

AORTİK OKLÜZYONA BAĞLI AKCİĞER İSKEMİ- REPERFÜZYON HASARINI ÖNLEMEDE LİKOPENİN ETKİSİ

Dr. Ercüment AYVA

ÖZET

AMAÇ: Torakoabdominal aort cerrahisi esnasında meydana gelen İ/R sürecinde uzak organ konumundaki akciğerlerde oluşan hasarın önlenmesi ve azaltılmasında likopenin etkisini saptamayı amaçladık.

GEREÇ ve YÖNTEM: 28 adet Sprague Dawley cinsi erkek rat kullanıldı. Her grupta 7 adet olacak şekilde 4 gruba ayrıldı. Denekler 10 gün süreyle beslenme programına alındı. Grup 1; Likopen içeriği yüksek olan gıdalar haricinde oral yoldan beslenildi. Grup 2; Grup 1 ile aynı şekilde beslenen ve İ/R modeli oluşturulan grup. Grup 3; Grup 1 ve 2 deki oral alımlarına ek olarak orogastrik lavaj ile 1 mg/kg/gün likopen (Good'n Natural 10 mg kapsül USA) ile beslenen ve İ/R modeli oluşturulan grup. Grup 4; Grup 1 ve 2 deki oral alımlarına ek olarak orogastrik lavaj ile 40 mg/kg/gün likopen ile beslenen ve İ/R modeli oluşturulan grup. Sonrasında grup 1'e karın eksplorasyonu yapıldı. Kan ve akciğer örnekleri alındı. Diğer gruplar ise sol renal arter altından abdominal aortaya kros klemp konularak aortik total oklüzyon sağlandı. 45 dakikalık iskemik süresinden sonra 120 dakika süreyle reperfüzyon sağlandı. Alınan örneklerinden SOD, GSH-Px, TNF- α , MDA düzeylerine bakıldı.

SONUÇ: İ/R sonrası gelişen akciğer hasarı özellikle vasküler cerrahi kliniklerinde mortalite ve morbiditeyi arttıran önemli bir faktördür. Yapmış olduğumuz çalışmamızda kan ve akciğer dokusu incelemelerinde likopenin antioksidan enzim düzeylerinde artış, enflamatuvar olay ve lipid peroksidasyonunda gerilemeye neden olduğunu saptadık. Literatürde farklı bir örneğine rastlamadığımız çalışmamızın yeni çalışmalara klavuz olacağı ve yapılacak yeni çalışmalarla klinik uygulamalarda İ/R sonrasında akciğer hasarının önlenmesinde yer bulacağı kanısındayız.

THE EFFECT OF LYCOPENE ON LUNG ISCHEMIA-REPERFUSION INJURY DURING AORTIC OCCLUSION

Dr. Ercüment AYVA

SUMMARY

PURPOSE: The aim of this study was to determine whether I/R could have an important role on lung injury and to determine whether lycopene could have a preventive effect on this injury

MATERIAL and METHOD: Sprague Dawley rats (n=28) were randomly assigned to 4 groups. Sham (grup 1), control (grup 2), low dose lycopene (grup 3) and high dose (grup 4). Grup 1; Feeding orally with pellet mouse food. Group 2; Feeding orally with pellet mouse food for 10 days, Grup 3; Administered 1mg/kg/day of lycopene (Good'n Natural 10 mg capsule USA) with orogastric lavage to feeding procedure. Group 4; Administered 40 mg/kg/day of lycopene. After the nutrition program for a period of 10 days in group 1 only the abdominal exploration has been made. Than blood and lung tissue samples were taken. In the other groups below the left renal artery the abdominal aortic total occlusion was achieved. After 45 minutes of clamping time 120 minutes reperfusion provided. Than blood and lung tissue samples were taken.

We measured the levels of SOD, GSH-Px, TNF- α and MDA from blood and tissue samples.

CONCLUSION: Lung injury occurs after the surgery involving the temporary aortic cross clamping with subsequent I/R of the lower extremities is an important cause of high mortality and morbidity rate in vascular surgery. The results of the study indicate that lycopene was decreased the lipid peroxidation rate and inflamatuary proces in serum and pulmonary tissue induced by I/R. Our study is a new and a different research by lycopene on I/R injury about the lungs. It would also be a guide to new studies.

I. GİRİŞ

1.1. İSKEMİ

İskemi, kan akımının yetersiz olması sonucu doku oksijeninin ve metabolik gereksinimlerin karşılanamaması durumudur. Hücresel fonksiyonların gerçekleşebilmesi için gerekli temel yakıt oksijendir. İskemiye bağlı hücre hasarının patogenezindeki temel faktörler oksijen ve enerji depolarının tükenmesidir.

Bir dokuya giden kan akımı kesildiğinde, o dokuya ait hücrelerin fonksiyon bozukluğu ile başlayan ve hücre ölümüne kadar ilerleyen bir dizi kimyasal olay gerçekleşir. Membran bütünlüğü, iyon transportu, protein sentezi, lipogenez ve fosfolipid turnover'ı için gerekli reaksiyonlar hücrenin iskemi sonucu etkilenen fonksiyonlarıdır. Bu fonksiyonların etkilenme derecesi hipoksinin süresine ve derinliğine bağlıdır. Dokuların iskemiye dayanıklılığı da birbirinden farklıdır. İskeminin hücreler üzerindeki etkileri;

1. İskeminin sebep olduğu hipoksiden dolayı hücrede adenzin trifosfat (ATP) üretimi anaerobik yolla olur. Anaerobik glikolizle her glikoz başına üretilen ATP, aerobik glikolizle üretilen toplam ATP'nin ancak %7'si kadardır (1). Anaerobik glikoliz sonucu laktik asid ve diğer inorganik fosfat bileşikleri birikir ve hücre içi asidoz oluşur. Hücre içi asidoz normal enzim kinetiklerini bozar ve lizozomal membranları zedeler. Lizozomlar proteaz, DNAaz, RNAaz, glukozidaz ve katepsinleri içerir. Bu enzimlerin lizozomlardan sızması hücresel yapıların enzimatik sindirimine neden olur.

2. Hücresel denge için gerekli olan enerji kaynaklarının, özellikle ATP'nin tüketimi, hücre membranında iyon dengesizliğine yol açar. Normal vücut sıcaklığında mitokondriyal oksidatif fosforilasyon, ATP ve yüksek enerjili fosfat depolarının tükenmesinden 3-4 dakika sonra biter ve hücre içi kalsiyum (Ca^{+2})

dengesini yönlendiren ATP'ye bağımlı membran pompaları bozularak normal iyon gradientleri kaybolur (2).

Membrandaki sodyum (Na^+), potasyum (K^+) alışverişinden Na^+ - K^+ ATP'az sistemi sorumludur. Düşük ATP konsantrasyonunda hücre içinde Na^+ birikerek K^+ hücre dışına kaçar. Hücre içinde artan Na^+ 'yı çıkarmak için Na^+ - Ca^{+2} pompa sistemi çalışmaya başlar. Bu sistem hücre içindeki artmış Na^+ 'dan bir adet dışarıya çıkarırken bunun yerine bir adet Ca^{+2} içeriye taşır. Bunun sonucu olarak hücre içi Ca^{+2} miktarı artar. Artmış olan Ca^{+2} , ortamda ATP olmadığından hücrenin kasılabilirliğini arttıramaz. (Fizyolojik koşullarda hücre içinde biriken fazla Ca^{+2} dışarı atılarak ya da hücre içinde depolanarak tolere edilir). İskemi sırasında hücrede enerji tükendiğinden sitoplazma ve mitokondride fazla miktarda Ca^{+2} birikmekte ve Ca^{+2} 'nin toksik etki göstermesine neden olmaktadır. Artan Ca^{+2} düzeyi fosfolipazları, proteazları aktive ederek radikal ve yağ asitleri oluşumunu artırır ve hücreyi ölüme sürükleyebilir (lipid peroksidasyonu).

3. İskemi sırasında serbest yağ asitlerinin konsantrasyonları artar (3). Serbest yağ asitleri Ca^{+2} 'nin mitokondriden salınımını artırarak etkisini çoğaltır. Yüksek hücre içi Ca^{+2} konsantrasyonu Ca^{+2} 'ye bağlı fosfolipaz A_2 'yi aktive ederek plazma membranından serbest yağ asitlerinin sitozole salınımını artırır (4). Salınmış yağ asitleri (özellikle araşidonik asit) siklooksijenaz ve lipooksijenaz tarafından prostaglandinlere çevrilir (5). Araşidonik asit metaboliti olan tromboksan A_2 , trombosit agregasyonu, vazokonstrüksiyon, mikrosirkülasyonu kan akımında azalmaya ve iskemik hücre hasarına yol açmaktadır (6). Aynı zamanda güçlü bir kemotaktandır ve nötrofillerin (PMNL) endotele adezyonunu artırır. Trombositleri aktive ederek vazospazma ve iskeminin artmasına neden olur.

1.2. REPERFÜZYON ve REPERFÜZYON HASARI

Reperfüzyon, iskemiye neden olan etkenin ortadan kaldırılarak dokuya kan akımının yeniden düzenlenmesidir. Reperfüzyonun, iskemik dokuda enerji

ihtiyacının sağlanması ve toksik metabolitlerin uzaklaştırılması olarak iki olumlu etkisi vardır. Böylelikle reperfüzyon iskemik hasarın düzeltilebilmesi için gerekli bir süreçtir. Ancak oksijenlenmiş kanın iskemik dokuya dönüşü dokuyu daha fazla zedeleyen bir reaksiyon sürecini başlatır (7,8,9).

Reperfüzyon hasarının tam mekanizması bilinmemekle beraber reaktif oksijen ürünlerinin (ROS), endotelial faktörlerin, PMNL'lerin, hücre içi Ca^{+2} dengesi bozukluklarının, mikrovasküler disfonksiyonun, enflamatuvar reaksiyonların ve apoptozisin altta yatan potansiyel mekanizmalar olduğu düşünülmektedir (10,11).

Reperfüzyon hasarına doğrudan veya dolaylı olarak katılan pek çok madde ve biyokimyasal reaksiyon tanımlanmıştır. Bu maddelerin birbiriyle etkileşimi sonucunda iskemi-reperfüzyon (İ/R) hasarının reperfüzyon kısmının mediyatörleri olan ROS ortaya çıkar.

