrol, ekstrasellüler paramanyetik bir kontrast maddedir. Gadolinyum (III) ile makrosiklik ligand butrolden oluşan nötral bir komplekstir. Gadobutrol düşük konsantrasyonlarda dahi relaksasyon zamanlarında belirgin kısalmaya neden olur. Gadovist pozitif yüklü Gd^{3+} , üç tane internal karboksilat grubunun negatif yükleriyle dengelendiği için nötr bir moleküldür. Hidrofilik niteliğinden dolayı gadobutrol, proteinlere bağlanmaz, enzim inhibe etme özelliği yoktur ve sadece ekstrasellüler alanda dağılır. Kompleman sistemini aktive etmediğinden anaflaktoid reaksiyonlara yol açma potansiyeli son derece düşüktür.

İntravenöz uygulama sonrasında, Gadobutrol hücre dışı alanda hızla dağılır ve glomerüler filtrasyon ile böbreklerden değişmeden elimine edilir. Ekstrarenal eliminasyonu dikkate alınmayacak düzeydedir. Uygulamadan 2 saat içinde verilen dozun %50 si ve 12 saat içerisinde ise %90 dan fazlası idrar ile itrah olur. % 0.1 den azı feçes ile atılır. Plazma veya idrarda hiç metabolitine rastlanmamıştır.

Renal fonksiyon bozukluğu olanlarda Gadovistin serum yarılanma ömrü, azalan glomerüler filtrasyon nedeni ile uzamaktadır (20).

Gadoviste ait bazı bilgiler tablo 2 de özetlenmiştir (Tablo 2).

Tablo 2: Gadovist 1M özellikleri

Parametre		Gadovist 1.0
Viskosite	37 derecede	4.96 mPa.s
Osmolalite	37 derecede	1603 mOsm/kg H ₂ O
Partisyon sabitesi	n-oktanol/tampon ph 7.6 içinde	0.006
T1-relaksivite (r1)	(37 derecede,1.5T) plazmada	5.3 mmol-1 saniye-1
T2-relaksivite (r2)	(37 derecede,1.5T) plazmada	5.7 mmol-1 saniye-1

Genel olarak Gadovisti 0,1 mmol/kg dozda enjekte etmek tanı açısından yeterlidir. Tanı duyarlılığını artırmak için 0,3 mmol/kg olarak da kullanılmaktadır (3).

Vogler ve arkadaşlarının MRG kontrast ajanlarıyla yaptıkları karşılaştırmalı bir çalışmada ratlarda LD50 (lethal doz 50); 23 mmol/kg (20-27 mmol/kg) olduğu gösterilmiştir (21). Vogler ve arkadaşlarının yaptıkları bu çalışmada diğer MRG kontrast ajanlarıyla karşılaştırıldığında (Gadoteirol, Gadopentetate, gadodiamid); 1M. Gadobutrolün osmolalitesi ve viskozitesi daha düşüktür (21).

2.8. Kontrast Ajanlarının Yan Etkileri

Radyolojide kontrast maddeler doğru tanıya ulaşmak amacıyla tercih edilirler. Fakat bu ajanların bazı yan etkileri olabilmektedir. Kontrast maddelere karşı oluşabilecek reaksiyonlar; allerjik (anaflaktoid) ve kemotoksik olarak ayrılabilir (22, 23).

Kemotoksik reaksiyonlar kontrast maddenin veriliş yeri ve hızı, dozu, osmolalitesi, konsantrasyonu ile ilişkilidir. Kemotoksik reaksiyonlara örnek olarak; uygulama alanında ateş, ağrı, dolaşım bozukluğu, endotel hasarı, kardiyak depresyon verilebilir (22, 24).

Allerjik reaksiyonlar ise dozdan bağımsız olarak aniden ortaya çıkar. Bulantı, sıcaklık basması gibi hafif etkilerle sınırlı kalabileceği gibi, ölümcül bronkospazm, larinks ödemi ve kardiyak kollapsa kadar gidebilecek etkiler gözlenebilir.

Radyokontrast madde uygulamalarından sonra en büyük problemlerden birisi de nefropatidir. Kontrast Madde Nefropatisi (KMN), intravasküler kontrast madde kullanımını takiben gelişen ve böbrek yetersizliğine yol açabilecek diğer tüm sebeplerin dışlandığı akut böbrek yetmezliği (ABY)'dir. KMN 1999'dan beri Avrupa Ürogenital Radyoloji Derneği tarafından tanımlanmaktadır. Kontrast maddenin IV. uygulanımından sonraki 3 gün içinde serum kreatin değerinde %25 nispetinde ya da 44 $\mu\text{mol/L}$ 'lik bir artışı tanı kriteri olarak kabul edilmiştir (25). Kontrast madde nefropatisi etyopatogenezinde üzerinde durulan durumlar, renal kan akımında ortaya çıkan hemodinamik değişiklikler, böbrek hücrelerine direk toksik etkiler, yine son zamanlarda üzerinde sık durulan konulardan birisi de oksidatif strese bağlı etkiler ve kullanılan kontrast maddenin osmolalitesidir.

Bakris ve arkadaşları, kontrast maddeye bağlı nefropatide serbest oksijen radikallerinin de rolü olduğunu belirtmişlerdir (26). Yüksek konsantrasyonlarda serbest radikaller ve ürünleri, lipid peroksidasyonu, Deoksiribonükleik asit (DNA) ve protein hasarı oluşturarak hücresel elemanlarda oksidatif stres oluşturur ve zarar verirler. Aynı zamanda serbest radikaller direk sitotoksik etkiyle de nefropati oluşturabilirler (27,28).

Düşük osmolaliteli non-iyonik iyotlu kontrast maddelerin yan etki potansiyelleri yeterince düşüktür ($<850 \text{ mOsm/kg H}_2\text{O}$) (29) (insan plazma osmolalitesi $300 \text{ mOsm/kg H}_2\text{O}$). İyotlu kontrast maddelerin yan etkilerinin hiperosmolalite ile bağlantılı olduğuna inanılır. İyonik yüksek osmolar kontrast maddelerin; sinüs bradikardisi, kalp bloğu, QT ve QRS uzaması, ST segment depresyonu, dev T dalga inversiyonu, kontraktilite azalması ve malign ventriküler aritmiler gibi bazı kardiyak yan etkilerinin olduğu bildirilmiştir (29).

Kaufman ve arkadaşlarının yaptıkları bir çalışmada nefropati riski olan hastalarda gadolinyumlu ajanların kullanıldığı ve nefropati oluşmadığı saptanmıştır. Renal yetmezlikli, diyabetik, daha önceden iyotlu kontrast madde allerjisi gözlenmiş hasta gruplarında da gadolinyum dimeglumin kullanılmış, yan etki bildirilmemiştir. Buna karşın Spinoza ve arkadaşlarının yaptıkları bir çalışmada ise gadodiamid kullanımı sonrasında, renal yetmezlikli hastaların bazılarında kreatinin seviyesinde yükselme saptamışlardır (30).

Son zamanlarda, radyolojide kullanılan pek çok kontrast ajanla kıyaslandığında çok daha az yan etki profiline sahip olan MRG kontrast ajanlarının, NSF'e neden olduğu gündeme gelmeye başlamıştır.

Paramanyetik kontrast maddeler oldukça güvenlidir. Günümüze kadar 60 ml'ye kadar (0,4 mmol/kg) yapılan bolus enjeksiyonlarında yan etkiler bildirilmemiştir. Bu kadar kontrast madde kullanılsa bile bu miktar yine de BT anjiyografide kullanılan iyotlu kontrast madde miktarından daha da azdır. Ayrıca genellikle 0.1-0.3 mmol/kg dozunda kullanılmaktadır. Gadobutrol gibi yüksek konsantrasyonlu kontrast maddelerin üretilmesi ile bu miktarın daha da azalacağı belirtilmektedir (3).

İlk NSF olgusu Mart 1997'de saptandı ve 15 olguda ortaya çıkan durum tıp literatüründe "skleromiksödem-benzeri kütanöz hastalık" olarak Eylül 2000'de yayımlandı (31,32).

Bu antiteye daha sonra "nefrojenik fibrozan dermopati" (NFD) adı verildi (22, 33). Hastalarda, tipik olarak MRG kontrast ajanı aldıktan (2-75 gün sonra; ortalama 25 gün) sonra ortaya çıkan, başlangıçta ekstremitelerde hiperpigmente benekler ve plaklar, distal ekstremitelerde şişliklerle kendini gösteren ve sonraki haftalarda şiddetli deri endurasyonu ile seyreden, uyluk ve ön kolun da tutulabildiği sıkıntılı bir klinik problemdir. Deri endurasyonu ilerleyici olabilir. Şiddetli ağrıya sekonder hareket kısıtlılığı oluşabilir. Deri esnekliğinde kayıplar ve kontraktürler gelişebilir. Sonuçta ciddi fiziksel kısıtlamaya neden olabilecek fiziksel sakatlıklar oluşabilir. Bu fibrozan deri hastalığının akciğerler, karaciğer, kaslar ve kalp gibi başka organların da tutulduğu daha yaygın formu NSF olarak tanımlandı (34,35).

Cilt biyopsileri, lezyonun çıkış zamanına bağlı olarak değişkenlik göstermektedir. Hastalığın erken dönemlerinde ciltte yalnızca spindle fibroblastların sınırlı proliferasyonu ve minimal kollajen artışı izlenir. Eski lezyonlarda ise retiküler dermiste ve subdermal dokuda artmış fibroblast ve kollajen depozisyonu mevcuttur. Stromal musinde artış mevcuttur. Ciltte bol miktarda CD34+ dermal dentrositler, faktör XIIIa+ ve CD 68+ monositler ve multinükleer hücreler saptanır (36).

Ortonne ve arkadaşları NSF' li hastalarda, kontrast ajan depozitlerinin veya alerjen bir maddenin dokularda depolanabileceği ve dolaşımdaki fibrositler için

hedef olabileceğini söylemişlerdir. Aynı zamanda asidozun da predispozan bir faktör olabileceğini düşünmektedirler (36).

Kısacası NSF'nin tam nedeni bilinmemekle birlikte bir spekülasyona göre "kemik iliğinden köken alan ve dolaşımda bulunan fibrositler" deri ve çeşitli vücut bölgelerine, endotel hasarı tarafından tetiklenen bir süreç ile yönlendiriliyor olabilirler (37).

2.9. MRG Kontrast Maddelerinin Yan Etkileri İle İlgili Yapılan Çalışmalar

Gadolinium içeren MRG kontrast ajanlarının karşılaştırılması, bu ajanların *invivo* stabilitesi ve NSF in patogenezindeki potansiyel rolüne ilişkin bir çalışmada; klinik olarak kullanılan ekstrasellüler gadolinium kontrast ajanları; (Gd-DTPA (Magnevist®), Gadobutrol (Gadovist®), Gadodiamide (Omniscan®), Gado versetamide (Optimark®), Gd-BOPTA (Multihance®), Gd-DOTA (Dotarem®)) ratlarda bir subkronik toksisite çalışmasında test edilmiş, kontrast ajanlara yüksek dozda maruz kalan ratlarda, şiddetli renal disfonksiyonlu hastalardakine benzer bir durum elde edilmiştir. Deride makroskobik ve mikroskobik bulgular (fibrozis ve CD34+ hücre infiltrasyonu) sadece Gadodiamide (Omniscan®) uygulanan hayvanlarda gözlemlendi (38).

Bazı araştırmacılar, sağlıklı gönüllülerde, gadoliniumlu kontrast ajan kullanımını sonrasında yumuşak doku ve deride gadolinum saptamışlar, fakat NSF gelişen hastalarda bu birikim ortalamadan daha yüksek konsantrasyonda gösterilmiştir. Renal yetmezlikli hastalarda deri ve subkutanöz dokularda yara iyileşme yanıtını tetikleyen, yeni tanımlanan spesifik bir beyaz küre tipinin aktive edildiği ve fibrozis ile sonuçlandığı tahmin edilmektedir. Bu mekanizma Shabana ve arkadaşlarının bir çalışmasında, neden ABY'li olan hastalarda gadolinium kullanımından sonra NSF geliştiğini açıklayabilir (35).

Gadobutrol ile ilgili yapılan rat ve köpek çalışmalarında IV yolla subkronik yüksek dozlarda ilaç verilerek böbrek ağırlığında doz bağımlı bir artış ve renal proksimal tubuler epitelyumun, doz bağımlı vakualizasyonu saptanmıştır. Bir

çalışmada, ratların bir kısmına 8 haftalık bir iyileşme süreci sağlanmış, bu değişikliklerin geri dönüşlü olduğu saptanmıştır (3).

Yine literatürde değişik MRG kontrast ajanları ile uygulanan, ratlarda kontrast ajanlardan gadolinyum salınımının toksikolojik değerlendirilmesi amaçlı bir çalışmada, ratlara IV yolla 1mmol/kg tek doz şeklinde, yine IV yöntemle 1 mmol/kg haftada 2 kez 3 hafta süresince kontrast madde uygulanmış, sonuçta böbrek dokusunda herhangi bir ağırlık artışının saptanmadığı bildirilmiştir (4).

İn vivo gadolinyum salınımı, ratlarda 1 mmol/kg ilacın tek doz veya tekrarlanan IV uygulamalardan sonra karaciğer, böbrek, dalak, femur ve beyinde gadolinyum içeriği hesaplanarak, multihance, omniscan ve Gadovist için değerlendirilmiş, kan kimyasında, hematolojide ve de histopatolojide, test edilen kontrast maddelerin herhangi birisiyle görülen değişiklik olmamıştır.

Bu deneysel koşullar altında bulunan rezidüel gadolinyum sıralaması; GdAc> Omniscan> Gadovist> Multihance olarak değerlendirilmiştir. Bu çalışma ile kontrast maddeyi oluşturan moleküllerin klinik kullanımının güvenilir olduğu gösterilmiştir. Fakat bir derecede toksisitesi de mevcuttur (4).

MRG kontrast ajanı olarak kullanılan paramanyetik gadolinyum komplekslerinin toksisitesini açıklamada saptanan mekanizmalardan biri kompleksin metabolize olması ve kompleksin invivo ayrımıdır (serbest ligandlara ve metale ayrışması). Hem serbest ligandlar hem de metaller, kompleksin kendisinden yaklaşık 20 kat daha toksiktir. Bu serbest ligandlar fizyolojik pozitif iyonların bir şelatörü olarak rol oynarlar (Ca, Zn). Bununla birlikte yeni şekillendirilmiş kompleksler üriner sistemden atılır. Ve metaller tipik olarak dokularda birikir.

Paramanyetik komplekslerden Gd. salınımını daha iyi taklit eden Gadolinyum asetat iyi bir transmetallation örneğidir. Yapılan çalışmada 5 adet rat grubu (saline, GdAc, Multihance, Gadovist uygulanan gruplar) oluşturulmuş, bu gruptaki hayvanlara tek doz enjeksiyon uygulandıktan 24 saat sonra kesilmişler. Diğer 5 rat grubuna ise ardışık 3 hafta, haftada 2 kez enjeksiyon yapılmış, son enjeksiyondan 2 gün sonra kesilmişler. Test edilen hayvanlarda, üriner parametrelerde, hematolojik olarak tek ve tekrarlayan dozlarda herhangi bir değişiklik saptanmamıştır. Histopatolojik incelemede organ ağırlıklarında ve

makroskopik incelemelerde herhangi bir değişiklik saptanmamıştır. Mikroskopik olarak dalak beyaz pulpasında periarteriyolar lenfatik sheaths (PALS) lenfosit depopulasyonu saptanmıştır. Bu çalışmada kullanılan kontrast ajanların termodinamik olarak fizyolojik koşullarda stabil oldukları, insanlarda ve hayvanlarda metabolize olmadıkları izlenmiştir. Çalışmada tanı amaçlı tavsiye edilen dozdan 10 kat daha fazla dozda olsa dahi, paramanyetik kontrast ajanların tek doz enjeksiyonundan sonra, Gd açığa çıkmasının mümkün olmadığı gösterilmiştir. Bu çalışmada kullanılan kontrast maddelerden hiçbiri tek kullanımda veya tekrarlayan uygulamalar sonrasında (3 hafta boyunca haftada 2 kez) herhangi bir organda enjekte edilen dozun % 0.5 inden daha yüksek Gd. seviyesine neden olmadığı gözlenmiştir (4).

Yapılan bir çalışmada ratlarda Gadobutrol'ün uzun dönem eliminasyonu ve biyodağılımını araştırdıkları bir çalışmada IP uygulanan Gadobutrolün %90'dan fazlasının böbreklerden 2 saat içerisinde atıldığı, % 100 ü de 7 gün içerisinde atıldığı saptanmıştır (20).

