

T.C.
Süleyman Demirel Üniversitesi Tıp Fakültesi
Genel Cerrahi Anabilim Dalı

**DENEYSEL İNTESTİNAL İSKEMİ VE REPERFÜZYON
MODELİNDE CAFFEİC ACİD PHENETHYL ESTER İN
AKCİĞER HASARINI ÖNLEMEDEKİ ETKİNLİĞİ**

Dr. KADİR KUMBUL

UZMANLIK TEZİ

DANIŞMAN

Yrd.Doç. Dr. ÖMER RIDVAN TARHAN

**Bu tez Süleyman Demirel Üniversitesi Araştırma Fonu tarafından
1364-TU-06 proje numarası ile desteklenmiştir.**

2007 – ISPARTA

ÖNSÖZ

Uzmanlık eğitimim süresince bilgilerinden ve tecrübelerinden yararlandığım, bana her konuda destek ve yardımlarını esirgemeyen başta Anabilim Dalı başkanımız Prof.Dr.Mahmut Bülbül olmak üzere Prof. Dr. Nihat Kaymakçıoğlu, Doç.Dr.Erol Eroğlu, Yrd.Doç.Dr. Ömer Rıdvan Tarhan, Yrd.Doç.Dr. İbrahim Barut, Yrd.Doç.Dr. Celal Çerçi'ye teşekkürü borç bilirim.

Asistanlığım süresince birlikte çalıştığım tüm asistan arkadaşlarıma, Genel Cerrahi hemşire ve personeline teşekkür ederim.

Bu çalışmanın tamamlanmasındaki katkılarından dolayı; özellikle tez danışmanı hocam Yrd.Doç.Dr. Ömer Rıdvan Tarhan'a, Patoloji Anabilim Dalı başkanı Doç. Dr Nilgün Kapucuoğlu'na, Biyokimya Anabilim Dalı öğretim üyesi Doç. Dr. Recep Sütçü'ye ve Dr. H. Yusuf Kara'ya teşekkür ederim.

Ayrıca manevi desteklerini benden hiçbir zaman esirgemeyen aileme ve Hasibe Kocaboyun'a teşekkürü borç bilirim.

Dr. Kadir KUMBUL

SİMGELER VE KISALTMALAR

AMP	:	Adenozin Mono Fosfat
ATP	:	Adenozin TriFosfat
CAPE	:	Caffeic Acid Phenethyl Ester
CAT	:	Katalaz
CINC	:	Sitokin Bağımlı Nötrofil Kemoatraktan
COX	:	Siklooksijenaz
DNA	:	Deoksiribo Nükleik Asid
EDTA	:	Etilen Daimin Tetra Asetik Asit
ELAM	:	Endotelial Lökosit Adezyon Molekülü
GMP	:	Guanozin Mono Fosfat
GSH	:	Glutasyon
GSH-Px	:	Glutasyon Peroksidaz
GSSG	:	Okside Glutasyon
GST	:	Glutasyon S transferaz
HOCl	:	Hipoklorus Radikali
HPETE	:	Hidroperoksi Eikoz Tetraenoik Asid
H ₂ O ₂	:	Hidrojen Peroksit
ICAM	:	İntraselüler Adezyon Molekülü
İİR	:	İntestinal İskemi ve Reperfüzyon
İL	:	İnterlökin
İMP	:	İnozin Mono Fosfat
İR	:	İskemi/Reperfüzyon
LTB ₄	:	Lökotrien B ₄
MDA	:	Malondialdehit
MFS	:	Mononükleer Fagositer Sistem
MPO	:	Myeloperoksidaz
NADP	:	Nikotinamid Adenin Dinükleotid Fosfat
NF-κB	:	Nükleer Faktör Kappa B
NO	:	Nitrik Oksit
NOS	:	Nitrik Oksit Sentetaz
OH ⁻	:	Hidroksil Radikali
PAF	:	Platelet Aktive Edici Faktör
PLGSH	:	Fosfolipit Hidroperoksit Glutasyon
PMNL	:	Polimorfonükleer Lökosit
ROS	:	Reaktif Oksijen Türevleri
SMA	:	Süperior Mezenterik Arter
SOD	:	Süperoksit Dismutaz
TBA	:	Tiyobarbitürik Asit
TBARS	:	Tiyobarbitürik Asid Reaktif Maddeleri
TCA	:	Triklorasetik Asid
TNF	:	Tümör Nekroz Faktör
TxA ₂	:	Tromboxan A ₂
XO	:	Ksantin Oksidaz
VCAM	:	Vasküler Hücre Adezyon Molekülü

İÇİNDEKİLER

Önsöz	i
Simgeler ve kısaltmalar	ii
<u>1.GİRİŞ</u>	1
<u>2.GENEL BİLGİLER</u>	4
2.1 İİR Hasarı	4
2.2 İİR sonrası akciğer hasarı	12
2.3 Endotel koruyucu ajanlar	17
2.4 Serbest Radikaller	17
2.4.1 Reaktif oksijen türleri	18
2.4.1.1 Süperoksit radikali	18
2.4.1.2 Hidrojen peroksit	18
2.4.1.3 Hidroksil radikali	19
2.4.1.4 Singlet oksijen	19
2.4.2 Hücredeki serbest radikal kaynakları	19
2.4.2.1 Endojen kaynaklar	19
2.4.2.2 Eksojen kaynaklar	20
2.4.3 Reaktif oksijen türlerinin rolü	20
2.5 Antioksidanlar	22
2.5.1 Doğal (endojen) Antioksidanlar	22
2.5.1.1 Enzimler	22

2.5.1.2	Enzim olmayanlar	24
2.5.1.3	Diğer Antioksidanlar	25
2.5.2	Ekzojen Antioksidanlar	25
2.5.2.1	İlaçlar	25
2.5.2.2	Gıda Antioksidanları	26
2.6	Myeloperoksidaz (MPO)	26
2.7	Malondialdehit (MDA)	27
2.8	Caffeic Acid Phenethyl Ester (CAPE)	28
2.8.1	CAPE'nin yapısı ve kimyasal özellikleri	28
2.8.2	CAPE'nin fonksiyonel özellikleri	29
2.8.3	CAPE'nin antioksidan etkisi	30
<u>3.MATERYAL VE METOD</u>		32
3.1	Hayvanlar	32
3.2	Gruplar	32
3.3	Anestezi ve cerrahi işlem	33
3.4	Kullanılan malzeme ve aletler	36
3.5	Kullanılan kimyasal maddeler	36
3.5.1	MPO tayini için kullanılan Elisa kiti	36
3.5.2	Lipit peroksidasyonu tayini için kullanılan kimyasal maddeler	37
3.5.3	GSH-Px tayini için kullanılan kimyasal maddeler	37
3.5.4	SOD tayini için kullanılan kimyasal maddeler	37
3.6	Kullanılan çözeltiler	38

3.6.1	Lipit peroksidasyonu tayini için kullanılanlar	38
3.6.2	GSH-Px tayini için kullanılanlar	38
3.6.3	SOD Tayini İçin Kullanılanlar	38
3.7	Yöntem	39
3.7.1	MPO aktivitesinin ölçümü	39
3.7.2	Lipit peroksidasyonunun tayini	39
3.7.3	GSH-Px aktivitesinin ölçümü	40
3.7.4	SOD aktivitesinin ölçümü	41
3.8	Homojenizasyon	43
3.9	Akciğer doku örneklerinin histopatolojik olarak incelenmesi	43
3.10	İstatiksel inceleme	43
<u>4. BULGULAR</u>		45
4.1	Myeloperoksidaz	46
4.2	Malondialdehit	47
4.3	Glutasyon peroksidaz	48
4.4	Süperoksit dismutaz	49
4.5	Histopatolojik bulgular	50
<u>5.TARTIŞMA VE SONUÇ</u>		53
<u>6.ÖZET</u>		61
<u>7.SUMMARY</u>		62
<u>8.KAYNAKLAR</u>		63

1. GİRİŞ

İskemi, organı veya dokuyu perfüze eden kan akımındaki yetersizliğe bağlı olarak gelişen geri dönüşümlü veya dönüşümsüz hücre / doku zedelenmesidir. İntestinal iskemi ve reperfüzyon (IIR) genellikle morbidite ve mortalite ile sonuçlanan ciddi bir tablodur (1). İntestinal kan akımında bozukluğa yol açan durumlar oldukça geniş bir spekturuma sahip oldukları için her yaş grubundan hasta IIR riski altındadır. Yenidoğanda görülen nekrotizan enterkolitin etyopatogenezinde IIR vardır. Daha büyük yaş grubunda malrotasyon ve volvulus IIR sebebi olabilir. Kalp ve damar hastalığı olan yaşlılarda ise arteriel emboliye veya in situ trombüse bağlı olarak IIR gelişebilir(2). Ayrıca kanama, hipovolemi, kalp yetmezliği, travma, inkarsere inguinal herni, invaginasyon, hipoksi, hipotansiyon, koagülopatiler, vaskülopatiler, kardiyak ve aortik cerrahi durumlarda da IIR ortaya çıkabilir (3-4).

İskemi sonrasında hücrelerde pek çok metabolik ve yapısal değişiklikler oluşmaktadır. İskemi hücrede oksidatif fosforilasyonu bozarak hücre içi adenosin trifosfat (ATP) ve fosfokreatin sentezinde azalma yol açar. Bu durum hücre membranının ATP'ye bağımlı iyonik pompa fonksiyonunu bozarak hücreye daha fazla kalsiyum, sodyum ve su girmesi ile sonuçlanmaktadır. İskemi sırasında adenin nükleotidinin yıkımı da artmaktadır. Bu durum ise reaktif oksijen türevlerinin (ROS) prekürsörü hipoksantin hücre içi birikimini artırmaktadır. İskemi sonrasında o bölgedeki kan akımının yeniden sağlanması (reperfüzyon) ve hücre içi moleküler oksijenin yeniden sunulması ile birlikte ROS türevleri hızla oluşmaktadır. İskemi aynı zamanda endotel hücrelerinde bazı proinflamatuvar gen ürünlerinin (lökosit adezyon molekülü, sitokinler vb.) ve bioaktif bileşiklerin (endotelin, tromboksan A2 vb.) sentezini artırırken, bazı koruyucu gen ürünlerinin (yapısal nitrik oksit sentetaz (e NOS), sikloosijenaz-2 (COX-2)) ve bu enzimlerin ürünlerinin (nitrik oksit(NO), prostasiklin,adenozin) ekspresyon ve sentezini baskılamaktadır (5,6). Geri dönüşsüz hücre hasarını önleyebilmek için

organa/dokuya yeniden kan akımının sağlanması gerekmektedir. Ancak reperfüzyonun gerçekleştirilmesi, iskemik dokularda iskeminin dokuda/organda oluşturduğu hasardan daha fazla bir hasara yol açabilmektedir (7). İskemi ve reperfüzyon periyodlarında oluşan bu zararlı etkilerin tümü İİR hasarı olarak adlandırılmaktadır.

İR herhangi bir organ yada dokuda geliştikten sonra iskeminin süresi, şiddeti ve organın büyüklüğüne bağlı olarak hem o organda hemde uzak organlarda hasar gelişir. Temel olarak iskemi sonrası reperfüze edilen organda hücrel bütünlüğün bozulması sonucu ödem ve organ fonksiyon bozukluğu ile karakterize inflamatuvar ve metabolik bir hasar başlar. Olayın şiddetine bağlı olarak hasar hiçbir morfolojik değişikliğin olmadığı durumdan, bariz makroskobik hasarın olduğu bir düzeye kadar değişik derecelerde olabilir. Olay çoğu kez o organda sınırlı kalmayıp aktive olan bir çok sistem ve toksik medyatörlerin etkisi ile başta akciğerler olmak üzere karaciğer, kalp, beyin ve böbrekler gibi uzak organlarda hasar oluştururlar. İİR döngüsünden sonra gelişen sistemik inflamatuvar yanıtın en fazla akciğerler etkilenirler(8). İİR sonrasında gelişen sıkıntılı akciğer hasarının büyük bir kısmından polimorfonükleer lökositler (PMNL) sorumludur. İİR, barsağın mukoza engelini bozarak bakterilerin ve endotoksinlerin sistemik dolaşıma geçmesine neden olur(3,9,10,11). Endotoksin dolaşımdaki monositlerin, akciğer ve karaciğer gibi farklı dokulardaki makrofajların aktivasyonunu tetikler. Aktive monosit ve makrofajlardan çeşitli sitokinler ve inflamatuvar mediatörler açığa çıkarak sistemik inflamatuvar yanıtın gelişmesine neden olur (3,9,10,12).

Sistemik inflamatuvar yanıtın gelişmesi ile PMNL aktivasyonu, pulmoner sirkülasyonda PMNL sekestrasyonu ve PMNL-endotelial hücre adezyonu söz konusudur(1). PMNL'lerin endotel hücrelerine adezyonu sonrası açığa çıkan toksik maddeler sonucu endotelial tabakada hasar oluşur, kapiller permeabilite artar, alveolar ve interstisyel ödem gelişir(13).

İİR akciğerlerde önemli hasarlara neden olmaktadır. İİR sırasında oluşan akciğer hasarının etiopatogenezine ve önlenmesine yönelik çalışmalar günümüzde devam etmektedir. İİR'a bağlı akciğer hasarının patogenezinde serbest radikal ve antioksidan enzimlerini rolünün belirlenmesi, antioksidan tedavi denemelerini gündeme getirmiştir(14,15).

Propiller, güçlü antimikrobiyal, antiinflamatuvar, antioksidan ve antineoplastik aktiviteleri olan bal arıları tarafından toplanan ürünlerdir. Propillerin aktif bir komponenti olan Caffeic Acid Phenethyl Ester (CAPE) bu biyolojik aktivitelerin tümünden sorumlu tutulmakta ve kullanıldığında insan nötrofillerinde ROS'lerini bloke ettiği gösterilmiştir(15). Yine son yıllarda yapılmış olan bir çok çalışmada antioksidan özelliğe sahip olan CAPE'nin İİR'dan direk etkilenen organ ve dokularda reaktif oksijen radikallerine bağlı olarak gelişen hasarları önlediği saptanmıştır(14).

Bu çalışmadaki amacımız; İİR oluşturulan ratlarda, antioksidan ve antiinflamatuvar özelliği olan CAPE'nin, İİR sonrası sonrasında gelişen uzak organ hasarlarından en sık görülen akut akciğer hasarını önlemedeki etkinliğini araştırmaktır.

2.GENEL BİLGİLER

2.1 İİR hasarı

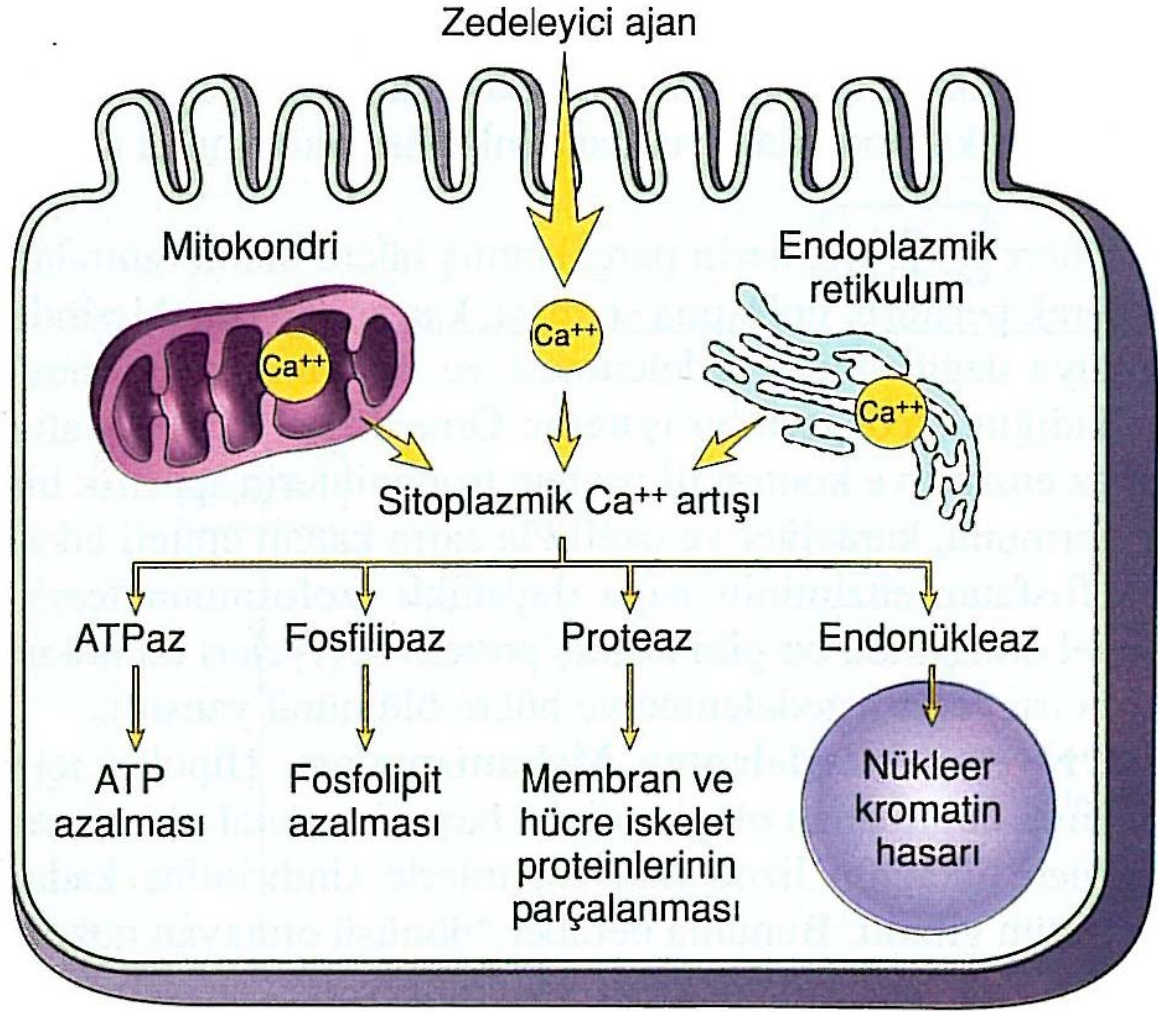
Günlük uygulama içerisinde tıbbın pek çok dalında iskemi ve reperfüzyonun yer aldığı olgular vardır. Şok, yanık, sepsis, pankreatit gibi olgularda ortaya çıkan hipovolemi ile iskemi ve bu durumların resüsite edilmesi ile de reperfüzyon hasarı oraya çıkmaktadır. Serebrovasküler olaylarda, myokard infarktüsünde, mezenteriyovasküler olaylarda uygulanan trombolitik tedavi veya revaskülarizasyon ameliyatları da yine reperfüzyon hasarına neden olmaktadır. Travmalarda ve travma cerrahilerinde hipovolemi yada kanama kontrolü nedeniyle yapılan klemp, tampon uygulamaları iskemiye neden olurken resüsitasyon sonrası mutlak bir reperfüzyon ile yine İİR hasarı gündeme gelmektedir. Kardiovasküler cerrahide aort yada periferik arter klemp uygulaması sonrası ortaya çıkan tablo İİR hasarı ile karakterizedir. Transplantasyon cerrahisinde kaçınılmaz olarak transplante edilecek organın iskemi ve reperfüzyonu söz konusu olup oluşan hasar greft fonksiyonlarını etkilemektedir. Özetle bütün cerrahi işlemler sırasında dokuların iskemisi ve sıklıkla bunun takip eden bir reperfüzyon periyodu vardır.

İntestinal kan akımındaki azalma iskemik hasar ile sonuçlanmaktadır. Fakat kan akımı geri döndüğü zaman, reperfüzyon hasarı adı verilen ve iskemik hasardan daha şiddetli bir hasar meydana gelmektedir. Reperfüzyon hasarının oluşmasında iki mekanizma söz konusudur. Bunlardan ilki serbest oksijen radikallerinin açığa çıkması, diğeri ise hidrolitik bir enzim olan fosfolipaz A₂' nin iskemik dönemde kalsiyum etkisiyle aktive olarak membranlardaki yağ asidlerini parçalamasıdır (16). PMNL'ler myeloperoksidaz (MPO) enzimi ve intestinal mukoza hücrelerindeki ksantin oksidaz (XO) enzimi etkisiyle serbest oksijen radikalleri ortaya çıkar (17). Fosfolipaz A₂ hücre membranındaki yağ asidlerini fosfolipidlerden ayıran hidrolitik bir enzimdir. Fosfolipaz A₂' nin etkisiyle lesitinden lizolesitin, sefalinden lizosefalin, fosfatidilkolinden lizofosfatidilkolin meydana gelir.

Fosfolipaz A₂ ayrıca prostaglandinlerin ve lökotrienlerin üretimini de uyarır. Lizolesitin çok sitotoksik bir maddedir. Ayrıca lizofosfatidilkolin normalde iskemiden sonra görülen intestinal permeabiliteyi oldukça şiddetlendirir (17,18,19).

İskemide hücre zedelenmesinin patogeneğinde oksijen yetersizliğinin önemi belirtilmekle birlikte kısmen artmış aktif oksijen türevleri de hücre ölümünün önemli araçlarıdır. Görüleceği gibi bu serbest radikal türevleri hücre üzerinde lipid peroksidasyonu ve diğer zararlı etkilere neden olur(15).

Sitoplazmik serbest kalsiyum normalde ATP bağımlı kalsiyum taşıyıcıları ile oldukça düşük yoğunluklarda (0.1 M den az) tutulur. İskemi veya toksinler hücre dışı kalsiyumun plazma membranından içeri akışına yol açar. Bunu hücre içi stoklardan kalsiyumun serbest bırakılması izler. Artan sitoplazmik kalsiyum sıra ile çeşitli fosfolipazları (membran hasarını ilerletir), proteazları (yapısal ve membran proteinlerini katabolize eder), ATPazları (ATP kaybını hızlandırır) ve endonükleazları (genetik materyali parçalar) aktive eder (6).(şekil 1).



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

Hipoksinin ilk etkisi hücrenin aerobik solunumu yani mitokondrilerdeki oksidatif fosforilasyonu üzerinedir. Oksijen basıncının azalması sonucu hücre içi ATP üretimi belirgin olarak azalır. ATP azalmasının hücre içindeki birçok sistemler üzerinde etkisi olur. Yukarıda tanımlandığı gibi sitoplazmik serbest kalsiyumda bir artış vardır. Ayrıca plazma membranının ATP enerjili sodyum pompasının aktivitesi azalır. Bunu sodyumun hücre içinde birikimi ve potasyumun hücre dışına çıkışı izler. Sodyum eriyiğinin net artışı, suyun izoozmotik artışı ile birlikte olup akut hücresel şişmeye neden olur. Bu şişme inorganik fosfatlar, laktik asit ve purin nükleozitleri gibi diğer metabolitlerin birikimi ile artan ozmotik yükü daha da artır.

Hücresel ATP de azalma ile birlikte adenozin monofosfattaki (AMP) artma da fosfofruktokinaz enzimini uyararak glikojenden ATP üretimi ile hücrenin enerjisini temin amacıyla gelişen anaerobik glikoliz hızını artırır. Sonuç olarak glikojen hızla tükenir. Artan glikoliz de fosfat esterlerinin hidrolizi ile laktik asit ve inorganik fosfatların birikimine neden olarak hücre içi pH'nın düşmesine yol açar(6).