Serbest radikaller, en dış yörüngesinde tek sayıda elektron içeren, anstabil, ileri derecede reaktif, kısa ömürlü moleküllerdir. Moleküler oksijenin (O_2) indirgenmesi ve eksitasyonu ile çok değişik ROS üretilebilir (12,13). ROS iskemi esnasında oluşur fakat oksijen miktarı az olduğu için az miktarda oluşur ve fonksiyon görmezler. Kan akımı ve oksijen sağlanmasının düzelmesi ile büyük miktarlarda ROS üretilerek reperfüzyon hasarı indüklenir (13).

Organizmada ROS ortaya çıktıktan sonra radikal reaksiyon dizileri başlar. Eğer bir serbest radikal, radikal olmayan bir molekülle reaksiyona girerse, binlerce reaksiyondan oluşan reaksiyon zincirlerini başlatır. ROS paylaşılmamış elektronlarından dolayı lipid, protein, nükleik asit, karbonhidrat gibi çeşitli makromoleküllerin oksidatif hasarına neden olurlar (12).

1.3. SERBEST RADİKALLER

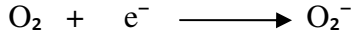
Günümüzde serbest oksijen radikalleri terimi yerine, daha kapsamlı olan ve hem süperoksit (O_2^-), hidroksil (OH^-) gibi oksijen içeren radikallere hem de aslında radikal olmayan ancak reaksiyonları ile oksijen içeren radikallerin oluşumuna neden olabilen peroksit (ROOH), singlet oksijen (1O_2), hipoklorik asit (HOCl) gibi molekülleri içine alan ROS terimi daha yaygın olarak kullanılmaktadır (14).

ROS, enflamasyon sırasında makrofaj ve PMNL'lerden salınma ve mitokondri katalizli elektron taşıyıcı reaksiyonların, metal katalizli reaksiyonlar, X-ray, ultraviyole (UV), gamma (γ) ışınlarına maruziyet, atmosfer kirliliği ve diğer mekanizmaların ürünü olarak üretilirler (15). ROS, biyolojik sistemlerde hem yararlı hem de zararlı etki göstermektedir (16). ROS'un yararlı etkileri arasında hücrel cevaplar gibi fizyolojik rolleri vardır. Örneğin, enflamasyon oluşturan ajanlara karşı savunmada ve hücrel sinyal iletiminde önemli bir fonksiyonu vardır. Çoğunlukla ROS düşük konsantrasyonlarda mitojenik özelliğin uyarılması gibi yararlı etkiler gösterirken yüksek düzeylerde protein, nükleik asit ve lipidleri içeren hücrel yapıların bozulduğu önemli reaksiyonlarda rol alır (17). ROS'un oluşturacağı zararlı etkiler antioksidan enzimlerle ve bunlara destek olarak enzimatik olmayan antioksidanlarla engellenmeye çalışılır (18). ROS'un etkisi ile oluşan oksidatif zararı önlemek için antioksidatif savunma sistemlerinin bulunmasına rağmen, reaktif oksidanlar yaşam süresince organizmada birikim gösteren ve serbest radikallerin neden olduğu deoksiribonükleik asit (DNA), lipid ve protein hasarları, yaşlanmadan kaynaklanan nörodejeneratif bozukluklar, artrit, ateroskleroz ve kanser gibi hastalıkların gelişiminde önemli rol oynadığı öne sürülmektedir (19).

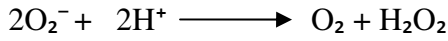
İskemik dokuların reperfüzyonu toksik ROS oluşumuna yol açar. Bunlar O_2^- , OH^- , HOCl, hidrojen peroksit (H_2O_2) ve nitrik oksitten (NO) derive peroksinitrittir ($ONOO^-$) (20).

1.3.1. O_2^- , H_2O_2

O_2 'nin bir elektron alarak indirgenmesiyle kararsız bir yapı olan O_2^- radikali oluşur.

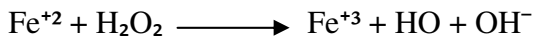


O_2^- anyonuna bir elektron eklenirse (O_2^- dismutasyonu) veya O_2 'nin doğrudan indirgenmesiyle H_2O_2 oluşur. Dismutasyon spontan olarak veya süperoksit dismutaz (SOD) enzim aracılığı ile katalize edilebilir (21).

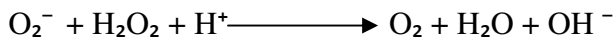


1.3.2. OH^- , FENTON ve HABER-WEISS REAKSİYONLARI

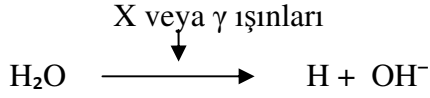
Fenton reaksiyonu: H_2O_2 'nin, demir (Fe^{+2}) ve diğer geçiş elementleri (bakır (Cu), çinko (Zn), mangan (Mn), krom (Cr), cobalt (Co), nikel (Ni), molibden (Mo)) varlığında indirgenerek OH^- radikali oluşur (22,23).



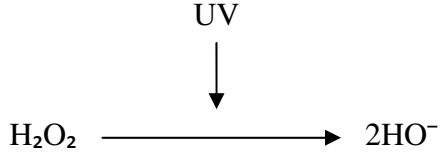
Haber- Weiss reaksiyonu: H_2O_2 , O_2^- ile reaksiyona girerek OH^- radikalini oluşturur. Bu reaksiyon Cu ve Fe^{+2} tarafından katalizlenir (24).



Suyun yüksek enerjili iyonizan radyasyona maruz kalmasıyla da OH^- oluşur.

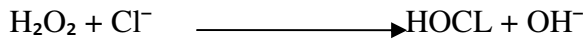


H₂O₂' nin UV ışığına maruz kalması ile OH⁻ oluşabilir.



1.3.3. HOCL

HOCL radikal olmadığı halde ROS arasında yer almaktadır. Fagositik hücreler tarafından bakterilerin öldürülmesinde önemli rol oynar. Aktive olan PMNL' ler, monosit, makrofajlar ve eozinofiller O₂⁻ radikali üretirler. Radikal üretimi fagositik hücrelerin bakterileri öldürmesinde büyük önem taşır. Özellikle PMNL' ler içerdikleri myeloperoksidaz enzimi aracılığı ile O₂⁻ nin dismutasyonu ile oluşan H₂O₂'yi klorür iyonu ile birleştirerek güçlü bir antibakteriyel ajan olan HOCL'ye dönüştürür (25).



1.3.4. °O2

Yapısında eşleşmemiş elektronu bulunmaması nedeniyle serbest radikal olmadığı halde ROS grubunda yer alır. °O2 serbest radikal reaksiyonların başlamasına neden olması açısından önem taşımaktadır.

1.4. HÜCREDEKİ SERBEST RADİKAL KAYNAKLARI

1.4.1. ENDOJEN KAYNAKLAR

1. Mitokondrial elektron transportu: Elektron taşıyıcıları oksijene elektron sızdırabilir. Oksijen %1 oranında O_2^- 'e indirgenebilir.
2. Plazma membranı: Lipid peroksidasyonu, fagositik hücrelerde nikotinamid adenin dinükleotid fosfat (NADPH) oksidaz.
3. Endoplazmik retikulum ve nükleer membran elektron transport sistemleri (Sitokrom P450, Sitokrom B5).
4. Peroksizomlar: Oksidazlar, flavoproteinler
5. Otooksidasyon reaksiyonları: Fe^{+2} , adrenalin
6. Yaşlanma

1.4.2. EKSOJEN KAYNAKLAR

1. Stres: Streste artan katekolaminler ve bunların oksidasyonları sonucunda serbest radikaller oluşur.
2. Alışkanlık yapıcı maddeler: Sigara, alkol, uyuşturucu,
3. Çevresel faktörler: Radyasyon, hava kirliliği
4. Aşırı oksijen konsantrasyonu (Hiperoksi)
5. Antineoplastik ilaçlar: Bleomisin, doxorubicine, adriamicine

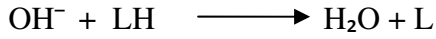
1.5. SERBEST RADİKALLERİN HÜCRELER ÜZERİNE ETKİLERİ

1.5.1. ROOH ve LİPİD PEROKSİDASYONU

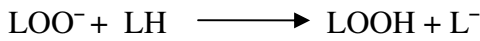
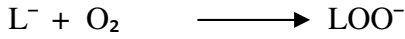
Hücre içi organeller, biyomembranlar ve membran fosfolipidlerinde bulunan doymamış yağ asitleri oksidatif ataklara aşırı derecede duyarlıdır (26). Serbest radikallerin hücrede başlattığı en önemli ve zararlı etki lipid peroksidasyonudur. ROS hücre hasarı meydana getirirken lipidlerden farklı radikaller ve lipid ROOH'

larda de oluşmaktadır. Çoklu doymamış yağ asitlerinin serbest radikaller ile oksidasyonu lipid peroksidasyonu olarak tanımlanır. Lipid peroksidasyonunda zincirleme reaksiyonun başlatılması için tetikleyici faktör gereklidir. Sözü edilen bu faktörün OH^- radikali olduğu kabul edilmektedir. Lipid peroksidasyonu, poliansatüre yağ asitlerinin zincirleme bir radikal reaksiyonudur ve üç aşamadan oluşur (27,28). Bunlar;

1. Başlangıç evresi: OH^- radikali, bir yağ asitinin (LH) metilen molekülünden bir hidrojen atomu (H^+) kopararak bir lipid radikali (L^-) oluşturur. Bu reaksiyon hem membran lipidleri hem de besinsel yağlar için geçerlidir.

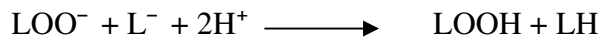


2. İlerleme ve yıkım evresi: Zincirleme reaksiyona uğrayan lipid radikaline O_2 ilavesi ile devam eder ve lipid peroksil radikali (LOO^-) ile lipid ROOH oluşur.



Tek elektron üzerinden yeniden yapılanma lipidin parçalanması ile sonuçlanır.

3. Sonlanma safhası: Zincir reaksiyonu antioksidanlar (likopen gibi) tarafından sonlandırılabilir.



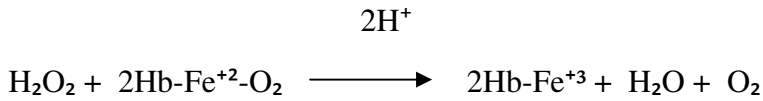
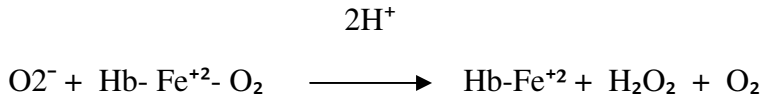
Lipid peroksidasyonu biyolojik membranlarda akıcılığın kaybına, membran potansiyelinde azalmaya, hidrojen ve diğer iyonlara karşı geçirgenliğin artışı neticesinde hücrenin hasarına ve içeriğinin serbestleşmesine neden olur. Ek olarak lipid peroksidasyonunun son ürünlerinden biri olan malondialdehit (MDA)

membran bileşenlerinin polimerizasyonuna ve çapraz bağ yapmalarına yol açar. Bu da, hücre yüzeyinin durumunu, enzim aktivitesini, iyon transportunu etkileyebilir (24).