2.10. Oksidan - Antioksidan Sistem

2.10.1. Serbest Radikaller

Atomlar, nötron ve protondan oluşan bir çekirdek ve bu çekirdeğin çevresinde dönen elektronlardan oluşurlar. Elektron çiftleri kararlı yapıdadırlar. İnsan vücudunun neredeyse tüm elektronları elektron çifti halinde bulunur. Bir bağ koştuğunda elektronlar ya birlikte kalır (ikisi de bir atoma katılır; oluşan atom iyon olur) ya da ayrılırlar (serbest radikaller oluşur). Serbest radikaller bir veya daha fazla eşleşmemiş elektrona sahip, kısa ömürlü, kararsız, molekül ağırlığı düşük ve çok etkin moleküller olarak tanımlanır (39). Eşleşmemiş elektronlar yüksek enerjili olup eşleşmiş elektronları ayırarak işlerine engel olurlar.

Serbest radikaller zararlı etkilerinin yanında vücut için gerekli birçok fonksiyonun gerçekleşmesinde de rol oynarlar. Örneğin; hücre sinyallerinde rol oynarlar (40,41). Mitokondride aerobik solunumda kullanılan oksijenin % 2-5 'si biyokimyasal tepkimelerde kullanılabilmesi için serbest oksijen radikallerine dönüştürülür. Steroit yapıdaki bazı bileşiklerin üretimi, eikozanoidler gibi

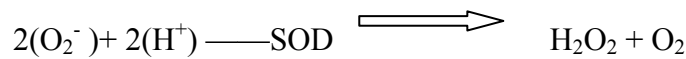
moleküllerin sentezi, ksenobiyotiklerin detoksifikasyonu, çok sayıda oksidaz ve hidroksilaz enzimlerinin etkileri ve sitotoksik etkilere sahip hücrelerin fonksiyonları için serbest radikal yapımı şarttır (41).

Mikroorganizmalara karşı savunmada fagositik lökositler, biyolojik hedefleri yok etmek için serbest radikal oluştururlar. Serbest radikaller savunma mekanizmalarının kapasitesini aşarlarsa hücrelerdeki lipid, protein, DNA, karbonhidrat ve enzim gibi önemli bileşenlerde hasara neden olurlar. Serbest radikaller, aynı zamanda kalsiyum metabolizmasına etki ederek hücre içi serbest kalsiyumun kontrolsüz yükselmesine ve dolayısıyla hücrenin zarar görmesine ya da ölmesine sebep olmaktadır (42).

2.10.1.1. Reaktif Oksijen ve Nitrojen Türleri

2.10.1.1.1. Süperoksit Radikali (O_2^-)

Moleküler oksijenin indirgeyici ajandan bir elektron alması sonucu süperoksit radikali (O_2^-) oluşur. Hücre içinde enerji metabolizmasında, ya da oksidazlar gibi bazı enzimlerin aktivitesi sonucu oluşurlar. Çok reaktif bir serbest radikal değildir. Süperoksit radikali sulu çözeltilerde H_2O_2 (hidrojen peroksit) oluşturmaktadır. Süperoksitlerden biri elektronlarını diğerine verir, böylelikle birinci süperoksit, O_2 'e okside olurken ikinci süperoksit, H_2O_2 'ye redükte olur. Bu reaksiyon dismutasyon olarak adlandırılır (43,44).



Süperoksit radikali vasküler fonksiyonların düzenlenmesinde, nötrofillerin bakterisidal aktivitesi sırasında, inflamasyonda yararlı etkilere sahiptir.

Azalmış süperoksit düzeyleri bakteriyel enfeksiyonlara artmış bir yatkınlığa yol açabilir. Artmış süperoksit düzeyleri ise süperoksit dismutaz (SOD) enzimiyle H_2O_2 ve oksijene dönüştürülerek azaltılır. Kısacası hücrel süperoksit düzeyleri sıkı kontrol altındadır (45, 46, 47).

2.10.1.1.2. Hidrojen Peroksit (H_2O_2)

Hidrojen peroksit, mikrozom, mitokondri ve fagositik hücrelerde oksijenin enzimatik olarak iki elektron indirgenmesiyle veya süperoksitlerin dismutasyonu

tepkimleri sonucunda oluşur. Hidrojen peroksit, dokularda bulunan katalaz, peroksidaz ve glutatyon peroksidaz (GPx) gibi enzimlerle su ve oksijen gibi daha zayıf etkili ürünlere dönüştürülerek etkisiz kılınır (46).

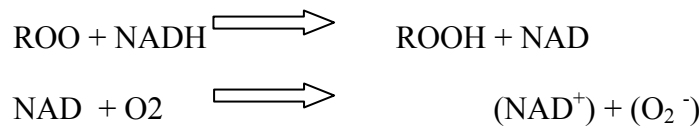
2.10.1.1.3. Hidroksil Radikali (OH[•])

(OH[•]) radikali, ortamda rastladığı her molekül ile tepkimeye girer. Bu durum (OH[•])'in eşlenmemiş elektron içeren dış orbitaline elektron alma ilgisinden kaynaklanır.

Hidroksil radikalının sebep olduğu en önemli hasar, lipit peroksidasyonudur. (OH[•])'in başlıca hedefi hücre zarındaki yağ asididir. Zar lipitlerinin peroksidasyonu sonucunda zarın yapısını bozar ve geçirgenliğini artırarak hücre ölümüne sebep olabilir (45). Aminoasitleri schiff bazı oluşturmak üzere oksitler. DNA'daki pürin ve pirimidin bazlarında kimyasal değişikliklere ve kırılmalara neden olur.

2.10.1.1.4. Peroksil (ROO[•]) ve Alkoksil (RO[•]) Radikalleri

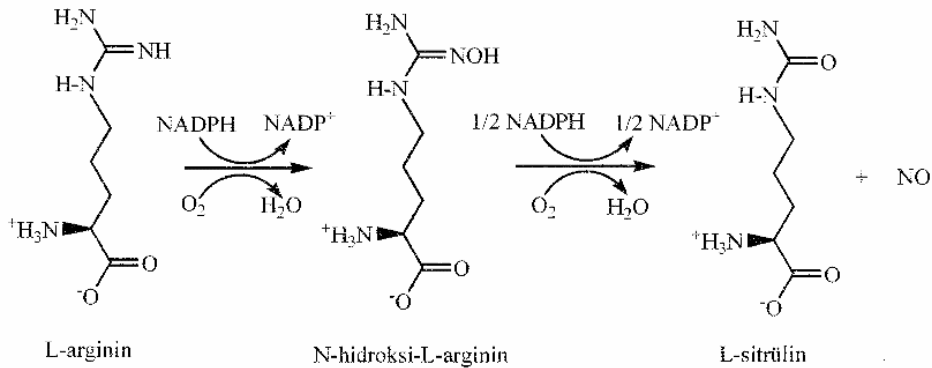
Lipit, nükleik asit, karbonhidrat, protein gibi biyolojik moleküllerin, hidroksil grubu ile reaksiyona girmesi sonucunda oluşan karbonlu radikaller hızlı bir şekilde O₂ ile reaksiyona girerek peroksil radikalini (ROO[•]) oluşturur. Peroksil radikalleri de askorbat ve NADH'ı okside etmekte; oksijen varlığında NADH'ın oksidasyonu ise süperoksit oluşumuna yol açmaktadır (45).



2.10.1.1.5. Nitrik Oksit (NO)

Aktive olmuş makrofajlardan NO salınır (48). NO'in birçok biyolojik olayla yakından ilişkili olduğu belirlenmiştir. NO; hem suda hem de yağda çözünebilen, nitrit (NO₂⁻) ve nitrata (NO₃⁻) oksitlenebilen renksiz, stabil bir gazdır. Lipofilik özelliğinden dolayı hücreler arasında kolaylıkla difüze olabilmektedir. Nitrojenin yedi ve oksijenin sekiz elektronunun etkileşimi ile oluşmuş yüksüz NO molekülü, ortaklanmamış bir adet elektron taşır. Bunun sonucunda NO molekülü, paramanyetik özellikli, yüksek reaktiviteye sahip bir radikaldir. NO çeşitli enzimler tarafından

farklı dokularda NADPH varlığında L-argininden sentezlenir (Şekil 2). Olay nitrik oksit sentetaz (NOS) tarafından gerçekleştirilir.



Şekil 2: Nitrik Oksit sentezi

NOS kaynak aldığı dokuya göre farklı isimler alır; Endotelyumda; eNOS, santral sinir sisteminde; nNOS, makrofajlar tarafından indüklenen ise iNOS adını alır(39).

Kan damarlarında; asetilkolin aracılığıyla endotel hücrelerindeki muskarinik reseptörlerden Ca⁺² oluşturmak üzere fosfoinositit siklüsü aktiflenir. Oluşan Ca⁺² NOS'u aktive eder. NOS nörotransmisyon ve vazodilatasyon oluşturur (48).

Nitrik oksit, serbest ya da bağlı geçiş metalleriyle veya oksijen içeren bazı radikallerle hızla reaksiyona girmektedir.

Mitokondriyal NO; sinyal sisteminde, hücre farklılaşması ve hücre büyümesinde ve apoptoziste rol oynar (49).

NO radikali, süperoksit ile bağlanarak yüksek aktiviteli ve yarılanma ömrü uzun, çok daha sitotoksik olan peroksinitrit oksidanını oluşturur. Peroksinitrit, nitrik oksitten daha az stabil ve daha kısa ömürlü olup bir seri mekanizma ile DNA hasarına neden olmaktadır (44).

2.10.2. Oksidatif Stres

Oksidatif stres basit bir şekilde, serbest radikal üretimi ve vücudun antioksidan savunması arasındaki dengesizlik olarak tanımlanabilir (50). Eğer serbest radikaller nötralize edilmezlerse vücutta ciddi hasarlara neden olabilirler. Vücutta oluşan oksidatif stres sonucunda, artış gösteren serbest radikaller, hücre membranı

proteinlerini yıkmak, membran lipid ve proteinlerini yok ederek hücre fonksiyonunu engellemek, nukleus membranını bozarak nukleustaki genetik materyale etki edip DNA'yı kırılma ve mutasyonlara açık hale getirmek, bağışıklık sistemindeki hücreleri yok ederek bağışıklık sistemini zorlamak sureti ile organizmaya zarar verirler.

2.10.3. Hücresel Hasar

2.10.3.1. Proteinlerin Etkilenimi

Oksidatif strese bağlı olarak oluşan protein oksidasyonu; öncelikle proteinlerin fizikokimyasal karakteristiklerinin ve sonra da fonksiyonlarının bozulmalarına yol açabilir. Proteinlerdeki oksidatif hasar; reseptörleri, enzimleri, sinyal iletim yollarını etkiler. Normal dokudaki artmış oksidatif protein ürünlerinin, hücre yaşlanmasında oksiradikal aracılı hasarın göstergesi olduğu kabul edilir (44).

2.10.3.2. DNA Hasarı

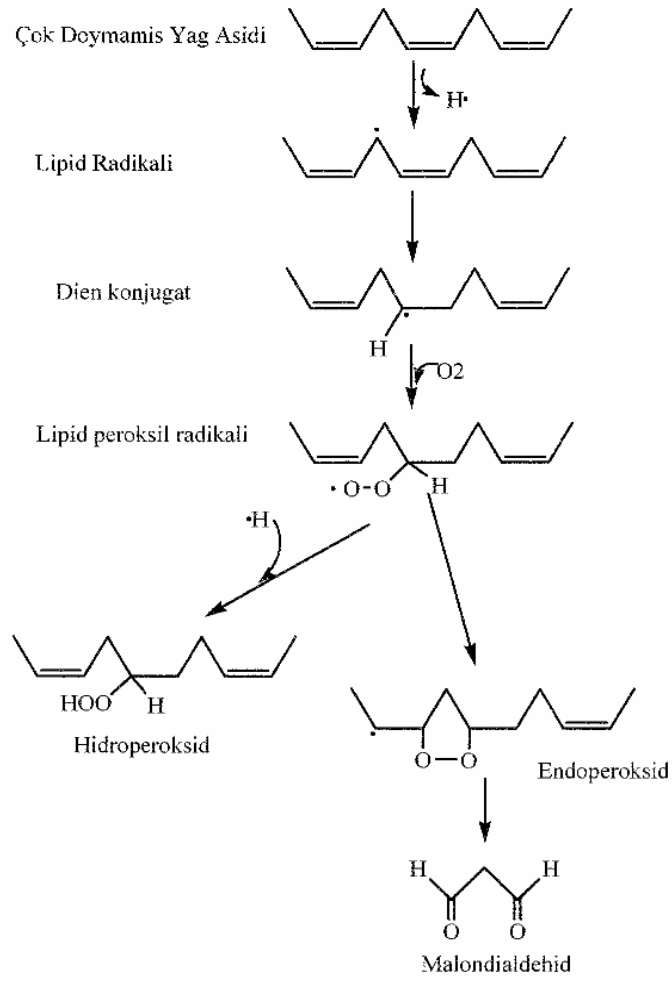
Serbest radikaller nükleik asit baz modifikasyonları yaparak, nokta mutasyonlarına ve DNA zincir kırıklarına neden olabilir. Serbest radikal etkisiyle DNA'nın yapısının değişmesi mutasyonlara ve hatta canlının eşey hücrelerindeki mutasyona bağlı olarak döllerin ölmesine neden olur (44).

2.10.3.3. Karbonhidrat Hasarı

Monosakkaritlerin vücutta oksidasyonu sonucunda Hidrojen peroksit, peroksitler ve okzoaldehitler meydana gelir. İnflamatuar eklem hastalıklarında; bağ dokunun önemli bir mukopolisakkariti olan hiyaluronik asidin, sinovial sıvıda artmış olan H_2O_2 ve O_2^- ile parçalandığı gösterilmiştir (44).

2.10.3.4. Lipit Peroksidasyonu

Lipid peroksidasyonu (LPO), serbest radikaller tarafından başlatılan ve zarların yapısındaki doymamış yağ asitlerinin oksidasyonuna neden olan kimyasal bir olay olarak tanımlanmaktadır (43). Lipid peroksidasyonun en önemli ürünü olan malondialdehid (MDA) üç ya da daha fazla çift bağ içeren yağ asitlerinin peroksidasyonu sonucunda meydana gelir (şekil 3).



Şekil 3: Lipit peroksidasyonu ve MDA oluşumu.

Oluşan MDA, hücre membranlarındaki bileşiklerin çapraz bağlanmasına yol açar. İyon geçirgenliğinde bozulma ve enzim aktivitesinin değişimi gibi olumsuz sonuçlara neden olur. MDA, DNA'nın nitrojen bazları ile reaksiyona girebileceğinden mutajenik, hücre kültürleri için genotoksik ve karsinojeniktir (39,43,44). Serbest radikaller, hücre membranının stabilizasyonunu ortadan kaldırarak, hücre ve dokuda tahribata neden olurlar. Lipit peroksidasyonu tepkimelerinde ilk basamak, serbest radikallerin poliansature yağ asidi zincirindeki metilen gruplarından bir hidrojen uzaklaştırması ile başlar. Böylece yağ asidi zinciri radikal niteliği kazanır. Oluşan lipit radikali, dayanıksız bir bileşik olup bir dizi değişikliğe uğramaktadır. Öncelikle molekül içi çift bağ aktarılması ile dien konjugatları olur, sonra lipit radikallerinin moleküler oksijen ile reaksiyona girmesi sonucu lipit peroksit radikali oluşur. Bu lipit peroksit radikali de zar yapısındaki

diğer bir poliansature yağ asidini etkileyerek yeni lipit radikallerini oluşturur. Kendisi de açığa çıkan hidrojen atomlarını alarak lipit hidroperoksitlerine dönüşür. Lipit peroksidasyonu, lipit hidroperoksitlerinin aldehit (MDA: Malondialdehit) ve diğer karbonil bileşiklerine dönüşmesiyle sona ermektedir.

2.10.4. Serbest Radikallere Bağlı Hastalıklar

Serbest radikaller, fazla üretildiğinde vücuttaki bazı yerlerde hasara neden olarak hastalıklara yol açar. Serbest radikal reaksiyonlarının neden olduğu hastalıklarda son zamanlarda giderek bir artış olmaktadır.

1. Genetiğe bağlı (Fanconi's anemia, bloom syndrome)
2. Çevresel bileşenler (iş hastalıkları, zehirlenme, virus ve bakteriyel enfeksiyon)
3. Hem genetik hem de çevresel (bronşial astım, diabetes mellitus, kanser, kardiovasküler hastalıklar olarak gruplanabilirler (44)).

Serbest radikaller; kanser oluşumunda, diyabette, inflamatuvar hastalıklarda, nöro-dejeneratif hastalıklarda ve yaşlanmanın etyopatogenezinde rol almaktadır (39).

2.10.5. Korunma ve Regülasyon

Serbest radikallerdeki aşırı yüklenmenin vücut için tehlike oluşturduğu şüphesizdir. Ancak vücudun işlevlerini görebilmesi ve hastalıklardan korunabilmesi için de gereklidirler. Serbest radikaller vücutta çok hassas bir dengeyle kontrol edilmektedirler: Oluşan bu toksik ürünler, antioksidan defans mekanizmalarıyla bertaraf edilirler (39). Canlı hücrelerde bulunan protein, lipit, karbonhidrat ve DNA gibi oksitlenebilecek maddelerin oksidasyonunu önleyen veya geciktirebilen maddelere antioksidanlar ve bu mekanizmaya ise antioksidan savunma denir. Antioksidan mekanizmalar enzimatik ve enzimatik olmayan yollardan oluşur (45).