Sonraki olay ribozomların granüllü endoplazmik retikulumdan ayrılması ve polizomlardan monozomların oluşumu ile protein sentezinde azalmadır. Bu aşamadan sonra iskemi hala devam ederse irreversibl zedelenme gelişir. Morfolojik olarak irreversibl zedelenmeye mitokondrilerin daha şiddetli vakuolizasyonu ve mitokondri matriksinde şekilsiz, kalsiyumdan zengin yoğunlukların birikimi eşlik eder(6).

Membran hasarının birçok potansiyel nedeni vardır(şekil 2).

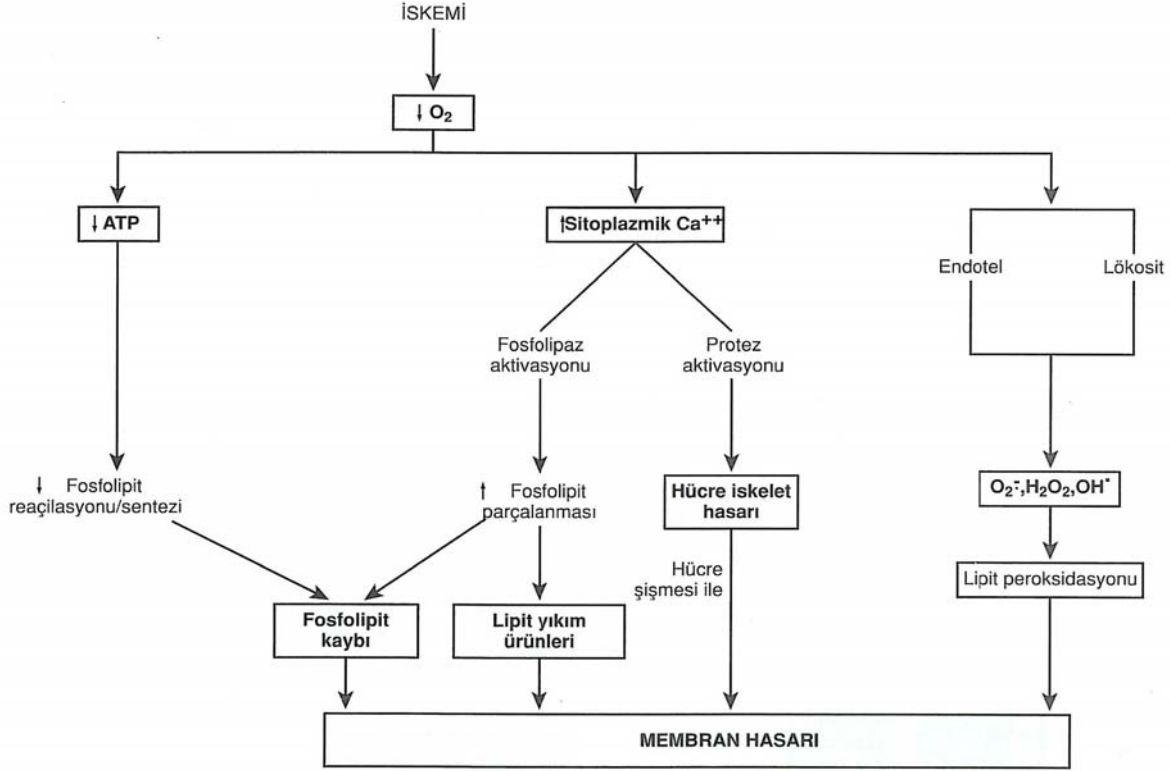
1-Membran fosfolipitlerinin ilerleyici kaybı: İskemiye bağlı kalsiyum artışı ile endojen fosfolipazların aktivasyonu artan parçalanmaya yol açabilir.

2- Hücre iskelet anormallikleri: Hücre içi kalsiyumun artması ile aktive olan proteazlar hücre çatısına zarar verebilirler.

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

4- Lipit yıkım ürünleri: Fosfolipit parçalanması sonucu iskemik hücrelerde biriken bu katabolik ürünler membranlar üzerinde deterjan etkisi yapar.(6).

Membran hasarının mekanizmaları ne olursa olsun sonuç, yukarıda tanımlanan olaylarla kalsiyumun bol miktarda hücre içine girmesidir(6).



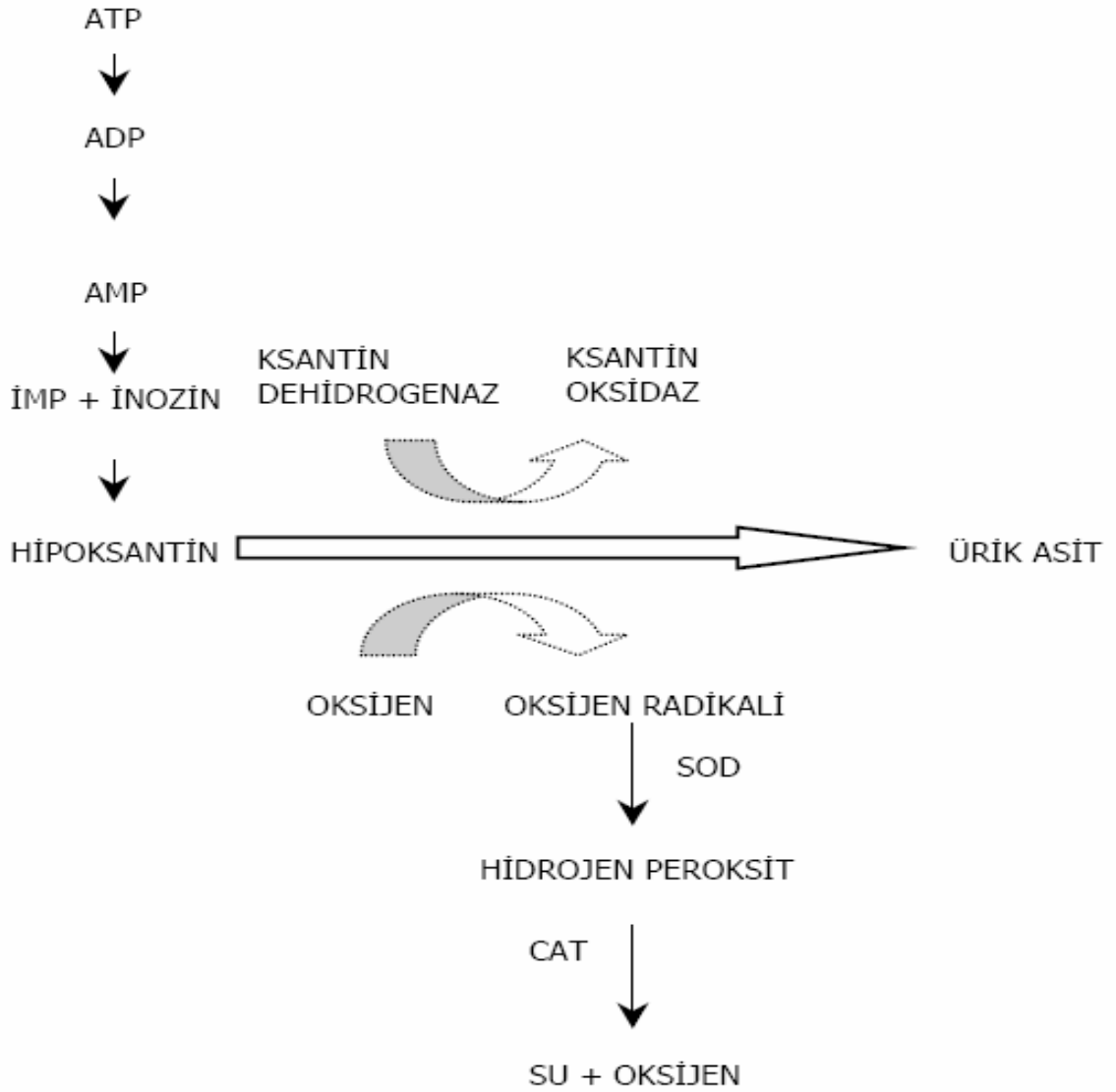
Şekil 2: İskemide membran hasarının mekanizmaları.

İskemide ATP sentezi durmakta fakat tüketimi devam etmektedir. ATP sırayla AMP ve son olarak da adenezine kadar parçalanır. Adenezin hızla hücre dışı ortama çıkarak burada inozin üzerinden hipoksantine çevrilir. Normoksik durumlarda hipoksantin ürik aside metabolize olur. Bu reaksiyonu ksantin dehidrogenaz enzimi katalize eder. Hipoksik durumlarda ise hipoksantin ürik aside metabolize olmadan iskemik dokuda birikir, ksantin dehidrogenaz enzimi ise ksantin oksidaza çevrilir.

Reperfüzyon ile moleküler oksijenin dokuya gelmesiyle hipoksantin, ksantin oksidaz enzimi ile ürik aside çevrilirken serbest oksijen radikali oluşur. Serbest oksijen radikali süperoksit dismutaz enzimi etkisiyle hidrojen peroksit ve oksijene dönüşür. Hidrojen peroksit ise katalaz enzimi etkisiyle su ve oksijene çevrilir (17). (şekil 3)

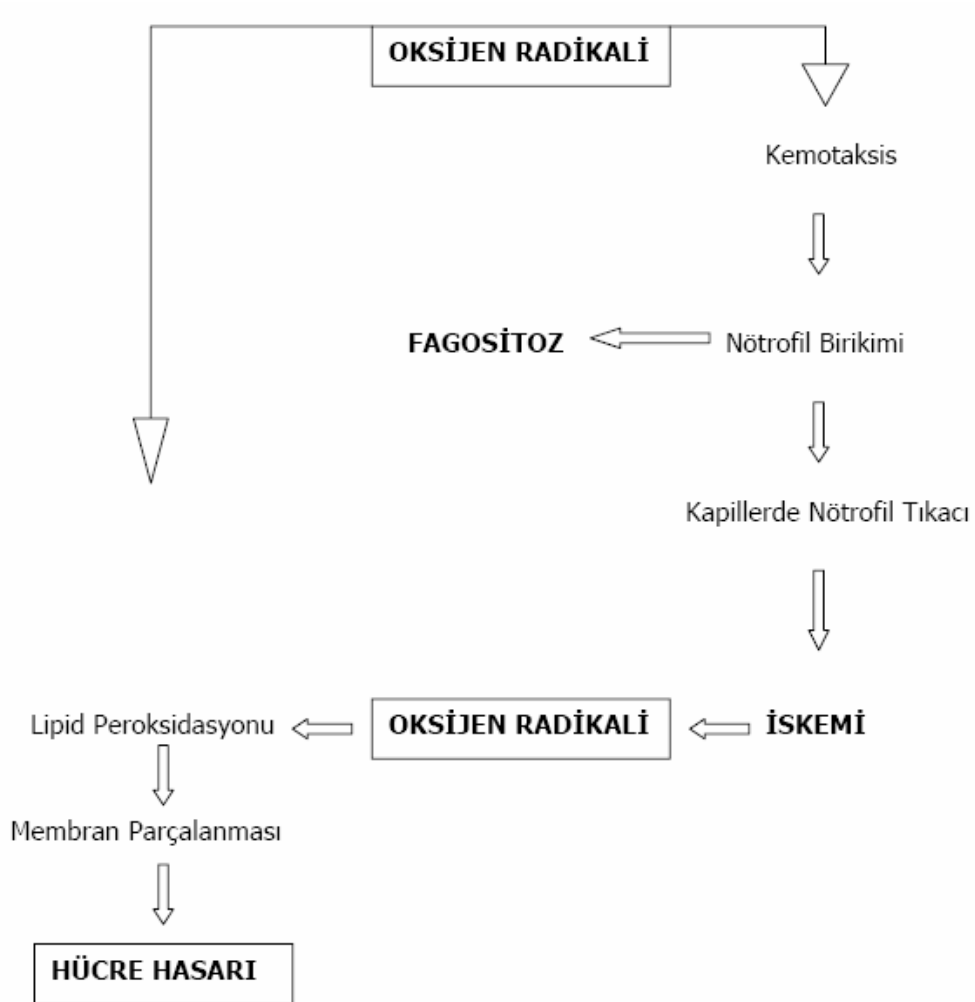
Serbest oksijen radikalleri hem dokuya doğrudan zarar vermekte hem de PMNL'lerin hasarlı dokuda birikmesini sağlamaktadır. Dokuya gelen aktive PMNL'ler myeloperoksidaz, elastaz, proteaz, kollajenaz, laktoferrin ve katyonik proteinler gibi enzimlerini açığa çıkarırlar. Bu enzimler hem dokudaki hasarı artırır, hem de daha fazla radikal oluşmasına neden olur (17,20).(şekil 4)

İskemik intestinal mukozada nötrofil infiltrasyonun stimüle olduğu ve nötrofil infiltrasyonu sonucunda O_2^- , H_2O_2 , OH^- gibi serbest oksijen türevlerinin açığa çıkarak doku hasarına sebep olduğu bilinmektedir. İntestinal mukoza hücrelerinin membranlarının lipid ve protein yapıları hasara uğramazsa hücrelerin normal fonksiyonları devam eder(15).



Şekil-3. İskemide pürin metabolizmasının gelişimi ve ksantin dehidrogenazın ksantin oksidaza çevrilmesi, reperfüzyonda oksijen radikalinin oluşumu.

Serbest oksijen radikalleri proteinler, polisakkaridler, nükleik asidler ve doymamış yağ asidleri gibi tüm biyolojik maddeler ile reaksiyona girebilmektedir. Oksijen radikalinin en karakteristik özelliği hücre membranındaki doymamış yağ asidlerinden metilen hidrojen atomunu ayırmasıdır. Bu reaksiyon hücre membranında lipid peroksidasyonunu başlatır ve ortaya konjuge dienler, lipid hidroperoksid radikalleri ve lipid hidroperoksidler gibi lipid türevi radikaller çıkar. Lipid peroksidasyonunun son ürünleri malondialdehit ve diğer aldehidler, hidrokarbon gazlar ve konjuge dienlerdir (19,21).



Şekil-4: Serbest oksijen radikalinin dokudaki doğrudan ve dolaylı etkileri.

Araşidonik asit 20 karbonlu poliansatüre bir yağ asididir. Vücutta yalnızca hücre membran proteinlerinin bir komponenti olarak bulunur. Araşidonik asit bu fosfolipidlerden hücrenel fosfolipazlar yoluyla salınır. Hücrenel fosfolipazlar mekanik, kimyasal, fiziksel uyarı veya C5a gibi iltihabi mediatörlerce aktive edilirler. Daha sonra siklooksijenaz enzimi ile prostoglandinler ve tromboksan A₂ (TxA₂) oluşturulur. Nötrofillerde baskın olarak 5-Lipooksijenaz enzimi ile de 5-HPETE oluşur. 5-HPETE oldukça kararsızdır; ya nötrofiller için kemotaktik olan 5-HETE'ye , yada lökotrienlere dönüşür. Lökotrienlerden de özellikle LTB₄ nötrofiller için kemotaktiktir (6). Oksijen radikallerinin salımı sonucunda intraselüler kalsiyumda bir artış olur ve bu kalsiyum artışının plazma membran fosfolipaz aktivasyonunun artışında çok önemli olduğu düşünülür. Fosfolipaz aktivasyonu ile de araşidonik asit metabolizma ürünleri oluşmaktadır (8). Bu ürünler nötrofil aracılı İR hasarını şu üç yoldan biriyle etkiler.

1-Bu ürünlerden özellikle TXA₂ ve LTB₄ kemo-atraktan etkilidir.

2-Araşidonik asit ürünleri aynı zamanda nötrofil aktivatörleri gibi çalışabilirler. LTB₄ nötrofil aracılı artmış kapiller permeabiliteyi in vivo ve in vitro indükleyebilir (22). TXA₂' nin de nötrofillerden hidrojen peroksit yapımını artırdığı bilinmektedir(23).

3-Lökotrienler ve tromboksan mikrovaskülarizasyon düzeyinde kan akımını ve böylelikle direk etkiyle doku perfüzyonunu etkiler. Bu yolla ,tromboxanın etkilerine bağlı reperfüzyon sırasındaki yavaş akımı ağırlaştırabilir (24).

İskemi ve reperfüzyon hasarında ayrıca platelet aktive edici faktör (PAF) ve komplemanlar da rol oynamaktadır. ROS'nin endotel hücrelerini PAF üretimi yapmak üzere stimüle ettiği de gösterilmiştir. PAF potent bir nötrofil agonistidir. İR hasarında PAF, nötrofil adezyonunu artırır ve lökositlerin ekstrasvazasyonuna katkıda bulunur.

Poliansatüre yağ asitleri serbest radikal etkilerine duyarlı olmalarına karşın protein ve nükleik asitler bu zararlı etkilere karşı daha dirençlidirler. Bunun başlıca sebebi, şiddetli hasar

oluşturucu zincirleme reaksiyonların protein ve nükleik asid moleküllerinde gerçekleşme ihtimalinin çok zayıf olmasıdır. Serbest radikaller DNA molekülüne çok yakın bir bölgede meydana geliyorsa, okside edici radikaller tarafından DNA molekülü kolaylıkla hasara uğratılabilmektedir(25).

2.2 İİR sonrası akciğer hasarı

İİR sonrasında başta akciğerler olmak üzere uzak organlarda hasar oluşur (13). Bu durum hastada çoğul organ yetersizliğine ve ölüme neden olabilir. Yapılmış olan çalışmalarda da değinildiği gibi, intestinal İR sonrası akciğer hasarı; akciğerde ödem, hemoraji, PMNL infiltrasyonu ile karakterize olan bir tablodur (26).

İİR sonrası oluşan akciğer hasarını açıklayan çeşitli mekanizmalar tanımlanmış olsa da en çok PMNL'lerin rolü dikkati çeker (13). İİR sonrası oluşan akciğer hasarının %80' ninden PMNL'ler sorumludur (11).

Lökositlerin vasküler lümeninden extra vasküler boşluğa çıkışında olayların oluş sırası;

- 1- marjinasyon ve yuvarlanma
- 2 – Adezyon ve endotelial hücreler arasından transmigrasyon
- 3- İnterstitial doku içinde kemotaktik bir uyarıyı izleyerek migrasyon (6).

Extravasküler kompartmana ulaşıldığında aktive edilmiş lökositler toksik ROS, proteazlar ve elastazlar salarlar ve buda mikrovaskuler permeabilite de artışa, ödeme, tromboza ve parankimal hücre ölümüne neden olur (6,27) . Extravazasyondan sonra lökositlerin kimyasal bir uyarıyı izleyerek zedelenme bölgesine göç etmesine kemotaksi denir. Hem ekzojen hemde endojen maddeler lökositler için kemotaktik olabilirler. Bunlar; çözülebilen bakteriel ürünler, kompleman sisteminin ürünleri (özellikle C5a), araşidonik asit metabolizmasının lipooksijenaz yolu ürünleri (özellikle LTB₄) ve sitokinler (İL 1,8, vb.) dir (6,28).

PMNL'ler myeloperoksidaz ve NADPH oksidaz yoluyla serbest radikaller oluşturabilir(8). Oksijen metabolitlerinin oluşumu lökosit NADPH oksidazın hızlı aktivasyonuna bağlıdır. Bu,

NADPH'ı oksidasyona uğratar (redükte nikotinamid adenin nükleotid fosfat) ve prosede oksijen, süperoksit iyonuna (O_2^-) indirgenir.



Süperoksit çoğu kez spontan dismutasyonla ($O_2^- + 2H^+ \longrightarrow H_2O_2$) hidrojen peroksite dönüşür. Nötrofil lizozomları (azurofilik granüller) MPO enzimi içerirler ve Cl^- gibi bir halid varlığında MPO, H_2O_2 'i HOCl (hipoklorus radikali) 'ne dönüştürür. HOCl kuvvetli bir oksidandır (6).



PMNL hidrojen peroksit ve hipoklorik asid sekresyonu yoluyla hasarı indükleyebilir. Nötrofil granülleri ayrıca çok fazla sayıda enzim içerir. Bunlardan bazıları; serin proteaz, elastaz, kollojenaz ve jelatinaz'dır. Sonuç olarak bu enzimler ve ROS mikrovasküler permeabilitede artışa yol açarak yapısal matrix proteinlerinde lizise neden olur (29).

Ayrıca İİR, barsak mukoza engelini bozarak bakteriyel translokasyona neden olur(9,10,11). Endotoksin sistemik inflamatuvar yanıt sendromunu başlatan primer mediyatördür (3,9). Endotoksin farklı dokularda monosit ve makrofajları uyarak inflamatuvar sitokinlerin sentez ve salınımını başlatır (10,26). Akciğer ve karaciğer, makrofajlar açısından zengindir. Aynı zamanda bu iki organ transloke olan endotoksinin ilk geçtiği organlardır (11, 30). İİR sonrası vena porta yoluyla karaciğere ve oradan da akciğere ulaşan endotoksinler, önce Kuppfer hücrelerini ve sonrasında alveolar makrofajları aktive ederek TNF-alfa ve IL-6 gibi sitokinlerin üretimini artırır (9,10,11,31).

TNF-alfa 17kDa molekül ağırlığında bir sitokindir. Aktive monosit, makrofaj, mast hücreleri, endotel hücreleri, T hücreleri, B hücreleri, Kupffer hücreleri gibi çeşitli hücrelerde üretilir (32). İnce barsak iskemi ve reperfüzyonu sonrası oluşan akut akciğer hasarından sorumlu en önemli sitokindir (1,3, 13, 33).

IL-6 molekül ağırlığı 26-kDa olan bir sitokindir. T hücreleri, makrofajlar, monositler, endotel hücreleri, mast hücreleri, kemik iliği stromal hücreleri gibi çeşitli hücrelerde üretilir (32, 34). Çoğul organ yetmezliği ve sıkıntılı solunum sendromunun patogenezinde önemli rol oynar (34, 35).

TNF-alfa ve IL-6 etkisiyle pulmoner endotel hücresinde ve PMNL'lerde bulunan adezyon molekülleri artarak hücre yüzeyine çıkarlar (13, 36, 37). PMNL'lerde bulunan adezyon molekülleri CD11a/CD18, CD11b/CD18 integrin molekülleridir. Pulmoner endotel hücresinde bulunan adezyon molekülleri ise ICAM-1, ICAM-2, ELAM, VCAM-1, P-selektin molekülleridir. Adezyon moleküllerinin aktivasyonu sonucunda PMNL'lerin pulmoner endotel hücresine adezyonu ve interstisyuma göçü olur (36,37,38,39).

PMNL kemotaktik faktörler (CINC-1, CINC-2 α , CINC-2 β , CINC-3); Kupffer hücrelerinin, alveolar makrofajlarının, TNF-alfa, çeşitli sitokinlerle ve endotoksin ile uyarılmasından sonra açığa çıkarak, PMNL'lerin kemotaksisine, aktivasyonuna, alveolar boşluğa ve interstisyuma migrasyonuna neden olarak akciğer hasarı oluşumunda önemli rol üstlenirler (40,41). İİR sonrası oluşan sıkıntılı solunum sendromundan dolaşımdaki PMNL aktivasyonunun artışı, akciğerlerde PMNL retansiyonu ve buna bağlı pulmoner mikrovasküler hasar sorumlu tutulmaktadır. Sıkıntılı solunum sendromu, protein ve PMNL'lerden zengin sıvının akciğer interstisyumuna ve alveolar boşluğa sızması ile oluşmaktadır. Normalde endotel bazal membranı geçirgen değildir veya yüksek seçici bir geçirgenliğe sahiptir. Damar endotelinin bütünlüğünden katedrin isimli proteinler sorumludur. İİR sonrası aktive olan PMNL'lerden salınan serin proteaz, elastaz, endotel bazal membranı

yapısındaki katedrinleri hidrolize ederek kapiller por boyutunun genişlemesine katkıda bulunur. Bu durum, endotelial bazal membran geçirgenliğini artırarak makromolekül ve sıvılara ek olarak PMNL'lerin akciğer interstisyumuna ve alveolar boşluğa geçişine neden olur (32).