1.5.2. PROTEİN OKSİDASYONU

Serbest radikaller ile oluşan protein oksidasyonunun sonucunda metionin sülfokside, histidin, oksihistidine veya asparagine, tirozin, ditirozine ve sistein disülfidlere dönüşür. Bu değişiklikler proteinlerin bağlanma özelliklerinde ve enzim aktivitelerinde farklılaşmaya neden olarak hücre fonksiyonlarında bozulmalara yol açabilir (29,30).

Serbest radikal reaksiyonları direkt olarak polipeptid parçalanmasına da yol açabilir (31). Proteinler serbest radikallere daha az hassas olup başlayan zararlı zincir reaksiyonunda hızlı ilerleme olasılığı 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.



1.5.3. DNA

ROS adenin ve piridin nükleotid durumlarının sürdürülebilmesi için gerekli yollara engel olabilirler. ROS, DNA ile reaksiyona girerek mutajenik olan 8-Hidroksiguanin'in ortaya çıkmasına neden olurlar (32,33).

1.5.4. KOVALEN BAĞLANMA

Serbest radikaller polisiklik hidrokarbonlar, aromatik aminler, ve nitrozaminler gibi ksenobiyotiklerin çeşitli biyomoleküllere kovalen bağlanmasına neden olabilir. Bu da doğrudan hücre hasarına yol açabilir (33).

1.6. İ/R HASARINDA ROL ALAN MEKANİZMALAR

1.6.1. Ca⁺²

1.6.2. Ksantin Oksidaz (XO)

1.6.3. PMNL aktivasyonu

1.6.4. Araşidonik asit metabolitleri

1.6.5. Prostaglandin (PGI₂)

1.6.6. Tromboksan A₂ (TxA₂)

1.6.7. Lökotrien B₄ (LTB₄)

1.6.8. NO

1.6.9. Endotelin

1.6.10. Trombosit aktive edici faktör (PAF)

1.6.11. Komplemanlar

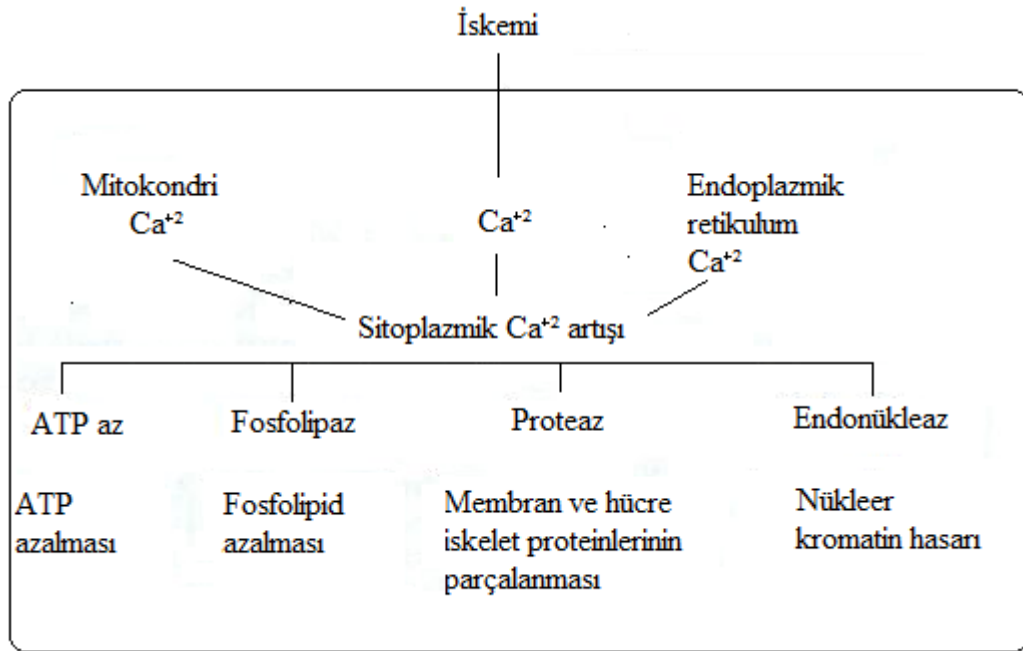
1.6.12. Sitokinler

1.6.13. Katekolamin oksidasyonu

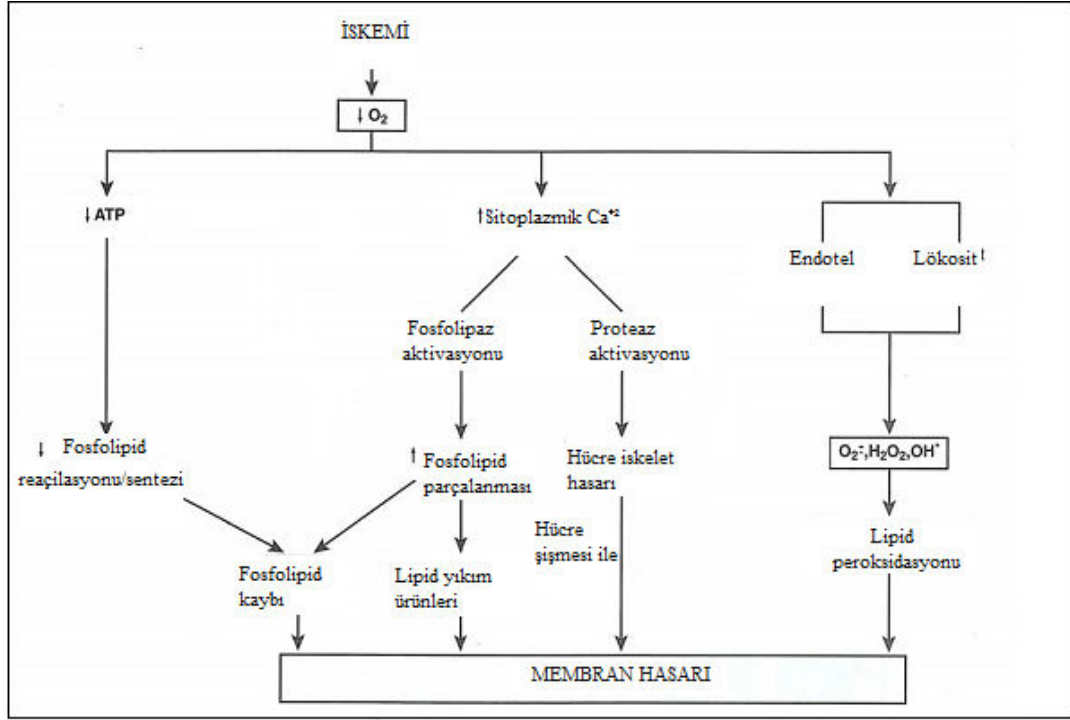
1.6.1. Ca⁺²

Hücre yaralanması ile ilgili olduğu düşünülen bir elementtir. Ca⁺² transportunu engelleyen herhangi bir durum hücre fonksiyonlarını olumsuz etkiler. Ca⁺² ATP az enzimleri önemli sülfidril gruplarına sahiptir ve ROS tarafından inaktive edilebilir. Hipoksi, sitokinler, endotoksin gibi faktörler ROS aracılığıyla hücre enerjisini azaltabilirler (34).

Reperfüzyon esnasında sarkolemmal membran hasarına ve oksidatif stresin indüklediği sarkoplazmik retikulum disfonksiyonuna bağlı olarak hücre içi Ca^{+2} miktarında belirgin artış olur. Ca^{+2} paradoksu adı verilen bu durumda rol oynayan temel hücresel mekanizmalar, iskemi esnasında aktive olmuş olan Na^{+}/Ca^{+2} değiştirici kanalı ile düşen hücre içi pH'ı normalize etmek için reperfüzyon esnasında aktive olan ve hücre dışına H^{+} iyonu atarken hücre içine, Ca^{+2} ile değiştirilecek olan Na^{+} girişini sağlayan Na^{+}/H^{+} değiştirici kanalıdır (35). Artan hücre içi ve mitokondriyal Ca^{+2} hücrelerde hiperkontraktüre neden olarak ve mitokondriyal PTP'u (Mitokondriyal PTP, iç mitokondriyal membranda yerleşmiş olan ve selektif olmayan bir kanalıdır) (35,36). Ayrıca Ca^{+2} 'nin proteaz aktivasyonu, gap junction disfonksiyonu ve membran rüptürü yaptığı da bilinmektedir (37).



Şekil 1. Hücre zedelenmesinde sitoplazmik kalsiyum artışının kaynakları ve sonuçları



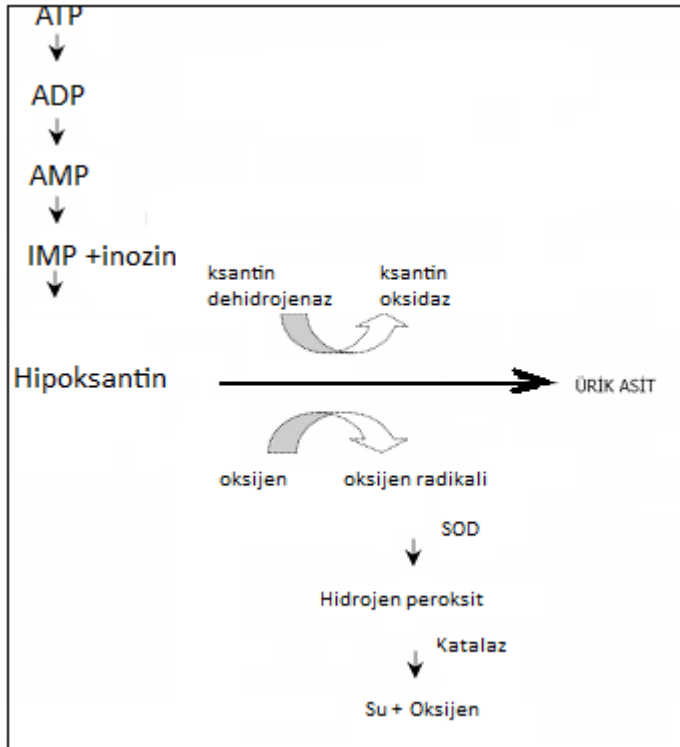
Şekil 2. İskemide membran hasarının mekanizmaları.