2.10.6. Hücre İçi Antioksidanlar ve Hücre Dışı Sıvılardaki Antioksidanlar

Hücre içi antioksidanlar enzimatik ve nonenzimatik olarak ayrılırlar (tablo3)

Tablo 3: Hücre içi antioksidan ajanlar

Enzimatik olanlar	Non enzimatik olanlar
Süperoksit dismutaz (SOD),	E vitamini
Katalaz (CAT)	C vitamini
Glutasyon peroksidaz (GPx)	
Glutasyon redüktaz	

Hücre içinde SOD, CAT, GPx, Gluatyon Redüktaz, enzimatik antioksidan olarak görev yaparlar. Non enzimatik antioksidanlar ise daha çok vitaminler sınıfındadırlar (51,52). Bilim adamları pek çok doğal maddenin antioksidan ajan olarak görev aldıklarını ispatlamaktadırlar (N-asetil sistein, melatonin, askorbik asit CAPE gibi) (53).

Hücre Dışı Sıvılardaki Antioksidanlar

Ekstrasellüler sıvılarda, enzimatik antioksidan sistemin aktivitesi sınırlıdır (54). Daha çok E vitamini, C vitamini, transferrin, serüloplazmin, karoten, albumin, bilirubin gibi maddeler rol oynamaktadır.

Antioksidan savunma öncelikle, enzimatik olarak yapılmaktadır.

Antioksidanlar dört farklı mekanizma ile oksidanları etkisizleştirirler:

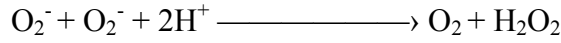
1. Scavenging (temizleme) etkisi: Oksidanları zayıf bir moleküle çevirme (bu etki enzimler tarafından gerçekleştirilir).
2. Quencher (baskılama) etkisi: Oksidanlara bir hidrojen aktararak etkisiz hale getirme (vitaminler ve flavinoitler tarafından gerçekleştirilir).
3. Onarma etkisi
4. Zincir koparma etkisi: Oksidanları bağlayarak fonksiyonlarını engelleme (hemoglobin, seruloplazmin ve E vitamini tarafından yapılır) (54,55).

2.10.7. Enzimatik Antioksidanlar

2.10.7.1. Süperoksit Dismutaz (SOD)

Hücre içinde mitokondride bulunan bir enzimdir. Son derece etkin olarak hücre hasarına yol açan süperoksit grubu, bakırlı bir enzim olan SOD aracılığıyla H_2O_2 ve oksijene çevrilir. Daha az toksik bir yapıya sahip olan H_2O_2 , dokularda bulunan katalaz, peroksidaz ve glutatyon peroksidaz gibi enzimlerle su ve oksijen gibi daha zayıf etkili ürünlere dönüştürülerek etkisizleştirilir. (39,44),

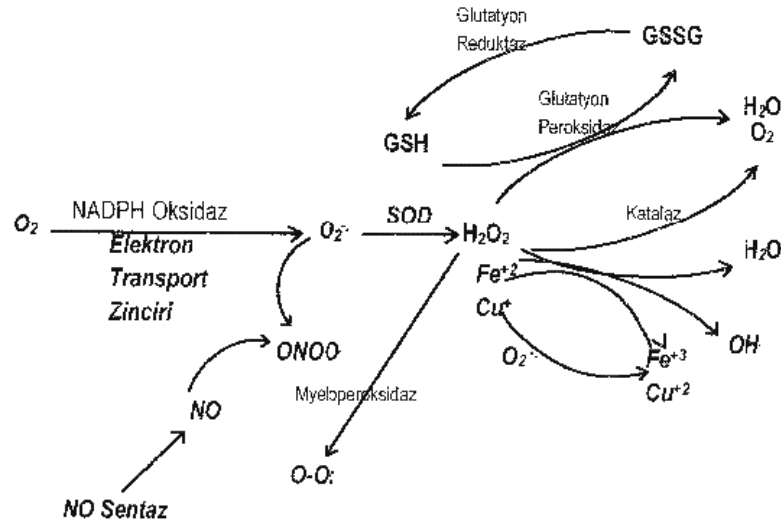
SOD



Süperoksit gruplarının hızlı bir şekilde oluşturduğu singlet oksijen, hücre zarlarındaki fosfolipid, glikolipid, gliserid ve sterol yapısındaki doymamış yağ asitleriyle reaksiyona girerek çeşitli lipid peroksidasyon ürünlerini oluşturur. Bunlar; peroksitler, alkoller, aldehitler, hidroksi yağ asitleri, etan ve pentan gibi maddelerdir.

2.10.7.2. Glutatyon Peroksidaz (GPx)

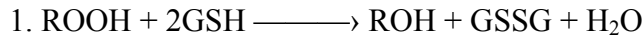
Redükte glutatyonun (GSH) -SH grubundan, su oluşturmak için hidroksil radikali ya da hidrojen peroksitle birleşmek üzere hidrojen çıkartmasını sağlar (Şekil 4).



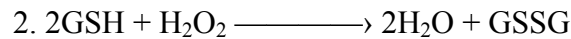
Şekil 4: Serbest radikallerin oluşumu ve enzimatik detoksifikasyonu

Glutasyon sisteminin ilk enzimi olan GS-peroksidaz (indirgenmiş glutatyona (GSH) bağımlı selenyumlu bir enzim), lipid peroksitlerini daha az toksik yağ asitlerine indirger, bunu yaparken de GSH'ü kofaktör olarak kullanır (44, 45)

GPx



GPx



Üç peptidli glutasyonu (GSH) oksidize eder (GSSG). İnsan dokuları majör peroksit uzaklaştırıcı enzim olarak GPx içermektedir. Ayrıca GPx lipoksijenaz ve siklooksijenaz yollarında değişiklik yapmak suretiyle tümör oluşumuna yol açabilir. Endoplazmik retikulumdan salınan H_2O_2 'nin dekompozisyonundan primer olarak GPx sorumludur.

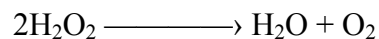
Katalaz ve SOD başlıca membranın hidrofilik bölgelerinde etki gösterir. Glutasyon peroksidaz hidrofobik membran komponentlerinde lipid peroksidasyonuna karşı koruyucu etki yapmaktadır. Dolayısıyla glutasyon peroksidaz, katalaz ve SOD'un kombine bulunduğu durumlarda hücre bütünlüğü daha etkili korunur. E vitamini yetersizliğinde membranı peroksidasyona karşı GPx korur. Eritrositlerde en kuvvetli antioksidan GPx'dir.

Lipid hidroperoksitlerin yıkımı ile oluşan aldehidler biyolojik olarak aktiftirler. Hücre düzeyinde metabolize olabilirler veya başlangıçtaki etki alanlarına diffüze olarak hücrenin diğer kesimlerine de hasarı yayarak sekonder bozuklukların da göstergesi olabilirler.

2.10.7.3. Katalaz (CAT)

Hücre içi peroksizomlarda bulunur. Hidrojen peroksiti suya ayrıştırarak hidroksil radikallerinin oluşumunu önler. Yapısında Fe^{+3} bulunduran dört hem grubundan oluşmuş bir hemoproteindir.

CAT



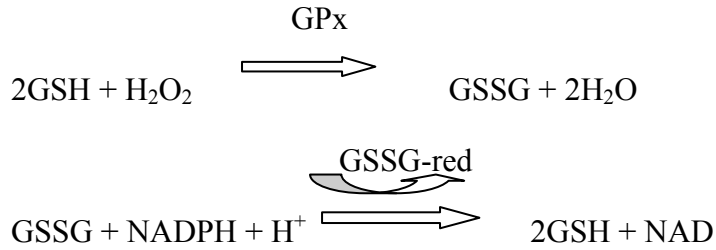
Kanserli dokularda katalaz sağlıklı dokulara göre daha yüksek bulunmuştur. Bu durumun, tümör hücrelerinde enzim ekspresyonundaki artıştan kaynaklandığı düşünülmektedir (45).

2.10.8. Non-Enzimatik Antioksidanlar

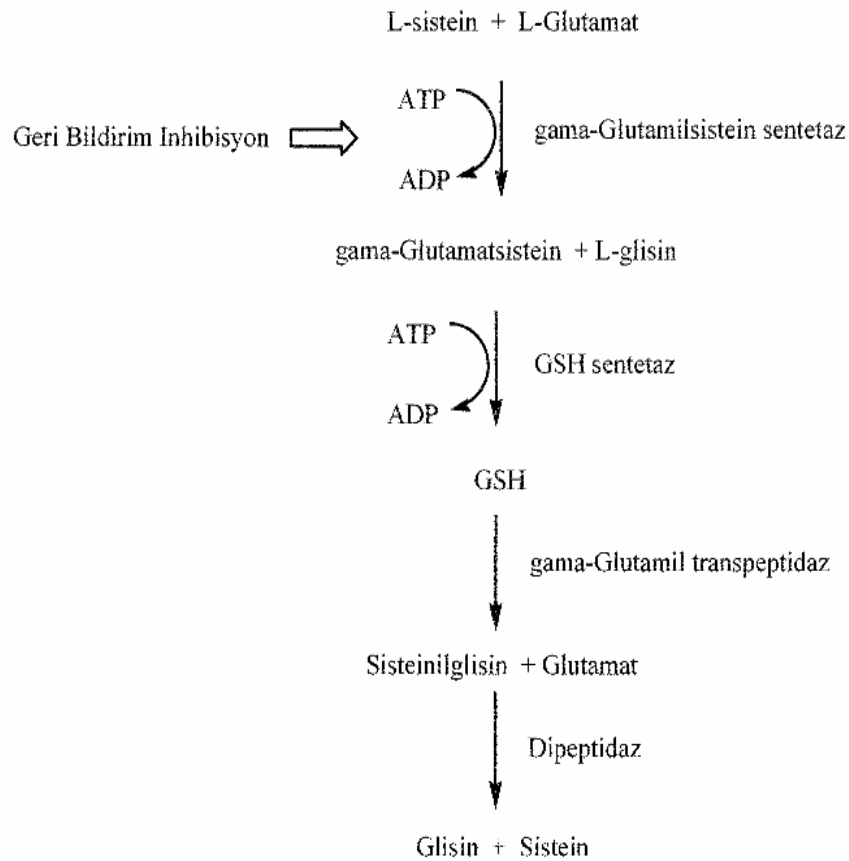
2.10.8.1. Glutasyon (GSH)

Glutasyon hücrelerde en çok bulunan protein dışı endojen tioldür. Doku GSH'ı yeterince tiol içeren aminoasitlerin varlığında, yeterli enzim varlığında sentezlenir (56). GSH *invivo* sentezlenebildiği için ve ince bağırsaktan kısmen emilebildiği için; endojen ve eksojen bir antioksidandır. Glutasyon, GSH-transferaz ve peroksidazlar için bir substrattır. Ksenobiyotik ve reaktif oksijen türlerinin detoksifikasyonuna katılır. Ayrıca, antioksidan etkili C ve E vitaminleri üzerinde orta düzeyde koruyucu etkiye sahiptir (57).

Glutasyon peroksidazlar (GPx) GSH'ın GSSG'ye oksitlenme reaksiyonunu katalizler. GSH ile GSSG arasındaki sürekli dengenin korunabilmesi için glutasyonun oksitlenmiş formu (GSSG) glutasyon redüktaz (GSSG-red) enzimi ile GSH'a indirgenir ve kofaktör olarak NADPH kullanılır (58).



Glutasyon; glutamat, sistein ve glisinden sentezlenir (Şekil 5).



Şekil 5: Glutasyon sentezi

GSH eksikliği hücre ölümüne yol açar. Karaciğer biri sitozolik, diğeri mitokondriyal iki GSH havuzuna sahiptir. Sitozolik olanının yarı ömrü 2-4 saat, ikincisinin yarı ömrü 30 saattir. Ökaryot hücrelerdeki GSH'nin %90'ı sitozolde, %10'u mitokondride, çok azı da endoplazmik retikulumda bulunur (59).

GSH, DNA hasarlarını önleme ve onarmada, metabolik fonksiyonlarda oluşan zehirli maddelerin inaktif hale dönüştürülmesinde ve serbest radikal hasarlarının önlenmesinde görev yapmaktadır (59).

2.10.8.2. C Vitamini (Askorbik Asit)

Askorbik asit suda eriyen bir vitamin olup sulu ortamlarda serbest radikallerle reaksiyona girebilir. Moleküler oksijen, nitrat, sitokrom a ve c bileşiklerinin indirgenmesini sağlayabilir. Plazmadaki antioksidan defansın ilk basamağıdır. Ateroskleroza karşı korunmada, LDL (low dansiteli lipoprotein) kolesterolün oksidasyonunu önleyerek etkin olur. Kollojen sentezinde, tirozin

yıkımında, epinefrin sentezinde, safra oluşumunda ve pek çok hidroksilasyon reaksiyonunda indirgeyici ajan olarak görev alır. Süperoksit ve hidroksil radikalleriyle reaksiyona girerek onları temizleyen bir antioksidandır (59,60).

2.10.8.3. E Vitamini

E vitamini yağda çözünen vitamindir. Bu nedenle çoğunlukla hücre membranında ve lipoproteinlerde bulunur. Membranlarda oksijen radikallerinin ana temizleyicisidir. Alfa, beta, gama, delta, gibi çeşitli formlarda bulunmaktadır. Bunlar içerisinde (α) - tokoferol en çok bulunan, en yüksek antioksidan aktiviteye sahip olan ve en aktif formdur (44). Zincir kırıcı antioksidan olarak fonksiyon görür. Eğer görevini yapmazsa serbest radikaller membran, DNA ve diğer hücre komponentlerini etkiler. α - tokoferol normal reproduksiyon, kas işlevleri ve pek çok diğer vücut fonksiyonu için gereklidir. Şu sıralar E vitamininin kalp hastalıklarını azalttığı oldukça kuvvetli bir görüş oluşturmuştur (44).

2.10.8.4. Karotenoitler

Karotenoitler, konjuge çift bağ açısından oldukça zengin olup teorik olarak düzenli mono ve poli cis izomerleri oluşturabilmektedirler (61). Karotenoitler triplet molekülleri ve singlet oksijeni süpürerek, serbest radikalleri inhibe ederler. Likopen doğal olarak bulunan karotenoitlerden bir tanesi olup yüksek derecede antioksidan etkisi yönünden son zamanlarda yapılan çalışmalarda dikkatleri üzerine çekmektedir(62).

2.10.8.5. Ürik Asit

Ürik asit insanlarda pürin katabolizmasının son ürünüdür. Ksantin oksidaz enzimiyle hipoksantin ve ksantinden oluşur. Suda çözünen bir antioksidan olup normal düzeylerde toksik reaktanları temizlediği ve oksidatif strese karşı koyucu olduğu rapor edilmektedir (60)

2.10.8.6. A Vitamini

A vitaminleri görme, üreme, büyüme ve epitel dokusunun sağlamlığı için gerekli olan bir maddedir. Retinoik asit diyetdeki retinolün oksidasyonu sonucu

oluşur. α -tokoferolle karşılaştırıldığında oldukça zayıf bir antioksidandır. İnsan LDL'sinde α -tokoferol'ün 1/20'si oranında bulunur ve α -tokoferol bittikten sonra kullanılır (60).

2.10.8.7. Seruloplazmin

Seruloplazmin, plazmada bakır taşır. Demir metabolizmasında da rol oynar. Demir iyonuna bağlı lipit peroksidasyonunu inhibe eder. Seruloplazminin antioksidan aktivitesi: ferooksidaz aktivitesi, askorbat oksidaz aktivitesi, oksijen radikali temizleyici aktivitesi ve GSH-bağımlı peroksidaz aktivitesi şeklinde dört yolla olur (63).

2.10.8.8. Transferrin

Süperoksit radikali ve hidrojen peroksit, serbest demir ve bakır iyonu varlığında hidroksil radikali gibi daha tehlikeli radikallere dönüşebilir. Hücre dışı ortamda en önemli antioksidan savunma aracı demir ve bakır iyonlarının bağlı duruma getirilmesi olmalıdır. Transferrin bu olayı gerçekleştirerek lipit peroksidasyonuna engel olur (63).

3. MATERYAL - METOD

3.1. Deneye Hazırlık

Çalışma için Süleyman Demirel Üniversitesi Tıp Fakültesi Etik Kurul onayı alındıktan sonra yaklaşık olarak benzer yaşlarda (9 hafta±1 hafta), Wistar albino cinsi, 80 erkek rat (ortalama ağırlıkları 240±25 gr) çalışmaya dahil edilmiştir. Ratlar; GRUP 1; (kontrol); IP yolla 3 hafta, haftada 2 kez salin verilecek 12 rat
GRUP 2; IP yolla 3 hafta, haftada 2 kez Gadovist verilecek 12 rat
GRUP 3; (kontrol) IV yolla 3 hafta, haftada 2 kez salin verilecek 16 rat
GRUP 4; IV yolla 3 hafta, haftada 2 kez Gadovist verilecek 16 rat
GRUP 5; (kontrol) IP yolla 4 hafta, haftada 5 kez salin verilecek 12 rat
GRUP 6; IP olarak 4 hafta, haftada 5 kez Gadovist verilecek 12 rat olacak şekilde gruplara ayrıldı.