İİR sonrası oluşan PMNL-endotelial hücre adezyonu, pulmoner mikrovasküler hasar gelişiminde anahtar rol oynar. PMNL'lerin endotelial hücelere adezyonu sonrası salgılanan toksik maddeler endotelial tabakada hasar oluşturarak kapiller permeabilite artışına ve interstisyel ödeme neden olmaktadır (11,13,42). İİR sonrasında interstisyumda ve alveolar boşlukta yerleşik doku makrofajları ve akciğerde sayıları artan nötrofiller, reaktif oksijen radikalleri, toksik katyonik proteinler, dejeneratif enzimler salgılayarak akciğer dokusunda hasar oluşmasına yol açarlar (43). MFS hücreleri, periferik kan monositleri ile doku makrofajlarıdır. Kemik iliğinde oluşan monoblast kök hücreler, öncü monositlere (promonositlere) ve daha sonrada sistemik dolaşıma geçerek monositlere dönüşürler. Sistemik dolaşımdaki monositler çeşitli organlara göç ederek makrofaj adını alırlar. Makrofajlar bir çok farklı organda bulunurlar. Bunlar karaciğerde Kupffer hücreleri, böbrekte intraglomerüler mesangial hücreler, akciğerlerde alveolar makrofajlar, dalakta sinus makrofajları, bağ dokusunda histiyositler, deride langerhans hücreleri, lenf düğümünde sinus makrofajları, kemik dokusunda osteoklastlar, sinir sisteminde mikroglialar, serozal yüzeylerde serozal makrofajlar şeklinde isimlendirilirler. Yukarıda sayılan hücrelerden özellikle karaciğer Kupffer hücreleri ve splenik monosit/makrofajlar MFS'nin %90' ından fazlasını oluşturan en önemli kısımdır (9).

Kupffer hücreleri MFS'in en önemli doku makrofajlarıdır. Hepatik makrofajlar, fiks doku makrofajlarının % 90' ından fazlasını oluşturur (9). Kupffer hücreleri, İİR sonrası salınımı artan, çoğul organ yetmezliği, sıkıntılı solunum sendromu ve akut inflamatuvar yanıtın gelişiminde önemli rolü olan; TNF- alfa ve IL-6 gibi çeşitli anahtar inflamatuvar sitokinlerin

primer üretim yeridir (1,9, 31). İİR sonrası portal dolaşıma geçen endotoksin Kupffer hücre aktivasyonuna neden olur. Aktive Kupffer hücreleri IL-6, TNF-alfa gibi çeşitli inflamatuvar sitokinlerin salınımına yol açarak lökosit ve vasküler adezyon moleküllerinin aktivasyonuna yol açar (31, 44). Ayrıca aktive Kupffer hücrelerinden reaktif oksijen radikallerinin üretimi ve salınımı da artmaktadır (45). PMNL'lerin nükleusu birbirine ince kromatin ile bağlanmış birkaç segmentten oluşmuş parçalı görünüme sahip olarak izlenirler. Bu yüzden normalde granülosit olarak adlandırılan bu hücrelere “polimorfonükleer” lökositler denmektedir. PMNL'ler içerdikleri granüllerin Romanowsky boyalarıyla boyanmalarına göre nötrofil, eozinofil (asidofil) ve bazofil olarak gruplandırılmaktadır. Asidofil (eozinofil) lökositlerin granülleri eozin gibi asidik boyalar ile boyanırlar. Bazofil lökositlerin granülleri metilen mavisi gibi bazik boyalar ile boyanırlar. Nötrofil lökositlerin granülleri ise ne asidik ne de bazik boyalar ile boyanmazlar. Bütün lökositlerin %60-70 ini oluşturan nötrofiller, PMNL'lerin %90 ından fazlasını oluşturmaktadır. PMNL'ler monositler gibi ekstravasküler alanda bulunabilirler. IL-6 gibi çeşitli kemotaktik maddeler, PMNL'lerin damar endotel hücrelerinin yüzeyine adezyonunu artırarak bu hücrelerin damar dışına çıkmasına neden olur. Bu olay diapedez olarak bilinir. Fagositoz yeteneğine sahip olan bu hücreler içerdikleri granülleri yönünden iki tipe ayrılır. Birinci tiptekiler; büyük, nonspesifik, peroksidaz-pozitif azurofilik (primer) granüller olarak adlandırılırlar ve peroksidaz ve asit fosfataz gibi enzimleri içerirler. İkinci tiptekiler ise; küçük spesifik (sekonder) granüller olarak adlandırılırlar ve alkalin fosfataz, kollojenaz ve aminopeptidaz gibi enzimleri içerirler. Nötrofillerin çoğu spesifik granüllüdür (%80-90). Kompleman fragmanları, hidroksil radikaller, ROS ve sitokinler gibi barsak kaynaklı uyarılar nötrofil aktivasyonuna neden olurlar (2,46). Patojenik durumla karşılaşıldığında PMNL'ler, ROS, toksik katyonik proteinler, dejeneratif enzimler salgılayarak normal dokuda da hasar oluşmasına yol açarlar (43, 45).

2.3 Endotel koruyucu ajanlar

Endotel hücreleri tarafından oluşturulan 3 önemli koruyucu ajan prostasiklin, nitrik oksit ve adenzindir(47). Prostatiklin vazodilatasyon yapan, nötrofil adherensini önleyen trombosit agregasyonunu inhibe eden ve lizozomal membranları stabilize eden potent bir eikosanoiddir(48). Yarı ömrü 1-2 dakikadır ve etkilerini adenilat siklazı aktive edip böylece cAMP yapımını artırarak gösterir.

NO, endotel hücrelerinde kalsiyum ve calmoduline bağımlı bir enzim olan NOS ile oluşturulur(47). NO' in etkileri guanilat siklazın aktivasyonu ve böylece cGMP oluşumu ile düzenlenir(49). Biyolojik yarı ömrü prostasiklinden daha kısa olup 10-20 saniyedir. NO endotel hücreleri tarafından oluşturulan süperoksit radikallerini nötralize eder, vazodilatasyon yapar, trombosit adherensini inhibe eder (26,47,49,50).

Endotel tarafından oluşturulan üçüncü koruyucu ajan adenzindir. Adenzin etkilerini adenilat siklazla eşleşmiş purinerjik reseptörlerin aktivasyonu ile oluşturur. Bunda guanozin trifosfat'a bağımlı bir mekanizma rol oynar(47). Adenzin, adenzin deaminaz ve adenzin kinaz enzimleriyle hızlıca metabolize olur. Prostatiklin ve NO gibi, adenzin de potent bir vazodilatördür. Endotelial hücrelere nötrofil adherensini azaltır ve nötrofil sitotoksitesini hafifletir (47,51). Adenzin aynı zamanda nötrofiller tarafından süperoksit radikali oluşmasını inhibe eder ve prostasiklin ve NO gibi İR hasarının çeşitli modellerinde yararlı etkiler gösterir (47).

2.4 Serbest Radikaller

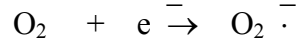
Serbest radikaller son yörüngelerinde eşleşmemiş elektron bulunması sebebiyle kolayca elektron alışverişi yapabilen moleküllerdir. Biyolojik sistemlerde serbest radikaller en fazla elektron transportu sırasında oluşur. Serbest radikaller organik veya inorganik moleküller şeklinde olabilirler. Cu^{+2} , Fe^{+3} , Mn^{+5} ve Mo^{+5} gibi geçiş metallerinin de ortaklanmamış

elektronları olduğu halde serbest radikal olarak kabul edilmezler. Fakat bunlar serbest radikal oluşum reaksiyonlarında katalizör olması sebebi ile önemlidir.

2.4.1 Reaktif oksijen türleri

2.4.1.1 Süperoksid Radikali :

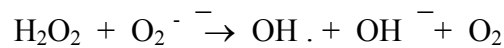
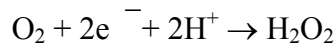
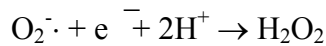
Doğal oksijen molekülünün bir elektron alması ile oluşur. En büyük kaynağı elektron transport zinciridir (52).



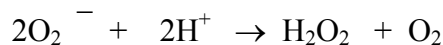
Süperoksid radikali bir serbest radikal olmakla birlikte hidrojen peroksit kaynağı olması ve geçiş metallerini indirgemesi bakımından da önemlidir.

2.4.1.2 Hidrojen Peroksit :

Moleküler oksijenin iki elektron veya süperoksidin bir elektron alması sonucu oluşan hidrojen peroksit, en reaktif ve zarar verici serbest oksijen radikali olan hidroksil radikaline kolayca yıkılır.



Hidrojen peroksit genellikle biyolojik sistemlerde süperoksidin dismutasyonu ile spontan olarak veya SOD katalizörlüğünde oluşur.



Hidrojen peroksit süperoksit benzer, reaksiyondaki ortama bağlı olarak hem oksidan hem de redüktan gibi davranabilir.

2.4.1.3 Hidroksil Radikali :

Suyun yüksek enerjili iyonize edici radyasyona maruz kalması sonucu veya hidrojen peroksitin geçiş metalleri varlığında indirgenmesi ile (Fenton Reaksiyonu) oluşur. Yarılanma ömrü çok kısa olup son derece reaktiftir.



2.4.1.4 Singlet Oksijen

Ortaklanmamış elektron olmadığından radikal olmayan reaktif oksijen molekülüdür. Serbest radikal reaksiyonu sonucu gelişebileceği gibi serbest radikal reaksiyonunun başlamasına da yol açabilir. Oksijenin elektronlarından birinin enerji alarak kendi spininin ters yönünde dönmesi sonucu oluşur.

2.4.2 Hücredeki serbest radikal kaynakları

2.4.2.1 Endojen Kaynaklar

1. Mitokondrial elektron transportu : Elektron taşıyıcıları oksijene elektron sızdırabilir. Oksijen %1 oranında süperoksida indirgenebilir.
2. Endoplazmik retikulum ve nükleer membran elektron transport sistemleri (sitokrom p-450, sitokrom b5)
3. Peroksizomlar: Oksidazlar, flavoproteinler
4. Aktive fagositler ve makrofajlar
5. Otooksidasyon reaksiyonları: Fe^{++} , adrenalin

6. Plazma membranı: Lipoksigenaz, prostoglandin sentetaz, fagositlerde NADPH oksidaz, lipid peroksidasyonu

7. Yaşlanma

2.4.2.2 Ekzojen Kaynaklar:

1. Aşırı oksijen konsantrasyonu (Hiperoksi)
2. Alışkanlık yapan maddeler: Alkol, uyuşturucu, sigara
3. Çevresel etkiler: Radyasyon, hava kirliliği
4. Stres: Streste katekolamin düzeyi artar. Katekolaminlerin oksidasyonu ise serbest radikal kaynağıdır.
5. Antineoplastik ilaçlar: Bleomisin, Doxorubicine, Adriamicine

2.4.3 Reaktif oksijen türevlerinin rolü:

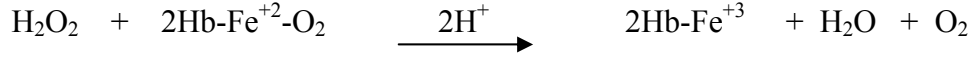
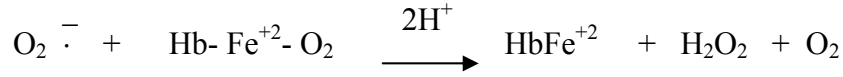
Günümüzde serbest oksijen radikalleri terimi yerine, daha kapsamlı olan ve hem süperoksit, hidroksil gibi oksijen içeren radikallere hem de aslında radikal olmayan ancak reaksiyonları ile oksijen içeren radikallerin oluşumuna neden olabilen peroksit, singlet oksijen, hipoklorik asit gibi molekülleri içine alan reaktif oksijen ürünleri (ROS) terimi daha yaygın olarak kullanılmaktadır (53).

Yukarıda da belirtildiği gibi iskemik dokuların reperfüzyonu toksik ROS oluşumuna yol açar. Bunlar süperoksit anyonlar (O_2^-), hidroksil radikalleri(OH^-), hipoklorik asit ($HOCl$), hidrojen peroksit (H_2O_2) ve nitrik oksitten derive peroksinitrittir (5) . Oksijen kökenli serbest radikaller aracılığı ile oluşan hücre hasarında başlangıç olay ksantin oksidaz kökenli süperoksit anyonlarının üretilmesidir (7) . İskemi sırasında sellüler ATP hipoksantin oluşturmak üzere degrade edilir. Normal koşullarda hipoksantin, ksantin dehidrogenaz yardımıyla ksantine oksidize edilir. Bununla birlikte iskemi sırasında ksantin dehidrogenaz ksantin oksidaza

dönüştürülür. Substrat olarak nikotinamid adenin dinükleotid kullanan ksantin dehidrogenazın tersine ksantin oksidaz oksijeni kullanır ve bundan dolayı iskemi sırasında hipoksantin hipoksantine dönüşümünü katalize edemez ve bu da hipoksantin dokuda aşırı seviyelere çıkmasına yol açar. Reperfüzyonla oksijen tekrar sunulduğunda fazla miktardaki hipoksantin ksantin oksidaz ile reaksiyona girmesi toksik ROS oluşumu ile sonuçlanır(5) (şekil 3)

Selüler ve subselüler membranların lipid peroksidasyonu da oksijen kökenli serbest radikallerin artırdığı hücre hasarında önemli bir mekanizmadır(8). Hücre membranları içerisinde poliansatüre yağ asitlerinin lipid peroksidasyonu, hücresel bütünlük ve fonksiyon kaybı ile sonuçlanabilir. Bu durum tek başına hidroksil radikalleri ile başlatılabileceği gibi, uygun bir şelatör varlığında O_2^- ile de başlatılabilir. Lipid peroksidasyonu, bitişik yağ asiti moleküllerinde otokatalitik bir zincir reaksiyonu suretiyle lipid peroksil radikallerinin oluşumuna neden olabilir. OH^- radikalleri ilave olarak proteinler ve DNA'nın direk oksidasyonuna neden olabilir. Bu aşamada enzim inaktivasyonu ve DNA ipliklerinin kırılması söz konusudur (8). Bu gibi DNA hasarı hem hücre ölümü hemde hücrelerin malign değişiminde rol alır. Serbest radikaller ayrıca sülfidril aracılı protein çapraz bağları oluşturarak parçalanmanın artmasına veya enzimatik aktivitenin kaybolmasına neden olur. Serbest radikal reaksiyonları direkt olarak polipeptid parçalanmasına da yol açabilir (6).

Proteinler serbest radikallere daha az hassas olup başlayan zararlı zincir reaksiyonunda hızlı ilerleme ihtimali daha azdır. Proteinler serbest radikal harabiyetinden aminoasit içeriğine bağlı olarak etkilenirler. Bu reaksiyonlar sonucu immunglobulin G ve albümin gibi fazla sayıda disülfid içerenlerin yapısı bozulur. HEM proteinleri de serbest radikallerden önemli oranda etkilenir.



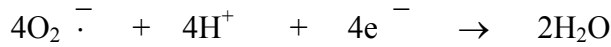
2.5 Antioksidanlar

2.5.1.Doğal (Endojen) Antioksidanlar

2.5.1.1 Enzimler

a-Mitokondrial sitokrom oksidaz sistemi:

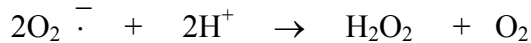
Solumun zincirinin son enzimi sitokrom oksidaz aşağıdaki reaksiyonla süperoksidi detoksifiye eder.



Bu reaksiyon normalde sürekli devam eder. Böylece yakıt maddelerinin oksidasyonu tamamlanır ve bol enerji üretimi sağlanır. Ancak süperoksid üretimi çoğu zaman bu enzimin kapasitesini aşar bu durumda diğer antioksidanlar devreye girer.

b-Süperoksid dismutaz (SOD):

Süperoksid dismutaz, süperoksidin hidrojen peroksit ve moleküler oksijene dönüşümünü katalizleyen enzim olup üç formu vardır.

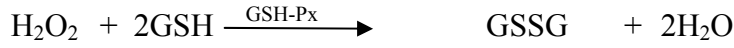


1. Cu-Zn SOD: Cu ve Zn içeren dimerik tip sitozolde bulunur, siyanidle inhibe olur.
2. Mn-SOD: Mn içeren tetramerik tip mitokondride bulunur. Siyanidle inhibe olmaz.
3. Ekstrasellüler CuZn SOD (54,55).

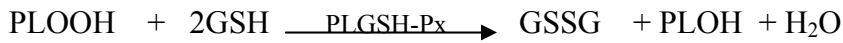
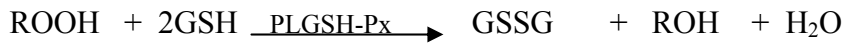
Enzimin fizyolojik fonksiyonu; oksijeni metabolize eden hücreleri süperoksit serbest radikallerinin zararlı etkilerine karşı korumaktır. SOD aktivitesi, yüksek oksijen kullanımı olan dokularda özellikle eritrositlerde fazladır. Normal metabolizma sırasında süperoksit üretimi fazla olmasına rağmen SOD sayesinde intrasellüler süperoksit düzeyi düşük tutulur.

c-Glutatyon Peroksidaz(GSH-Px) :

Glutatyon peroksidaz hidroperoksitlerin indirgenmesinden sorumlu enzimdir.

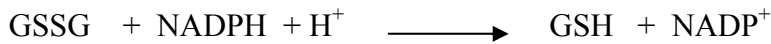


GSH-Px; tetramerik, dört selenyum atomu içeren sitozolik bir enzimdir. Membran fosfolipid hidroperoksitlerini alkollere indirger.



Membrana bağlı en önemli antioksidan olan vitamin E yetmezliğinde PLGSH-Px membranı peroksidasyona karşı korur.

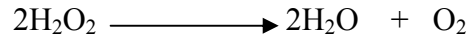
Hidroperoksitlerin redükte olmasıyla meydana gelen GSSG, glutatyon redüktazın katalizlediği reaksiyonla tekrar GSH' ye dönüşür(56).



GSH-Px solunum patlaması sırasında serbest radikal peroksidasyonu sonucu fagositik hücrelerin zarar görmesini engeller. Eritrositlerde de GSH-Px oksidan strese karşı antioksidandır. GSH-Px aktivitesinde azalma hidrojen peroksitin artmasına ve şiddetli hücre hasarına yol açar(56).

d-Katalaz (CAT):

Dört tane hem grubu bulunan bir hemoproteindir. Görevi hidrojen peroksiti oksijen ve suya parçalamaktır. Eritrositler yüksek oranda katalaz içermekte olup, katalaz aktivitesinin %98'den fazlasını sağlar.



Peroksidaz aktivitesi yanında bir hidrojen peroksiti elektron verici bir substrat olarak, diğerini de oksidan ve elektron alıcısı olarak kullanabilir.

Pankreatit, hemolitik hastalık ve bazı karaciğer hastalıklarında yükselmiş katalaz aktivitesinin saptanması diagnostik önem taşır (57).

e-Glutatyon-S-transferaz (GST) :

Özellikle araşidonik asit ve linoleat hidroperoksitleri olmak üzere lipid peroksitlerine karşı GST'lar selenyum bağımsız GSH-Px aktivitesi göstererek bir savunma mekanizması oluştururlar.

GST' lar antioksidan fonksiyonları yanında karaciğerde sitokrom p-450 enzim sistemi ile detoksifikasyona katkıda bulunur. Ayrıca hücre içi bağlayıcı ve taşıyıcısı, prostoglandin izomeraz etkisi, LTC₄(Lökotrien C₄) sentezi ve genotoksik ajanların detoksifikasyonu gibi rolleri vardır(58).

f-Hidroperoksidaz

2.5.1.2 Enzim Olmayanlar

1-Lipid fazda bulunanlar

α -tokoferol ve β -karoten

2-Sıvı fazda (hücre sitozolünde veya kan plazmasında bulunanlar): Askorbik asit, melatonin, ürat, sistein, seruloplazmin, transferin, laktoferrin, myoglobin, hemoglobin, ferritin, metiyonin, albümin, bilirubin, glutatyon.

2.5.1.3 Diğer Antioksidanlar

- 1- Karotenoidler
- 2- Melatonin
- 3- Glutatyon
- 4- Ürat
- 5- Sistein
- 6- Albümin
- 7- Serüloplazmin

2.5.2 Ekzojen Antioksidanlar

2.5.2.1 İlaçlar:

-Ksantin Oksidaz İnhibitörleri

Allopürinol

Oksiprinol

-Soya fasulyesi inhibitörleri: Ksantin dehidrogenazın proteolitik etki sonucu ksantin oksidaza dönüşümü inhibe eder.

-NADPH Oksidaz inhibitörleri: Adenozin, lokal anestezikler, kalsiyum kanal blokerleri, Nonsteroid Antiinflamatuvar ilaçlar vs.

-Rekombinant Süperoksid dismutaz

-Trolox-C:E vitamini analogudur.

-Endojen antioksidan aktiviteyi arttıran maddeler: GSH-Px aktivitesini arttıranlar (asetilsistein)

-Diğer nonenzimatik serbest radikal toplayıcıları:Mannitol, albümin

-Demir redoks döngüsü inhibitörleri: Desferroksamin, seruloplazmin

-Demir şelatörleri

-Nötrofil adhezyon inhibitörleri

2.5.2.2 Gıda Antioksidanları

-Butylated hydroxytoluene

-Butylated hydroxyanisole

-Sodyum benzoat

-Fe-süperoksid dismutaz

2.6 Myeloperoksidaz

Serbest oksijen radikalleri hem dokuya doğrudan zarar vermekte hem de PMNL'lerin hasarlı dokuda birikmesini sağlamaktadır. Nötrofil ve monositler primer lizozomal granüllerinde bir HEM enzimi olan MPO ihtiva ederler. Nötrofiller dolaşımda bulunan PMNL'lerin % 90'ından fazlasını oluşturular. Kompleman fragmanları, hidroksil radikaller, ROS ve sitokinler gibi uyarılar nötrofil aktivasyonuna neden olur. Dokuya gelen aktive PMNL'ler; MPO, elastaz, proteaz, kollajenaz , laktoferrin ve katyonik proteinler gibi

enzimlerini açığa çıkarırlar. Bu enzimler hem dokudaki hasarı artırır, hem de daha fazla radikal oluşmasına neden olurlar.