1.6.2. KSANTİN OKSİDAZ

Hipoksi sırasında ATP seviyesinin azalmasıyla birlikte adenzin difosfat (ADP) seviyesi artmaktadır. Artan ADP'ler önce adenzin monofosfata (AMP) daha sonra adenzin, inozin ve en sonunda hipoksantine dönüşür.

İskeminin olmadığı normal dokularda purinlerin yıkılımlında hipoksantinden ksantin oluşumunda ksantin dehidrojenaz (XDH) görev yapar. Hipoksantinden ksantin ve ksantinden ürik asit oluşumu basamaklarında elektron akseptörü olarak O_2 ' den daha çok nikotinamid adenin dinükleotid (NAD^+) kullanır. İskemi durumunda hücre içi Ca^{+2} artışı ile aktive olan enzimlerden biri XDH'dır. İskemi sırasında proteazların (fosfolipaz A_2 , nükleaz) Ca^{+2} bağlı aktivasyonu ile XDH formundaki enzim, XO formuna dönüşür. XDH'ın oksidaz olarak aktivite göstermesi durumunda hipoksantin ksantine ve ksantin ürik aside dönüşürken O_2 kullanılmakta ve O_2 'de H_2O_2 'ye indirgenmektedir. İskemi durumlarında oksijen seviyesi düşük olduğundan önemli hasar olmaz ancak oksijen seviyesi

reperfüzyon sırasında normale dönünce iskemi yerinde XO etkisiyle fazla miktarda H_2O_2 ve O_2^- oluşur. Bunların etkisiyle de İ/R hasarı denen duruma ortaya çıkar. XO bilinen ilk O_2^- radikal kaynağıdır. İskemik dokudaki serbest radikallerin en belirgin kaynağı XO enzimidir. Bu enzimin doğal formu olan XDH, O_2^- radikali oluşturmaz. XDH, O_2^- serbest radikal oluşumu için gerekli e^- transferini yapamaz.



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

1.6.3. NÖTROFİLLER (PMNL)

PMNL'ler dolaşımında en çok bulunan proenflamatuvar lökositlerdir. Enfeksiyon ve vücutta fizyolojik bariyerlere penetre olan yabancı materyallere karşı koruyuculuğun birinci basamağını oluşturur (38). İnsanlarda PMNL'lerin dolaşımdaki yarı ömürleri kısadır ve yaklaşık 8-16 saattir ve dolaşımda ortadan kalkmaları apoptotik yoluyla olmaktadır (39). Bu kontrollü ölüm programı, hücrelerin kontrolsüz şekilde lizise uğradığı, hücre içi yapıların çevre dokulara

yayılarak bunun sonucunda enflamatuvar yanıtı arttıran ve nekroz olarak tanımlanan ölümden oldukça farklıdır. Makrofajların, PMNL'leri bu apoptozis sonucunda programlı olarak fagosite etmeleri proenflamatuvar makrofaj mediatörlerinin ortama salınımını provake etmez ve böylece konakçı doku hasarının oluşması engellenmiş olur. Sonuçta PMNL'lerin ortadan kaldırılması enflamatuvar bir süreçtir ve bu apoptotik programda oluşan enflamatuvar yanıtın kontrol altında tutulmasını sağlayan bir mekanizmadır (40). Apoptozis mekanizmasında bir bozulma ve bu hücrelerin aşırı aktivasyonu sonucunda aktive olmuş PMNL'lerin endotel hasarı oluşturarak artmış vasküler permeabilite ve kapiller kaçak sendromuna neden olduğu ve muhtemel ARDS (Akut solunum sıkıntısı sendromu) ve SIRS (Sistemik enflamatuvar yanıt sendromu) altında yatan patofizyolojik neden olduğu gösterilmiştir (41).

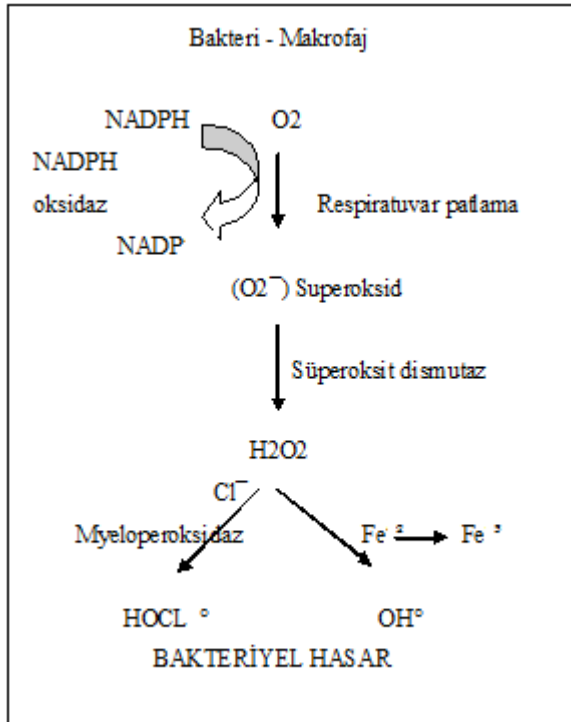
İ/R sonucunda da bu PMNL aktivasyonu rol oynamaktadır. İskemi sırasında ve daha ağırlıklı olarak bunu takip eden reperfüzyon döneminde postkapiller venüllerde endotelde artmış PMNL adezyonu görülür. PAF, LTB₄ ve serbest oksijen radikalleri bu durumun en muhtemel kimyasal mediatörleridir (42). Lökositlerin vasküler lümeninden ekstra vasküler boşluğa çıkışında olayların oluş sırası;

- 1- Marjinasyon ve yuvarlanma
- 2- Adezyon ve endotelyal hücreler arasından transmigrasyon
- 3- İnterstisyel doku içinde kemotaktik bir uyarıyı izleyerek migrasyon(31).

Ekstravazasyondan sonra lökositlerin kimyasal bir uyarıyı izleyerek zedelenme bölgesine göç etmesine kemotaksi denir. Hem ekzojen hemde endojen maddeler lökositler için kemotaktik olabilirler. Bunlar; çözülebilen bakteriyel ürünler, kompleman sisteminin ürünleri (özellikle aktive kompleman 5 (C5a)), araşidonik asit metabolizmasının lipooksijenaz yolu ürünleri (özellikle LTB₄) ve sitokinlerdir (İnterlökin (IL) 1,8,vb.) (31,43).

Ekstravasküler kompartmana ulaşıldığında aktive edilmiş lökositler toksik ROS, proteazlar ve elastaz salarlar ve bu da mikrovasküler permeabilite de artışa, ödeme, tromboza ve parankimal hücre ölümüne neden olur (31,44).

Aktive olmuş makrofajlar, PMNL'ler ve eozinofillerde fagositik solunumsal patlama sırasında da çeşitli serbest radikaller oluşur. Fagositik lökositler opsonize mikroorganizmalar, C5a kompleman fragmanı, LTB₄, bakteriyel orjinli N-formil oligopeptidler gibi partiküller ya da çözünebilir bir uyarıcıyla uyarıldıklarında lizozomal komponentleri dışarıya vermeye başlarlar ve reaktif oksijen metabolitlerinin oluşumuyla birlikte mitokondri dışında O₂ tüketiminde bir patlama (solunumsal patlama) gösterirler. Fagosite edilmiş bakteri, solunumsal patlama ürünlerinin etkisiyle öldürülür. Ancak bu oksidan ürünler hücrelerin antioksidan savunma güçlerini aştığında normal konak hücrelere zarar verirler ve çeşitli hastalıkların patogenezinde rol oynarlar.



Şekil 4. PMNL aktivasyonu

Reperfüzyonun başlamasından sonra serbest oksijen radikali patlaması sonucu;

1.Yaygın endotel hücre hasarı ve PAF gibi vazoaktif fosfolipidlerin biyosentezinde meydana gelen artış enflamatuvar reaksiyonun şiddetini artırır.

2.Endotel hasarı sonucunda PMNL agregasyonu ve adezyonu reperfüzyondan 2 saat sonra en yüksek seviyesine ulaşır. Aktive PMNL'ler, proteolitik enzim ve serbest oksijen radikalleri salgılamaları nedeni ile ekstrasellüler matrikste olduğu gibi canlı hücrelerde de hasar oluşturur.

Fagositlerin uyarılması, heksoz monofosfat sentezi yoluyla glukozun oksidasyonunda artışa yol açar. Solunumsal patlama sırasında elektron vericisi olarak NADPH kullanılır ve O_2 'nin O_2^- radikaline indirgenmesi sonucu $NADP^+$ üretimi artar ve heksoz monofosfat yolu aktive olur. Heksoz monofosfat yolunun aktivasyonuna neden olan $NADP^+$ nin diğer kaynağı H_2O_2 detoksifikasyonundan sorumlu olan glutatyon peroksidaz (GSH-Px) ve glutatyon reduktaz (GSH-r) sistemidir.

PMNL'ler ve monositlerin primer lizozomal granüllerinde, Fe-hem içeren myeloperoksidaz enzimi bulunur. Çeşitli uyarıcıların etkisiyle fagositler myeloperoksidaz içeren granüllerini hücre dışı aralıktaki fagositik vakuol içine boşaltır. Myeloperoksidaz, H_2O_2 varlığında klorur, iyodür, ve bromürün oksidasyonunu katalizleyerek HOCL, hipoyodik asit (HOI), ve hipobromik asit (HoBr) oluşturur. Bu bileşikler ve bunların tuzları güçlü oksidandırılar. Biyolojik olarak önemli moleküllerle reaksiyona girerek mikroorganizmaları etkileyen toksik ajanlar meydana getirirler.

Fagositin kendisi de reaktif oksidanların zarar vermelerine karşı hassastır. Bununla birlikte kendilerini oksidanlarına karşı koruyabilirler. Fagositlerin antioksidan sistemleri, O_2^- 'i H_2O_2 'ye dönüştüren SOD, H_2O_2 ' yi suya indirgeyen katalaz (CAT), H_2O_2 ' yi detoksifiye edici GSH-Px/GSH-r sistemi, antioksidan vitaminlerden α -tokoferol (Vitamin E) ve askorbik asit (Vitamin C) gibi antioksidanlardır.