Deney öncesi bir hafta boyunca sıçanların ortama adaptasyonu için 24°-26°C oda ısısında, %55-60 nemli ortamda ve 12 saat gün ışığı / 12 saat karanlık siklusunda serbest beslenme ve yaşam koşulları sağlandı.

3.2. Anestezi

Deney sırasında gerekli durumlarda uygulanan anestezi Ketamin Hidroklorid (Ketalar, Eczacıbaşı, İstanbul, Türkiye) ile 50 mg/kg dozunda IP yolla sağlanmıştır.

3.3. Başlangıçta MRG Tetkiki

Ratların adaptasyon sürecinden sonra baş coili kullanılarak, anestezi altında T1 ağırlıklı coronal imajları elde edilmiştir. Görüntüler SDÜ Tıp Fakültesi Radyoloji Anabilim Dalında 0,2 Tesla açık MRG ünitesinde (GE signa profile 0.2 T) alınmıştır.

3.4. Enjeksiyon İşlemleri

Yapılan ilk MRG tetkikinden 24 saat sonra ratların kuyruk lateral veninden, ılık suya batırılmış pamukla bir miktar vazodilatasyon oluşturularak bazal kanları alınmıştır. Sonrasında ratların ağırlıkları yeniden kaydedilerek verilecek salin ve

Gadovist preparatlarının hacim hesaplamaları yapılmıştır. Bu hesaplamalar her enjeksiyondan önce, her bir rat için tekrarlanmış ve ağırlık değişimleri göz önüne alınarak hacim hesaplamaları yenilenmiştir.

Grup 1'e, 3 hafta boyunca haftada 2 kez, sağ bacak abduksiyona getirilerek batın sağ alt kadrandan IP yolla 5 mmol/kg salin, Grup 2'ye ise eş zamanlarda, aynı bölgeden IP yolla, 5 mmol/ kg Gadovist verilmiştir (Resim 1).



Resim 1: İntraperitoneal enjeksiyon

Grup 3'e, 3 hafta boyunca haftada 2 kez, kuyruk veninden, 5 mmol/kg salin, Grup 4'e ise eş zamanlı Gadovist verilmiştir. Çok sayıda IV enjeksiyon hedeflendiğinden enjeksiyonlar, her seferinde sağ ve sol lateral kuyruk veni olacak şekilde, olabildiğince periferden başlanarak, proksimale doğru yer değişikliği yapılarak uygulanmıştır. Başlangıçta (1 kez) ratların maruz kaldığı stresi azaltmak maksadı ile, ratlara anestezi sonrası IV enjeksiyon yapılmıştır (Resim 2).



Resim 2: İntravenöz enjeksiyon

Anestezi; Ketamin Hidroklorid (Ketalar, Eczacıbaşı, İstanbul, Türkiye) ile 50 mg/kg dozunda, intraperitoneal yolla uygulanmıştır. Herhangi bir IV girişim

yapılmadan, anestezi esnasında Grup 4'e ait 2 tane ratın ölmesi üzerine diğer IV enjeksiyonlar anestezi yapılmıştır. Anestezi yapılmadan IV enjeksiyon işlemi, ratın havalanmasını optimum sağlayan, ratın rahat hareket etmesine imkan veren fakat sadece kuyruğunu dışarıda bırakan bir aparat ve yardımcı personel desteği ile uygulanmıştır.

Grup 5'e 4 hafta boyunca haftada 5 kez 5 mmol/kg dan sağ alt kadrandan intraperitoneal salin, Grup 6'ya ise Grup 5 ile eş zamanlı aynı yöntem ile Gadovist verilmiştir.

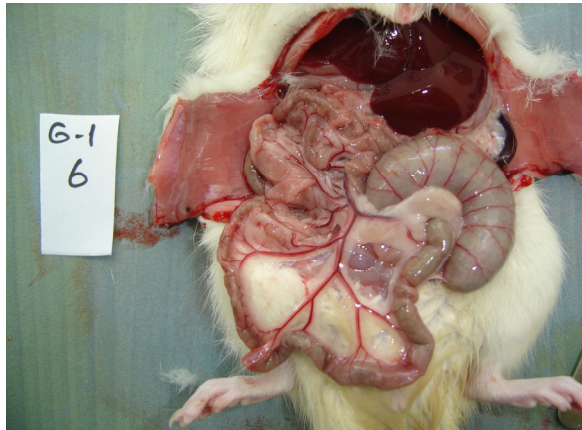
Deney süresince Grup 2'den 1 rat, Grup 4'den ise 3 rat ölmüştür.

3.5. Son MRG Tetkiki

Deney sonunda, anestezi altında; Grup 1, 2, 5 ve 6'daki ratların, IP enjeksiyonu takiben 5 dakika içerisinde T1 ağırlıklı koronal MRG imajları alınmış, Grup 3 ve 4'deki ratların ise IV enjeksiyonu takip eden ilk 3 dakika içerisinde T1 ağırlıklı abdominal MRG imajları alınmıştır.

3.6. Deneyin Sonlandırılması

Son enjeksiyondan yaklaşık 36-40 saat sonra Ketamin hidroklorid (Ketalar, Eczacıbaşı, İstanbul, Türkiye) ile 50 mg/kg dozunda, intraperitoneal yolla anestezi verilerek suretiyle laparotomi yapılmıştır. Tüm ratlarda inferior vena kavadan yaklaşık 3-4 cc kan alınmıştır. IP enjeksiyon yapılan Grup 1, 2, 5, 6'daki ratların batını açılır açılmaz periton, omentum izlenebilecek şekilde fotoğrafları çekilmiştir (Resim 3).



Resim 3: Batın içi fotoğrafları

Tüm ratlar, inferior vena kavalari kesilerek sakrifiye edilmişlerdir. IP enjeksiyon yapılan Grup 1, 2, 5, ve 6'daki ratların omentum ve peritonlarından örnekler alınmıştır. IV enjeksiyon yapılan Grup 3 ve 4'deki ratların ise kuyruklarından örnekleme yapılmıştır. Tüm ratların her iki böbrekleri alınmıştır. Tüm ratların sağ ve sol böbrekleri ayrı ayrı tartılarak kaydedilerek sol böbrek histopatolojik incelemeler için %10 luk formaldehit içerisinde alınmış, sağ böbrek ise alüminyum folyolara sarılmış ve inceleme esnasına kadar -80 °C'da muhafaza edilmiştir.

Deney başlangıcında ve en sonunda alınan kan örnekleri 3500 devirde yaklaşık 5 dakika santrifüj edilerek plazma ayrıştırılarak -80 °C'da muhafaza edilmiştir.

3.7. Histopatolojik İnceleme

Sol böbrekler %10 luk formaldehit içerisinde fikse edildikten sonra, parafin bloklara gömülen böbrek dokularından 5 µm lik kesitler alınarak, Hematoksilen&Eozin (HE) ile boyanmıştır. Spesmenler bir patolog tarafından ışık mikroskobu (Olympus BH-2; Olympus, Tokyo, Japan) ile değerlendirildi. Dokular değerlendirilirken tubuler dilatasyon, tubuler deskuamasyon, tubuler vakuolizasyon, tubuler nekroz, tubuler atrofi, tubuler cast, interstisiyel inflamasyon, interstisiyel ödem ve tubul içi eritrositler değerlendirilmiştir.

3.8. Biyokimyasal İnceleme

3.8.1. Plazmada NO Çalışılması

Deney başlangıcında ve sonunda alınan plazma örneklerinde GRIESS yöntemi ile nitrit ve nitrat çalışılmıştır (64). 1 birim plazmaya 1 birim 0,3M NaOH eklenerek oda ısısında 5 dakika inkübe edilmiş, karışıma 1 birim %10'luk ZnSO₄ eklenip vortekslenmiştir. Sonrasında 14 000 RPM de 5 dakika santirfüj edilmiş; NO için; 1 birim süpernatant, 1 birim VaCl₂, 0,5 birim sülfanilamid, 0,5 birim NEDD karışımı 37⁰C de yarım saat bekletilerek 540-550 dalga boyunda okunmuştur. NİTRİT için; 1 birim süpernatant, 0,5 birim sülfanilamid, 0,5 birim NEDD karışımı 37⁰C de yarım saat bekletilerek 540-550 dalga boyunda okunmuş, her iki değer nitrit

ve nitrat için hazırlanmış standartlara göre hesaplanarak NO (nitrat standardı ile okunan) değerinden nitrit değeri çıkarılarak son değer bulunmuştur.

3.8.2. Böbrek Dokusunda NO Çalışılması

Deney sonrası elde edilen sol böbrek dokusunda da GRIESS yöntemiyle çalışılmıştır (64).

0,3-0,35 gr doku tartılmış 5 katı hacimde PBS ile sulandırılmıştır. Homojenize edildikten sonra 2000 RCF de +4 °C de 5 dakika santirfuj edilmiş, 500 µl süpernatant alınarak üzerine 250 µl 0,3 N NaOH konarak oda ısısında 5 dakika inkübe edilmiştir. Daha sonra 250 µl %10 luk ZnSO₄ konarak vortekslenmiştir. 3000 RCF de +4 °C de 5 dakika santirfuj edilmiştir. Diğer 500 µl si 14 000 RPM de +4 °C de 5 dakika santirfuj edildikten sonra numuneler okunana dek dolapta muhafaza edilmiştir. Sonraki işlemler plazmada tayin yöntemiyle aynı şekilde uygulanmıştır.

3.8.3. Plazmada MDA Değerlerinin Çalışılması

Plazmada TBARS yöntemi ile MDA çalışılmıştır. 500 µl (mikrolitre) plazma alınarak üzerine 1 mililitre (1000 µl) TBA / TCA / HCl karışımı eklenip vortekslenmiş, 5 dakika oda ısısında bekletilmiş, sonrasında 5 dakika 10000 devir ile santrifuj edilmiştir. Süpernatantın tamamı cam tüplere alınarak üstüne 10 µl (mikrolitre) BHT eklenip 15 dakika kaynatılmış çeşme suyunda soğutulmuştur. Presipitasyon gözlemlendiğinde 5 dakika 10000 devir ile santrifujleyerek 532 nm de okumuştur.

3.8.4. Plazmada GSH Değerlerinin Çalışılması

500 µl plazma alınarak 1000 µl Tris / EDTA / NaDS (SDS) solusyona eklenip vortekslenmiş, 5 dakika oda ısısında bekletilmiştir. 5 dakika 10000 devirde santrifuj edilmiş, elde edilen süpernatant alınmış 40 µl DTNB eklenerek 20 dakika 37 °C tutularak 412 nm de okunmuştur ((abs - 0,756) x 3,08 / 0,0136 nmol / RSH / mlplazma).

3.8.5. Dokuda GSH ve MDA Tayini

Doku en az 0,3 gr. olacak şekilde tartılmıştır. (Doku ağırlığı x 9) olacak şekilde %10 luk TCA konularak doku homojenize edilmiş, 15 dakika 3000 devir ile 18/20 °C santrifüj edilmiştir (4000 rpm). 1,5 ml süpernatant alınarak mikrosantrifüj tüplerine konmuş, 8 dakika daha 3000 devirle 18/20 °C de santrifüj edilmiştir. Bu basamaktan sonra MDA ve GSH için farklı yöntemler izlenmiştir.

Daha sonra MDA için 750 µl (mikrolitre) örneğe 10 mikrolitre %1' lik BHT (butiledehidroksitoluen) konup, 750 mikrolitre TBA ile 15 dakika kaynatılmıştır. Bulanıklık oluşursa 8 dakika 3000 g / rpm santrifüj edilmiştir. 535 nm de okunarak sonuçlar abs TBARS'a göre değerlendirilmiştir. (kör → distile su) (65, 66)

GSH için 250 mikrolitre süpernatana 1000 mikrolitre 0,3 M Na₂HPO₄ eklenip, 125 mikrolitre DTNB eklenmiş cam deney tüplerine konulmuş, en son olarak da örnek ilave edilmiştir. Oda sıcaklığında 5-10 dakika beklenerek 412 nm de spektrofotometrede okunmuştur (67).

3.9. MRG Değerlendirmesi

Deney başlangıcında ve deney bitimindeki (kontrast madde uygulamasını takiben) alınan T1 ağırlıklı imajların her biri, bir radyolog tarafından değerlendirilmiştir.

Değerlendirme; aynı gruba ait ratların deney başlangıç ve sonundaki görüntülerinin karşılaştırılması ve ikincil olarak da kontrol ve ilaç gruplarının görüntü kalitelerinin birbiriyle kıyaslanması şeklinde planlanmıştır.

4. SONUÇLAR

4.1. MRG Sonuçları

Tüm gruplardaki ratların, deney başında alınan T1 ağırlıklı koronal baz imajları ile, deney sonunda alınan imajları karşılaştırılarak değerlendirildi. Kontrol ve ilaç gruplarının deney sonundaki görüntüleri de kendi aralarında kıyaslandı. Değerlendirmede öncelikle patolojik bulgular saptanmaya çalışılmıştır.

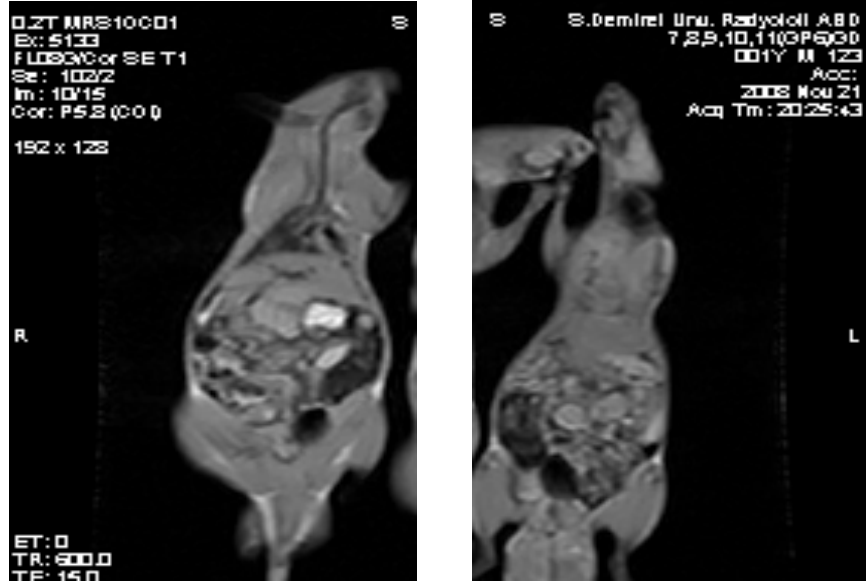
MRG değerlendirilirken, deney başlangıcındaki kontrastsız T1 ağırlıklı imajlarda herhangi bir patolojik bulguya rastlanmamıştır.

Deney sonrası elde edilen görüntüler incelendiğinde ise Grup 2'ye ait bir ratın boynunda periferik kontrast parlaklaşmasının daha belirgin olarak izlendiği nodüler görünüm dikkati çekmiştir. Ratın yapılan muayenesinde bu bölgede apse formasyonu dikkati çekmiştir (Resim 4).



Resim 4: IP kontrast madde enjeksiyonu sonrası elde olunan koronal T1 ağırlıklı MRG incelemesi; periferik parlaklaşma gösteren nodüler oluşum (boyun absesi)

Yine inceleme esnasında bazı ratlarda peritonda kontrast sonrası diffüz parlaklaşmanın izlendiği nodüler oluşumlar dikkati çekmiştir (Resim 5).



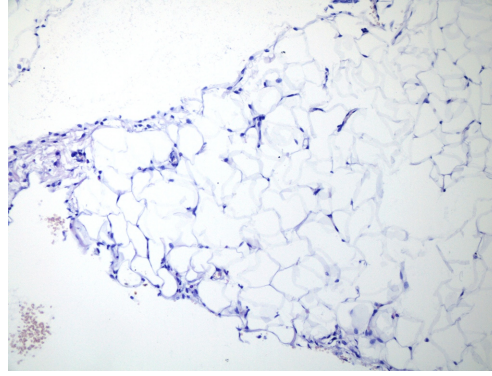
Resim 5: IP kontrast madde enjeksiyonu sonrası elde olunan koronal T1 ağırlıklı MRG incelemesi; peritonda milimetrik nodüler oluşumlar izlenmekte.

Bu ratların makroskopik incelemesinde peritonda multipl sayıda nodüller dikkati çekmiştir (Resim 6).



Resim 6: Makroskopik incelemede periton ve omentumda izlenen multipl sayıda nodüler oluşum.