MPO çeşitli bileşikler (elektron yada hidrojen donörleri) okside edebilen bir enzim substrat kompleksi oluşturmak için, substratı olan H₂O₂ ile birleşir ve bunların oksidasyonu sonucu, çeşitli yollarla organizmayı etkileyebilen toksik ajanlar meydana getir ve bunlar hücre ölümüne yol açarlar. Nötrofillerin primer fonksiyonu fagositoz ve mikroorganizmaların sindirimi olmasına rağmen bu hücrelerden toksik ajanların sızıntısı veya sekresyonu yakın hücrelere zarar verir. Fagositik kaynaklı oksidanlar ototoksik, immünoşüpresif ve mutajenik etkiler gösterirler. İskemi ve reperfüzyon sonucu akciğerlerde nötrofil birikimi olur. Bu nötrofillerden ortama salınan serbest radikaller akciğer hasarına neden olur(59).

2.7 MDA

Serbest radikallerin en hasar verici etkisi, poliansatüre yağ asitleri ve fosfolipidden oluşan hücre membranları üzerine olmaktadır. Oksijen serbest radikalleri lipid peroksidasyonunu indükleyerek fonksiyonel ve yapısal hücre hasarına neden olur (60). Lipid peroksidasyonu, lipid moleküllerindeki iki ansatüre bağ arasında yerleşmiş metilen grubundan bir hidrojen atomunun çıkması ile başlatılan kompleks bir fenomendir. Sonuçta yeni bir karbon merkezli lipid serbest radikali oluşur. Oksijen varlığında bu yeni lipid serbest radikalinden lipid peroksitler veya hidroperoksitler oluşmaktadır. Bu son ürünler nispeten daha stabil bir son ürün olan ve lipid peroksidasyonunun markeri olarak kullanılabilen malondialdehite dönüşür (61).

2.8 Caffeic Acid Phenethyl Ester (CAPE)

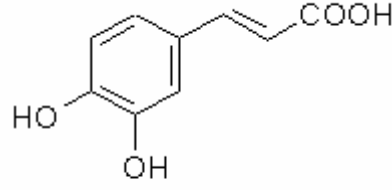
CAPE, bal arısı tarafından yapılan balda bulunan ve daha önceden antiinflamatuvar, antioksidan, antiviral, antikanser, antiapoptotik, immünmodülatör özellikleri daha önceki çalışmalarda ispatlanmış, flavonoid benzeri yapıda bir bileşiktir(15,62,63,64,65,66,67,68).

İnsan vücudundaki normal hücrelere karşı bilinen hiçbir zararlı etkisi bulunmamaktadır. Halk arasında, sık tüketimi olan ve sağlığa yararlı özellikleri uzun yıllardan beri bilinen ancak üzerine bilimsel çalışmaların başlaması uzun zaman alan bir bileşiktir(64).

Arı kovanlarının çatlak ve hasarlanmış yerlerinin tamirinde, dış ortamdan izole edilmesinde, giriş deliklerinin daraltılmasında, kovanın içine giren zararlı maddeler, mikroorganizmalar ve böceklerin muflanarak etkisiz hale getirilmesinde propolis kullanılmaktadır(69,70). Propoliste yaklaşık 100 çeşitten fazla bileşen bulunmuştur. Propolis arıların bitkilerden topladığı maddelere göre değişmektedir. Flavonoidler, caffeic acid ve esterleri propoliste en fazla bulunan ve propolisin biyolojik olarak aktif bileşenidir(15,71,72,73).

2.8.1 CAPE nin yapısı ve kimyasal özellikleri

Yapısal olarak flavanoidlere benzeyen CAPE'nin iki halkasal yapısı vardır(74).(şekil 5) Halkalardan bir tanesinde molekülün hemen hemen bütün kimyasal özelliklerini gösteren ve fonksiyonel olan iki "-OH" grubu vardır. Hidroksil grupları, aktif bir şekilde elektron alıp vererek oksitleyici ve redükleyici özellik gösterirler. Çok uzun aromatik ve alifatik yapıda karbon grupları taşıdığı için aynı zamanda lipofilik özelliكتedir(71,75). Böylece molekülün kolayca hücre membran yapılarından geçmesi ve etki edeceği bölgeye ulaşması kolaylaşır. CAPE intraperitoneal uygulandığı zaman yeterli kan konsantrasyonuna ulaşmaktadır.



Şekil 5: CAPE'nin yapısı

2.8.2 CAPE nin fonksiyonel özellikleri

CAPE, arıların bitkilerden topladığı maddeler içinde bulunan keskin ve güzel kokulu propolis maddesinin aktif bileşenlerinden birisidir. Eskiden propolis ampirik olarak antiinflamatuvar, immünomodülatör, antioksidan, antimikrobik gibi birçok özelliği ile tedavi amaçlı kullanılmış, iyileştirici etkinin olduğu gösterilmiştir(14,15,71,72,76).

Canlılar üzerindeki bu olumlu etkileri çeşitli faktörlere dayandırılabilir. CAPE; 10 µmol/kg konsantrasyonda ksantin-ksantin oksidaz sistemini ve reaktif serbest oksijen radikali oluşumunu bloke etmektedir. Bu durum, yapılan birçok çalışmada poliansature yağ asitlerinin oksidasyonuna sekonder olarak oluşan malondialdehid düzeyini anlamlı ölçüde düşürmesi ile doğrulanmaktadır(65). CAPE'nin protein tirozin kinaz, siklooksigenaz (non-spesifik olarak) ve lipooksigenaz aktivitesini baskıladığı ve böylece lipid peroksidasyonunu engellediği gösterilmiştir(14,15,68,77).

CAPE'nin antiinflamatuvar etkinliği yapılan çalışmalarda Diklofenak ve Hidrokortizon ile eşdeğer bulunmuştur(64).

Nükleer faktör kappa B (NF-κB), rel mutagen ailesine bağlı bir transkripsiyon faktörüdür ve immünite ve inflamasyon döngüsünde rol oynayan pek çok geni aktive etmektedir(78). NF-κB'nin regülasyonunda bozulma graft versus host hastalığı, toksik şok, kanser ve akut inflamatuvar hastalıklar gibi birçok patolojide rol oynar. Ayrıca apoptozisde önemli bir ajandır(63). NF-κB proteinleri stoplazmada inaktif olarak bulunmaktadır. Aktivasyon

bakteriyel yapı taşları, oksidatif stres ve protein sentez inhibitörleri ile olmaktadır. Reaktif oksijen radikalleri, NF-κB için ikincil haberci rolü oynamaktadır(63). CAPE, özgül olarak NF-κB'yi bloke ederek ve oksijen radikallerini bloke ederek başta TNF-α olmak üzere birçok inflamatuvar ajanları bloke etmektedir. CAPE'nin glukokortikoid reseptörlerinden bağımsız olarak inflamatuvar hücrelerde apoptozisi önlediği de gösterilmiştir(75).

Ayrıca CAPE; ornitin karboksilaz, 5-alfa redüktaz, proteaz, lipoksijenaz, HIV-1 integras gibi bazı enzimlerin potansiyel engelleyicisidir(66,67,74,75).

2.8.3 CAPE nin antioksidan etkisi

CAPE, linoleik asit ve araşidonik asitin 5-lipooksijenaz tarafından oluşturulan oksijenasyonunu inhibe eder. Yaklaşık olarak 10 µmol/L konsantrasyonunda in vitro koşullarda nötrofiller veya ksantin/ ksantin oksidaz sistemi tarafından oluşturulan reaktif oksijen türlerini tamamen bloke eder. CAPE, antioksidan özelliğini zincirinde bulunan iki hidroksil grubu ile sağlamaktadır(14,15,64,68,75,77,79).

İlhan ve ark. tavşanlarda spinal kordda İR hasarına karşı CAPE'nin ve metil prednizolonun koruyucu etkisini ve spinal kord dokusunda MDA, SOD, CAT ve histolojik değişikliklerle araştırmışlar. MDA seviyeleri CAPE grubunda metil prednizolon grubuna göre belirgin olarak düşük bulmuşlar, kontrol grubu ile kıyaslandığında CAPE grubunda ek doku hasarı saptamamışlar(77).

Vücutta özellikle iskemi esnasında, ATP'den hipoksantin oluşur, ardından hipoksantin, ksantin'e indirgenir. İskemi esnasında bol miktarda sentezlenen ksantin ise, reperfüzyon ile ortama oksijen sağlanması sonrası ksantin oksidazın katalizlediği bir reaksiyonla ürik asite çevrilir. Bu reaksiyon esnasında ortaya superoksit anyonu çıkar. Ksantin oksidaz enzimi, en önemli serbest oksijen kaynağı enzimdir. Ksantin oksidaz inhibitörleri ile yapılan çalışmalar,

bu ajanların özellikle iskemi-reperfüzyon hasarında antioksidan özelliğini ortaya koymuştur. Bu konuda CAPE ile pek çok çalışma yapılmış ve etkin bulunmuştur(68).

Diabetik rat karaciğerinde, intestinal iskemi ve reperfüzyon hasarında ve testiküler torsiyon/detorsiyondan sonra CAPE'nin antioksidan koruyucu etkisi üzerinde durulmuştur.

Yılmaz ve arkadaşları streptozosinle diabetik olan ratların karaciğerinde MDA seviyeleri, SOD ve CAT aktivitelerini araştırmışlar. Diabetik ratların karaciğerinde MDA seviyelerinin kontrol grubu ratlara kıyasla artmış olduğu ve MDA seviyelerinin CAPE grubunda kontrol grubunun düzeyinde kaldığını bildirmişler. CAPE tedavisi verilen diabetik rat karaciğerinde SOD ve CAT aktivitelerinin azaldığını saptamışlardır. CAPE serbest oksijen radikallerini süpürücü etkisinden dolayı diabetik rat karaciğerinde SOD ve CAT aktivitelerinde artışı engellediği öne sürülmüştür(80).

NF- κ B 'nin inflamatuvar olayda ve oksidan strese önemli yeri olduğu gösterilmiştir. CAPE, özgül olarak NF- κ B'yi bloke ederek ve oksijen radikallerini bloke ederek başta TNF- α olmak üzere birçok inflamatuvar sitokinleri bloke etmektedir(62,63). Nitrik Oksit ile süperoksit radikalının ilk biyokimyasal ürünü, özellikle DNA'yı okside eden kısa ömürlü bir serbest radikal olan peroksinitrittir(68). CAPE, nitrik oksit sentetaz enzim aktivitelerini bloke ederek ve süperoksit dismutaz enziminin kullanımını engelleyerek etkin olmaktadır. CAPE'nin inducible Nitrik Oksit Sentetaz (iNOS) aktivitesini, iNOS üzerindeki NF- κ B bağlantı noktalarını bloke ederek inhibe ettiği gösterilmiştir(81).

Sonuç olarak CAPE antioksidan etkisini, lipid peroksidasyonunu suprese ederek, ortamdaki reaktif oksijen türlerini süpürerek, ksantin oksidaz ve nitrik oksit sentetaz aktivitesini inhibe ederek ve SOD aktivitesini koruyarak göstermektedir(64).

3.MATERYAL VE METOD

3.1 Hayvanlar

Çalışma, Süleyman Demirel Üniversitesi Tıp Fakültesi deney hayvanları laboratuvarından elde edilen erkek, sağlıklı, erişkin, 200-250 gr arasında olan Wistar-Albino cinsi rat kullanılarak gerçekleştirildi. Ratlar deney öncesi tel kafeslerde 12 saat gece 12 saat gündüz sirkadiyen ritimde, ortam sıcaklığı 20-26 °C olacak şekilde tutuldular. Deneyden 12 saat önce, su hariç beslenmeleri durduruldu. Tüm ratların bakımı, Tıbbi Araştırmalar Ulusal Derneği tarafından biçimlendirilen ‘Deney Hayvanlarının Bakım Prensipleri’ne ve Laboratuvar Hayvanı Kaynakları Enstitüsü tarafından hazırlanıp Ulusal Sağlık Enstitüsü tarafından yayınlanan (NIH basım no.85-23, 1985 revize edildi) ‘Laboratuvar Hayvanlarının Bakım ve Kullanımı için Kılavuz’una uygun olarak yapıldı. Çalışma protokolü ve deneysel metod Süleyman Demirel Üniversitesi Etik Kurul tarafından onaylandı. Çalışmada 30 rat randomize olarak 3 gruba ayrıldı (n=10)

3.2 Gruplar

Çalışma grupları sırası ile randomize olarak şöyle oluşturuldu :

Grup I (kontrol grubu) : Bu gruptaki ratlara laparotomi yapılarak, iskemi ve reperfüzyon uygulanmadan sadece anestezi verildi. 180 dakika sonra akciğer doku örnekleri alındı.

Grup II (IIR grubu) : Bu gruptaki ratlara aşağıda anlatıldığı şekilde 60 dakika iskemi uygulandı ve 120 dakika süresince reperfüze edildikten sonra ratlar sakrifiye edilerek akciğer doku örnekleri alındı.

Grup III (IIR+CAPE grubu) : Bu gruptaki ratlara grup II de olduğu gibi 60 dakika süresince mezenterica superior artere mikrovasküler klemp konularak iskemi uygulandıktan sonra mesenterica superior artere konulan mikrovasküler klemp kaldırılarak 120 dakika boyunca reperfüzyon uygulandı.Reperfüzyonla beraber ratlara intraperitoneal olarak 1 kez **10**

μ/kg dozunda CAPE uygulandı.Reperfüzyon süresi sonrasında ratlar sakrifiye edilerek akciğer doku örnekleri alındı.

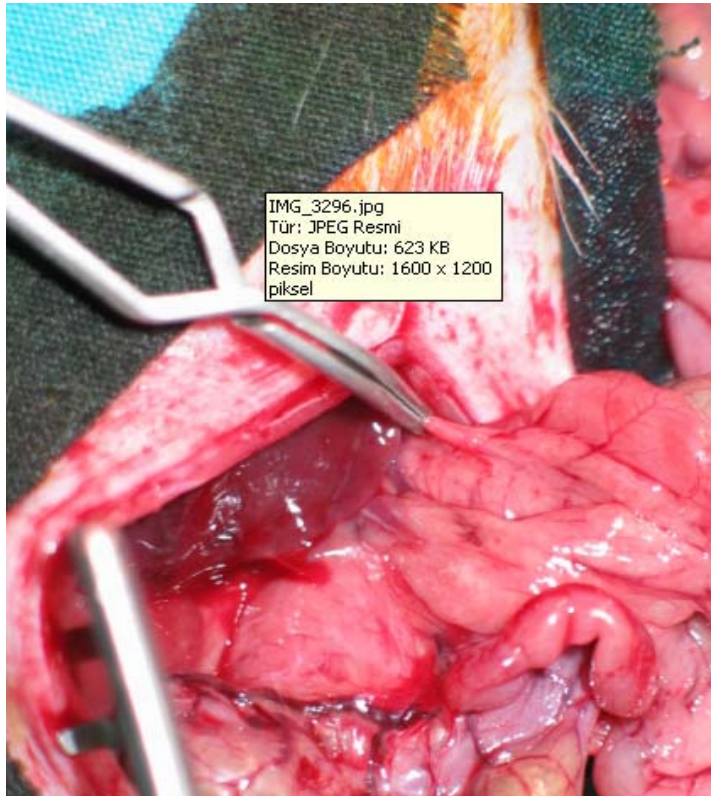
3.3 Anestezi ve Cerrahi işlem

Ratlar üzerine yapılan çalışmalar genel anestezi altında gerçekleştirildi.Genel anestezi için, başlangıçta intramusküler olarak 90 mg/kg ketamin hidroklorür (Ketalar) ve 80 mg/kg xylazin (Rompun) kullanıldı. Gerektiğinde saatlik olarak ilk dozun 1/3 ü ilave dozlar halinde tekrarlandı.

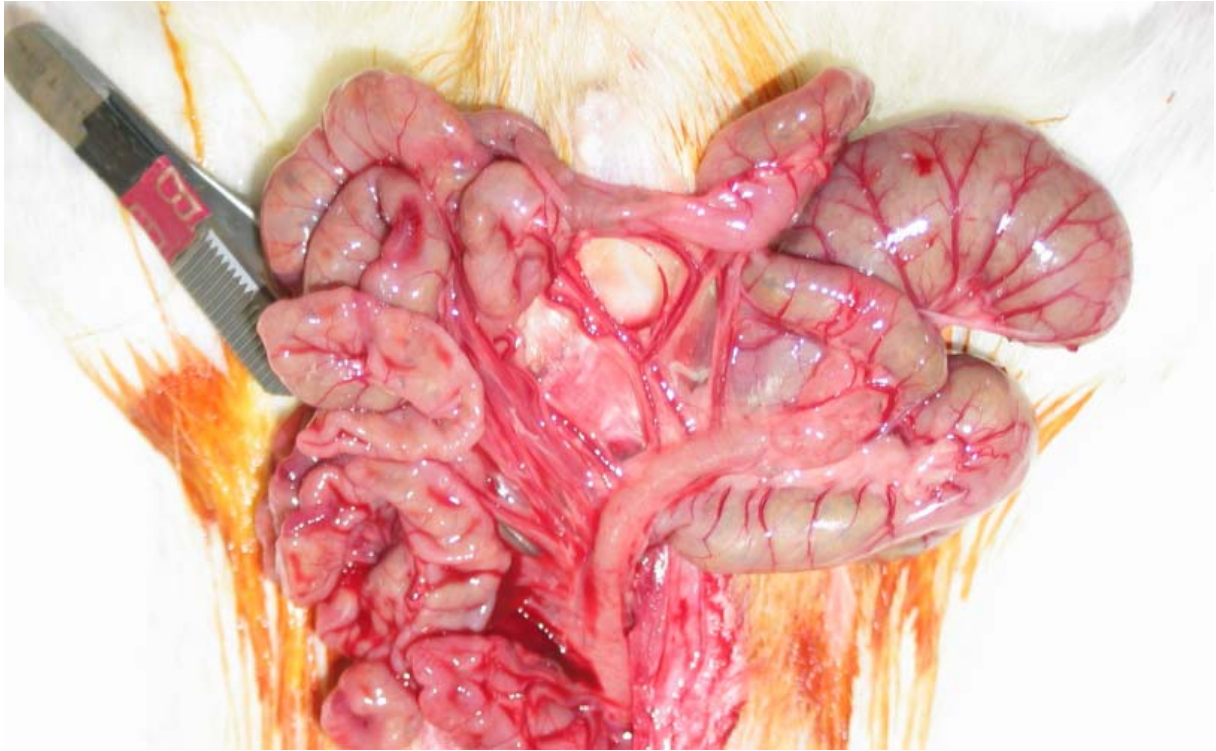
Bu çalışmada 60 dakika intestinal iskemi ve 120 dakika reperfüzyon uygulandı. Karın ön duvarı cildinin traş edilmesi ve % 10' luk povidon - iyot solüsyonu ile temizlenmesini takiben orta hat insizyonu ile laparotomi yapılarak karın boşluğuna girildi (resim 1). İnce barsaklar laparotomi kesisinden dışarı çıkarılarak süperior mezenterik arter (SMA) ortaya konuldu. SMA'e atravmatik mikrovasküler bir klemp konulmasıyla dolaşımı engellendi (resim 2). İntestinal iskemi arter vurumlarının kaybolması ve barsak renginin soluklaşmasıyla doğrulandı (resim 3). Barsaklar batın içerisine geri gönderildi. Laparotomi kesisi atravmatik 4/0 prolent dikişle kapatılarak intestinal iskemi için 60 dakika beklendi. İntestinal iskemi sonunda tekrar laparotomi yapıldı. SMA'deki mikrovasküler klemp çıkarılarak intestinal reperfüzyon başlatıldı. Reperfüzyon arter vurumlarının tekrar belirmesi ve ince barsak renginin pembeleşmesi görülerek doğrulandı (resim 4). Barsaklar tekrar karın içine geri kondu. Grup III deki hayvanlara intraperitoneal yolla, 10 $\mu mol/kg$ dozunda CAPE verilerek laparotomi kesisi tekrar 4/0 prolent dikiş ile kapatıldı. 120 dakika intestinal reperfüzyon süresi sonunda, median sternotomi ile ratların göğüs boşluğu açıldı. Çıkan aorta kesilerek sıçanların kan kaybından ölmesi sağlandı. Her iki akciğer toraks boşluğundan çıkarıldı ve serum fizyolojik ile yıkanarak yüzeysel temizlikleri yapıldı. Her iki akciğerden alınan doku örnekleri %10' luk formaldehit içinde tespit edildi. Her iki akciğerin geri kalanı biyokimyasal tetkikler için tampon fosfat solüsyonu içerisinde -80 °C'de saklandı.