PMNL'lerden toksik ajanların sızıntısı veya sekresyonu, yakın hücrelere ve solubl sistemlere zarar verir. Fagosit kaynaklı oksidanlar ototoksik, immunsupresif ve mutajenik etkiler gösterir. Örneğin romatoid artritli (RA) hastaların diz eklemlerinde fazla miktarda PMNL birikir ve bu PMNL 'lerden ortama salıverilen serbest radikaller eklem hasarını hızlandırırlar.

1.6.4. PGI₂

Endotel hücrelerinden serbestlenen ilk vazoaaktif ajan olan PGI₂ endotelyal yüzeylerde trombosit agregasyonunu önleyen güçlü bir vazodilatatördür.

1.6.5. Tx A₂

Araşidonik asitten siklooksijenaz yardımı ile oluşan TxA₂ trombositleri agreste eder ve vazokonstrüktör etkisi vardır. Reperfüzyon, prostaglandin üretiminin en güçlü uyarandır. TXA₂, İ/R'de endotelyuma PMNL adhezyonunu uyaran güçlü bir kemotaktik maddedir.

1.6.6. LT B₄

LTB₄, İ/R boyunca endotelial disfonksiyonda önemli rol oynayan ve lipooksijenaz yoluyla oluşan araşidonik asit metabolitleridir. LTB₄, PMNL yüzeyindeki spesifik reseptörlere bağlanır. Adezyon moleküllerinin aktivasyonunu, endotelial hücrelere yapışmayı, serbest oksijen radikallerinin ve proteazların üretimini sağlar. 3 saatlik iskemik periyodu mukozal LTB₄ seviyelerini değiştirmezken, reperfüzyonun izlediği aynı süreli iskemi mukozal LTB₄ seviyelerinde % 200-600 oranında artışa yol açmaktadır (45).

1.6.7. NO

Endotel türevli NO veya genişletici faktör (EDRF) olarak da bilinen NO, asetil kolin uyarısı, hipoksi, endotoksin, hücresel zedelenme veya mekanik

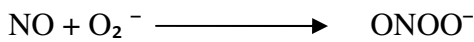
kesilme stresine yanıt olarak dolaşıma salınabilen önemli bir pro-oksitatif ve antioksitatif sinyal molekülü olmakla birlikte aynı zamanda çok reaktif bir radikaldir (46).

Yarı ömrü birkaç saniye olan, lipofilik özellikte olan diffüze olabilen bir maddedir. Bu serbest radikal damar endotel hücrelerinde NO sentaz (eNOS) enzimi tarafından L-arjininden sentezlenir (47). NO kendiliğinden nitrat ve nitrite ayrışır. Hücrel hasarın yanında büyük miktarlardaki NO parakrin ve otokrin fonksiyonların bozulmasına, bölgesel kan akımında dağılım bozukluğuna, barsak motilitesinde azalmaya ve permeabilitesinde artışa yol açar (48).

İskemik periyoda oluşan doku hipoksisi endoteldeki NO üretimini azaltır, reperfüzyonun erken fazında azalan NO ile mikrovasküler vazokonstrüksiyona neden olur (49).

Oksitatif stres, NO'nun biyoyararlanımını azaltarak onun PMNL akümülyasyonunu önleme, O_2^- radikallerini inaktive etme ve vazodilatasyon yapma gibi etkilerini engeller. Deneysel çalışmalarda NO düzeyini yükselten ajanlar iskemik hasarı azaltsa da iskemi sırasında oluşan aşırı miktardaki NO, ya bu radikalın stabil son ürünleri olan nitrit ve nitrate dönüşür, ya da O_2^- radikali ile reaksiyona girerek bir toksik oksijen metaboliti olan $ONOO^-$ oluşturur. $ONOO^-$ ise dokularda hasar yapar (50).

İskemi sürecinde oksitatif stresin başlaması ile NO ve O_2^- anyonu bağışıklık sistem hücreleri tarafından üretilir. Bu koşullar altında birbirleri ile etkileşime girerek önemli derecede kuvvetli oksitatif bir molekül olan $ONOO^-$ anyonunu üretirler. Bu serbest radikal DNA kırılmalarına ve lipidlerde oksidasyonlara neden olabilir (25).



1.6.8. ENDOTELİN

Arter ve venlerde kontraksiyona neden olan en güçlü vazokonstrüktördür. İskemik kalmış bir barsağın ürettiği endotelinin, intestinal İ/R hasarının sistemik bir hasara dönüşmesinden sorumlu olabilecek güçlü bir aday olduğu ileri sürülmektedir (13).

1.6.9. PAF

Fosfolipaz A₂'nin etkisiyle endotel hücreleri tarafından membran fosfolipidlerinden üretilir. Çok çeşitli enflamatuvar reaksiyonda ARDS, akut pankreatit, enflamatuvar barsak hastalığı, glomeruler hasar vs.) etkin olduğu gözlenen bir substrattır (51). Trombositlerin şekil değişikliğine, agregasyonuna, ve granül içeriğinin salınmasına yol açan oldukça kuvvetli bir ajandır. Ek olarak PAF kuvvetli bir PMNL kemoatraktan üretiminde önemli bir rol oynar. Lökositlerin aktivasyonuna, adezyon ve diapedezine ve aynı zamanda vasküler permeabilitede artışa yol açar. Pek çok çalışma PAF'ın invitro ve invivo ortamda lökositlerin mikrovasküler endotele adhezyonunu arttırdığını göstermiştir. PAF'ın, reperfüzyon sonucu gerçekleşen kemotaksisin bir düzenleyicisi olduğu düşünülmektedir (13).

1.6.10. KOMPLEMANLAR

Komplemanların arka arkaya aktivasyonu, anafatoksin aktive kompleman 3 (C3a) ve C5a'nın üretimine yol açar. PMNL'ler üzerindeki etkileri ise kemotaksis, endotele adhezyonun artışı, serbest oksijen radikallerinin üretim ve salınmasını sağlamaktır (13).

1.6.11. SİTOKİNLER

Reperfüzyon sonrası, dolaşımda IL-1, IL-6 ve tümör nekroze edici faktör (TNF- α) gibi sitokinler gözlenir. Hem IL-1'in hem de TNF- α vasküler

yaralanmaya katkıda buldukları ve endotel adhezyon moleküllerini arttırdıkları gösterilmiştir (13). İ/R’de sitokin salınımının bilinmesine rağmen bu sitokinlerin permeabilite üzerine olan etkilerinin direk mi yoksa hücre adezyon molekülleri ekspresyonu ve PMNL adhezyon aktivasyonu yoluyla mı olduğu bilinmemektedir (42).

1.6.12. KATEKOLAMİNLER

1.7. İ/R SONRASINDA GELİŞEN UZAK ORGAN HASARINDA AKCİĞERLERİN DURUMU

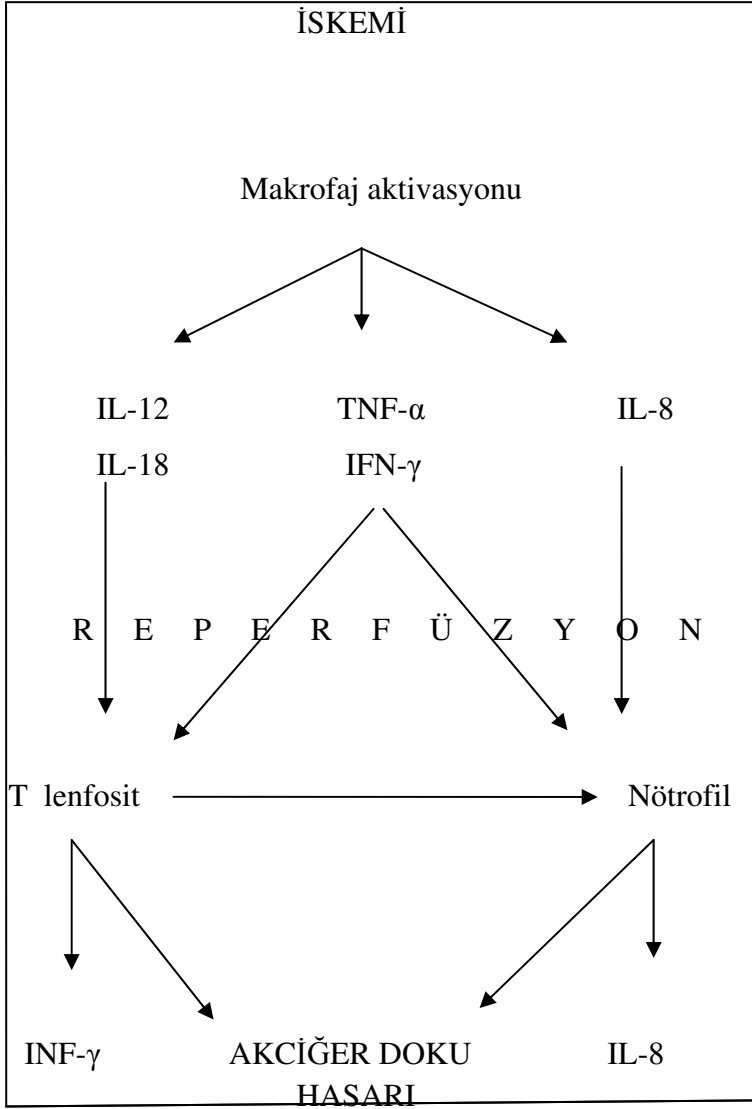
Vasküler cerrahi girişimler (anevrizma, aortaliak oklusiv hastalık) nedeniyle torako- abdominal aortanın geçici bir süreyle klempenmesi, klemp seviyesinin altındaki dokularda iskemi ve klembin kaldırılmasıyla da dokuların tekrar reperfüzyonu sonucunda başta akciğerler (miyokard, böbrek, v.b.) olmak üzere birçok uzak organda hasar oluşumuna neden olur (52,53).

Oluşan bu İ/R tablosu akciğerde interstisyel ödem ve enflamasyonla karakterize bir hasar şeklindedir. (54-58) Gelişen bu akciğer hasarı da hastalarda morbidite ve mortalite artışına neden olur.

Akciğerlerin, pulmoner arterler, bronşiyal arterler ve bunlardan bağımsız olarak alveoler yüzeylerinden aldıkları O₂ ile iskemik hasara dirençli olduğu düşünülmektedir (59). Ancak son 10 yıldır birçok deneysel çalışma ve klinik durum göstermiştir ki akciğer alveolo-kapiller membranı İ/R hasarına oldukça hassastır (60,61).