Patoloji incelemesi sonrasında bu görünümüler kronik enflamasyona sekonder değişiklikler olarak değerlendirilmiştir (Resim 7).

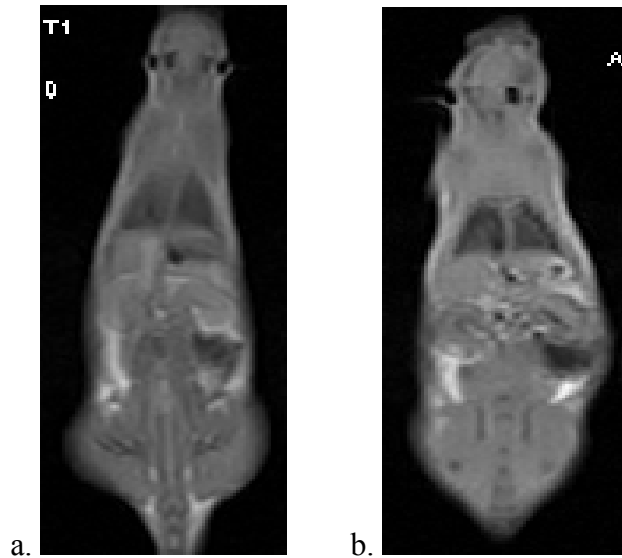


Resim 7: Omentumda inflamasyon (HE x400)

Kontrast maddenin verilış yöntemine göre (IP, IV) organ kontrastlanmalarını değerlendirilirken, öncelikle böbreklerin kontrastlanması göz önünde bulundurulmuştur.

IP yolla salın verilen gruplarda, periton içi serbest sıvının T1 ağırlıklı incelemedeki karakteristiği izlenmiş, böbrekte beklendiği gibi parlaklaşma saptanmamıştır. IV yolla salın verilen grupta böbrekte herhangi bir parlaklaşma izlenmemiştir.

IP ve IV yolla gadobutrol uygulanan gruplar arasında böbrek parlaklaşmasında herhangi bir farklılık olmadığı saptanmıştır (Resim 8).

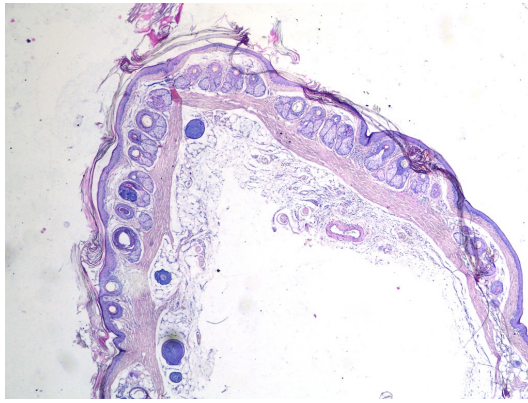


Resim 8: a) IP ve b) IV yolla kontrast madde verilen 2 Grupta alınan T1 ağırlıklı MRG imajlarda böbrek parlaklaşmasında belirgin farklılığın olmadığı izlenmektedir.

4.2. Histopatoloji

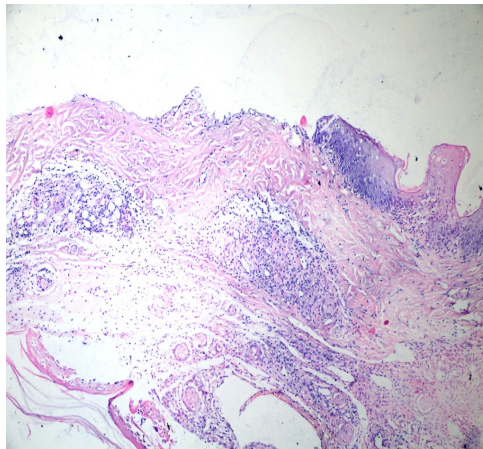
3 hafta boyunca haftada 2 kez (toplam 6 doz) IP uygulama yapılan Grup 1 ve 2'ye ait ratlardan, 4 hafta boyunca haftada 5 kez (toplam 20 doz) IP uygulama yapılan Grup 5 ve 6'ya ait ratlardan alınan periton- omentum örnekleri değerlendirildiğinde; tüm ratların omentum ve peritonunda kronik inflamasyon bulguları izlenmiştir (Resim 6,7).

IV uygulama yapılan ratların kuyruklarından alınan örneklerde ise; kontrol grubunda (Grup 3), tamamen normal bulgular izlenmiştir (Resim 9).



Resim 9: Normal görünümde kuyruk kesiti (HEX400).

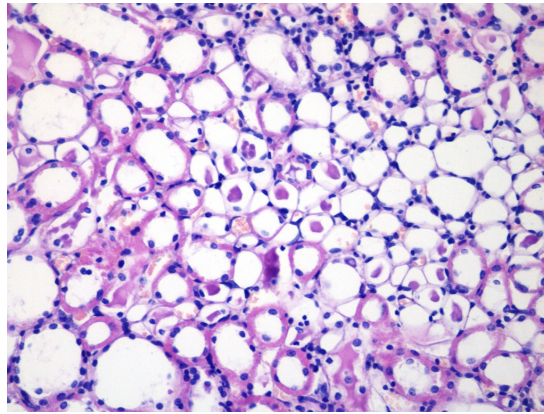
Kuyruk veninden Gadobutrol uygulanan Grup 4'de 3/13 rat, örnekleme yeterli olmadığından değerlendirme dışı bırakılmış, 4 örnek tamamiyle normal olup 6 örnekte kuyrukta ülser saptanmıştır (Resim 10). Bir örnekte ülser ek olarak venöz tromboz izlenmiştir.



Resim 10: Ülsere kuyruk (HEX 400).

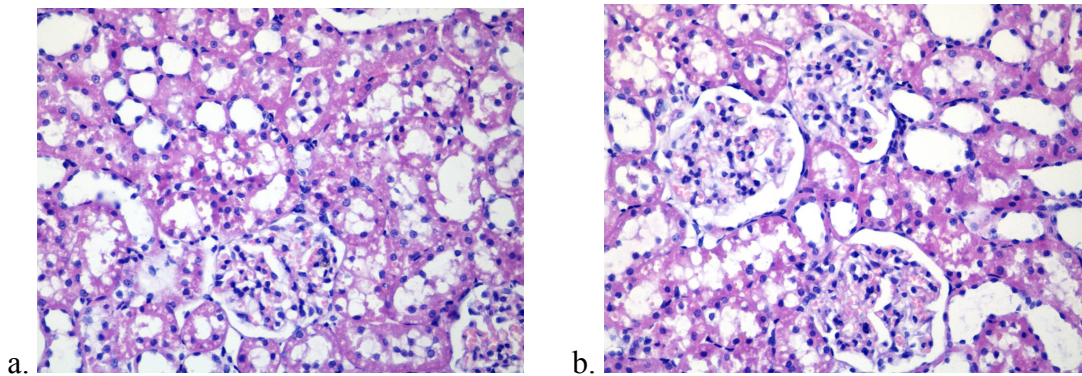
Sol böbrek dokularının histopatolojik değerlendirilmesinde; tubular nekroz, tubular dilatasyon, tubular epitelyal deskuamasyon, tubular vakuolizasyon, tubular atrofi, interstisyel inflamasyon, interstisyel ödem, tubular cast, intratubular eritrosit araştırılmıştır (Tablo 4). Grupların hiçbirisinde tubuler nekroz, interstisyel ödem, tubular epitelyal deskuamasyon, tubular atrofi, interstisyel inflamasyon saptanmamıştır.

Kontrol gruplarının hiçbirinde tubular cast saptanmazken, ilaç verdiğimiz gruplarda; Grup 2'de 6/11 ratta, Grup 4'de 6/13 ratta, Grup 6'da 2/12 ratta saptanmıştır (Resim 11).



Resim 11: Tübül içinde cast (HEx400)

Kontrol gruplarının hiçbirinde intratubular eritrosit saptanmazken; Grup 2'de 9/11 ratta, Grup 4'de 13 ratın hepsinde, Grup 6'da 4/12 ratta saptanmıştır (Resim 12 a,b).



Resim 12: a ve b de intratubuler eritrositler (HEx400)

Sonuçlar kıkare testi ile değerlendirildiğinde, kontrol grupları ile ilaç verilen gruplar arasında tübüler dilatasyon açısından anlamlı fark saptanmamıştır.

Gadobutrol verilen gruplarda (hem IV, hem IP yolla); tübüler vakuolizasyon, tübüler cast ve tübul içinde eritrosit bulunması kontrol grubuna göre anlamlı ölçüde daha yüksekti (Yates düzeltilmeli ki-kare testi; $p<0.05$).

Tablo 4: Gruplardaki böbrek dokularında saptanan histopatolojik bulguların sayısal dağılımı

	1.Grup	2.Grup	3.Grup	4.Grup	5.Grup	6.Grup
Tubular nekroz	0	0	0	0	0	0
Tubular dilatasyon	4	1	3	2	3	0
Tubular epitelyal deskuamasyon	0	0	0	0	0	0
Tubular vakuolizasyon	0	9	3	13	0	12
Tubular atrofi	0	0	0	0	0	0
Interstisyel inflamasyon	0	0	0	0	0	0
Interstisyel ödem	0	0	0	0	0	0
Tubular cast	0	6	0	6	0	4
Tubul içinde eritrosit	0	9	0	13	0	7

4.3. Serbest Radikal Düzeyleri

Tüm Gadobutrol verdiğimiz gruplardaki böbrek dokusunda ölçülen MDA ve NO değerleri kontrol gruplarına oranla daha yüksek değerlerde ölçüldü. Ancak bu değerler istatistiksel olarak anlamlı düzeyde değildi. GSH değerleri ise Gadobutrol uygulanan gruplarda daha düşük saptanmıştı. Ama bu değerler de istatistiksel olarak anlamlı düzeyde değildi.

Tüm gruplarda deney başlangıç aşamasında alınan bazal kan örneklerinden elde edilen plazmada MDA, GSH, NO değerlerinde kontrol ve ilaç grupları arasında istatistiksel olarak anlamlı farklılık saptanmamıştır.

Grup 1 ve Grup 2 arasında deney sonunda ölçülen plazma MDA değerleri açısından istatistiksel olarak anlamlı fark vardı. Grup 2'nin plazma MDA değerleri, Grup 1 den anlamlı olarak daha yüksekti (Tablo 5) (Şekil 6).

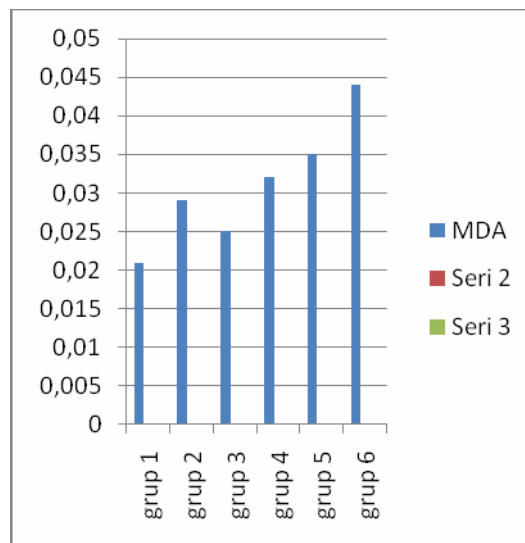
Tablo 5: Grup 1 ve Grup 2 arasında deney sonunda plazmada ölçülen parametrelerin karşılaştırılması

Ölçülen parametreler	Grup 1	Grup 2	P değeri
	Ortalama± std sapma	Ortalama± std sapma	
MDA	0,02 ± 0,007	0,03 ± 0,006	0,006
GSH	1,44 ± 1,13	1,43 ± 0,17	0,76
NO	15,41 ± 5,17	14,80 ± 2,81	0,67

Grup 3 ve 4 arasında deney sonunda ölçülen plazma MDA değerleri açısından istatistiksel olarak anlamlı fark vardı. Grup 4'ün plazma MDA değerleri, Grup 3'den anlamlı olarak daha yüksekti (Tablo 6) (şekil 7). Bu gruplarda GSH, NO değerlerinde ise istatistiksel olarak anlamlı farklılık saptanmamıştır ($p>0,05$).

Tablo 6: Grup 3 ve Grup 4 arasında deney sonunda plazmada ölçülen parametrelerin karşılaştırılması

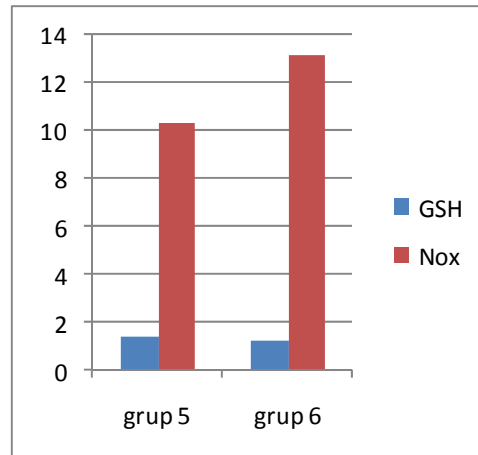
Ölçülen parametreler	Grup 3	Grup 4	P değeri
	Ortalama± std sapma	Ortalama± std sapma	
MDA	0,02 ± 0,005	0,03 ± 0,008	0,011
GSH	1,42 ± 0,18	1,34 ± 0,24	0,48
NO	13,41 ± 7,78	10,94 ± 1,92	0,37



Şekil 6: Tüm Grupların deney sonu plazma MDA değerlerinin karşılaştırılması

Grup 5 ve Grup 6 arasında deney sonunda ölçülen plazma MDA değerleri açısından istatistiksel olarak anlamlı fark vardı. Grup 6'nın plazma MDA değerleri, Grup 5 den anlamlı olarak daha yüksekti (Tablo 7) (şekil 6).

Grup 5 ve Grup 6 arasında deney sonunda ölçülen plazma GSH değerleri açısından istatistiksel olarak anlamlı fark vardı. Grup 5'in plazma GSH değerleri, Grup 6'dan anlamlı olarak daha yüksekti (şekil 7) (Tablo 7).



Şekil 7: Grup 5 ve 6'da deney sonunda plazmada ölçülen GSH ve NO değerlerinin karşılaştırılması

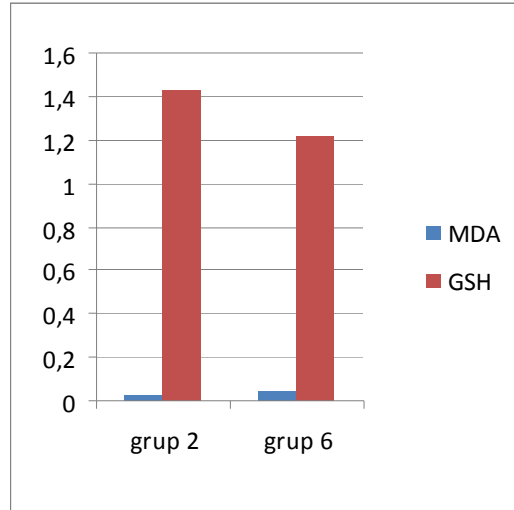
Tablo 7: Grup 5 ve Grup 6 arasında deney sonunda plazmada ölçülen parametrelerin karşılaştırılması

Ölçülen parametreler	Grup 5	Grup 6	P değeri
	Ortalama ± std sapma	Ortalama ± std sapma	
MDA	0,03 ± 0,01	0,04 ± 0,01	0,049
GSH	1,42 ± 0,22	1,23 ± 0,17	0,028
NO	10,37 ± 2,23	13,16 ± 2,57	0,018

Grup 5 ve 6 arasında deney sonunda, plazmada ölçülen NO değerinde istatistiksel olarak anlamlı farklılık vardı. Grup 6'nın NO değeri, Grup 5'e göre daha yüksekti (şekil 7) (Tablo 7).

Grup 2 ve Grup 6 arasında deney sonunda ölçülen plazma MDA değerleri açısından istatistiksel olarak anlamlı fark vardı. Grup 6'nın plazma MDA değerleri, Grup 2'den anlamlı olarak daha yüksekti (Şekil 8). Grup 2 ve Grup 6 arasında deney sonunda ölçülen plazma GSH değerleri açısından istatistiksel olarak anlamlı fark

vardı. Grup 6'nın plazma GSH değerleri, Grup 2'den anlamlı olarak daha düşüktü (Şekil 8). Grup 2 ve Grup 6 arasında deney sonunda ölçülen plazma NO değerleri açısından istatistiksel olarak anlamlı fark yoktu (Tablo 8).