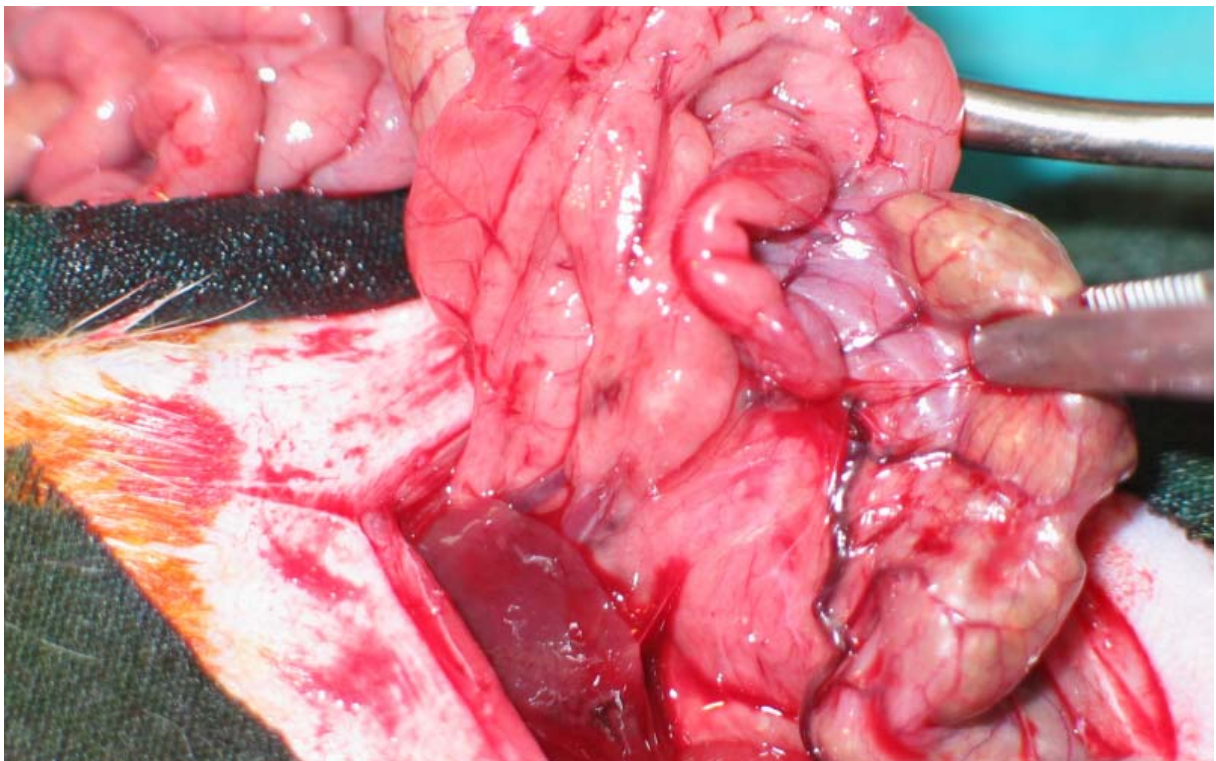
Resim 1



Resim 2



Resim 3



Resim 4

3.4 Kullanılan malzeme ve aletler

1- Soğutmalı santrifüj	: Eppendorf MR5415 (Almanya)
2- Santrifüj	: Jouan B4İ (Fransa)
3- Derin dondurucu	: Uğur (Türkiye)
4- Hassas terazi	: Scaltec SPB 33 (İsviçre)
5- Vorteks	: Nüve NM 100 (Türkiye)
6- Otomatik pipetler	: Eppendorf (Almanya), Gilson (Fransa)
7- Spektrofotometre	: Shimadzu UV 1601 (Japonya)
8- Sonikatör	: Bandelin Sonoplus (Almanya)
9- pH metre	: Hanna Instruments (Portekiz)
10- Manyetik karıştırıcı	: Nüve (Türkiye)
11-ELİZA cihazı	: Biotek Instruments (A.B.D.)
12- Homojenizatör	: Ultra Turrax T25 (Almanya)
13- Biyokimya analizörü	: Abbott Aeroset (Almanya)

3.5 Kullanılan kimyasal maddeler

3.5.1 MPO tayini için kullanılan Elisa kiti

Çalışmamızda MPO tayini için IBL Hamburg ANCA-P (MPO) – AB ELİSA kiti (Almanya) kullanıldı. Kit içeriği :

- 1- 8x12 lik bölünebilir microplate
- 2- 6 adet 1,5 ml'lik IgG Anti-MPO antibodies kalibratör (IgG: 0,5,10,20,40,100 U/ml)
- 3- 2 adet 1,5 ml'lik Anti-MPO kontrolü (pozitif ve negatif kontrol)
- 4- 1 adet 20 ml sample buffer (tris, NaN₃ < 0,1 %)

- 5- 1 adet 15 ml enzim konjugat solüsyon (PBS, PROCLİN 300 < 0,5 %)
- 6- 1 adet 15 ml TMB substrat solüsyon
- 7- 1 adet 15 ml stop solüsyon (1 M HCl)
- 8- 1 adet 20 ml yıkama solüsyonu (PBS, NaN₃ < 0,1 %)

3.5.2 Lipit peroksidasyonu tayini için kullanılan kimyasal maddeler

- | | |
|-----------------------------|-----------------|
| 1-Trikloroasetik asit (TCA) | Merck (Almanya) |
| 2-Tiyobarbitürik asit (TBA) | Merck (Almanya) |

3.5.3 GSH-Px tayini için kullanılan kimyasal maddeler

- | | |
|--------------------------------------|-----------------|
| 1- Potasyum dihidrojen fosfat | Merck (Almanya) |
| 2- Disodyum hidrojen fosfat dihidrat | Merck (Almanya) |
| 3- Glutatyon redüktaz | Fluka (İsviçre) |
| 4- β-NADPH | Sigma (Almanya) |
| 5- Glutatyon-redükte | Sigma (Almanya) |
| 6- Kümen hidroperoksit | Sigma (Almanya) |
| 7- Titripleks III | Merck (Almanya) |

3.5.4 SOD tayini için kullanılan kimyasal maddeler

- 1- Potasyum dihidrojen fosfat, Merck (Almanya)
- 2- Disodyum hidrojen fosfat dihidrat, Merck (Almanya)
- 3- CAPS, Sigma (Almanya)
- 4- Iodonitrotetrazolyum violet, Sigma (Almanya)
- 5-Ksantin, Merck (Almanya)
- 6-Ksantin oksidaz, Sigma (Almanya)

7 -Titripleks III, Merck (Almanya)

3.6 Kullanılan çözeltiler

3.6.1 Lipit peroksidasyonu için kullanılanlar

1- TCA çözeltisi (% 10): 10 gr TCA tartılıp, bir miktar distile suda eritilir ve son hacim 100 ml'ye tamamlanır.

2- TBA çözeltisi (% 0.67): 0.67 gr TBA tartılıp, bir miktar distile suda eritilir ve son hacim 100 ml'ye tamamlanır.

3.6.2 GSH-Px tayini için kullanılanlar

1- Kümen hidroperoksit çözeltisi (0.18 mM): Kümen hidroperoksitten 1.62 µl alınır, 50 ml distile su ile seyreltilir. Çözelti, günlük hazırlanır.

2- Glutasyon çözeltisi (4 mM): 0.0614 gr glutasyon tartılır ve hacmi 50 mM fosfat tamponu (pH: 7.2 olan ve 4.3 mM EDTA içeren) ile 50 ml'ye tamamlanır.

3- Glutasyon redüktaz ($\geq 0,5$ U/L): 10 µl glutasyon redüktaz alınır, 10 ml distile su ile seyreltilir. Bundan 50 µl çekilip, 50 mM fosfat tamponu (4.3 mM EDTA içeren ve pH: 7.2 olan) ile 50 ml'ye seyreltilir. Çözelti, günlük hazırlanır.

4- β -NADPH çözeltisi (0.34 mM): 0.0116 gr β -NADPH tartılıp hacmi 50 mM fosfat tamponu (pH: 7.2 olan ve 4.3 mM EDTA içeren) ile 50 ml'ye tamamlanır.

3.6.3 SOD tayini için kullanılanlar

1- Kümen hidroperoksit çözeltisi (0.18 mM): Kümen hidroperoksitten 1.62 µl alınır, 50 ml distile su ile seyreltilir. Çözelti, günlük hazırlanır.

2- Glutasyon çözeltilisi (4 mM): 0.0614 gr glutasyon tartılır ve hacmi 50 mM fosfat tamponu (pH: 7.2 olan ve 4.3 mM EDTA içeren) ile 50 ml'ye tamamlanır.

3- Glutasyon redüktaz ($\geq 0,5$ U/L): 10 μ l glutasyon redüktaz alınır, 10 ml distile su ile seyreltilir. Bundan 50 μ l çekilip, 50 mM fosfat tamponu (4.3 mM EDTA içeren ve pH: 7.2 olan) ile 50 ml'ye seyreltilir. Çözelti, günlük hazırlanır.

4- β -NADPH çözeltilisi (0.34 mM): 0.0116 gr β -NADPH tartılıp hacmi 50 mM fosfat tamponu (pH: 7.2 olan ve 4.3 mM EDTA içeren) ile 50 ml'ye tamamlanır.

3.7 Yöntem

3.7.1 MPO aktivitesinin ölçümü

Kalibratör, kontrol ve örnekler için yeterli sayıda mikropate hazırlandı. Mikropate üzerindeki kuyucuklara 100'er μ l kalibratör, kontrol ve örnek pipetlendi. 30 dakika süresince oda ısısında enkübe edildi. Bütün kuyucuklar 300 μ l yıkama solüsyonu ile 3 kez yıkandı. Her kuyucuğa 100 μ l enzim konjugat eklendi. 15 dakika süresince oda ısısında enkübe edildi. Tekrar kuyucuklar 300 μ l yıkama solüsyonu ile 3 kez yıkandı. Kuyucuklara 100 μ l TMB substrat solüsyon eklendi. 15 dakika oda ısısında enkübe edildikten sonra 100 μ l stop solüsyonu eklendi. 5 dakika oda ısısında enkübe edildi. Daha sonra 450 nm de eliza cihazında (ELX 808 ultramicroplate reader BIOTEK INSTRUMENTS, A.B.D) optik dansitesi okutularak sonuçlar U/ml olarak elde edildi. Elde edilen sonuçlar U/ mgr protein olarak hesaplandı.

3.7.2 Lipit Peroksidasyonunun Tayini:

Lipit peroksidasyon ürünlerinden olan MDA, Draper ve Hadley'in çift kaynatmalı tiyobarbitürik asit reaktivitesi metodu kullanılarak ölçüldü.

Deneyin prensibi: Yağ asidi peroksidasyonunun son ürünü olan MDA, TBA ile reaksiyona girerek, 532 nm'de maksimum absorban veren renkli bir kompleks oluşturur.

Deneyin yapılışı: 0.5 ml serum, üzerine 2.5 ml % 10'luk TCA eklenerek karıştırıldı. 15 dakika kaynatılıp soğutuldu. 5000 devir/dk'da 10 dakika santrifüj edildi. 2 ml süpernatant alınıp, üzerine 1ml % 0.67'lik TBA eklendi. Tüpler karıştırıldıktan sonra 15 dakika kaynatıldı ve hemen soğutuldu. 532 nm'de absorbanları, numune yerine distile su konularak hazırlanan köre karşı okundu.

Sonuçlar, MDA-TBA kompleksinin 532 nm'deki ekstinsiyon katsayısından ($1.56 \times 10^5 \text{ cm}^{-1}\text{M}^{-1}$) yararlanılarak nanomol/mg protein olarak hesaplandı.

Sonuçlar aşağıdaki şekilde hesaplandı:

$$A = a \times b \times c$$

$$c = A / a \times b$$

$$A \text{ mol cm} \times 1 \times 10^9 \text{ nmol} \times L$$

$$c = \frac{A}{1.56 \times 10^5 \text{ L cm mol } 10^3 \text{ ml}}$$

$$1.56 \times 10^5 \text{ L cm mol } 10^3 \text{ ml}$$

$$c \text{ (nmol/ml)} = A \times 57.69$$

A = absorban

a = ekstinsiyon katsayısı

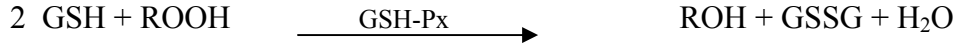
b = ışık yolu

c = konsantrasyon

3.7.3 GSH-Px Aktivitesinin Ölçümü:

Deneyin prensibi Paglia ve Valentine'nin metoduna dayanmaktadır.

Glutasyon peroksidaz, kümen hidroperoksid ile glutasyonun oksidasyonunu katalizler. Okside glutasyon, NADPH varlığında glutasyon redüktaz tarafından indirgenir. Bu arada NADPH, NADP^{+} ye oksitlenir.



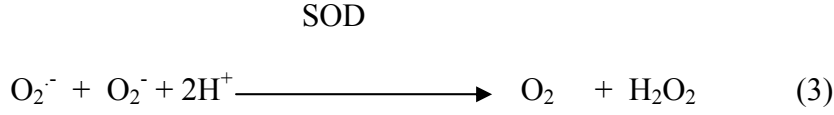
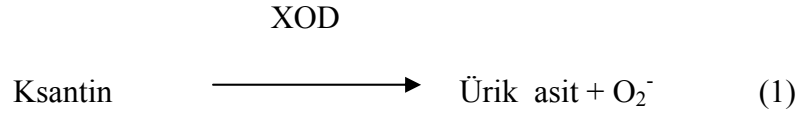
NADPH'nin azalmasına bağı olarak 340 nm'de meydana gelen absorbands değişimi ölçülerek enzim aktivitesi hesaplandı.

Deneyin yapılışı: Bir deney tüpünde 1 ml; glutasyon (4 mM), glutasyon redüktaz (≥ 0.5 U/L) ve β -NADPH (0.34 mM) çözeltilerini içeren reaktif ile 20 μ l numune karıştırılıp, ölçümden hemen önce 40 μ l kümen hidroperoksit (0.18 mM) ilave edildi. Enzim aktivitesini ölçmek için 340 nm'deki absorbands değişimi hesaplandı. U/L cinsinden bulunan enzim aktivitesi, homojenizasyon esnasındaki dilüsyon katsayısı ile çarpıldıktan sonra doku protein değerine bölünerek sonuçlar U/mgr birimi olarak ifade edildi.

3.7.4 SOD aktivitesinin ölçümü

Deneyin prensibi Sun ve arkadaşlarının metoduna dayanmaktadır.

Deneyin Prensibi: SOD çeşitli yollarla ortaya çıkan süperoksit radikalının H_2O_2 'ye dismutasyonu reaksiyonunu katalizler. Ksantin-ksantin oksidaz (XOD) sistemi tarafından üretilen O_2^- radikallerinin (reaksiyon 1), 2-(4-iyodofenil)-3-(4-(4-nitrofenol)-5-fenil tetrazolyum klorit (INT) ile meydana getirdiği kırmızı renkli formazon boyasının (reaksiyon 2), 505 nm dalga boyunda verdiği optik dansitenin spektrofotometrik olarak okunması esasına dayanmaktadır. Bu reaksiyona dayanan optik dansitedeki azalmadan yararlanarak, reaksiyonun % inhibisyonu belirlendi.



Deneyin Yapılışı: 25 µl homojenattan alındı ve % inhibisyonun % 30-60 arasında olması için örnekler dilüe edilmedi. 0.025 ml homojenata, 0.850 ml 0.05 mM ksantin çözeltisi (0.025 mM INT içeren) ve 40 mM'lık CAPS (0.94 mM'lık EDTA içeren) ilave edildi. 0.125 ml ksantin oksidaz (80 U/L) ilave edildikten hemen sonra 505 nm'de 37 °C'de 30 saniyelik gecikme fazının ardından, havaya karşı başlangıç absorbansı (A₁) ve 3 dakika sonra da son absorbans (A₂) okundu. Aynı işlemler köre karşı denemeyle de tekrarlandı.

$$\% \text{ inhibisyon} = 100 - \frac{\Delta A(\text{numune})/\text{dk}}{\Delta A(\text{kör})/\text{dk}} \times 100$$

Standart (5.2 U/mL) çalışılarak hazırlanan % inhibisyon-konsantrasyon grafiğinden yararlanılarak konsantrasyonlar saptandı. Enzim aktivitesi U/ml olarak bulundu. Bu değerler homojenizasyon sırasındaki dilüsyon katsayısı ile çarpılıp dokunun protein değerine bölünerek U/mgr birimi şeklinde sonuçlar verildi.

3.8 Homojenizasyon

Ratların donmuş akciğer örnekleri 500 mg tartıldıktan sonra 4,5 ml pH 7.4'deki %0.05 sodyum azid içeren 100 mmol / L lik fosfat tamponunda homojenizatörle (Ultra-Turrax T25, Almanya) 1 dk süreyle buz banyosu içerisinde homojenize edildi. İşlem sonunda elde edilen %10' luk homojenatlar 30 sn süreyle buz banyosu içerisinde sonike edildi (Bandelin Sonoplus UW 2070, Almanya). Örnekler daha sonra 4000 g' de, +4 °C'de soğutmalı santrifüjde (Eppendorf MR 5415, Almanya) 10 dk süreyle santrifüj edilerek süpernatantlar elde edildi. Süpernatantların protein miktarı Lowry metoduna göre ölçüldü. Daha sonra süpernatantlardan MDA, SOD, GSH-Px ve MPO düzeyleri ölçüldü.

3.9 Akciğer Doku Örneklerinin Histopatolojik Olarak İncelenmesi

Histopatolojik inceleme için doku örnekleri % 10 ' luk formaldehitde 24 saat fikse edildi. Örneklerin tümü doku takip cihazında (Shandon Patcenter) rutin takibe alınarak parafin bloklar hazırlandı. Bu parafin bloklardan mikrotom (Leica Rotary) ile her doku örneği için 5 µm kalınlığında seri kesitler hazırlanarak, Hemotoksilen-Eozin (HE) boyası ile boyandı. Hazırlanan preparatlar gruplara kör olan tek bir patolog tarafından, ışık mikroskopunda (Nikon UFX-IIA, Japan) akciğer dokusu interstisyum ve alveollerdeki iltihabi hücreleri incelendi.

3.10 İstatiksel inceleme

İstatistiksel değerlendirmeler "SPSS 11.0 for Windows" paket programı kullanılarak yapıldı. Genel olarak gruplar arasında anlamlı bir fark olup olmadığı Kruskal-Wallis varyans analiziyle değerlendirildi. Grupların birbiriyle karşılaştırılması için Mann-Whitney U testi kullanıldı. P değerinin 0.05'den küçük olması anlamlı olarak kabul edildi. Gruplar arasındaki

parametrelerin median değerleri, 90ıncı, 75inci, 50nci, 25inci ve 10uncu persentilleri boksör torbası grafiği ile gösterildi.

4. BULGULAR

Deney gruplarının akciğer doku MPO, MDA, GSH-PX ve SOD median değerleri ve interquartile range aralığı tablo-1 de gösterildi.

PARAMETRE /GRUPLAR	Grup I (sham)	Grup II (IIR)	Grup III (IIR+CAPE)
MPO (U/mg protein)	0.040203 (0.02799)	0.097151 (0.03996)	0.056119 (0.04740)
MDA (nmol/mg protein)	0.556227 (0.18001)	1.620173 (0.25407)	1.331242 (0.31560)
GSH-Px (U/mg protein)	0.079275 (0.02276)	0.049599 (0.00967)	0.044445 (0.00480)
SOD (U/mg protein)	0.324489 (0.14665)	0.638070 (0.14425)	0.555762 (0.16201)

Tablo 1: Grupların MPO, MDA, GSH-PX ve SOD median değerleri ve (interquartile range)

Kruskal Wallis Test kullanılarak 3 grup arasında değerler yönünden karşılaştırma yapıldı.

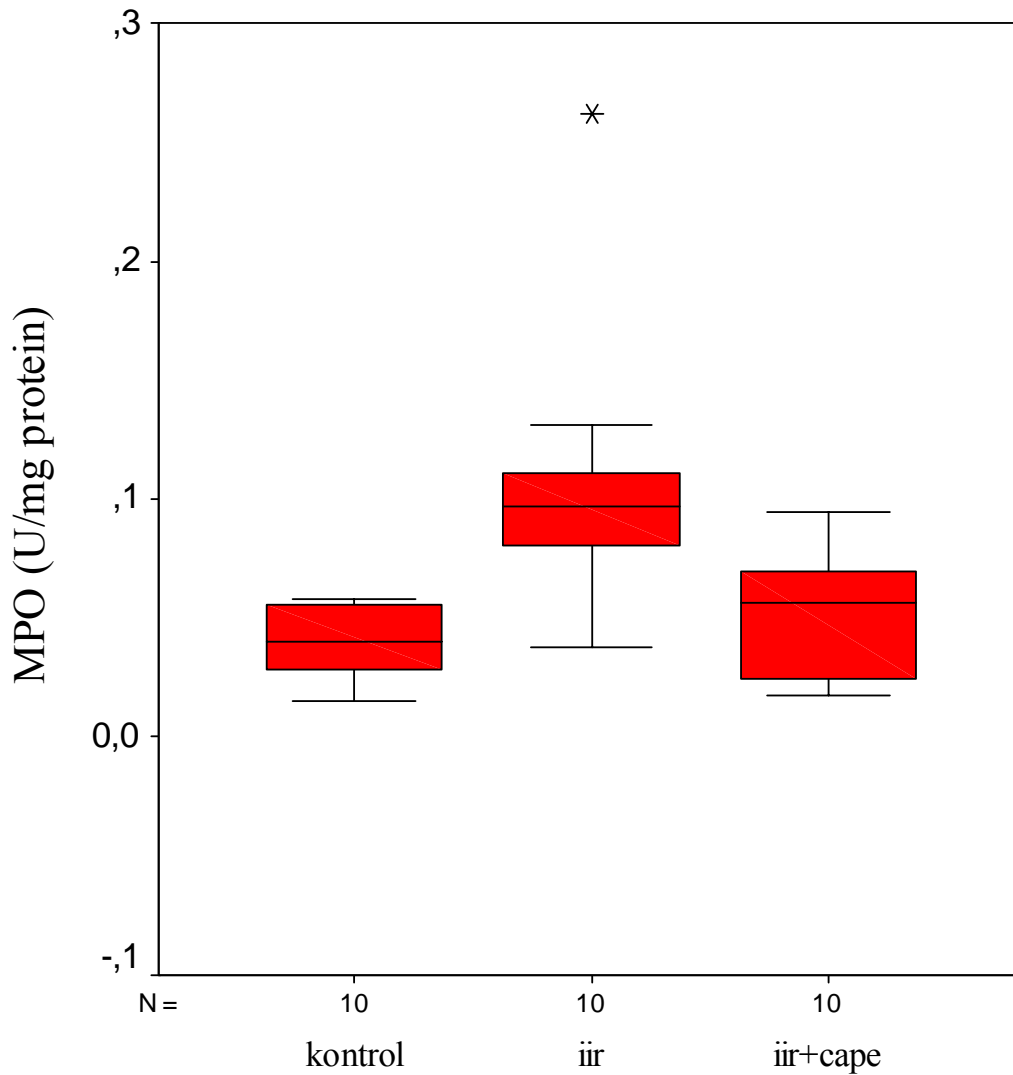
P < 0.016 olanlar anlamlı kabul edildi. Her 3 grupta değerler yönünden tüm parametrelerde anlamlı farklılıklar saptandı.(P<0,016) (Tablo 2)

	MDA	MPO	SOD	GPX
Chi-Square	21.099	13.675	19.954	20.023
df	2	2	2	2
Asymp.Sig.	0.0002	0.001	0.0004	0.0004
p değeri				

Tablo 2: Üç grubun MDA, MPO, SOD, GSH-Px düzeyleri yönünden birbirleri ile karşılaştırılması

4.1. Myeloperoksidaz (MPO)

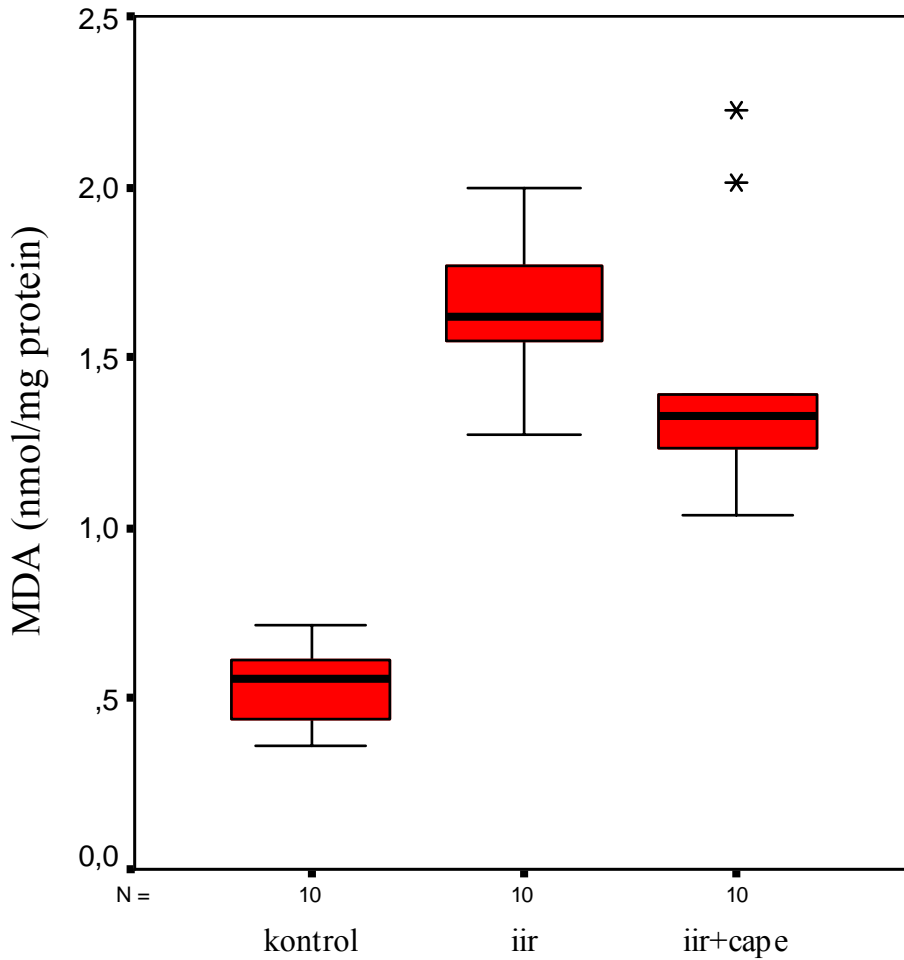
Grupların median MPO düzeyleri şekil-6’da gösterildi. Üç grubun median MPO düzeyleri arasında anlamlı fark saptandı ($\chi^2=13.675$, 2 d.f., $p<0.016$). Grup I ve II’nin median MPO düzeyleri sırasıyla 0.040203 U/mgr protein ve 0.097151 U/mgr protein olarak ölçüldü. İİR un etkisi ile her iki grubun MPO değerleri arasında anlamlı fark gözlemlendi. ($p:0.01$). Grup III’de; İİR ile beraber CAPE verilen grupta, median MPO düzeyi 0.056119 U/mgr protein ölçülerek, Grup I’e göre anlamlı olarak artmış, grup II’ye göre anlamlı olarak azalmış olduğu görüldü. ($p:0.04$)



şekil-6: Grupların median MPO düzeylerinin boksör torbası grafiğinde gösterilmesi. Yatay çizgiler 90ncı, 75inci, 50nci (median), 25inci ve 10uncu persentilleri göstermektedir.