İ/R sonrasında akciğerlerde oluşan hasarın nedeni ve fizyopatolojik mekanizması henüz tam olarak ortaya konulamamıştır. Ancak bu olayın, oluşan İ/R sonrasında kompleks bir enflamatuvar döngünün başlaması ile ortaya çıktığı düşünülmektedir. Plazmada komplemanlar, sitokinler, araşidonik asit türevleri ve PAF gibi proenflamatuvar ajanların arttığı saptanmıştır (62,63).

Bunlarla birlikte XO, O₂⁻, OH⁻ radikalleri ve H₂O₂ gibi ROS'da ortaya çıkmaktadır (61). Sonuçta oluşan bu toksik ROS, yağ asit radikalleri ile etkileşerek, lipid peroksidasyon reaksiyonunu oluştururlar ve hücre hasarına yol açarlar.



Şekil 5. Akciğer vasküler yatakta İ/R sırasında lökosit aktivasyonu ve sitokin salınımı arasındaki etkileşimin olası mekanizması (64)

İ/R sonrası oluşan akciğer hasarını açıklayan çeşitli mekanizmalar tanımlanmış olsa da en çok PMNL'lerin rolü dikkati çeker (65). İ/R sonrası oluşan akciğer hasarının %80' ninden PMNL'ler sorumludur (66).

1.8. ANTIOKSİDAN SAVUNMA SİSTEMLERİ

Organizmada devamlı olarak serbest oksijen radikalleri oluşmasına rağmen antioksidan savunma sistemleri ile oksidasyon arasındaki dinamik dengeden dolayı zararlı etkiler ortaya çıkmaz. Fizyolojik veya patolojik olaylar sonucu bu dengenin oksidasyon lehine değişmesi durumunda oksidatif hasar gelişebilmektedir.

Organizma serbest radikallerin zararlı etkilerinden korunmak amacı ile vücutta ROS'u enzimatik ve enzimatik olmayan antioksidanların aktivasyonu ile dengeleyip uzaklaştırabilir. Antioksidanların etki mekanizmaları;

1. Serbest oksijen radikallerini etkileyerek onları tutma veya daha zayıf yeni moleküllere çevrilmesi.
2. Serbest oksijen radikalleriyle etkileşip onlara bir hidrojen aktararak aktivitelerini azaltılması veya inaktif hale dönüştürülmesi.
3. Serbest oksijen radikallerini bağlayarak zincirlerini kırıp fonksiyonlarının engellenmesi.
4. Serbest radikallerin oluşturdukları hasarın onarılması.

Antioksidanlar, endojen kaynaklı veya eksojen kaynaklı olabilirler.

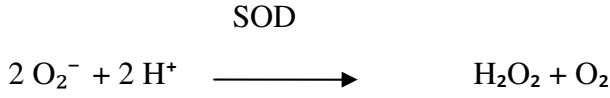
1.8.1. ENDOJEN ANTIOKSİDANLAR

Endojen antioksidanlar, enzim ve enzim olmayanlar olmak üzere iki sınıfa ayrılırlar.

1.8.1.1. ENZİM OLAN ENDOJEN ANTIOKSİDANLAR

1.8.1.1.1. SOD

SOD hücre içi kuvvetli antioksidan bir enzimdir. O_2^- i, H_2O_2 ve O_2 çeviren reaksiyonu katalizleyen bir metalloenzimdir (67).



O_2^- anyonunun üretimi ile serbest radikal reaksiyonları tetiklenir. SOD hücrel kompartmanlardaki O_2^- düzeylerini kontrol altında tutar. Bu enzimlerin aktif merkezlerinde bulunan aminoasitlerin çeşitliliği, kofaktör ve diğer bazı özelliklerine göre farklı izoformları bulunmaktadır. İnsanda üç farklı izoformu vardır (68). Bunlar;

Sitoplazmik SOD (Cu-Zn SOD): Kofaktörleri Zn ve Cu 'dur. Bu enzimin aktivitesinden Cu, stabilitesinden ise Zn sorumludur.

Mitokondriyal SOD (Mn-SOD): Kofaktörü Mn dir.

Ekstrasellüler SOD (EC-SOD): Tetramerik yapıdadır. Heparin ve heparin sülfat gibi glikozaminoglikanlara eğilim gösterir. Bu enzim de aktivitesi için Cu'ya, stabilitesi için Zn'ye ihtiyaç duyar (69). Ancak yapılan araştırmalarda genellikle tümünü kapsayan enzim (total SOD) aktivitesi ölçülür.

1.8.1.1.2. GSH-Px

GSH-Px'in, selenyum (Se)-bağımlı ve Se bağımsız, olmak üzere iki izoformu vardır (69). Bu iki enzimin alt ünite sayıları ve katalitik mekanizmaları farklıdır. Glutasyon (GSH) mekanizması çok önemli antioksidatif savunma mekanizmalarından biridir. GSH-Px karaciğerde en yüksek; kalp, akciğer ve beyinde orta; kasta ise düşük düzeyde aktivite gösterir. Aşırı düzeylerde H_2O_2 varlığında redükte GSH'ın okside glutatyona (GSSG, glutasyon disülfid) dönüşümünü katalize eder. Bu arada H_2O_2 'de suya dönüştürülerek detoksifiye olur.

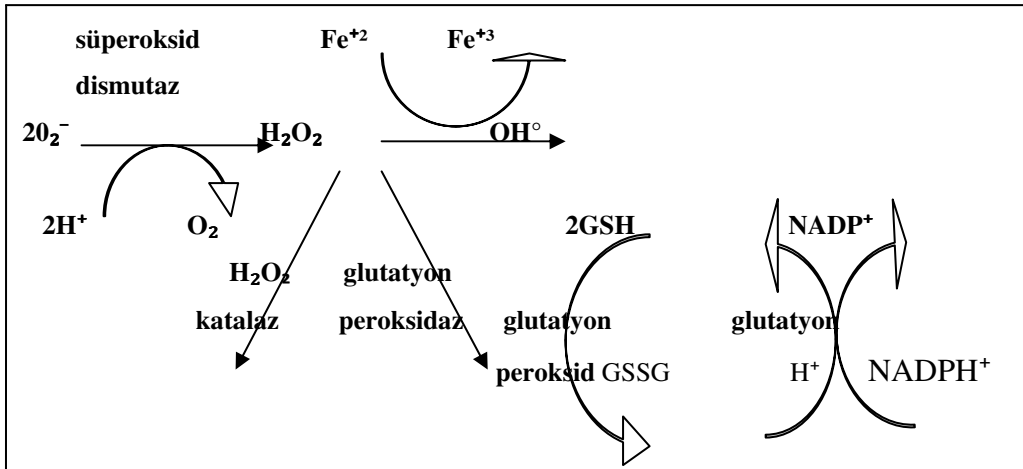
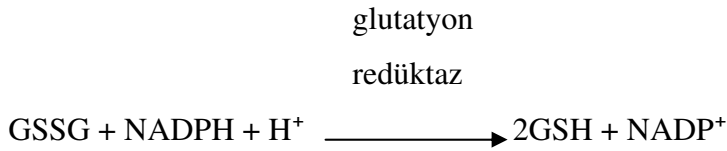


GSH-Px, GSH'ın tiyol (-SH) grupları ile alkilasyon ajanlarının reaksiyonunu kataliz ederek onların elektrofilik alanlarını yok eder. Başta araşidonik asit ve linoleat hidroksiperoksitleri olmak üzere lipid ROOH'lara karşı GSH-Px'ler Se bağımsız olarak aktivite gösterirler (70).



1.8.1.1.3. GSH-r

GSH-r, GSH-Px vasıtasıyla ROOH' ların indirgenmesi sonucu oluşan GSSG'nin tekrar indirgenmiş GSH'a dönüşümünü katalize eder.



Şekil 6. Antioksidan enzim sistemleri

1.8.1.1.4. GLUTATYON- S-TRANSFERAZ (GST)

GST, başta araşidonik asit ve lineolat ROOH'lari olmak üzere lipid ROOH'lara karşı Se-bağımsız GSH-Px aktivitesi göstererek bir antioksidan savunma mekanizması oluştururlar.



GST'ler katalitik ve katalitik olmayan çok sayıda fonksiyona sahiptirler. Bunlar hem detoksifikasyon yaparlar hem de hücre içi bağlayıcı ve taşıyıcı rolleri vardır. GST'ler, karaciğerde sitokrom P450 enzim sistemi tarafından reaktif ara ürünlere dönüştürülen yabancı maddelerin daha az reaktif konjugatlara dönüşümünü katalizlerler.

Serum GST konsantrasyon tayininin aminotransferazlardan (AST ve ALT) daha duyarlı bir hepatosellüler hasar indeksi sağladığı gösterilmiştir.

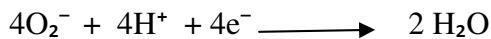
1.8.1.1.5. CAT

CAT, bitki hayvan ve aerobik bakterilerde bulunan ve H_2O_2 'i su ve O_2 'ye dönüştüren bir enzimdir (69). Esas olarak peroksizomlarda bulunur ve yapısında 4 adet hem molekülü bulunan bir hemoproteindir. Karaciğer ve eritrositler katalazın en yüksek aktiviteye sahip olduğu organlardır. CAT hücreyi solunumsal patlamalara karşı da koruyucu olarak hizmet eder. CAT'ın indirgeyici aktivitesi H_2O_2 yanı sıra metil-, etil-hidroksiperoksitler gibi küçük moleküllü lipid-ROOH'ları da içine alır.



1.8.1.1.6. MİTOKONDRIYAL SİTOKROM OKSİDAZ SİSTEMİ

Solumun zincirinin son enzimi sitokrom oksidaz aşağıdaki reaksiyonla O_2^- i detoksifiye eder.



Bu reaksiyon normalde sürekli devam eder. Böylece yakıt maddelerinin oksidasyonu tamamlanır ve bol enerji üretimi sağlanır. Ancak O_2^- üretimi çoğu zaman bu enzimin kapasitesini aşar bu durumda diğer antioksidanlar devreye girer.

1.8.1.2. ENZİM OLMAYAN ENDOJEN ANTIOKSİDANLAR

Canlı organizmalarda enzimatik antioksidanların yanı sıra vitaminler de serbest radikallerin zararlı etkilerinin ortadan kaldırılmasında önemlidir. Vitaminler non-enzimatik antioksidanlar kısmında yer alır.