Şekil 8: Grup 2 ve 6'da deney sonunda plazmada ölçülen MDA ve GSH değerlerinin karşılaştırması

Tablo 8: Grup 2 ve Grup 6 arasında deney sonunda plazmada ölçülen parametrelerin karşılaştırılması

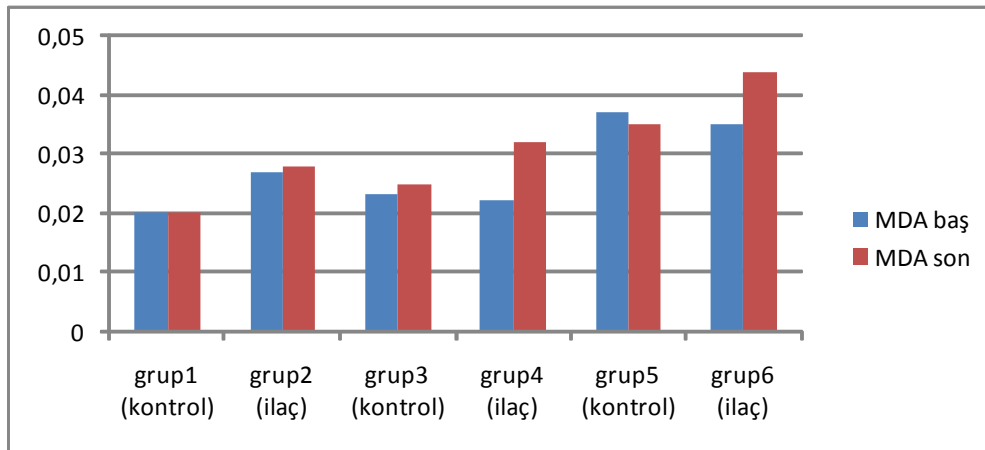
Ölçülen parametreler	Grup 2	Grup 6	P değeri
	Ortalama ± std sapma	Ortalama ± std sapma	
MDA	0,03 ± 0,007	0,04 ± 0,01	0,002
GSH	1,43 ± 1,17	1,23 ± 0,17	0,011
NO	14,80 ± 2,81	13,16 ± 2,57	0,18

Grup 2 ve 6 arasında dokuda ölçülen MDA, GSH, NO değerlerinde istatistiksel olarak anlamlı farklılık saptanmamıştır ($p>0,05$).

Gruplar deney başlangıcında alınan bazal plazma örnekleri ve deney sonunda elde edilen plazma örneklerinde MDA, GSH, NO değerlerindeki değişimler açısından değerlendirildiğinde; salın verilen kontrol gruplarında deney başı- sonu arasında istatistiksel olarak anlamlı farklılık saptanmamıştır.

Grup 2’de (3 hafta, haftada 2 kez IP Gadobutrol verdiğimiz grupta) plazmada ölçülen parametrelerden MDA, GSH ve NO değerlerinde başlangıç ve sonuç arasında istatistiksel olarak anlamlı farklılık yoktu.

Grup 4’de plazmada ölçülen parametrelerden MDA, GSH ve NO değerlerinde başlangıç ve sonuç değerleri açısından karşılaştırma yapıldığında, deney sonunda plazmadan ölçülen MDA ve NO değerleri, deney başlangıcında plazmadan ölçülen MDA ve NO değerlerine göre daha yüksek saptanmıştır (Şekil 9) (Tablo 9).

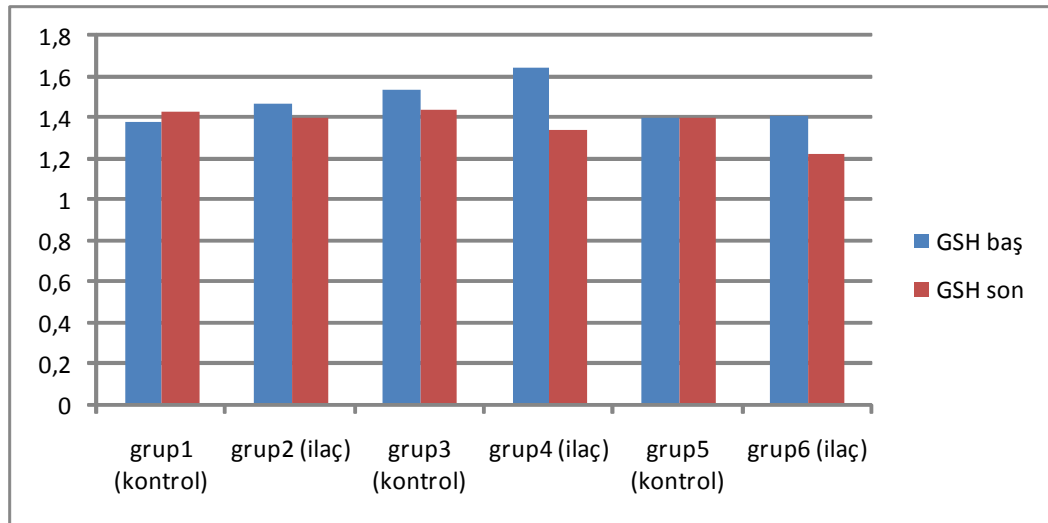


Şekil 9: Tüm gruplarda deney başında ve sonrasında elde edilen plazma örneklerinde MDA değerlerinin değişimlerinin kıyaslanması

Deney başlangıcında plazmadan ölçülen GSH değeri deney sonunda plazmadan ölçülen GSH değerlerine göre daha yüksek saptanmıştır (deney sonundaki plazma GSH değeri daha düşüktür) (Tablo 9) (şekil 10).

Tablo 9: Grup 4’de plazmada ölçülen parametrelerin deney başlangıç ve sonuç değerleri açısından karşılaştırması

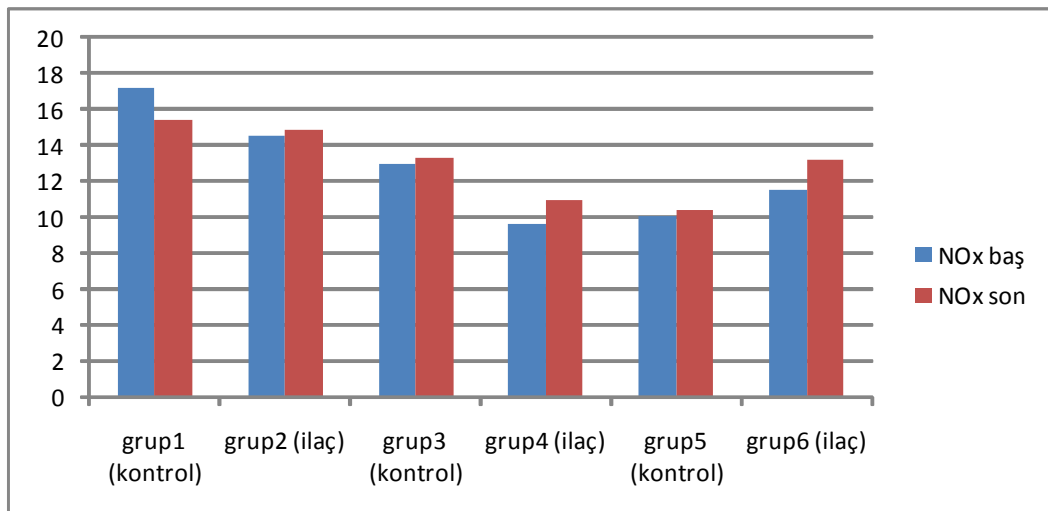
Ölçülen parametreler	Başlangıç	Sonuç	P değeri
Grup 4 için	Ortalama ± std sapma	Ortalama ± std sapma	
MDA	0,02 ± 0,004	0,03 ± 0,008	0,002
GSH	1,34 ± 0,24	1,33 ± 0,24	0,03
NO	9,62 ± 1,77	10,94 ± 1,92	0,03



Şekil 10: Tüm gruplarda deney başında ve sonrasında elde edilen plazma örneklerinde GSH değerlerinin değişimlerinin kıyaslanması

Grup 6'da plazmada ölçülen parametrelerden MDA değerlerinde başlangıç ve sonuç değerleri açısından karşılaştırma yapıldığında istatistiksel olarak anlamlı fark saptanmıştır. Deney sonunda plazmadan ölçülen MDA değeri deney başlangıcında plazmadan ölçülen MDA değerlerine göre daha yüksek saptanmıştır (Tablo 10) (Şekil 9).

Grup 6'da plazmada ölçülen parametrelerden GSH ve NO değerlerinde başlangıç ve sonuç arasında istatistiksel olarak anlamlı farklılık yoktur.



Şekil 11: Tüm gruplarda deney başında ve sonrasında elde edilen plazma örneklerinde NO değerlerinin değişimlerinin kıyaslanması

Tablo 10: Grup 6’da plazmada ölçülen parametrelerin deney başlangıç ve sonuç değerleri açısından karşılaştırması

Ölçülen parametreler	Başlangıç	Sonuç	P değeri
Grup 6 için	Ortalama ± std sapma	Ortalama± std sapma	
MDA	0,03 ± 0,008	0,04 ± 0,01	0,002
GSH	1,41 ± 0,30	1,23 ± 0,17	0,14
NO	11,49 ±3,01	13,16 ± 2,57	0,1

5. TARTIŞMA

Gelişen teknolojinin en güzel örneklerinden biri olan MRG, tanı koymada mükemmel avantajlar sağlamaktadır. Bazı patolojik durumların tespitinde MRG kontrast ajanlarının kullanımına ihtiyaç duyulmaktadır.

Radyolojide kullanılan kontrast maddelere bağlı gelişen nefropati son derece önemli klinik sonuçlar oluşturmakta ve hastanın yaşam kalitesini etkileyebilmektedir. Bu durum esas olarak 'önce zarar verme' anlayışını ilke edinmiş tıp camiasını düşündürmekte, hasta için en etkin fakat en zararsız tanısal yöntemleri bulma çabasına götürmektedir.

MRG kontrast ajanlarının, radyolojide kullanılan pek çok kontrast ajana göre çok daha az yan etkiye sahip ve güvenilir olduğu bilinmektedir.

Nefropati açısından riskli durumlarda alternatif olarak gadolinyumlu ajanlar kullanılabilir. Kaufman ve arkadaşları periferik vasküler girişim yaptıkları iki hastalarına gadopentat dimeglumin kullanarak bu hastalarda nefropati gelişmediğini gözlemlemişlerdir. Spinoza ve arkadaşları, 24'ü renal yetmezlikli 25 renal arter stenozlu hastalardan oluşan çalışmalarında, gadodiamid kullanmışlar ve 2 hastalarında kreatinin seviyesinde yükselme ortaya çıkmıştır (30).

Son dönemde ortaya çıkmış bir antite olan, NSF olarak adlandırılan durum, tüm bilim adamlarını MRG kontrast ajanlarını yeni baştan gözden geçirmek için uyarıcı olmuştur. NSF, böbrek yetmezlikli hastalarda ilk olarak deride tanımlanan, fakat sonra kas, AC'ler, plevra, perikard ve kemikleri de tuttuğu saptanan, diffüz fibrozis yapan sistemik bir hastalıktır. Hastalık endüre, kalınlaşmış deri lezyonları şeklinde bulgu verebileceği gibi, ilerlemiş bulgularla da karşımıza çıkabilmektedir (34,35).

NSF'nin nedeni bilinmemektedir. Kemik iliğinden köken alan ve dolaşımda bulunan fibrositlerin, endotel hasarı bulunan deri ve çeşitli vücut bölgelerine yönlendirildikleri düşünülmektedir (37). Öncelikle böbrek yetmezliği zemininde gelişen bu durumun endotel hasarı oluşturan başka durumlarda da oluşup oluşmadığı tam olarak bilinmemektedir.

Literatürde, Gadolinyum içeren MRG kontrast ajanlarının NSF patogenezindeki rollerine ilişkin yapılan bir çalışmada; ekstrasellüler gadolinyum kontrast ajanları ratlarda bir subkronik toksisite çalışmasında test edilmiştir. Hayvanlara 4 hafta için haftada 5 kez 2.5 mmol/kg dozda gd (gadolinyum) (toplam 20 doz) IV enjeksiyonla verilerek derinin histopatolojisi değerlendirilmiş ve değişik dokularda gd konsantrasyonu ölçülmüştür. Sonuçta; kontrast ajanlara yüksek dozda maruz kalan ratlarda, şiddetli renal disfonksiyonlu hastalardakine benzer bir durum elde edilmiştir (38).

Biz araştırmamızda, toplam 6 kez 5 mmol/kg dozda IV ve IP Gadobutrol uygulamıştık. Uyguladığımız bu subkronik doz toplamı, bahsedilen çalışmadakinden daha düşük olmasına rağmen klinik uygulama dozundan çok daha yüksekti. Çalışmamızın sonucunda histopatolojik değerlendirme yapıldığında, böbreklerde tubuler vakuolizasyon, tubuler cast ve tubul içinde eritrosit saptanmıştır. Bu nedenlerle hastalarda MRG kontrast ajanı kullanılırken özellikle de yüksek dozlarda ve sık kullanımlarda çok daha dikkatli olmak gerekliliği sonucuna ulaşılabilir.

Yine bizim çalışmamızın bir diğer ayağında ise Gadobutrolü 5 mmol/ kg dozda toplam 20 doz IP uygulamıştık. Bu dozlarda bir böbrek hasarlanması bekliyorduk. Olası bu hasarın oluşumunda daha önce hiç çalışılmamış bir parametre olan oksidan- antioksidan ajanların düzeylerini ve etkilerini araştırdık.

Gadobutrol ile ilgili yapılan rat ve köpek çalışmalarında 2.5 ve 5 mmol/kg dozda, 4 hafta süre ile haftada 5 kez kuyruk veninden uygulama yapılarak (toplamda 20 doz), subkronik toksisite ile ilgili bazı çalışmalar yapılmıştır. Bu çalışmanın sonucunda böbrek ağırlığında doz bağımlı bir artış ve renal proksimal tubuler epitelyumun doz bağımlı vakuolizasyonu saptanmış, ratların bir kısmında 8 haftalık bir iyileşme süreci sağlanmış, bu değişikliğin geri dönüşlü olduğu izlenmiştir (3). Biz ratlarımıza benzer dozlarda ilacı IV değil de IP yolla verdik ve iyileşme süresi tanımadık. Oluşması beklenen böbrek hasarlanması ile oksidatif stres göstergeleri arasındaki ilişkiyi araştırdık. Yüksek subkronik dozlarda böbrek dokusunda istatistiksel olarak anlamlı düzeye ulaşmayan artışın histopatolojik hasarlanmayı açıklayacak düzeyde olmadığını gözledik. Toplam 6 dozda ilaç uyguladığımız gruplarda ise, daha düşük dozlarda böbrek dokusunda benzer histopatolojik yan

etkileri gözleyip gözleyemeyeceğimizi test ettik ve bu dozlarda da histopatolojik böbrek hasarlanması saptadık.

Radyolojide kullanılan kontrast ajanlarla oluşan kontrast madde nefropatisinin fizyopatolojik mekanizması, bize MRG kontrast ajanları ile oluşan böbrek yan etkilerini ve NSF'in patogenezi araştırmak- anlamak açısından yol gösterebilir. Kontrast madde nefropatisi etyopatogenezinde pek çok faktör saptanmıştır. En çok üzerinde durulan durumlar, renal kan akımında ortaya çıkan hemodinamik değişiklikler, böbrek hücrelerine direk toksik etkilerdir. Yine son zamanlarda üzerinde sık durulan etkenlerden birisi de oksidatif strese bağlı etkiler ve kullanılan kontrast maddenin osmolalitesidir. Düşük osmolaliteli non - iyonik iyotlu kontrast maddelerin yan etki potansiyelleri yeterince düşüktür (8). İyonik kontrast maddeler hipertondiktir. İyotlu kontrast maddelerin yan etkilerinin hiperosmolalite ile bağlantılı olduğuna inanılır.

IV uygulamanın, yapılan uzun süreli rat çalışmalarında pek çok sıkıntıyı da beraberinde getirdiği şüphesizdir. Bu sıkıntılardan biri de rat kuyruk veninin tromboze veya ülserle olması ve sonuçta hayvanın maruz kalacağı stresin artmasıdır. Hayvanın strese maruz kalması sonucunda bazı hemodinamik değerler etkilenebilmektedir. IP uygulama sonrası MRG görüntü kalitesinde ve aynı dozlardaki yan etkilerde farklılık saptanmazsa, benzer çalışmalarda, IV yöntemine göre çok daha kolay bir yöntem olan IP yöntemin kullanılabilceğini düşündük. Biz araştırmamızda Gadobutrolü 2 farklı yöntemde (IV ve IP) vererek etkinliği ve yan etkileri arasında fark olup olmadığını test ettik. Yaptığımız literatür taramalarında, ratlarda 0,25 mmol/kg Gadobutrol'ün IP verilerek uzun dönem eliminasyonu ve biyodağılımını araştırıldığı bir çalışma ile karşılaştık. Bu çalışmada IP uygulanan Gadobutrolün %90'dan fazlası böbreklerden 2 saat içerisinde atılmıştır. % 100' ü de 7 gün içerisinde atılmıştır. IP enjeksiyondan 7 gün sonra vücutta kalan miktarın tamamı 1. günde % 0,71 den % 0,15 e düşmüştür (20). Bizim araştırmamızda değerlendirme şeklimiz MRG ile olduğundan bu açıdan bir miktar daha farklıydı. Böbrek parlaklaşmasının baz alındığı bu karşılaştırmada IV ve IP gruplar arasında farklılık saptamadık. Aynı zamanda subkronik yüksek dozlarda uygulanan Gadobutrol sonrası yapılan böbrek dokusunun histopatolojik incelemesinde de, hem IV hem de IP gruplarda saptanan histopatolojik değişiklikler aynı idi. Tüm bu

bulgularla IV uygulama ve IP uygulama arasında hem yan etkiler hem de MRG görüntü kalitesi açısından farklılık olmadığı söylenebilir. Sonuç olarak bulgularımız IP uygulamanın deneysel konfor açısından IV uygulamaya tercih edilebileceğinin göstergesiydi.