4.2 Malondialdehit (MDA)

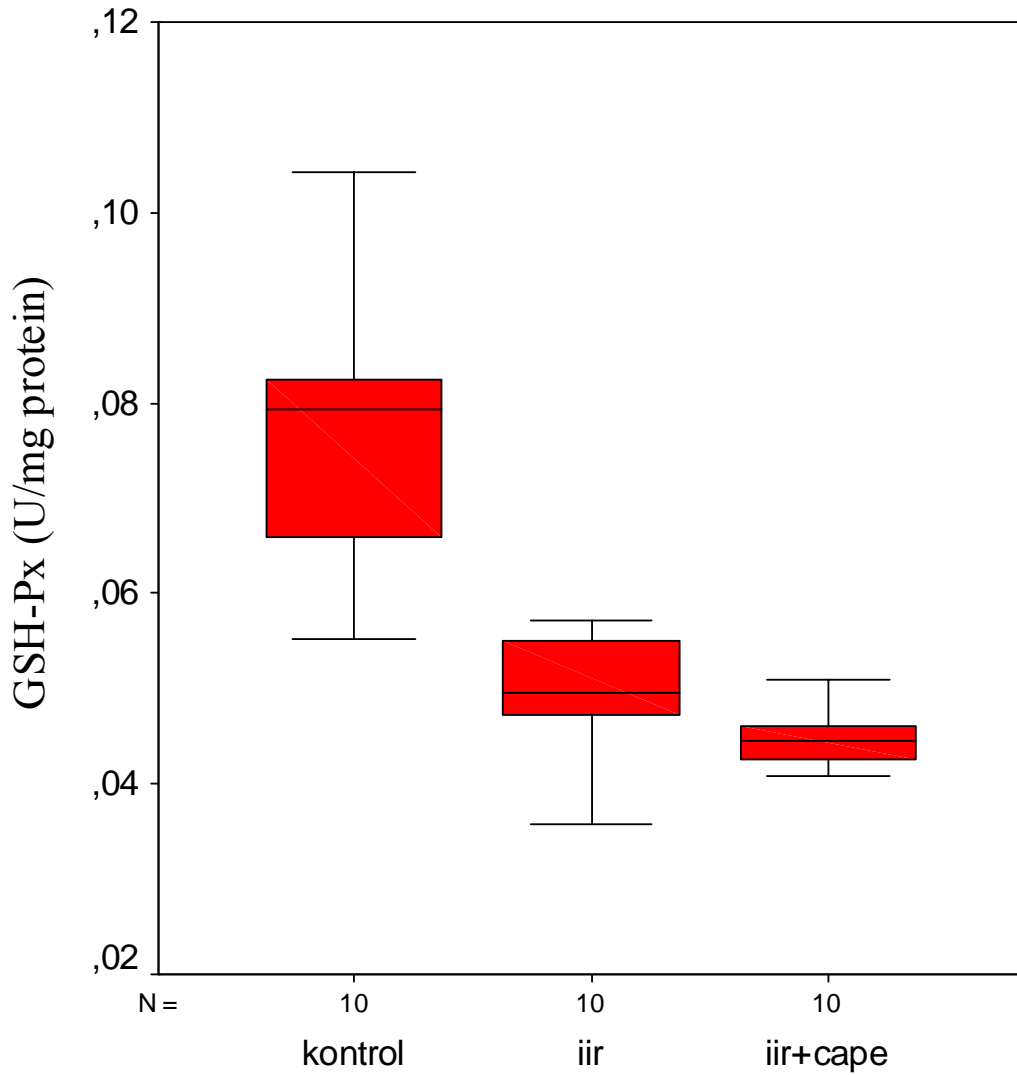
Grupların median MDA düzeyleri şekil-7’de gösterildi. Üç grubun MDA ortalamaları arasında anlamlı fark saptandı ($\chi^2=21.099$, 2 d.f., $p<0.016$). Grup I ve II’nin median MDA düzeyleri sırasıyla 0.556227 nmol/mg protein ve 1.620173 nmol/mg protein olarak ölçüldü. İki grubun median MDA değerleri arasında anlamlı bir fark saptandı (**p:0.0001**). Ratlarda İİR sonrasında median MDA düzeyi anlamlı olarak artmıştı. Grup III’de İİR ile beraber CAPE verilen grupta, median MDA değeri 1.331242 nmol/ mg protein olarak ölçülerek, Grup I’e göre anlamlı olarak artmışken (**p< 0.0001**), Grup II’ye göre anlamlı derecede azalmıştı.(**p<0.049**)



Şekil 7: Grupların median MDA düzeylerinin boksör torbası grafiğinde gösterilmesi. Yatay çizgiler 90ncı, 75inci, 50nci (median) ve 10uncu persentilleri göstermektedir.

4.3 Glutasyon peroksidaz (GSH-Px)

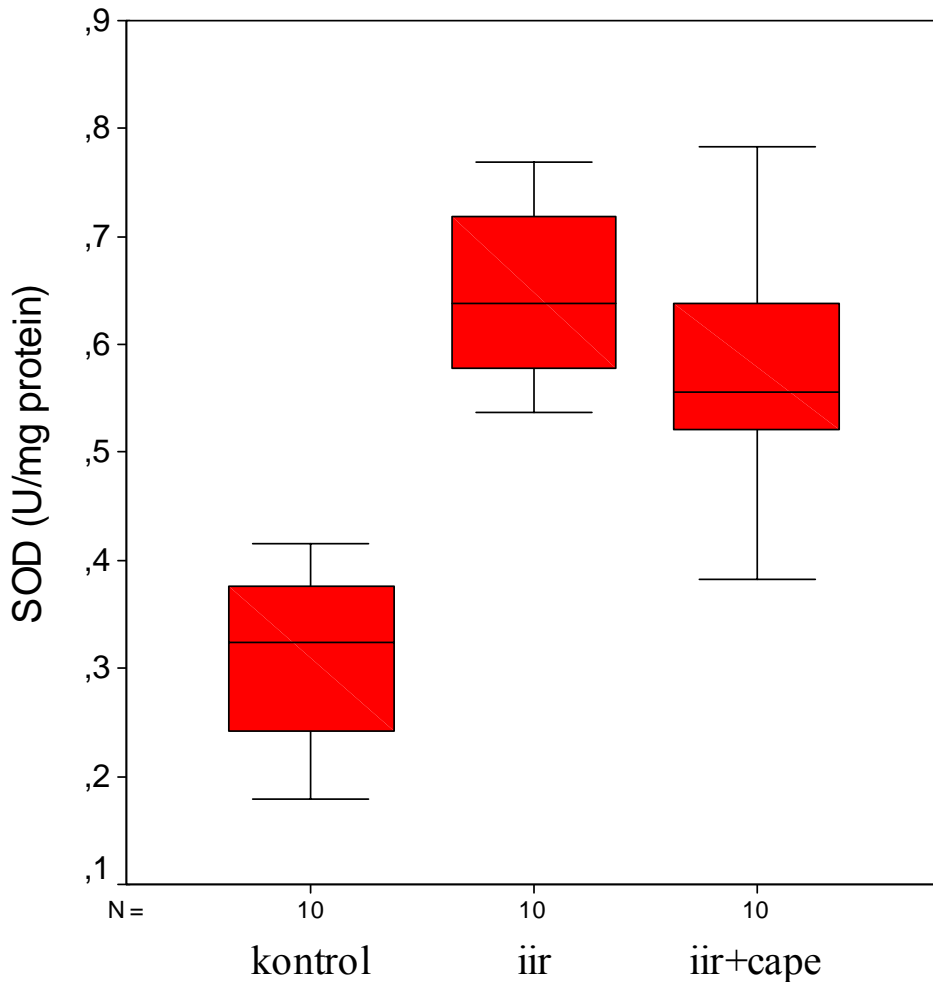
Grupların median GSH-Px düzeyleri şekil-8’de gösterildi. Üç grubun median GSH-Px düzeyleri arasında anlamlı fark saptandı ($\chi^2=20.023$, 2 d.f., $p<0.016$). Grup I ve II’nin median GSH-Px düzeyleri sırasıyla 0.079275 U/mgr protein ve 0.049599 U/mgr protein olarak ölçüldü. İİR un etkisi ile her iki grubun median GSH-Px değerleri arasında anlamlı fark gözlemlendi. ($p:0.0003$). Grup III’de; İİR ile beraber CAPE verilen grupta, median GSH-Px düzeyi 0.044445 U/mgr protein ölçülerek, Grup I’e göre anlamlı olarak azalmış olduğu görüldü. ($p:0.0001$) Grup II ve Grup III arasında median GSH-Px düzeyleri yönünden anlamlı fark gözlenmedi. ($p:0.059$)



Şekil 8 : Grupların median GSH-Px düzeylerinin boksör torbası grafiğinde gösterilmesi. Yatay çizgiler 90ıncı, 75inci, 50nci (median), 25inci ve 10uncu persentilleri göstermektedir.

4.4 Süperoksit dismutaz (SOD)

Grupların median SOD düzeyleri şekil-9’da gösterildi. Üç grubun median SOD düzeyleri arasında anlamlı fark saptandı ($\chi^2=19.954$, 2 d.f., $p<0.016$). Grup I ve II’nin median SOD düzeyleri sırasıyla 0.324489 U/mgr protein ve 0.638070 U/mgr protein olarak ölçüldü. İİR un etkisi ile her iki grubun median SOD değerleri arasında anlamlı fark gözlemlendi. ($p<0.0001$). Grup III’de; İİR ile beraber CAPE verilen grupta, median SOD düzeyi 0.555762 U/mgr protein ölçülerek, Grup I’e göre anlamlı olarak artmış olduğu görüldü. ($p<0.0002$) Grup II ve Grup III arasında median SOD düzeyleri yönünden anlamlı fark gözlenmedi. ($p<0.096$)



Şekil 9: Grupların median SOD düzeylerinin boksör torbası grafiğinde gösterilmesi. Yatay çizgiler 90ıncı, 75inci, 50inci (median), 25inci, 10uncu persentilleri göstermektedir.

4.5 Histopatolojik bulgular

Akciğer dokusu histopatolojik değerlendirme için Özdülger ve ark.(82)'nin yayınında belirtilmiş olduğu şekilde akciğer doku hasarı değerlendirme ölçeği kullanıldı. Bu ölçeğe göre;

Grade 1; Normal akciğer histolojisini

Grade 2; Hafif derecede nötrofil lökosit infiltrasyonunu

Grade 3; Orta derecede nötrofil lökosit infiltrasyonunu, perivasküler ödem formasyonunu, akciğer yapısında kısmi destrüksiyonu

Grade 4;Yoğun nötrofil lökosit infiltrasyonunu, pulmoner yapıda tam destrüksiyonu tanımlar.

Her üç grup ratların akciğer dokuları histopatolojik inceleme sonucunda;

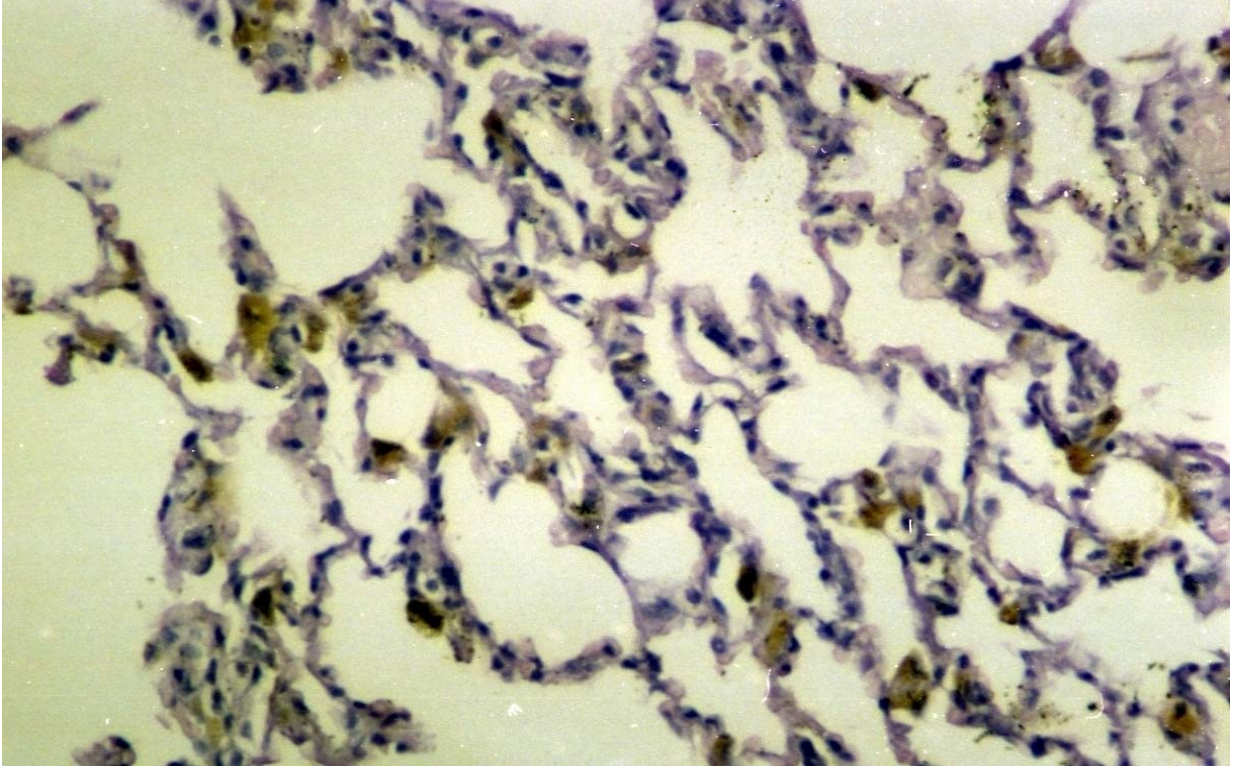
Grup I (kontrol) deki 10 adet ratın akciğer dokuları incelendiğinde 8 tanesinin (%80) akciğer dokusu grade I (Normal akciğer histolojisi)(resim 5), 2 adet ratın (%20) akciğer dokusu grade II (Hafif derecede nötrofil lökosit infiltrasyonu) olarak değerlendirildi.

Grup II (İİR) deki 10 adet ratın akciğer dokuları incelendiğinde 7 tanesinin (%70) akciğer dokusu grade III (Orta derecede nötrofil lökosit infiltrasyonu, perivasküler ödem formasyonu, akciğer yapısında kısmi destrüksiyon) (resim 6), 3 tanesinin (%30) akciğer dokusu grade II (hafif derecede nötrofil lökosit infiltrasyonu) olarak değerlendirildi.

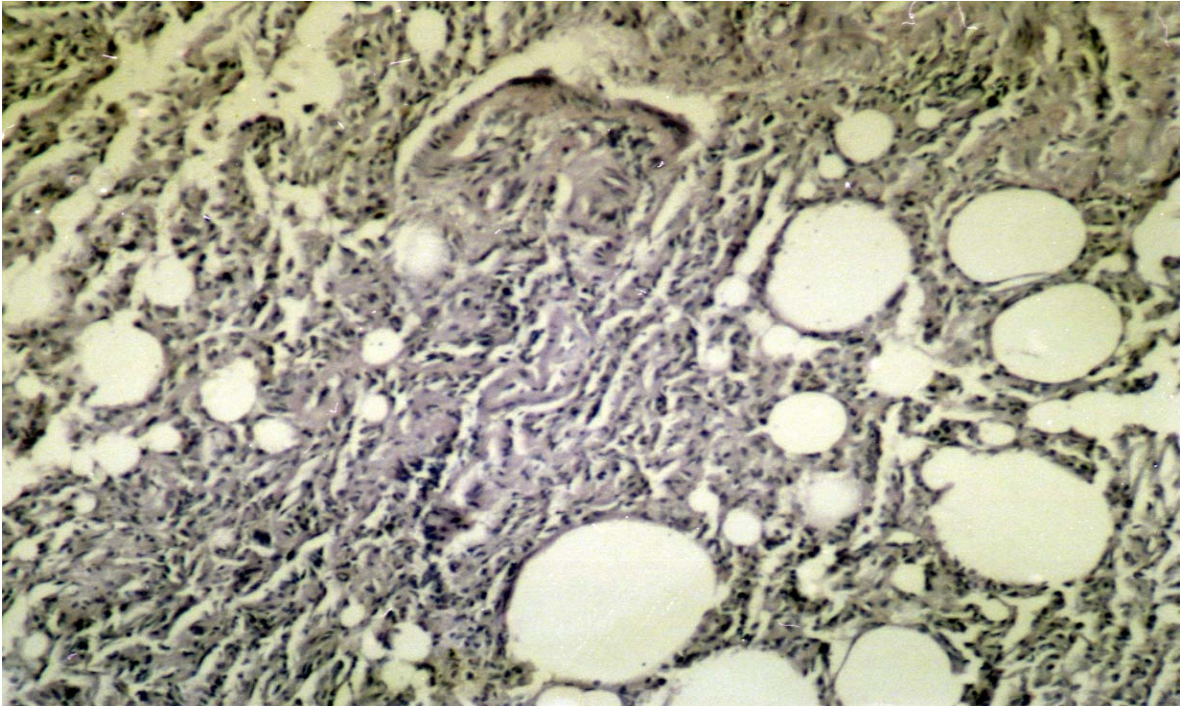
Grup III (IİR+CAPE) deki 10 adet ratın akciğer dokuları incelendiğinde 7 ratın (%70) akciğer dokusu grade II (resim 7,8), 3 ratın (%30) akciğer dokusu grade I olarak değerlendirildi..

Gruplar arası akciğer histopatolojisi değerlendirildiğinde, kontrol grubu ile İİR oluşturulan grup (grup I ve grup II) karşılaştırıldığında lökosit infiltrasyonu, perivasküler ödem formasyonu, akciğer yapısında destrüksiyonun belirgin şekilde arttığı gözlemlendi. Bu kriterler göz önüne alınarak İİR yapılan her iki grup (grup II ve grup III) karşılaştırıldığında; CAPE'

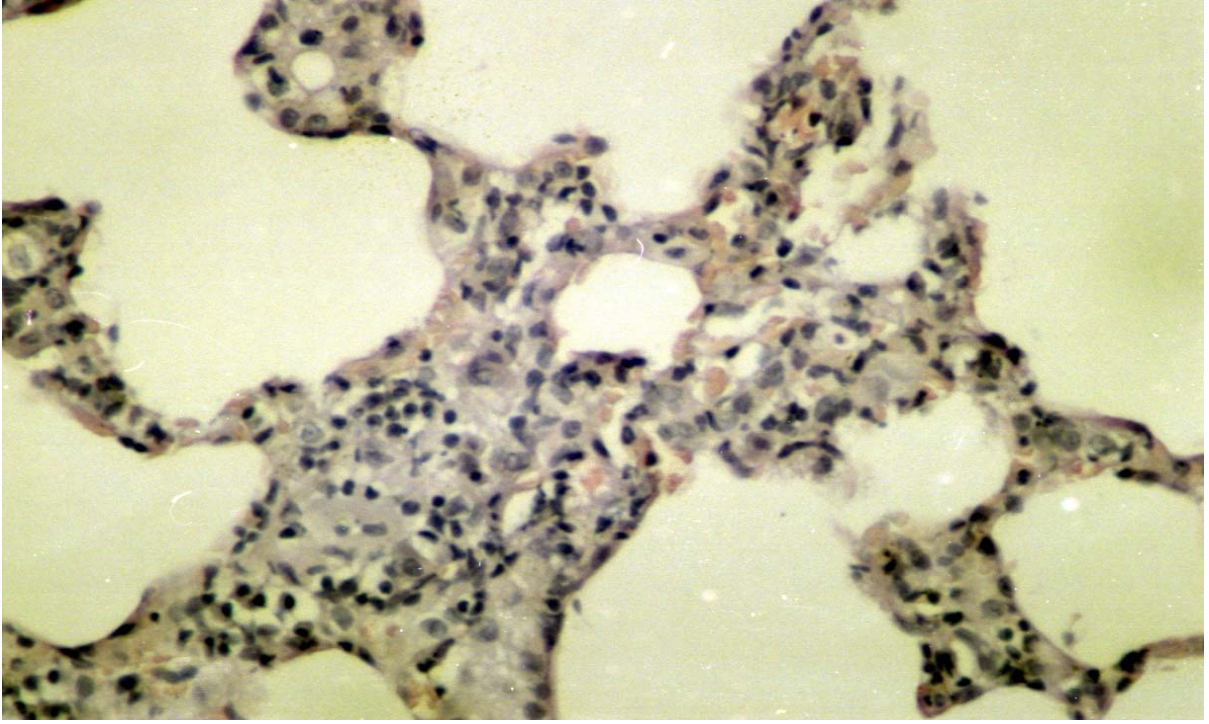
nin lökosit infiltrasyonunu, perivasküler ödem formasyonunu ve akciğer yapısında destrüksiyonu azalttığı gözlemlendi.