1. Melatonin 2. Seruloplazmin 3. Transferrin 4. Miyoglobin 5. Hemoglobin
6. Ferritin 7. Bilirubin 8. Glutasyon 9. Sistein 10. Metiyonin 11. Ürat 12. Laktoferrin 13. Albümin

1.8.2. EKSOJEN ANTIOKSİDANLAR

Eksojen antioksidanlar, vitaminler, ilaçlar ve gıda antioksidanları olmak üzere sınıflandırılabilirler.

1.8.2.1. VİTAMİN EKSOJEN ANTIOKSİDANLAR

1. α -tokoferol 2. β -karoten 3. Askorbik asit 4. Folik asit (folat)

1.8.2.2. İLAÇ OLARAK KULLANILAN EKSOJEN ANTIOKSİDANLAR

.XO inhibitörleri (allopürinol, oksipürinol, pterin aldehit, tungsten)

.NADPH oksidaz inhibitörleri (adenozin, lokal anestetikler, kalsiyum kanal blokerleri, nonsteroid antiinflamatuvar ilaçlar, diphenylene iodonium).

.Rekombinant SOD

.Trolox-C (vitamin E analogu).

.Endojen antioksidan aktiviteyi artıranlar (GSH-Px aktivitesini artıran asetilsistein).

- .Nonenzimatik serbest radikal toplayıcılar (mannitol, albümin)
- .Demir redoks döngüsü inhibitörleri (desferroksamin).
- .PMNL adezyon inhibitörleri
- .Sitokinler (TNF- α ve IL-1).
- .Barbitüratlar.
- .Demir şelatörleri

1.8.2.3.GIDALARDAKİ EKSOJEN ANTİOKSİDANLAR

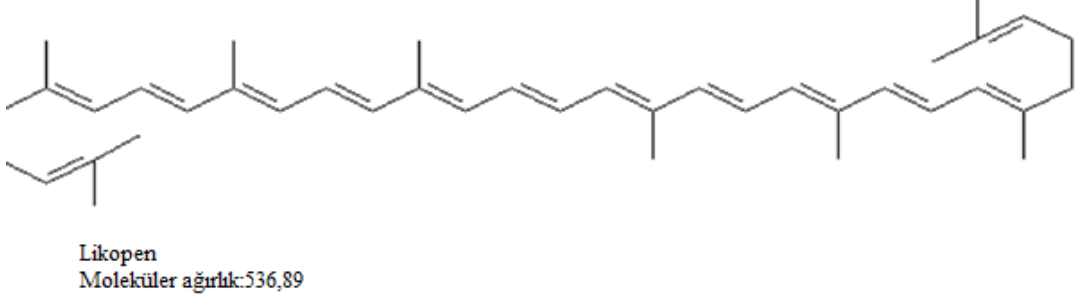
- .Butylated hydroxytoluene
- .Butylated hydroxyanisole
- .Sodyum benzoat
- .Fe-süperoksit dismutaz
- .Ethoxyquin
- .Propylgalate

1.9. LİKOPEN

Günlük diyetlerimizde meyve ve sebzelerin ağırlık kazanmasının birçok kanser ve aterosklerotik kalp hastalıklarından koruyucu ve azaltıcı etkisi olduğu bilinmektedir (71-74). Bu etkilerini ise içlerinde bulundurdukları serbest radikallerini yok etme özellikleri gösterilmiş olan Vitamin E, C, karotenoid, polifenoller, antioksidan enzimlere kofaktörlük yapan metaller aracılığı ile göstermektedirler (75).

Likopen, domates ve domates ürünlerinde bulunan yağda çözünen kırmızı-turuncu renkli bir karotenoiddir. Ayrıca kırmızı meyve ve sebzeler kuru kayısı, guava, karpuz, papaya ve pembe greyfurtta da bulunur. Bitki ve mikroorganizmalar tarafından sentezlenebilen ancak hayvanlar tarafından sentezlenemeyen doğal bir pigmenttir. Diyetle likopen alımının %85'inden fazlası domates ürünleriyle olmaktadır. Domatesin likopen içeriği onun olgunlaşmasıyla orantılıdır.

Likopen, Vitamin A aktivitesi olmayan β karotenin asiklik izomeri olan bir karotenoiddir (76). Ansature asiklik hidrokarbon yapısındadır ve 11 adet konjuge 2 adet non konjuge çift bağ içerir.



Şekil 7. Likopenin kimyasal yapısı (77).

Likopen, insan plazmasında β karoten ve diğer diyetsel karotenoidlere göre en fazla bulunan karotenoiddir. Karotenoidler arasında insan vücudundaki antioksidan savunma sisteminde diğerlerine nazaran baskın rol oynamasının nedeni de bu olarak gösterilmektedir (78). Epidemiyolojik çalışmalarda likopenin serum düzeyleriyle kronik hastalıklar arasındaki direk ilişki olduğu gösterilmiştir (79-81).

Likopenin, serbest oksijeni inhibe edici özelliği β -karotenin iki, α -tokoferolden ise on kat daha fazladır (82).

Prostat dokusunda likopenin daha çok cis izomeri, kanda ve yiyeceklerde ise daha az oranda cis izomeri kalinde bulunmaktadır (83). Birçok taze meyve ve sebze likopen kaynağı olarak bilinse de, pişmiş domates ve domates ürünleri (domates suyu, ketçap, domates sosu, domates çorbası) likopenin bol olarak bulunduğu yiyeceklerdir ve işlenmemiş taze domates suyuna nazaran likopenin biyoyararlanımının daha fazla olduğunu gösterilmiştir (84). Bu biyoyararlanımdaki farklılığın likopenin trans ve cis izomerlerinden kaynaklanmaktadır (83). Yeni çalışmalar ısıya maruz kalmış domates ve domates ürünlerinin cis izomerleri haline döndüğü ve bu şekilde alındıklarında biyoyararlanımlarının arttığını

göstermektedir (3). Vücutta bu izomerizasyon reaksiyonlarının olduğu gösteren bazı belirteçler gösterilmiş ancak bu konu tam olarak aydınlatılamamıştır. Şu anki bilgiler likopenin cis formunda bağırsaklardan daha fazlaca emilebildiği yönündedir. Bu konuyla ilgili olarak doku izomeraz enzimlerinin trans→cis form oluşumunda etkili olduğu öne sürülmektedir. Likopenin ısı, ışık ve kimyasal reaksiyonların indüklediği cis-trans izomerizasyonu vardır (83,85). Bitkilerde likopen baskın olarak trans konfigürasyonunda bulunur ve bu form termodinamik olarak en stabil formudur (83,85).

Likopenin biyoyararlanımı ve biyotransformasyonu tam olarak ortaya konulamamıştır. Prostat dokusunda 14-18 adet farklı likopen izomeri saptanmıştır. Likopenin en sıklıkla bulunan ve şu ana kadar saptanabilen izomerik formları trans, 5-cis, 9-cis, 13-cis ve 15-cis tir (86). Diğer dokulara göre prostat dokusunda daha yüksek konsantrasyonda likopen bulunmaktadır (86). Günümüzde likopenin antioksidan özellikleri araştırılmaktadır (76,83). Ayrıca hücrelerarası intercelluler gap junction iletişiminin hormonal, immun sistem ve metabolik yollarda olan etkileri de araştırılmakta olan bir moleküldür (87-91).

1.9.1. LİKOPENİN ANTIENFLAMATUVAR ETKİSİ

Likopenin serbest radikallere karşı 'scavenger' etkisi yapısındaki yüksek sayıdaki konjuge çift bağlardan dolayıdır. 'Scavenger' etkisini H_2O_2 ve diğer serbest radikalleri etkisiz hale getirerek, SOD, GSH-Px, GSH-r düzeylerini arttırarak ve böylece oksidatif stres yanıtını baskılayarak yapmaktadır (92).

İnsanlarda likopenden zengin diyet verilerek yapılan bir çalışmanın sonucunda GSH düzeylerini de arttırdığı görülmüş (92). GSH, O_2^- ' lerin SOD ile muamelesi sonrasında oluşan H_2O_2 'nin uzaklaştırılmasında ana rol oynayan GSH-Px'in yeterli düzeylerde tutulmasında rol oynayan en önemli antioksidan metabolittir. GSH ayrıca birçok redükte edici enzimin kofaktörü olarak rol oynamaktadır (msl. dehidroaskorbat redüktaz, endoperoksit izomeraz) (93).

Bakteriyel endotoksin lipopolisakkarit yapısıyla CD14 ile etkileşime geçerek makrofaj aktivasyonunu yapar bu da enflamatuvar yanıtın oluşmasını sağlar. Daha sonra sinyal transdüksiyonuyla bu durum proenflamatuvar genleri aktive eder ve NO üretimine neden olur. NO'nunda akut-kronik enflamatuvar hasarda etkili olduğu gösterilmiştir (94). Enflamatuvar yanıt esnasında NO üretimi artar ve O_2^- ajanlarla etkileşerek hücre için sitotoksik olan $ONOO^-$ oluşturur (95).

Bu üretimin büyük bir kısmı iNOS ile sağlanır ve kontrolü de daha transkripsiyon aşamasında Nükleer faktör kappa B (NF-Kb) ve Aktivatör protein-1 (AP-1) gibi transkripsiyon faktörleri ile sağlanır (96). Bütün bu bilgilerin ışığında kanser gibi enflamatuvar olaylarda NO üretiminin inhibisyonu faydalı bir tedavi stratejisidir (95).

Siklooksijenaz (COX) araşidonik asiti prostaglandinlere çeviren ve COX-1, COX-2 şeklinde iki izoformu olan bir enzimdir. COX-1 gastrointestinal mukozayı koruyucudur. COX -2 ise uyarılabilir bir enzimdir, akut/kronik enflamasyon, ağrı, hücrel iyileşme mekanizmalarında rol alır (97).

Birçok tümör tipinde COX-2 seviyeleri tümör invazyonuyla ilişkili bulunmuştur (98). Örnek olarak benign prostatik epitelyuma göre prostat kanserlerinde daha çok COX-2 üretilir. Buna rağmen COX-2' nin inhibisyonu prostat tümör hücrelerinde apoptozisi artırıcı etki göstermiştir (98). Buradan yola çıkarak COX-2'nin inhibisyonuyla ilişkili kanserlerin önlenmesinde başarılı sonuçlar alınabilir.

Enflamatuvar hastalıklarda artmış NO'nun nedeni iNOS, artmış prostaglandinlerin nedeni ise COX-2 ekspresyonundaki artmadır (99). iNOS ve /veya COX-2 nin aşırı ekspresyonu enflamasyonla ilişkilidir ve birçok enflamatuvar hastalığın nedeni olarak belirtilmektedir (97).