Bizim araştırmamızda, kuyruk veninden Gadobutrol uygulanan ratların bir kısmında ülserasyon ve 1 tanesinde tromboz gelişti. Serum fizyolojik verilen grupta ise kuyruk örnekleri tamamen normaldi. Bu durum Gadovistin viskosite ve osmolalitesinin serum fizyolojiğe göre daha yüksek oluşuna bağlı olabilir. Özellikle sık enjeksiyon uygulanan kronik hastalarda uygulama alanını seçerken bu durum göz önünde bulundurulmalıdır. Vogler ve arkadaşlarının yaptıkları bir çalışmada, diğer MRG kontrast ajanlarıyla karşılaştırıldığında (Gadoteirol, Gadopentetate, gadodiamid); 1M. Gadobutrolün osmolalitesi ve viskozitesinin daha düşük olduğu belirtilmiştir (21). Bu nedenlerle daha güvenli olarak düşünülebilir.

Literatürde Gadobutrol ile ilgili yapılan rat ve köpek çalışmalarında yüksek subkronik dozlarda IV uygulama yapılarak böbrek ağırlığında doz bağımlı bir artış ve renal proksimal tubuler epitelyumun doz bağımlı vakualizasyonu mevcuttu. Aynı çalışmada ratların bir kısmına 8 haftalık bir iyileşme süreci sağlanmış, bu değişikliğin geri dönüşlü olduğu saptanmıştı (3).

Biz ratlarımıza aynı dozlarda Gadobutrolü IP verdik ve iyileşme süresi tanımadık. Bizim çalışmamızda tubuler vakuolizasyona ek olarak tubuler casts ve tubul içinde eritrosit de saptadık. Zaten beklediğimiz böbrek hasarlanmasının oluşumunda daha önce hiç çalışılmamış bir parametre olan oksidan- antioksidan ajanların düzeylerini ve etkilerini test ettik.

Radyolojide kullanılan kontrast maddeler sonrasında gelişen nefropatinin patogeneğinde serbest radikallerin araştırıldığı pek çok çalışma yapılmıştır. Serbest radikaller bir veya daha fazla eşleşmemiş elektrona sahip, kısa ömürlü, kararsız, molekül ağırlığı düşük ve çok etkin molekülerdir (1). Eşleşmemiş elektronlar yüksek enerjili olup eşleşmiş elektronları ayırarak işlerine engel olurlar.

NO molekülü, paramanyetik özellikli, yüksek reaktiviteye sahip bir radikaldir. Suda ve yağda çözünebilir. Lipofilik özelliğinden dolayı hücreler arasında kolaylıkla difüze olabilir. NO radikali, süperoksit ile bağlanarak yüksek aktiviteli ve

yarılanma ömrü uzun, çok daha sitotoksik olan peroksinitrit oksidanını oluşturur. Peroksinitrit, nitrik oksitten daha az stabil ve daha kısa ömürlü olup bir seri mekanizma ile hücre hasarına neden olmaktadır (35).

Oksidatif strese bağlı olarak oluşan lipid peroksidasyonu, serbest radikaller tarafından başlatılan ve zarların yapısındaki doymamış yağ asitlerinin oksidasyonuna neden olan kimyasal bir olay olarak tanımlanmaktadır (34). Lipid peroksidasyonun en önemli ürünü olan MDA artışı oksidatif stresi gösterir.

Serbest radikaller ve böbrek hasarlanması ile ilgili pek çok çalışma yapılmıştır. Vankomisin ile yapılan bir çalışmada vankomisine bağlı bilinen nefrotoksitenin serbest radikallerle ilişkisi araştırılmış, vankomisin verilen grupta serbest radikal düzeyleri yüksek bulunmuştur (68).

Böbrek toksitesi bilinen sisplatin ile yapılan bir çalışmada, biyokimyasal olarak serbest radikal düzeylerinin sisplatin grubunda kontrol grubuna göre belirgin yükseldiği gözlenmiştir (69).

Serbest radikallerdeki aşırı yükselmenin vücut için tehlike oluşturduğu şüphesizdir. Ancak vücudun işlevlerini görebilmesi ve hastalıklardan korunabilmesi için de gereklidirler. Serbest radikaller vücutta çok hassas bir dengeyle kontrol edilmektedirler (1).

Glutasyon (GSH), hücrelerde *invivo* sentezlenebilen bir antioksidandır (56). İnce bağırsaktan kısmen emilebilir. Glutasyon, GSH-transferaz ve peroksidazlar için bir substrattır. Reaktif oksijen türlerinin detoksifikasyonuna katılır. Ayrıca, antioksidan etkili C ve E vitaminleri üzerinde orta düzeyde koruyucu etkiye sahiptir (57). Oksidan stres durumunda, serbest radikal düzeylerinde artış olduğunda antioksidan yollarında kullanıldığından miktarı azalabilir.

Biz araştırmamızda, süre ve yöntemle bağlı farklılık olmadan tüm gadobutrol verilen gruplarda böbrekte bir miktar histopatolojik hasarlanma saptadık.

Her grup için oksidan- antioksidan ajanların düzeylerini test ettiğimizde ise; Grup 1 ve 2'ye MDA değerleri açısından bakıldığında, toplam 6 doz IP Gadobutrol verdiğimiz Grup 2'de, başlangıç değerlerine göre sonuç plazma MDA değerlerinde istatistiksel olarak anlamlı düzeylere ulaşmayan bir artış olmuştur. Salin verdiğimiz 1.

Kontrol grubunda ise deney başı ve sonu arasında plazmada MDA artışı olmamıştı. Her iki grubun deney sonu plazma değerleri karşılaştırıldığında MDA açısından vaka ve kontrol grupları arasındaki fark anlamlıydı. Toplam 6 doz IP Gadobutrol uygulaması sonrası, plazma MDA serbest radikalinde artış mevcuttu.

Plazma GSH değerleri açısından değerlendirildiğinde; Grup 2’de, plazmada başlangıç değerlerine göre sonuç GSH değerlerinde istatistiksel olarak anlamlı düzeylere ulaşmayan azalma saptandı. Kontrol grubunda ise GSH değerinde, herhangi bir azalma saptanmamıştı.

NO değerleri açısından bakıldığında; Gadobutrol verdiğimiz Grup 2’de, plazmada başlangıç değerlerine göre sonuç NO değerlerinde anlamlı düzeylere ulaşmayan bir artış saptanmıştı. Kontrol grubunda ise deney başı- sonu arasındaki NO değerinde artış yoktu.

Grup 3 ve 4’e MDA değerleri açısından bakıldığında, toplam 6 doz IV Gadobutrol verdiğimiz Grup 4’de, başlangıç değerlerine göre sonuç MDA değerlerinde istatistiksel olarak anlamlı düzeylerde artış olmuştu. Kontrol grubu ile kıyaslandığında da MDA daki bu artış anlamlı düzeylerdeydi.

Antioksidan yolakta görev yapan GSH değerleri açısından değerlendirildiğinde; Grup 4’de, plazmada başlangıç değerlerine göre sonuç GSH değerlerinde istatistiksel olarak anlamlı azalma olmuştu.

NO değerleri açısından bakıldığında; Grup 4’de, plazmada başlangıç değerlerine göre sonuç NO değerlerinde istatistiksel olarak anlamlı bir artış saptanmıştı.

Grup 5 ve 6’ya MDA değerleri açısından bakıldığında, toplam 20 doz IP Gadobutrol verdiğimiz Grup 6’da, başlangıç değerlerine göre sonuç MDA değerlerinde istatistiksel olarak anlamlı artış olmuştu. Kontrol grubu ile kıyaslandığında da MDA daki bu artış istatistiksel olarak anlamlıydı.

GSH değerleri açısından değerlendirildiğinde; toplam 20 doz IP Gadobutrol verdiğimiz Grup 6’da, plazmada başlangıç değerlerine göre sonuç GSH değerlerinde istatistiksel olarak anlamlı düzeylere ulaşmayan azalma olmuştu. Kontrol grubu ile

kıyaslandığında Grup 6'da GSH değeri, kontrol grubuna göre anlamlı düşük bulunmuştu.

NO değerleri açısından bakıldığında; toplam 20 doz IP Gadobutrol verdiğimiz Grup 6'da, plazmada başlangıç değerlerine göre sonuç NO değerlerinde istatistiksel olarak anlamlı düzeylere ulaşmayan bir artış saptanmıştı. Kontrol grubu ile kıyaslandığında NO değeri daha yüksek bulunmuştu.

Bu deney sonucunda Gadobutrol uyguladığımız gruplarda plazmada, serbest radikal düzeylerinde bir artış izledik. Bu artış kontrol gruplarına göre kıyaslandığında MDA' da daha belirgin görünümündedir.

Yüksek kümülatif dozlarda (toplam 20 kez, 5 mmol/kg dozda) IP Gadovist uygulanan Grup 6'da, kontrol grubuna göre NO'da ve MDA'da artış, aynı zamanda GSH'da düşme saptanmıştı. Bu bulgular oksidan stresin göstergeleriydi. Daha düşük kümülatif dozlarda IP ve IV Gadobutrol verdiğimiz gruplarda ise serbest radikallerden MDA'nın yükselişi daha anlamlıydı. Bu lipid peroksidasyonunun bir göstergesiydi.

Farklı kümülatif dozlarda (toplam 6 ve 20 doz) IP Gadobutrol verdiğimiz grupları plazma serbest radikalleri açısından kıyasladığımızda, MDA'da doza bağlı artış, GSH da ise doza bağlı bir azalma gözledik.

Tüm bunlar, klinik uygulama dozundan çok daha yüksek kümülatif dozlarda Gadobutrol uygulaması sonucunda oksidatif bir stres oluştuğunu göstermektedir. Fakat tezat olarak serum fizyolojik verdiğimiz kontrol grupları ve Gadobutrol verdiğimiz gruplar arasında böbrek dokularından elde ettiğimiz MDA, GSH ve NO değerlerine baktığımız zaman, Gadobutrol uyguladığımız gruplarda MDA ve NO değerleri daha yüksek olmasına rağmen bu farklılık istatistiksel olarak anlamlı düzeyde değildi. Yine GSH değerleri de Gadobutrol uyguladığımız gruplarda daha düşük saptanmıştı. Bu da beklediğimiz bir sonuç olmasına rağmen istatistiksel olarak anlamlı düzeylerde değildi.

Çalışmamızın asıl amacı çok yüksek dozlarda oluşması muhtemel böbrek hasarlanmasının mekanizmasında oksidatif stres-serbest radikallerin etkisini araştırmaktı. Fakat elde ettiğimiz değerlere baktığımızda histopatolojik olarak bir miktar hasarlandığı izlenen böbrek dokusunda istatistiksel olarak anlamlı düzeylere

ulaşmayan serbest radikal değerlerinde artış vardı. Bu sonuçlar da böbrekteki histopatolojik hasarlanmayı birebir açıklayacak düzeyde değildi. Yüksek kümülatif dozlarda Gadobutrol uygulaması sonucunda oluşan böbrek hasarından multifaktöriyel mekanizmalar zinciri sorumlu olabilir.

Yine de Gadobutrol sonrası plazmada artış gösteren serbest radikal düzeyleri artmış oksidatif stresi göstermektedir. Serbest radikaller çevresel pek çok nedenden, özellikle de stres faktöründen sıkça etkilenmektedirler. Deneyimizin yaklaşık 1 ay kadar sürmesi, bu esnada ratların bir miktar daha yaşlanması, bazı ratlarda bir takım fiziksel- organik hasarların ortaya çıkması araştırmamızı zora sokan faktörlerdendi. Bazı ratlarda apseler ortaya çıkmıştı. IP enjeksiyon yaptığımız tüm ratlarda (kontrol ve Gadobutrol uygulanan grupların hepsinde) peritonda kronik enflamasyon bulguları oluşmuştu. Kuyruk veninden IV enjeksiyon yaptığımız ratlarda, enjeksiyon sonrası, enjeksiyon bölgelerini temizlememize rağmen kontrol ve ilaç uyguladığımız grupların hepsinde de bazı davranış değişiklikleri oluşmaktaydı. Daha agresif ve saldırganlaşan IV gruplarda ratlar, kan kokusu aldıkları ratların kuyruk bölgelerini kemiriyorlardı. Bu ratları ayrı kafeslere aldığımızda ise kendi kendilerine de zarar vermekteydiler. Aynı zamanda son derece sosyal olan ratların yalnız bırakılmaları da ekstra bir stres oluşturmaktaydı.

Tüm bu nedenleri göz önüne aldığımızda plazmada oksidatif strese ait göstergelerin yalnızca Gadobutrolün etkisiyle değiştiğini düşünmek yanlış olacaktır. Fakat histopatolojik bulguları da göz önüne alırsak yalnızca Gadobutrol verilen gruplarda bariz olan değişikliklerin nedeni ilaca bağlı değişiklikler olarak düşünülebilir. Yine yalnızca Gadobutrol uygulanan gruptaki ratlarda artan oksidatif stres göstergeleri de daha çok ilaca bağlı bir etkilenimi düşündürmektedir.

ÖZET

RATLARDA GADOBUTROLÜN, FARKLI KÜMÜLATİF DOZLARA VE UYGULAMA ŞEKLİNE BAĞIMLI BÖBREK YAN ETKİLERİNİN, KAN VE BÖBREKTE OKSİDAN-ANTIOKSİDAN DURUMLAR ÜZERİNE ETKİLERİNİN ARAŞTIRILMASI

Radyolojik kontrast ajanlar, doğru teşhis için sıkça kullanılan ve vazgeçilmez olan maddelerdir. Bu maddelerin böbrekte bazı yan etkileri tanımlanmıştır. Radyolojik kontrast ajanların neden oldukları renal hasarlanmaların etyolojisinde serbest radikallerin rolü ile ilgili pek çok çalışma yapılmaktadır.

Manyetik Rezonans Görüntüleme (MRG) kontrast ajanları diğer radyokontrast ajanlara göre nispeten çok daha az yan etkiye sahiptirler. Ancak bazı çalışmalarda, MRG kontrast ajanlarının çok yüksek kümülatif dozlarda uygulanmasından sonra, değişik derecelerde böbrek hasarlanmaları bildirilmiştir. Fakat bu hasarlanmanın etyopatogenezi henüz tam olarak aydınlatılamamıştır.

Biz çalışmamızda, MRG kontrast ajanı olan Gadobutrolün, intraperitoneal (IP) ve intravenöz (IV) kümülatif doz uygulamalarından sonra böbrek dokusundaki yan etkilerini, böbrekte ve kanda oksidatif strese neden olup olmadığını araştırdık. Oksidatif stres göstergesi olarak nitrik oksit (NO), malondialdehit (MDA) ve glutatyon (GSH) değerlerini araştırdık.

Çalışmamızda ratlar 3 kontrol ve 3 ilaç grubu olmak üzere 6 gruba ayrıldı. 5 mmol/kg dozda Gadobutrol, gruplardan birine 6 dozda IP, birine 6 dozda IV, diğerine ise 20 dozda IP olarak verildi. 3 kontrol grubuna ise aynı yöntemlerle aynı dozlarda salin uygulandı.

Tüm Gadobutrol verilen gruplarda, histopatolojik olarak böbrekte tubuler vakuolizasyon, intratubuler eritrosit birikimi ve tubuler cast oluşumu gibi bazı hasarlanmalar gözlemlendi.

Gadobutrol alan gruplardaki ratların böbrek dokusunda, oksidatif stres göstergelerinde, kontrol grubuna oranla istatistiksel olarak anlamlı düzeye ulaşmayan artış saptandı.

Gadobutrol verilen grupların deney sonu plazma MDA değerleri, kontrol grupları ile kıyaslandığında anlamlı düzeyde yüksek saptandı.

6 kez IV Gadobutrol verilen grupta plazmada, deney başlangıcı ile sonu arasında MDA ve NO değerlerinde anlamlı artış, GSH değerlerinde ise anlamlı azalma izlendi. 20 doz IP Gadobutrol verilen grupta plazmada, başlangıç değerlerine göre deney sonu MDA değerlerinde anlamlı artış saptandı. 6 doz IP uygulama yapılan grupta ise oksidatif stres göstergelerinde anlamlı düzeylere ulaşmayan artışlar saptandı.