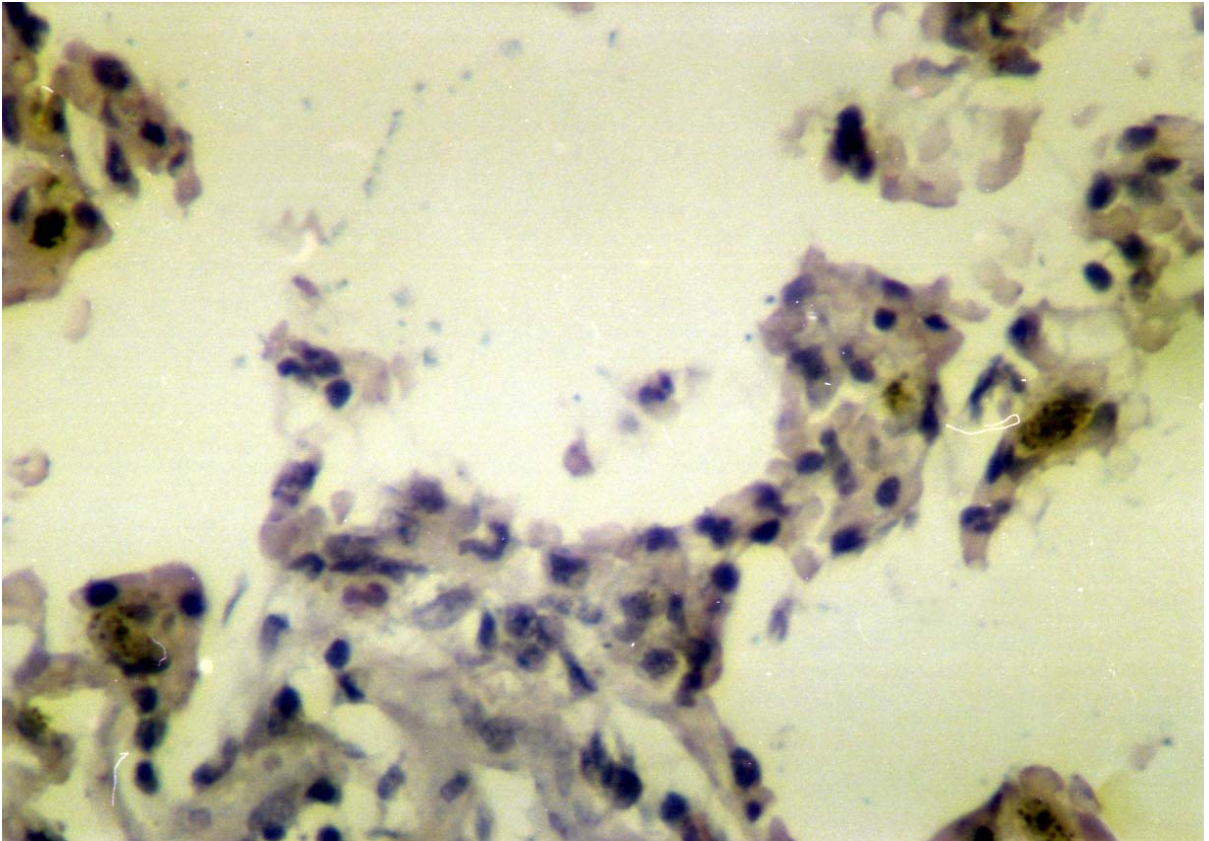
Resim 5: Normal akciğer dokusu (grade I)(H.E., x200)



Resim 6: Orta derecede nötrofil lökosit infiltrasyonu,perivasküler ödem formasyonu,akciğer yapısında kısmi destrüksiyon (grade III)(H.E., x40)



Resim 7 : Hafif derecede nötrofil lökosit infiltrasyonu (grade II).(H.E., x200)



Resim 8: Alveol duvarında ve intra alveolar nötrofil (Grade II) (H.E., x200)

5. TARTIŞMA VE SONUÇ

Daha önce literatürde rastlamadığımız ve Deneysel İİR modelinde CAPE'nin akciğer hasarını önlemedeki etkinliği araştırılan çalışmamızda; Grup II'de, İİR sonrasında akciğerlerde nötrofil sekestrasyonu, serbest radikal oluşumu (MPO,MDA düzeyleri) artmıştır. Histopatolojik olarak incelenen akciğer dokularında ise Grade III hasar tespit edildi. Grup III'de ise, iskemi sonrasında intraperitoneal olarak 10 µgr/kg dozunda CAPE verilen ratlarda; MDA ve MPO düzeylerinin istatistiksel olarak anlamlı azaldığı görülüp, histopatolojik olarak incelendiğinde ise akciğer hasarının Grade II düzeyinde olduğu saptandı. Deneysel İİR modelinde CAPE'nin oluşan akciğer hasarına olumlu etkileri mevcuttur.

İİR genellikle morbidite ve mortalite ile sonuçlanan ciddi bir tablodur (1). İntestinal kan akımında bozukluğa yol açan durumlar oldukça geniş bir spekturuma sahip oldukları için her yaş grubundan hasta İİR riski altındadır. Küçük yaş gruplarında sık görülen intestinal invaginasyon, nekrotizan enterkolit, daha büyük yaş grubunda malrotasyon ve volvulus İİR sebebi olabilir. Kalp ve damar hastalığı olan yaşlılarda ise arteriel emboliye veya in situ trombüse bağlı olarak İİR gelişebilir(2). Ayrıca kanama, hipovolemi, kalp yetmezliği, travma, inkarsere inguinal herni, adhesive intestinal obstrüksiyon, hipoksi, hipotansiyon, koagülopatiler, vaskülopatiler, kardiyak ve aortik cerrahi durumlarda da İİR ortaya çıkabilir (3-4). İİR etyolojik açıdan geniş bir yelpazeye sahip olduğu için klinik açıdan oldukça önemi olan bir durumdur.

İskemik dokuda kan akımı yeniden restore edildiğinde iskemi-reperfüzyona bağlı olarak meydana gelen hasarın o bölgede sınırlı kalmadığı, kardiyak, renal ve pulmoner komplikasyonların geliştiği, akciğerlere inflamatuvar hücrelerin akümülasyonu ile birlikte olan pulmoner hipertansiyon, hipoksemi, non kardiyojenik pulmoner ödem ile karakterize pulmoner disfonksiyon gelişmektedir..

Bilindiği üzere, intestinal sistemde iskemi sonucunda kan akımının kesilmesi sonucu oluşan hasar, kan akımının sağlanmasını takiben reperfüzyonla gerçekleşen hasardan çok daha fazla olmaktadır. Reperfüzyon komplikasyonlarının iskemiye uğramış dokularda büyük oranda lokal hasara uğramış hücrelerden açığa çıkan lizozomal enzimler, potasyum ve tamponlanmamış asitler gibi anaerobik metabolizma ürünlerine bağlı olduğu düşünülse de akciğer gibi uzak organlardaki reperfüzyon hasarında bu anaerobik metabolizma ürünlerinin etkisi araştırılmalıdır. Uzaktaki bir iskemiye takiben gelişen respiratuar komplikasyonlar ile dolaşımdaki bağlantıyı gösteren inandırıcı deneysel ve klinik bulgular bildirilmiştir(83).

Klausner ve arkadaşlarının (83) öne sürdüğü tezde oksijenizasyon ürünleri ve reperfüzyon esnasında ortama salınan enflamasyon mediatörleri gibi ajanların beyaz kan hücreleri ile birlikte hareket etmesinin birincil derecedeki önemi vurgulanmıştır.

İskemik bir dokuda kan akımının yeniden başlaması durumunda, özellikle dokuya gelip yerleşen PMNL'ler tarafından salınan serbest oksijen radikalleri dokudaki yıkımı artırıcı etki yapmaktadırlar. Serbest oksijen radikallerinin dolaşıma salınımı sistemik dolaşımdaki PMNL'leri stimüle edip, bunların alveolar sekestrasyonuna sebep olmaktadır. Serbest oksijen radikallerinin lipid ve nükleik asitlerin peroksidasyonu yolu ile doku hasarına neden olduğu düşünülmektedir(8,19,21).

Akciğerdeki değişikliklerin akut respiratuar distress sendromlu hastalarda görülenlere benzer olduğu ve multipl organ yetmezliğinin bir parçası olduğu belirtilmiştir. Son birkaç dekattan beri yapılan çalışmalarda nötrofillerin santral bir rol oynadığı çok sayıda mediatör tanımlanmıştır. İskemik dokunun reperfüzyonu hasar bölgesi ile sınırlı olmayan enflamasyona yol açar. Serbest oksijen türevleri, araşidonik asit metabolitleri olan LTB₄ ve TXA₂ gibi kemoaktivatörlerin dolaşıma salınımının, dolaşan PMNL'leri stimüle ettiğine ve bunların pulmoner sekestrasyonuna neden olduğuna inanılmaktadır(83).

Daha sonraki çalışmalar, akciğer fonksiyonundaki değişikliklerin erken reperfüzyon esnasındaki plazma TxA₂ ve LTB₄ seviyelerindeki artış ile ilişkili olduğunu ve bu ekozonoidlerin sentezinin inhibe edilmesinin pulmoner hasarı büyük oranda azalttığını göstermiştir(84).

Nötrofil aracılığı ile oluşan hasar için önceden mevcut olması gereken ön koşul mikrovasküler endoteliuma nötrofillerin adezyonudur. Adezyon reseptör bağlama mekanizması ile gerçekleşir. Nötrofil adezyon molekülleri CD11/CD18 membran glikoprotein kompleksinin üyeleridir. Bu moleküller endotel üzerindeki endotelial lökosit adezyon molekülü (ELAM-1) ve interselüler adezyon molekülü (ICAM-1) ile ilişkilidir. Monoklonal antikoların spesifik olarak dolaşımdaki nötrofillerin üzerindeki CD11/CD18 kompleksine bağlandığı ve doku hasarını engellediği aynı zamanda da nötrofilleri 20 kat azalttığı belirlenmiştir(85,86).

Fakat yapılan bir başka çalışmada Caty ve ark.(87), İİR modelinde ratlarda anti-TNF antikoları denemişler ve çalışmanın sonucunda; anti-TNF antikoları verilen grupta, kontrol grubuna göre akciğer dokusunda istiksel olarak azalmış mikrovasküler permeabilite gözlenmiş. Fakat her iki grupta nötrofil sekestrasyonu açısından anlamlı fark bulunmamış.

Wilmore ve arkadaşları (3) barsak mukozal bariyerinin bozulması sonucunda sistemik dolaşıma geçen endotoksinin karaciğer Kupffer hücrelerinden TNF-alfa üretim ve salınımını artırarak akciğer hasarını oluşturduğunu göstermişlerdir.

İİR hasarını önlemeye yönelik yapılan çalışmalardan bir tanesine göre de; reperfüzyon sonucu venöz kan yoluyla reaktif oksijen içerikleri başta olmak üzere toksik yapıların sistemik dağılımı gerçekleşmektedir. Reperfüzyon sonucunda nötrofil aktivasyonu ve nötrofillerden açığa çıkan mediyatörlerin bir takım yöntemler ve medikal olarak engellenmesini takiben; gerek karaciğerde bulunan Kupffer hücrelerinin blokajı gerekse

splenektomi yapılarak uzak organ hasarının azaltılması gibi cerrahi olarak bir takım deneysel alışmalarda başarı elde edilmiştir (3,88).

Antioksidan enzimlerin de İİR sonrası akciğer hasarına karşı koruyucu etkisi gösterilmiştir. Bu çalışmalarda da şekilde lipid peroksidasyonu ile antioksidan enzim düzeyleri birbirine paralel seyretmiştir.

Koike ve arkadaşları (89) İİR sonrası akciğerde MPO ve SOD düzeyinin arttığını göstermişlerdir. Simpson ve arkadaşları (11) İİR sonrası akciğerde MPO düzeyinin arttığını, İİR öncesinde PMNL antiserumu verilerek nötrojeni oluşturulduktan sonra ise akciğer MPO düzeyinin azaldığını göstermişlerdir. MPO düzeyi ile PMNL sayısı arasında pozitif korelasyon olduğu bilinmektedir (89).

Koltuksuz ve ark.(15) İİR oluşturulan rat modelinde CAPE'nin intestinal hasara koruyucu etkisini araştırmışlar ve CAPE'nin, İİR sonrası ince barsaklarda oluşan hasarı azalttığını rapor etmişler.

Akciğer dokusu nötrofil sekestrasyonunu kantitatif olarak gösterebilecek bir yöntem doku MPO aktivitesinin spektrofotometrik olarak ölçülmesidir(90). Akciğerlerdeki nötrofil konsantrasyonunun histolojik morfolojik analizi, MPO aktivasyonu ile korelasyon gösterir. Serbest oksijen radikalleri hem dokuya doğrudan zarar vermekte hem de PMNL'in hasarlı dokuda birikmesini sağlamaktadır. Nötrofil ve monositler MPO ihtiva ederler. Aktive olduktan sonra dokuya gelen PMNL'ler MPO gibi bir takım enzimlerini açığa çıkarırlar. Bunların oksidasyonu sonucu çeşitli yollarla organizmayı etkileyen toksik ajanlar meydana gelir. Cavriani ve ark.(91) ratlarda İİR modeli oluşturmuşlar ve MPO düzeyini İİR oluşturulan grupta, kontrol grubuna göre daha yüksek saptamışlar. Bizim yaptığımız çalışmada da akciğer dokusunda MPO düzeyi; İİR oluşturulan grupta, kontrol grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı yüksek bulundu. Antioksidan, antiinflamatuvar, lipid peroksidasyonun inhibe edici özelliği olan CAPE verilen 3. grupta MPO düzeyinin, İİR grubuna göre istatistiksel olarak

anlamli azalmis olduğu görüldü. Elde ettiğimiz sonuç, CAPE'nin PMNL'lerin sekestrasyonunu azalttığı, antioksidan, antiinflamatuvar etkinliğinin olduğunu desteklemekteydi.

İİR da oluşan serbest radikaller yüksek reaktiviteleri nedeni ile membrandaki lipidlere saldırarak lipid peroksidasyonunu başlatır. Membran fosfolipidlerinde gerçekleşen lipid peroksidasyonu sırasında lipid hidroperoksit, siklik peroksit ve siklik endoperoksit oluşur. Bu ürünler aldehite parçalanırlar. Bu esnada MDA oluşur. MDA iskemi sırasında az miktarda üretilirken reperfüzyon esnasında belirgin olarak artmaktadır. MDA ölçümü lipid peroksidasyonunun ölçümü için kullanılır. Akciğerlerde İR hasarı esnasında akümüle olan lipid peroksidasyon ürünü MDA'nın TBARS ile verdiği reaksiyon spektrofotometrik olarak ölçülerek akciğer hasarının derecesi hakkında fikir edilebilir. Ozan ve ark.(92) İR modeli üzerinde yapmış oldukları çalışmada, kan ve doku MDA düzeylerini İR grubunda yüksek bulmuşlar. Bizim de yapmış olduğumuz çalışmamızda akciğer dokularında MDA düzeyleri ölçüldü. İİR grubunda ölçülen MDA düzeyi, kontrol grubuna göre artmış olmakla birlikte bu artış istatistiki olarak anlamlı idi. Lipid peroksidasyonunu inhibe edici özelliği olan CAPE verilen grupta MDA düzeyi, İİR grubuna göre istatistiki olarak anlamlı derecede azalmıştı. Bu sonuç CAPE nin lipid peroksidasyonu inhibe ettiği yolundaki hipotezleri desteklemekteydi.

Oksijeni metabolize eden tüm hücrelerde bulunan SOD ve GSH-Px enzimleri serbest oksijen radikal toksisitesine karşı önemli defans mekanizması oluştururlar. Reperfüzyon esnasında oluşumu artan serbest radikalleri ortadan kaldırmaya yönelik SOD enzimi, toksik süperoksit radikallerinin H_2O_2 ve moleküler oksijene dismutasyonunu hızlandırır. Plazmada üretilen ve eritrosit hücre membranını geçebilen H_2O_2 ve süperoksit iyonları eritrositlerde toplanır. Eritrositlerde H_2O_2 'in detoksifikasyonunu sağlayan GSH-Px, doğal bir antioksidan savunma sistemidir. GSH-Px; H_2O_2 ve diğer peroksitlerin yıkımını katalize eden önemli bir antioksidandır. Kanda ve homojenize edilmiş dokularda SOD ve GSH-Px düzeylerine

bakılarak İR hasarından ne düzeyde etkilendiği belirlenebilir. Bizim çalışmamızda akciğer dokusu GSH-Px düzeyi; İİR grubunda kontrol grubuna göre daha düşük seviyede ölçüldü. İİR grubu ve CAPE grubu arasında ise istatistiksel olarak anlamlı bir fark saptanmadı. Bu sonuç ile GSH-Px ölçümünün daha çok eritositlerdeki hasarı gösterdiğini ve dokularda oluşan hasarı gösteremeyebileceği düşünüldü.

Çalışmamızda grupları SOD düzeyi açısından kıyasladık. SOD düzeyi İİR grubunda kontrol grubuna göre istatistiksel açıdan anlamlı olarak artmıştı. CAPE verilen gruptaki SOD düzeyi, İİR grubunun SOD düzeyine göre azalmıştı fakat bu azalma istatistiksel açıdan anlamsızdı.($p>0.05$).

İİR sonrasında başta akciğerler olmak üzere uzak organlarda hasar oluşur (13). Bu durum hastada çoğul organ yetersizliğine ve ölüme neden olabilir. Yapılan çalışmalarda da değinildiği gibi, intestinal İR sonrası akciğer hasarı; akciğerde ödem, hemoraji, PMNL infiltrasyonu ile karakterize olan bir tablodur (26). İİR sonrası oluşan sıkıntılı solunum sendromundan dolaşımdaki PMNL'lerin aktivasyonunun artışı, akciğerlerde PMNL retansiyonu ve buna bağlı pulmoner mikrovasküler hasar sorumlu tutulmaktadır. Sıkıntılı solunum sendromu, protein ve PMN lökositlerden zengin sıvının akciğer interstisyumuna ve alveolar boşluğa sızması ile oluşmaktadır. Normalde endotel bazal membranı geçirgen değildir veya yüksek seçici bir geçirgenliğe sahiptir. Damar endotelinin bütünlüğünden katedrin isimli proteinler sorumludur. İİR sonrası aktive olan PMNL'lerden salınan serin proteaz, elastaz, endotel bazal membranı yapısındaki katedrinleri hidrolize ederek kapiller por boyutununun genişlemesine katkıda bulunur. Bu durum, endotelial bazal membranın geçirgenliğini artırarak makromolekül ve sıvılara ek olarak PMNL'lerin akciğer interstisyumuna ve alveolar boşluğa geçişine neden olur (32).

Köksel ve ark.'nın(64) yaptığı çalışmada ratlara lipopolisakarit enjekte edilerek sepsis oluşturulmuş ve bu sepsis modelinde CAPE'nin akciğer hasarına olan koruyucu etkisi

araştrılmış. Akciğerler histopatolojik olarak incelenmiş ve bizim de çalışmamızda kullandığımız Özdülger ve ark.(82)'nin yayınında belirtilmiş olduğu şekilde akciğer doku hasarı değerlendirme ölçeği kullanılmış. Kontrol grubunda akciğer histopatolojisi grade 1 olarak değerlendirilmiş. Sepsis grubunda akciğer histopatolojisi grade 2-3 olarak değerlendirilmiş. CAPE verilen grupta ise akciğer hasarının gerilediğini ve akciğer histopatolojisinin grade 1-2 olarak değerlendirildiğini rapor etmişler.

Çalışmamızda ratların akciğer dokularını histopatolojik açıdan incelediğimizde; Grup I (kontrol) deki 10 adet ratın 8 tanesinin akciğer dokusu grade I (Normal akciğer histolojisi), 2 adet ratın akciğer dokusu grade II (Hafif derecede nötrofil lökosit infiltrasyonu) olarak değerlendirildi. Bu 2 ratın akciğerindeki infiltrasyonun anesteziye bağlı olabileceği düşünüldü. Grup II (İR) deki 10 adet ratın akciğer dokuları incelendiğinde 7 tanesinin akciğer dokusu grade III (Orta derecede nötrofil lökosit infiltrasyonu, perivasküler ödem formasyonu, akciğer yapısında kısmi destruksiyon), 3 tanesinin akciğer dokusu grade II (Hafif derecede nötrofil lökosit infiltrasyonu) olarak değerlendirildi. İİR ile beraber ratların akciğerlerinde, kontrol grubu ile kıyaslandığında yaygın akciğer hasarı geliştiği görüldü. İİR yapılan ve beraber CAPE verilen grupta (grup III); 10 adet ratın akciğer dokuları incelendiğinde 7 tanesinin akciğer dokusu grade II, 3 ratın akciğer dokusu grade I olarak değerlendirildi. İskemi sonrası CAPE verilen grubun akciğer dokusunda PMNL'lerin ve doku hasarının daha az olmasının sebebinin, PMNL'ler için aynı zamanda bir indükleyici faktör olan serbest oksijen radikallerinin etkilerinin CAPE ile nötralize edilmesi ve ortamda serbest oksijen türlerinin azaltılması olabileceği düşünüldü. Bu sonuçlarla; antiinflamatuvar, antioksidan ve lipit peroksidasyonunu inhibe edici özelliği olan CAPE'nin histopatolojik olarak akciğer dokusu üzerine koruyucu etkisi olduğu düşünüldü.

İR hasarı ile ilgili olarak bir çok çalışmalar yapılmış ve çeşitli ajanlar kullanılarak, bu ajanların iskemi ve reperfüzyonun gerek lokal, gerekse uzak organ hasarını önlemedeki

etkinlikleri araştırılmıştır. Ve bu konudaki çalışmalar hızla devam etmektedir. İİR hasarının klinik olarak önemli bir sorun olması ve klinikte sık karşılaşılan bir durum olması sebebiyle, bizim deneyimizde de İİR modeli oluşturularak bu konu üzerinde çalışılması planlandı. Aynı zamanda antiinflamatuvar, immünomodülatör, antikanser, antioksidan, antimikrobik gibi birçok özelliği olan ve faydaları bir çok çalışma ile rapor edilmiş olan CAPE ile ilgili olarak; İİR sonrası uzak organ hasarını araştırılan fazla sayıda çalışma yapılmamış olması ve akciğer hasarını önlemedeki etkinliği ile ilgili hiç çalışma yapılmamış olması sebebiyle, deneyimizde İİR sonrası CAPE'nin akciğer hasarını önlemedeki etkinliğini araştırıldı..

Çalışmamızda elde ettiğimiz sonuçlardan yola çıkarak, CAPE'nin İİR sonrası akciğer hasarını önlemede olumlu etkileri olduğunu düşünmekteyiz.

6. ÖZET

Deneyisel intestinal iskemi ve reperfüzyon modelinde CAPE'nin akciğer hasarını önlemedeki etkinliği

İİR sonrası gelişen hasar çoğu kez o organda sınırlı kalmayıp aktive olan bazı sistem ve toksik medyatörlerin etkisi ile başta akciğerler olmak üzere karaciğer, kalp, beyin ve böbrekler gibi uzak organlarda hasar oluştururlar. İR döngüsünden sonra gelişen sistemik enflamatuar yanıtta en fazla akciğerler etkilenirler. Oluşan akciğer hasarının etiopatogenezine ve önlenmesine yönelik çalışmalar günümüzde devam etmektedir. İİR'a bağlı akciğer hasarının patogenezinde serbest radikal ve antioksidan enzimlerini rolünün belirlenmesi, antioksidan tedavi denemelerini gündeme getirmiştir. Özellikle antioksidan ve lipit peroksidasyonunu inhibe edici özelliği olan CAPE ile ilgili olarak İR sonrası uzak organ hasarı üzerine bir takım çalışmalar yapılmış olup İİR sonrası akciğer hasarını önlemedeki etkinliğine dair çalışmaya rastlanılmadı. Bunun üzerine ratlarda istestinal iskemi ve reperfüzyon modeli oluşturularak CAPE'nin akciğer hasarına olan etkinliğini araştırıldı.