20 doz IP Gadobutrol uygulanan gruptaki plazma MDA değeri, 6 doz IP uygulanan gruba göre anlamlı olarak daha yüksek, GSH değeri ise daha düşük saptandı. Bu sonuçlar, yüksek doz Gadobutrol uygulaması sonrası oksidatif stres göstergelerinde doza bağlı bir artışı desteklemektedir.

Sonuç olarak Gadobutrolün çok yüksek kümülatif dozlardaki uygulaması plazmada oksidatif stresi artırmaktadır. Fakat böbrek dokusunda oksidatif stres göstergelerindeki artış istatistiksel olarak anlamlı düzeylere ulaşmamaktadır. Bu durum, böbrek hasarlanmasında başka faktörlerin de rol oynayabileceğini düşündürmektedir.

Anahtar kelimeler: Kontrast ajan, Gadobutrol, kümülatif doz, böbrek hasarlanması, oksidatif stres.

SUMMARY

AN INVESTIGATION IN RATS OF GADOBUTROL REGARDING RENAL SIDE EFFECTS RELATED TO DIFFERENT CUMMULATIVE DOSAGES AND ADMINISTRATION METHOD, AND EFFECTS ON OXIDANT-ANTIOXIDANT CONDITIONS IN BLOOD AND KIDNEY

Radiologic contrast medias are used frequently for the exact diagnosis and therefore they are indispensable. However, some nephrotoxic side effects of these medias have been reported. Lots of investigations have been done about the role of free radicals as an etiology of renal damage by using contrast media.

MRI contrast medias have less side effects than the other radiocontrast medias. But different degrees of renal damage have been reported after administration of MRI contrast medias with high cumulative dosage in some investigations. But pathogenesis of this damage has not been explained yet.

In our study, we investigated that renal side effects of Gadobutrol as a MRI contrast agent which was administered via IP and IV routes in various cumulative dosage as well as the presence of oxidative stress in renal tissue and blood. As an indicator of oxidative stress, we measured the levels of NO, MDA and GSH.

In our study we divided rats into 6 groups, 3 of 6 as a drug group and the other 3 as a control group. Gadobutrol in 5 mmol/kg dosage was given to one group 6 times via IP, was given the other group 6 times via IV and was given to third group 20 times via IP. We gave salin to other remaining 3 groups with the same method and with same dosages.

In Gadobutrol groups, we demonstrated some damages like vacuolation of kidney tubules, intratubular erythrocyte accumulation and tubular cast formation.

The oxidative stress was found to be increased in the renal parenchyma of Gadobutrol groups when compared to the control groups. However, the difference did not reach statistically significant.

At the end of our study, values MDA in the Gadobutrol given groups were high meaningfully when we compared with control group.

In the plasma of group which was given 6 times Gadobutrol via IV, end levels of MDA and NO increased significantly when we compared with initial levels. On the other hand, levels of GDA decreased significantly. In the group of 20 doses Gadobutrol given via IP, when we compared with initial levels, there was increased values at the end of experiment. In the group of 6 doses given via IP, we showed that there was increase in the indicators of oxidative stress, but they were not meaningfully.

The levels of MDA in the group of 20 doses Gadobutrol given via IP was higher significantly than in the group of 6 doses via IP. But level of GSH was lower. These results support dose dependent increasement of oxidative stress finings after high dose Gadobutrol administration.

As a result, administration of Gadobutrol with a high cummulative dosages increases oxidative stress. But, oxidative stress findings of renal parenchyma can not reach statistically significant levels. This condition shows us that some other factors can play a role in the damage of kidney.

Key words: Contrast media, Gadobutrol, cummulative dosage, renal damage, oxidative stress

KAYNAKÇA

1. Cowper SE. Nephrogenic systemic fibrosis: the nosological and conceptual evolution of nephrogenic fibrosing dermatopathy. *Am J Kidney Dis* 2005;46(4):763–765.
2. Broome DR, Girguis MS, Baron PW, Cottrell AC, Kjellin I, Kirk GA. Gadodiamide-associated nephrogenic system fibrosis: why radiologists should be concerned. *AJR*. 2007;188:586-592
3. Product Monograph Gadovist® 1.0 (gadobutrol injection) 604 mg/mL (1.0 mmol/mL) For Intravenous Use Contrast Enhancement Agent for Magnetic Resonance Imaging (MRI) Bayer Inc. Revision Date: 77 Belfield Road October 25, 2007 <http://www.bayer.ca> Submission Control Number: 115680 © 2007, Bayer Inc.
4. Bussi S, Fouillet X, Morisetti A Toxicological assessment of gadolinium release from contrast media *Experimental and Toxicologic Patology* 2006, 58:323-330
5. Gandh SN, Brown MA, . Won g J G. MRG Contrast Agents for Liver Imaging: What, When, How1. *Radiographics* 2006; 26:1621–1636
6. Pınar T.MRG Tarihçesi, *Temel radyoloji Fiziği* 2005;199-202
7. Purcell EM., Torrey HC.,Pound RV.: Resonanceabsorption by nuclear magnetic moments in a solid. *Phys Rev* 1946;69:37-38
8. Oyar O, Yeşildağ A.: MRG nin tarihçesi, *Tıbbi Görüntüleme Fiziği* 2003;5:281
9. Ada E.:Magnetik rezonans görüntüleme de görüntü oluşturmada temel prensipler-I *Temel radyoloji Fiziği* 2005;207-213
10. Sabir N.: İ nstrumentasyon, magnetler, sarmallar, donanım ve güvenlik. *Temel radyoloji Fiziği* 2005;203206
11. Yeşildağ A, Oyar O.: MRG’de görüntü karakteristikleri , *Tıbbi Görüntüleme Fiziği* 2003; 5;294-295
12. Yeşildağ A, Oyar O.: MRG’de kullanılan inceleme sekansları, *Tıbbi Görüntüleme Fiziği* 2003; 5;300-306
13. Oyar O. *Radyolojide Temel Fizik Kavramlar*. 1.baskı. İzmir, Tayf Ofset, 1998; 213-226
14. Dayanır Y.Ö. MRG kullanılan kontrast maddeler ve manyetizasyon transfer görüntüleme; *Temel radyoloji fiziği*; 2004-2005; 217-222
15. O. Akın, A. M. Ağıldere, MRG’de kullanılan kontrast maddeler *Tanısal ve Girişimsel Radyoloji* 2000;6, 348-354
16. Frank H, Weissleder R, Brady TJ. Enhancement of MR angiography with iron oxide: Preliminary studies in whole-blood phantom in animals. *AJR* 1994; 162:209- 213
17. Mattrey RF, Trambert MA, Brown JJ, et al. Perflubron as an oral contrast agent for MRG imaging: Results of a phase III clinical trial. *Radiology* 1994; 191:841-848.

18. Brown JJ, Duncan JR, Heiken JP, et al. Perfluorooctylbromide as a gastrointestinal contrast agent for MRG imaging: Use with and without glucagon. *Radiology* 1991; 181:455-460
19. Kaminsky S, Laniado M, Gogoll M, et al. Gadopentate dimeglumine as a bowel contrast agent: Safety and efficacy. *Radiology* 1991; 178:503-508
20. Molecular Imaging and Contrast Agent Database Gadobutrol Gd-DO3A-butrol Kenneth T. Cheng National Center for Biotechnology Information, National Library of Medicine, National Institutes of Health E-mail: chengke@mail.nih.gov numara verilecek Created: February 15, 2006 Updated: October 18, 2007
21. Vogler H.,Platzek J., Pre-clinical evaluation of Gadobutrol:a new, neutral, ekstracelluler contrast agent for magnetic rezonans imaging.*European Journal of Radiology* 21 (1995); 1-10
22. Shellock F.G.,Kanal E. Safety of Magnetic Rezonans İmaging Kontrast Agents,. *Journal of Magnetic Resonance İmaging* 1999;10:477-484
23. Oyar O, Savaş R, Elmas N. İzmir Devlet Hastanesi Tıp Dergisi. 1993: XXXI (2); 268-273
24. Normann PT, Hustvedt SO, Storflor H, et al. Preclinical safety and pharmacokinetic profile of gadodiamide injection. *Clinical MRI* 1995; 5:95-101.
25. Thomsen HS, Morcos SK, Barrett BJ. Contrast-induced nephropathy: The wheel has turned 360 degrees. *ACTA Radiologica*. 2008;6; 646-655
26. Derici Ü, Yılmaz M. Kontrast maddeye bağlı nefrotoksisite ve tedavi yaklaşımları. *Türk Nefroloji ve Transplantasyon Dergisi*. 2000: 1; 14-17
27. Goldenberg I, Matetezy S. Nephropathy induced by contrast media: pathogenesis, risk factors and preventive strategies. *CMAJ*. 2005;172(11); 1461-1471
28. Acute Renal Failure: Pathophysiology of Nephrotoxic Acute Renal Failure. *Atlas of Diseases of the Kidney*, Rick G. Schnellmann and Katrina J. Kelly. Chapter 15,1-14. (www.kidneyatlas.org) (En son erişim tarihi: 20 Kasım2008)
29. Katzberg RW. Urography into the 21st century: new contrast media, renal handling, imaging characteristics, and nephrotoxicity. *Radiology* 1997; 204(2): 297-312
30. Thomsen H.S, Morcos S.K: Radiographic Contrast Media. *BJU International*. 2000;86: 1-10
31. GE Healthcare Paper on Nefrogenic Systemic Fibrosis March 2007
32. Manual On Contrast Media Version 6 2008 ACR
33. Cowper SE, Su LD, Bhawan J, Robin HS, LeBoit PE. Nephrogenic fibrosing dermopathy. *Am J Dermatopathol* 2001; 23:383- 393
34. Ting WW, Stone MS, Madison KC, Kurtz K. Nephrogenic fibrosing dermopathy with systemic involvement. *Arch Dermatol* 2003; 139:903–906

35. Wael M. Shabana, Richard H. Cohan, James H. Ellis, Nephrogenic Systemic Fibrosis: A Report of 29 Cases, *AJR* 2008; 190:736–741
36. Alan S. Boyd, Gadolinium deposition in nephrogenic fibrosing dermopathy, *J Am Acad Dermatol.*2006;10-48
37. Cowper SE, Boyer PJ. Nephrogenic systemic fibrosis: an update. *Curr Rheumatol Rep* 2006; 8:151-157.
38. Session: ISP: Genitourinary (Contrast Materials and Adverse Effects) Comparison of Gd-containing MRI Contrast Agents: Their in Vivo Stability and Potential Role in the Pathogenesis of NSF Tuesday, November 27 2007
39. Valko M, Leibfritz D, Mancol J, Cronin M.T.D, Mazur M, Telser J. Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease. *The International Journal of Biochemistry&Cell Biology.* 2007: 39; 44-84
40. Gomez-Cabrera MC, Borrás C, Pallardo F, Sastre J, Ji LL, Vina J, et al. Decreasing xanthine oxidase-mediated oxidative stress prevents useful cellular adaptations to exercise in rats. *J Physiol.*2005;567:113-120
41. Nishiyama Y, Ikeda H, Haramaki N, et al. Oxidative stress is related to exercise intolerance in patients with heart failure. *Am Heart J.* 1998;135:115
42. McCormick M, Denning G. M, Rezska G. M, Bilski P, Buettner G. R, Rasmussen G.T, Railsback M.A, Britigan B.E. Biological effects of menadione photochemistry: effects of menadione on biological systems may not involve classical oxidant production. *Biochem J* 2000; 350: 797-804
43. Kalender S, Kalender Y, Ogutcu A, Uzunhisarcikli M, Durak D, Açikgöz F. Endosulfan-induced cardiotoxicity and free radical metabolism in rats: the protective effect of vitamin E. *Toxicology* 2004: 202; 227-235
44. Valko M, Rhodes CJ, Mancol J, Izakovic M., Mazur M., Free radicals, metals and antioxidants in oxidative stress-induced cancer. *Chemico-Biological Interactions.* 2006: 160;1-40
45. Cherubini A, Ruggiero C, Polidori MC, Mecocci C, et al. Potential markers of oxidative stress in stroke. *Free Radical Biology & Medicine* 2005; 39: 841-852.
46. Memisogullari R, Taysi S, Bakan E, Capoglu I, et al. Antioxidant Status and Lipid Peroxidation in Type II Diabetes Mellitus. *Cell Biochem Func.* 2003; 21: 291-296
47. Vincent AM, Russell JW, Low P, Feldman EL, et al. Oxidative Stress in the Pathogenesis of Diabetic Neuropathy. *Endocrine Reviews.* 2004; 25: 612–628
48. Kuyumcu A, Düzgün A.P, Özmen M. M, Besler H.T, et al. Travma ve enfeksiyonda nitrik oksit rolü. *Ulus Travma Dergisi* 2004;10(3):149-159
49. Shiva S, Brookes PS, Patel RP, Anderson PG, Darley-Usmar VM, et al. Nitric oxide partitioning into mitochondrial membranes and the control of respiration at cytochrome c oxidase. *Proc Natl Acad Sci USA* 2001;98(13):7212-7217.

50. Gordon CA, Himmelfarb J. Antioxidant therapy in uremia: Evidence-Based medicine? *Seminars in Dialysis*. 2004; 17(5); 327-332
51. Halliwell B, Gutteridge JMC. *Free Radicals in Biology and Medicine*, Third Edition, Oxford Science Publications, 2001:22-24
52. Mates JM. Effect of antioxidant enzymes in the molecular control of reactive oxygen species toxicology. *Toxicology*. 2000; 153; 83-104
53. Vardi N, Parlakpinar H, Ozturk F, Acet A. Gentamicin-induced nephrotoxicity and protective effect of caffeic acid phenethyl ester in rats. *Fundamental & Clinical Pharmacology*. 2005; 19; 173–177
54. Cherubini A, Ruggiero C, Polidori MC, Mecocci C, et al. Potential markers of oxidative stress in stroke. *Free Radical Biology & Medicine* 2005; 39: 841-852
55. Taysi S, Polat F, Gul M, Sari RA, Bakan E, et al. Lipid peroxidation, some extracellular antioxidants, and antioxidant enzymes in serum of patients with rheumatoid arthritis. *Rheumatology International* 2002; 21 (5): 200–204
56. Kim YG, Kim SK, Kwon JW, Park OJ, Kim SG, Kim YC, et al. Effects of cysteine on amino acid concentration and transsulfuration enzyme activities in rat liver with protein-calorie malnutrition. *Life Sci* 2003; 72:1171-81
57. Fang YZ, Yang S, Wu G, et al. Free radicals, antioxidants and nutrition. *Nutrition* 2002; 18:872-9
58. Lubberda Z. The role of glutathione in mammalian Gametes. *Reproductive biology* 2005; 5(1):5-17
59. Chavan S, Sava L, Saxena V, Pillai S, Sontakke A, Ingole D. Reduced glutathione: Importance of specimen collection. *Indian Journal of Clinical Biochemistry* 2005; 20(1):150-152
60. Cherubini A, Ruggiero C, Polidori MC, Mecocci C, et al. Potential markers of oxidative stress in stroke. *Free Radical Biology & Medicine* 2005; 39: 841-852.9
61. Hughes DA, Wright AJ, Finglas PM, Polley AC, Bailey AL, Astley SB, Southon S, et al. Effects of lycopene and lutein supplementation on the expression of functionally associated surface molecules on blood monocytes from healthy male nonsmokers. *J Infect Dis*. 2000; 182 Suppl 1:11-15
62. Matos HR, Di Mascio P, Medeiros MH, et al. Protective effect of lycopene on lipid peroxidation and oxidative DNA damage in cell culture. *Arch Biochem Biophys* 2000; 383 (1) :56-59
63. Memisogullari R, Bakan E. Levels of ceruloplasmin, transferrin, and lipid peroxidation in the serum of patients with Type 2 diabetes mellitus. *Journal of Diabetes and Its Complications* 2004; 18: 193-197
64. Miranda KM, Espey MG, Wink DA, Nitric Oxide: *Biol and Chem*, 2001; 5(1) :62-71

65. Casini, A. et al. Lipid peroxidation and cellular damage in extrahepatic tissues of bromobenzene intoxicated mice. *Am. J. Pathol.* 123: 520-531; 1986
66. Kurtel H, Granger DM, Tso P, et al. Vulnerability of intestinal interstitial fluid to oxidant stress. *Am J Physiol* 1992;263:573–578
67. Aykaç, G. et al. The effect of chronic ethanol ingestion on hepatic lipid peroxide, glutathione, glutathione peroxidase and glutathione transferase in rats. *Toxicology* 32: 71-76; 1985
68. Öktem F., Arslan M.K., Ozguner F., Candir Ö., Yilmaz H.R., Ciris M., Uz F. In vivo evidences suggesting the role of oxidative stres in pathogenesis of vancomycin-induced nephrotoxicity: Protection by erdosteine. *Toxicology.* 2005: 215; 227-233
69. Özen S, Akyol Ö, Iraz M et all. Role of Caffeic Acid Phenethyl Ester, an Active Component of Propolis, against Cisplatin-induced Nephrotoxicity in Rats. *J. Appl. Toxicol.*2004: 24; 27–35