Çalışmamızda otuz adet erişkin Wistar Albino cinsi rat kullanıldı ve her grupta 10 adet rat olacak şekilde üç gruba ayrıldı. Gruplar; 1. grup kontrol grubu, 2. grup SMA'in atravmatik mikrovasküler klemp ile klemlenerek 60 dakika iskemi olusturulan ve 120 dakika süresince reperfüze edilen grup olarak; 3. grup ise İİR+ CAPE grubu olarak oluşturuldu. Reperfüzyon süresi sonunda tüm hayvanlar sakrifiye edilerek biyokimyasal ve histopatolojik incelemeler için akciğer dokuları alındı. Biyokimyasal açıdan oksidatif hasarın tayini için MPO, SOD, GSH-Px; lipit peroksidasyonu tayini için MDA almak üzere 4 parametre çalışıldı. Sonuçlar, median değerleri ve interquartile range şeklinde tablo ve grafiklerle gösterildi. Histopatolojik inceleme için ise akciğer doku hasarı değerlendirme ölçeği kullanıldı.

İİR sonrasında akciğer dokusunda MPO, MDA ve SOD düzeyleri istatistiksel olarak anlamlı derecede artmıştır. CAPE verilen grupta MPO ve MDA düzeylerinin İİR grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı olarak azalmıştır. Dokuların histopatolojik açıdan değerlendirilmesi sonucunda ise; İİR grubundaki ratların akciğer hasarı Grade III olarak gözlenirken, CAPE verilen III. grupta ise ratların akciğer hasarları grade II olarak gözlendi.

Sonuç olarak; antienflamatuar, antioksidan ve lipit peroksidasyonunu inhibe edici özelliği olan CAPE'nin İİR sonrası akciğer hasarı üzerine koruyucu özelliği mevcuttur.

Anahtar sözcükler: İntestinal iskemi/repefüzyon, akciğer hasarı, CAPE

7. SUMMARY

The efficiency of CAPE on prevention of lung injury in intestinal ischemia and reperfusion model

The injury occurs after IIR is not frequently restricted in that organ, it also damages distant organ especially like lungs and then liver, heart, brain and kidneys by effect of activated some systems and toxic mediators. Mostly, lungs are effected by inflammatuar response consists after IR cycle. The studies aimed to etiopathogenesis and prevention of lung injury currently have been going on. Determining the role of free radicals and antioxidant enzymes in the pathogenesis of lung injury after IIR, brought antioxidant treatment practise up to date. Although there are some studies about CAPE which has antioxidant and inhibiting lipid peroxidation properties and distant organ injury after IIR, we haven't observed any study about effects of CAPE on prevention of lung injury after IIR. So that it is investigated effects of CAPE on lung injury by constituting an IIR model on rats.

30 wistar albino rats were used for our study and classified into three groups which contains 10 rats each. Groups were calssified like; 1st group was control group, 2nd group was the group which ischemia was made by clamping SMA during 60 minutes with a microvascular clamp and reperfused during 120 minutes. 3rd group was IIR + CAPE performed group. After 120 minutes reperfusion, all animals were killed and lung tissue was taken for biochemical and histological analysis.

We analyzed 4 parameters as MPO, SOD, GPX-Px to assess oxidative injury and MDA to assess lipid peroxidation. The results were shown in the form of median value and inter quartile range in tables and graphs. Lung tissue injury assessment scala was used for histopathological findings.

Lung tissue MPO, MDA and SOD levels increased statistically significant after IIR. MPO and MDA levels decreased statistically significant in the group which CAPE was performed comparing to IIR group. When the tissues were evaluated histopathologically; the lung injury of rats in the IIR group is observed as grade III; the lung injury in 3rd group which CAPE was performed, is observed as grade II.

As a consuquence; the CAPE which has antiinflammatuar, antioxidant and inhibiting lipid peroxidation propterties, has protective effect on lung injury after IIR.

Key words: intestinal ischemia/reperfusion, lung injury, CAPE

8. KAYNAKLAR

- 1-Tullis MJ, Brown S, Gewertz BL. Hepatic influence on pulmonary neutrophil sequestration following intestinal ischemia-reperfusion. J Surg Res 66: 143-146,1996.
- 2-Megison SM, Horton JW, Chao H, Walker PB. A new model for intestinal ischemia in the rat. J Surg Res 49: 168-173, 1990.
- 3-Sorkine P, Szold O, Halpern P, Gutman M, Gremland M, Rudick V, Goldman G. Gut decontamination reduces bowel ischemia-induced lung injury in rats. Chest 112: 491-495,1997.
- 4-Grotz MRW, Deitch EA, Ding J, Xu D, Huang Q. Intestinal cytokine response after gut ischemia Role of gut barrier failure, Ann Surg 229: 478-486. 1999
- 5- Carden D.L., Granger D.N. Pathophysiology of ischemia-reperfusion injury. J Pathol. 190:255-66, 2000
- 6- Kumar V., Cotran R., Robbins S.L. Basic Pathology. 6th edition. P:6-10, 30-36 2000
- 7-Collard C.D., Gelman S. Pathophysiology, clinical manifestations and preventations of ischemia-reperfusion injury. Anesthesiology 94:1133-1138, 2001.
- 8-Cantürk N.Z., Sayek İ. Cerrahi araştırma kitabı. Nobel tıp kitabevleri 2005.
- 9- Towfigh S, Heisler T, Rigberg DA, Hines OJ, Chu J, McFadden DW, Chandler C. Intestinal ischemia and the gut-liver axis: An in vitro model. J Surg Res 88: 160-164, 2000.
- 10- Borjesson A, Norlin A, Wang X, Andersson R, Folkesson HG. TNF- α stimulates alveolar liquid clearance during intestinal ischemiareperfusion in rats. Am J Physiol 278: L3-L12, 2000.
- 11- Simpson R, Alon R, Kobzik L, Valeri R, Shepro D, Hechtman HB. Neutrophil and nonneutrophil-mediated injury in intestinal ischemiareperfusion. Ann Surg 218: 444-454,1993
- 12-. Turnage R.H, Guice K.S, Oldham K.T. Endotoxemia and remote organ injury following intestinal reperfusion. J Surg Res 56: 571-578, 1994
- 13-Köksoy C, Kuzu MA, Kuzu I, Ergün H, Gürhan I. Role of tumour necrosis factor in lung injury caused by intestinal ischaemia-reperfusion. Br J Surg 88: 464-468, 2001.
- 14- Özer MK., Çiçek E., Gökalp O., Koyu A., Parlakpınar H., Acet A. Myokardiyal iskemi reperfüzyon sonrası böbrek hasarında nitrik oksit rolü ve CAPE'nin etkisi S.D.Ü Tıp Fak. Dergisi 2005: 12(4)/ 23-27

- 15- Koltuksuz U., Özen S., Uz E., Aydinç M., Karaman A., Gültek A., Akyol Ö., Gürsoy MH., Aydın E. CAPE prevents intestinal reperfusion injury in rats. *J Ped Surg.* 34:10, 1458-1462, 1999.
- 16- Udassin R., Vromen A., Haskel Y. The time sequence of injury and recovery following transient reversible intestinal ischemia. *J Surg Res* 56: 221-225,1994.
- 17- Otamiri T. Oxygen radicals, lipid peroxidasyon, and neutrophil infiltration after small-intestinal ischemia and reperfusion. *Surgery* 105:593-597,1989.
- 18- Schoenberg MH., Muhl E., Sellin D. Posthypotensive generation of superoxide free radicals-possible role in the pathogenesis of the intestinal mucosal damage. *Acta Chir Scand* 150:301-309. 1984.
- 19- Schoenberg MH. Reperfusion injury after intestinal ischemia. *Crit Care Med* 21:1376-1386.1993
- 20- Musemeche CA., Henning SJ., Baker JL. İnflammatory enzyme composition of the neonatal rat intestine: İmplications for susceptibility to ischemia. *J Ped Surg* 28:778-791.1993.
- 21- Van Ye TM., Roza AM., Pieper GM. İnhibition of intestinal lipid peroxidation does not minimize morphologic damage. *J Surg Res.* 55:553-558.1993.
- 22-. Arfors KE., Lundberg C., Lindbom L. Et al. A monoclonal antibody to the membrane glycoprotein complex CD18 inhibits polymorphonuclear leukocyte accumulation and plasma leakage in vivo. *Blood* 69:338-40, 1987.
- 23- Paterson IS., Klausner JM., Goldman G. Et al. Thromboxane mediates the ischemia-induced neutrophil oxidative burst. *Surgery* 106:224-29, 1989.
- 24- Utsonomiya T., Krausz MM., dunham B. Maintenance of cardidynamics with aspirin during abdominal aortic aneurysmectomy. *Ann Surg* 194: 602-08, 1981
- 25- Kayalı R., Çakatay U. Basic mechanisms of protein oxidation. *Cerrahpaşa J med* 35:83-89, 2004
- 26- Jun-Lin Z., Guo-Hua J., Yi-Ling Y., Jun-Lan Z., Xin-Li H. Role of nitric oxide and peroxynitrite anion in lung injury induced by intestinal ischemia-reperfusion in rats. *World J Gastroenterol* 2003;9(6): 1318-1322
- 27- Panes J., Perry M., Granger D.N. Leukocyte endothelial cell adhesion: Avenues for therapeutic intervention. *Br J Pharmacol.* 126: 537-550, 1999.
- 28- Narita K., Kuwabara Y., Fujii Y. Lung injury after intestinal ischemia reperfusion may be avoided by the reduced absorption of locally produced cytokines. *Surg Today* 2004. 34:937-942

- 29- Wellbourn CRB., Goldman G., Paterson IS., Valeri CR., Shepro D., Hetchman HB. Pathophysiology of ischemia-reperfusion: central role of neutrophil. *Br. J Surg.* 78:651-5, 1991.
- 30- Grossie VB Jr, Kennedy WR, Narins D Zinc, copper, and iron in plasma and tissues after intestinal ischemia and reperfusion in the rat. *Nutrition.* 19(11-12):1003-5.2003.
- 31- Horie Y, Wolf R., Russel J., Shanley T.P, Granger N. Role of kupffer cells in gut ischemia/reperfusion-induced hepatic microvascular dysfunction in mice. *Hepatology* 26:1499-1505.1997
- 32- Burtis CA., Ashwood ER: Tietz textbook of clinical chemistry, W.B. Saunders Company, 3rd ed. 21: pp541- 616.1999
- 33-Turnage RH., Guice KS., Oldham KT.The effects of hypovolemia on multiple organ injury following intestinal reperfusion. *Shock* 1(6):408-12.1994.
- 34- Suwa T., Hogg J.C., Klut M.E., Hards J., Eeden S.F. Interleukin-6 changes deformability of neutrophils and induces their sequestration in the lung. *Am J Resp* 163: pp 970-976. 2001.
- 35-Hierholzer C., Kalff J.C, Audolfsson G, Billiar T.R., Tweardy D.J., Bauer A.J. Molecular and functional contractile sequelae of rat intestinal ischemia / reperfusion injury. *Transplantation* 68: 1244-1254.1999.
- 36- Wada K., Montaldo M.C., Stahl G.L. Inhibition of complement C5 reduces local and remote organ injury after intestinal ischemia / reperfusion in the rat. *Gastroenterology* 120(1): 126-133. 2001.
- 37- Burne M.J., Elghandour A., Haq M., Saba R.S., Norman J., Condon T., Bennet F., Rabb H. IL-1 and TNF independent pathways mediate ICAM-1 / VCAM-1 up-regulation in ischemia reperfusion injury. *J Leukoc Biol* 70: 192-198. 2001.
- 38- Grace PA Ischemia reperfusion injury. *British journal of surgery* 1994; 81: 637-47
- 39- Xiao F., Eppihimer M.J., Willis B.H, Carden D.L. Complementmediated lung injury and neutrophil retention after intestinal ischemia-reperfusion. *J Appl Physiol* 82(5):1459-1465.1997.
- 40- Takayama M., Ishibashi M., Ishii H., Kuraki T., Nishida T., Yoshida M. Effects of neutrophil elastase inhibitor (ONO-5046) on lung injury after intestinal ischemia-reperfusion. *J Appl Physiol* 91: 1800-1807. 2001.
- 41- K ksoy C., Kuzu A., Erg n H., Demirpen e E., Z lfikaroğlu B. Intestinal ischemia and reperfusion impairs vasomotor functions of pulmonary vascular bed. *Annals of surgery.*Vol 231 No.1, 105-111
- 42- Stahl GL., Xu Y., Hao L., Miller M., Buras JA., Fung M., Zhao H. Role for the alternative complement pathway in ischemia/reperfusion injury. *Am J Pathol* 162(2):449-55.2003.

- 43- Shi J., Gilbert G.E, Kokubo Y., Ohashi T. Role of the liver in regulating numbers of circulating neutrophils. *Blood* 98: 1226- 1230. 2001.
- 44- Kalia N., Brown NJ., Wood RF., Hopkinson K, Fairburn B, Pockley AG. Effects of intestinal ischemia-reperfusion injury on rat peripheral blood neutrophil activation. *Dig Dis Sci* 48(9):1677- 84.2003.
- 45- Yabe Y., Kobayashi N., Nishihashi T., Takahashi R., Nishikawa M., Takakura Y., Hashida M. Prevention of neutrophil-mediated hepatic ischemia/reperfusion injury by superoxide dismutase and catalase derivatives. *J Pharmacol Exp Ther* 298:894-899. 2001.
- 46- Rossman J.E, Caty M.G, Zheng S., Karamanoukian H.L., Thusu, K, Azizkhan R.G., Dandona P. Mucosal protection from intestinal ischemia-reperfusion reduces oxidant injury to the lung. *J Surg Res* 73:41-46. 1997.
- 47- Lefer AM., Lefer DJ. Pharmacology of the endothelium in ischemia reperfusion and circulatory shock. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 1993; 33: 71-90
- 48- Moncado S., Vane JR., Arachidonic acid metabolites and the interactions between platelets and blood vessel walls. *N Engl J Med* 1979; 300: 1142-7
- 49- Murad F. Cyclic guanosine monophosphate as a mediator of vasodilation. *J Clin Invest* 1986; 78,1-5.
- 50- Palmer RMJ., Ferrige AG., Moncado S. Nitric oxide release accounts for the biological activity of endothelium-derived relaxing factor. *Nature* 1987; 327: 524-6
- 51- Cronstein BN, Levin RJ., Belanoff J., Weissman G., Hirschorn R. Adenosine: an endogenous inhibitor of neutrophil mediated injury to endothelial cells. *J Clin Invest* 1986;78 :760-70
- 52- Erden M. Serbest Radikaller. *T.Klin. Tıp Bilimleri Dergisi*.12:201-207, 1992.
- 53- Beckman JS., Chen J., Ischiropoulos H., Crow JP. Oxidative chemistry of peroxynitrite. *Meth Enzymol* 233:229-40, 1994.
- 54- Ohno H., Matsuura N., Ishikawa M. Serum Mn-SOD in patients with Diabetes Mellitus and Thyroid Dysfunction as Judged by an ELISA. *Horm. Metab. Res.* 23:449-451, 1991.
- 55- Sugawara M., Kita T. Deficiency of Superoxide Dismutase endemic goiter Tissue. *J Clin Endoc and Metabol.* 67(6): 1156-1161, 1988.
- 56- Wheeler CR., Salzman JA. Automated Assay for Superoxide Dismutase, Catalase, Glutathione Peroxidase and Glutathione Reductase Activity. *Anal Biochem.* 184:193-199, 1990.
- 57- Goth L. A simple Method for Determination of serum catalase activity and revision of reference range. *Clinica Chimica Acta* .196:143-152, 1991.

- 58-Fernandez V., Simitzu K. Effects of hyperthyroidism on rat liver Glutathione Metabolism. 129(1):85-91, 1991.
- 59- Özbal Y. Temel immünoloji. I. Baskı. İstanbul. Nobel tıp kitabevleri 2000.
- 60- Kellog EW. Superoxide, hydrogen peroxide and singlet oxygen in lipid peroxidation by a xanthine oxidase system. J Biol Chem 1975; 250: 8812-17
- 61- Slater TF. Free radical mechanisms in tissue injury. Biochemistry 1984; 222:1-5
- 62- Fitzpatrick LR., Wang J., Le T. CAPE, an inhibitor of Nuclear Factor κ B, attenuates bacterial peptidoglycan polysaccharide-induced colitis in rats. JPET 299:915-920, 2001
- 63- Özen S, Akyol Ö, Iraz M, Söğüt S, Özüğurlu F, Özyurt H, Odacı E, Yıldırım Z. Role of Caffeic Acid Phenethyl Ester, an Active Component of Propolis, against Cisplatin Induced Nephrotoxicity in Rats. Journal of Applied Toxicology 2004 24, 27-35
- 64- Koksel O., Özdülger A., Tamer L., Cinel L., Ercil M., Değirmenci U., Ünlü S., Kanık A. Effects of CAPE on lipopolisaccharide-induced lung injury in rats. Pulmonary Pharmacology and therapeutics 19:90-95, 2006
- 65- Yılmaz HR, Uz E, Yucel N, Altuntas I and Ozcelik N. Protective effect of Caffeic Acid Phenethyl Ester (CAPE) on lipid peroxidation and antioxidant enzymes in diabetic rat liver. J Biochem Molecular Toxicology 2004; 18:4 p:234-238
- 66- Michaluart P., Masferrer JL., Carothers AM et al. Inhibitory effects of CAPE on the activity and expression of cyclooxygenase-2 in human oral epithelial cells in a rat model of inflammation. Cancer Res. 59:2347-2352, 1999.
- 67- Lin MW., Yang SR., Huang MH., Wu SN. Stimulatory actions of CAPE, a known inhibitor of NF-Kappa B activation on Ca^{2+} activated K^{+} current in pituitary GH3 cells. J Biol Chem 279: 26885-26892, 2004.
- 68- Sahin S, Sogut S, Ozyurt H, Uz E, İlhan A, Akyol O. Tissue xanthine oxidase activity and nitric oxide levels after spinal cord ischemia/reperfusion injury in rabbits: comparison of caffeic acid phenethyl ester (CAPE) and methylprednisolone. Neurosci Res Commun 31:111-21, 2002
- 69- Orsolice N., Terzic S, Mihaljevic Z., Sver L., Basic I. Effects of local administration of propolis and its polyphenolic compounds on tumor formation and growth. Biol Pharm Bull 28: 1928-1933, 2005.
- 70- Yazıcıoğlu YA., Değer O., Ovalı E., Barlak Y., Hoşver I, Tekelioğlu Y., Karahan SC. Effects of Turkish pollen and propolis extracts on respiratory burst for K-562 cell lines. Int Immunopharmacol. 5: 1652-1657, 2005
- 71- Russo A., Longo R., Vanella A. Antioxidant activity of propolis: role of caffeic acid phenethyl ester and galangin. Fitoterapia 73:21-29, 2002.

- 72- Castaldo S., Capasso F. Propolis, an old remedy used in modern medicine. *Fitoterapia* 73:1-6, 2002.
- 73- Havsteen BH. The biochemistry and medical significance of the flavanoids. *Pharmacol Ther.* 96:67-202, 2002.
- 74- Fesen MR., Pommier Y., Leteurtre E., Hiroguchi S., Yung J., Kohn KW. Inhibition of HIV-1 integrase by flavones, caffeic acid phenethyl ester and related compounds. *Biochem Pharmacol* 48: 595-608, 1994.
- 75- Sud'ina GF., Mirzoeva OK., Pushkareva GA., Sumbatyan NV., Varfolomeev SD. CAPE as a lipoxygenase inhibitor with antioxidant properties. *FEBS Lett.* 329:21-24, 1993
- 76- Borelli F., Maffia P., Pinto L., Ianora A., Russo A., Capasso F., Iaenti A. Phytochemical compounds involved in the anti-inflammatory effects of propolis extract. *Fitoterapia* 73:53-63, 2002
- 77- İlhan A., Koltuksuz U., Özen S., Ciralık H., Akyol O. The effects of CAPE on spinal cord ischemia/reperfusion injury in rabbits. *Eur J Cardiothorac Surg.* 16:458-463, 1999
- 78- Watabe M, Hishikawa K, Takayanagi A, Shimizu N and Nakaki T. Caffeic acid phenethyl ester induces apoptosis by inhibition of NfκB and activation of Fas in Human Breast Cancer MCF-7 Cells. *The Journal of Biological Chemistry* 2004; 279:6017-6026
- 79- Uz E., Öktem F., Yılmaz HR et al. The activities of purine-catabolizing enzymes and the level of nitric oxide in rat kidneys subjected to methotrexate: Protective effect of CAPE. *Mol Cell Biochem* 277:165-170, 2005.
- 80- Yılmaz HR, Uz E, Yucel N, Altuntas I and Ozcelik N. Protective effect of Caffeic Acid Phenethyl Ester (CAPE) on lipid peroxidation and antioxidant enzymes in diabetic rat liver. *J Biochem Molecular Toxicology* 2004; 18:4 p:234-238
- 81- Hosnuter M, Gurel A, Babucco O, Armutcu F, Kargı E, Isikdemir A. The effect of CAPE on lipid peroxidation and nitric oxide levels in the plasma of rats following thermal injury. *Burns* 2004;30:121-5
- 82- Ozdulger A, Cinel I, Koksel O, Cinel L, Avlan D, Unlu A, Okcu H, Dikmengil M, Oral U. The protective effect of N-acetylcysteine on apoptotic lung injury in cecal ligation and puncture-induced sepsis model. *Shock* 19(4): 366-72
- 83- Klausner JM., Paterson IS., Mannick JA., Valeri CR., Shepro D., Hetchman HB. Reperfusion pulmonary edema. *JAMA* 261:1030-1035, 1989.
- 84- Haim Anner, Ronald P, Kaufmann Jr, Kobzik L, Valeri R, Shepro D, Hechtman HB. Pulmonary leukosequestration induced by hind limb ischemia. *ANN Surg* 1987;206 (2).162-7.
- 85- Crinnion JN, Homer-Vanniasinkam S, Gough MJ. Skeletal muscle reperfusion injury: Pathophysiology and clinical considerations. *Cardiovascular surgery* 1993; 1(4): 317-24

- 86- Carden DL., Smith JK., Korthuis RJ. Neutrophie-mediated microvascular dysfunction in the post ischemic canine skeletal muscle. *Circ Res* 66:1436-44, 1990.
- 87- Caty MG., Guice KS., Oldham KT., Remick DG., Kunkel SI. Evidence for tumor necrosis factor-induced pulmonary microvascular injury after intestinal ischemia/reperfusion. *Ann Surg.* 1990 Dec;212(6):694-700.
- 88- Mononükleer fagositer sistem blokajının intestinal iskemi-reperfüzyona bağı akciğer hasarına etkisi M.Özbek Bezir. Tıpta Uzmanlık tezi 2002, Isparta
- 89- Koike K, Moore FA, Moore EE, Trew CE, Banerjee A, Peterson VM. Endotoxin pretreatment inhibits neutrophil proliferation and function. *J Surg Res* 57: 49-54.1994.
- 90- Seekamp A, Ward PA İschemia-reperfusion injury. *Inflammatory disease theraphy* 1993; AAS41 : 137-52
- 91- Cavriani G., Filho RMO., Trezena AG., Silva ZL., Domingos HV., Arruda MJC., Jancar S., Lima WT. Lung microvascular permeability regulated by nitric oxide in a rat model of intestinal ischemia reperfusion. *Euro J Pharmacol.* 494:241-249, 2004.
- 92- Ozan E., Koyutürk L., Sapmaz T. Böbrek iskemi reperfüzyon hasarında antioksidan olarak prostoglandin E1 (PGE1) kullanımının incelenmesi. *Fırat Tıp Dergisi.* 9(3):67-71, 2004.