Likopenin antioksidan, antiproliferatif ve antienflamatuvar özelliklerinin araştırıldığı çalışmalarda likopen alımıyla COX-2 ve NO'nun üretimleri

arasındaki ilişki; likopenin antioksidan, antiproliferatif ve antiinflamatuvar etki mekanizmalarına ışık tutacak daha ayrıntılı bilgiler sağlamak ve oksidatif strese bağlı gelişen hastalıkların tedavi ve önlenmesinde yeni terapötik yaklaşımların geliştirilmesi için araştırılmıştır.

Transkripsiyon faktörü NF-kB, iNOS ve COX-2 ekspresyonunu düzenler. Bu yüzden NF-kB nin aktivasyonu artmış NO ve prostaglandin seviyelerine neden olur (97,99). Makrofajlardan NO salınımı iNOS a bağlıdır ve lipopolisakkarit, interferon (IFN)- γ ,TNF- α gibi birçok ajan tarafından aktive edilebilir (100). Lipopolisakkarit aracılığı ile makrofaj aktivasyonu ve sonrasında iNOS aracılığı ile NO sentezini gösteren çalışma sonucunda likopenin iNOS sentezini ve haberci(m)-ribonükleik asit (RNA) ekspresyonunu azaltıcı etkisini gözlemlenmiş. Bu çalışma sonucunda da likopenin lipopolisakkaritlerle aktive olan fare makrofajlarında NO üretimini inhibe ederek antiinflamatuvar etki gösterdiği belirtilmiştir.

1.9.2. LİKOPENİN ANTİKANSEROJEN ETKİSİ

Likopenin kronik hastalıklara karşı potansiyel koruyucu etkisi normal ve risk altındaki populasyonların epidemiyolojik gözlemlerine dayanmaktadır. Bu çalışmalarda likopen diyet yoluyla alınmış ve likopenin plazma, doku düzeylerine bakılarak değerlendirme yapılmıştır. Doku kültürü ve invitro sistemlerde likopenin kanserden koruyucu ve önleyici etkileri birçok çalışmayla gösterilmiştir. Böylece likopenle ilgili birçok koruyucu mekanizmada ortaya atılmıştır. Yapılan epidemiyolojik çalışmalarda domates ve domates ürünleriyle beslenmesi sonucunda o popülasyondaki kanser ve koroner kalp hastalığı insidansının daha düşük olduğu gösterilmiştir (89,101-114). Yapılan bu çalışmalara örnekler verecek olursak;

1.Aynı yaş grubunda prostat kansinom (Ca) olan ve olmayan insanların prostat dokusu ve serum likopen seviyeleri karşılaştırılmış ve maligniteli grupta belirgin olarak düşük bulunmuştur (102). Prostat Ca'lı hastalarda likopenin

izomerizasyonu ile ilgili bir sorun olduğu ve bundan dolayı emiliminin yetersizliğinden kaynaklanabileceği hipotezi öne sürölmüştür. Levy ve ark. likopenin kültür ortamlarında, insan endometrial, meme ve akciğer kanser hücrelerinin üremesini inhibe ettiği, α ve β karotenden daha etkili olduğu gösterilmiştir (89).

2.Likopen vitamin D3 ile birlikte kullanıldığında sinerjistik etki göstererek hücre gelişim döngüsünü inhibe eder ve promyelositik lösemi hücrelerinde HL 60 farklılaşmasını sağlar (103).

3.Colditz ve ark. yaptığı bir çalışmada; 1271 hastanın farklı gruplar oluşturularak farklı sebzelerle beslenilmesi sağlanmış ve bu insanların kanserden ölümleri araştırılmış. Domates alan grupta kanser mortalitesinde %50 azalma saptanmış. Havuç ve diğer karotenoidden zengin sebzelerle beslenenlerde ise bu etki görülmemiş (104).

4.US Health Professionals grubunun yaptığı çalışmada ise; prostat Ca ile birçok karotenoid ve retinal alımı arasındaki ilişki araştırılmış. Sonucunda ise çeşitli domates ürünleriyle alınan likopenin alım miktarıyla prostat Ca arasında ters bir orantı saptanmış. Bu etki diğer karotenoidlerde görülmemiş. Yine plazma ve doku likopen düzeyleriyle prostat Ca arasındaki ters ilişki olduğu başka çalışmalarda da gösterilmiştir (102,105).

5.Fare embriyo fibroblast hücrelerinde, likopen önemli bir gap junction protein kodlayısı olan connexin 43 geni ekspresyonunu arttırarak gap junctionlar arası komunikasyonu arttırıcı etki etmektedir ve bu da antikarsinojenik ajan olarak etki göstermektedir (106).

6.Oral kavite, farinks, özafagus, mide, kolon, rektum Ca'lı histolojik olarak kanıtlanmış hastalar gruplara ayrılmış ve yüksek doz domates tüketimiyle takip edilen hastalarda sindirim sistemi kanserlerinde inhibe edici etkisi olduğu görölmüş (107).

7. Epidemiyolojik çalışmalarda akciğer Ca riskiyle likopen alımı ve kan düzeyi ilişkileri araştırılmış ve likopen düzeyi ile akciğer Ca arasında ters ilişki saptanmıştır. Ancak bu farklı çalışmalarda desteklenilmemiştir (108-110).

8. Servikal intraepitelyal neoplazi ve mesane Ca ile likopen kan düzeyleri arasında ters ilişki saptanmıştır (111,112).

9. Giovannucci, domates ve domates ürünleriyle beslenme sonucu kan plazma düzeyleri ve bunların kanserle olan ilişkisinin araştırıldığı 72 epidemiyolojik çalışmanın sonuçlarını yayınlamıştır (101). Bu çalışmalar sonucunda birçok kanser tipiyle likopen arasında ters orantılı ilişki saptanmıştır. Burada prostat, akciğer, mide kanserlerinde bu ilişki çok güçlü olarak belirtilmiş ancak pankreas, kolon, rektum, özafagus, oral mukoza, serviks kanserleri için ise bunların likopenle olan ilişkisi idda boyutunda kalmıştır.

10. Likopen içeren domates ve sebze suları içildiğinde sağlıklı kişilerde DNA sarmalındaki kırılmaların azaldığı saptanmıştır (113).

11. Prostat Ca'lı hastaların kapsül haline getirilmiş domates ekstretelerinden almaları sonucu PSA (Prostat spesifik antijen) seviyelerinde azalma olduğu saptanmıştır (114).

1.9.3. ATEROSKLEROZ GELİŞİMİNDE LİKOPENİN ETKİSİ

Günümüzde serum kolesterol seviyeleri ve koroner arter hastalıkları arasındaki ilişki bilinmektedir. Buna ilaveten serbest oksijen radikallerinin neden olduğu oksidatif stresinde koroner arter hastalıklarında büyük önem taşıdığı düşünülmektedir. Kandaki düşük dansiteli lipoprotein (LDL) oksidasyonu ateroskleroz ve koroner arter hastalıklarının etyolojisinde anahtar rol oynamaktadır. Bu durumun açıklaması ise şöyle yapılmaktadır; Okside olmuş LDL'leri arter duvarında bulunan makrofajlar fagosite eder ve bu plak formasyonunun oluşumunu başlatır (115). Cai ve Harrison ayrıca artmış ROS endotelden salınan NO

salınımını inhibe ettiği ve bunun endotelial disfonksiyonun gelişmesine neden olduğunu belirtmişlerdir (116). Endotelial disfonksiyon da aterosklerozun başlangıç aşamasında gelişen bir durumdur. Beslenme alışkanlıkları da kronik hastalıkların (koroner arter hastalığı, hipertansiyon, diabetes mellitus (DM) komplikasyonları) gelişiminde önemli rol oynar. Karotenoid içeriği yüksek olan gıdalarla beslenmenin bu kronik hastalıklara karşı belirgin koruyucu etkisi vardır. İnvitro çalışmalar diyetle (msl. Vitamin E ve β karoten) alınan antioksidanların okside LDL oluşumunu ve bunların makrofajlar tarafından alınımını önlemektedir. Birçok epidemiyolojik çalışma B karoten ve kardiyovasküler hastalıklar arasında ilişki olduğunu göstermiştir. Yapılan çalışmalar;

Literatürde antioksidan gıdaların oksidatif olayları inhibe ederek aterosklerozun ilerleyişini yavaşlattığını belirten yayınlar mevcuttur (117-119).

MI (Miyokard İnfarktüsü) ve iskemik stroke altında yatan nedenin yüksek LDL düzeyi ve bunun oksidasyonun etkili olduğu belirtilmektedir (120). Multimerkezli (EUROMIC) bir çalışmada yağ dokunun antioksidan durumuyla (α , β karoten, likopen) AMI arasındaki ilişki araştırılmış 10 farklı Avrupa ülkesinin diyet alışkanlıkları değerlendirildikten sonra yapılan analizde sadece likopenin koruyucu olduğu saptanılmıştır (81). Yağ dokusu içeriği en yüksek poliansatüre yağ içeren kişilerde likopenin maksimum koruyuculuğu saptanılmıştır (81). Ayrıca düşük likopen seviyeleri ile koroner arter hastalığı ve mortalitesi oranları daha yüksek bulunmuştur (121).

2 hafta süreyle likopenden fakir diyetle beslenen insanlarda % 50 oranında serum likopen düzeyinin azaldığı görülmüş ve sonrasında lipid oksidasyonunda % 25 'lik artma görülmüş (122).

II. GEREÇ ve YÖNTEMLER

Çalışma Afyon Kocatepe Üniversitesi Hayvan Denepleri Etik Kurulundan (AKÜHADYEK) onay alındıktan sonra (10/07/2008, B.30.2.AKÜ.0.8Z.00.00/236), Süleyman Demirel Üniversitesi Tıp Fakültesi Deneş Hayvanları Laboratuvarından elde edilen erkek, sağlıklı, Sprague Dawley cinsi rat, kullanılarak gerçekleştirildi. Ratlar deneş öncesi tel kafeslerde 12 saat gece 12 saat gündüz sirkadiyen ritimde, ortam sıcaklığı 20-26°C olacak şekilde tutuldular. Deneşden 12 saat önce, su hariç beslenmeleri durduruldu. Tüm ratların bakımı, Tıbbi Araştırmalar Ulusal Derneğı tarafından biçimlendirilen 'Deneş Hayvanlarının Bakım Prensipleri'ne ve Laboratuvar Hayvanı Kaynakları Enstitüsü tarafından hazırlanıp Ulusal Sağlık Enstitüsü tarafından yayınlanan 'Laboratuvar Hayvanlarının Bakım ve Kullanımı için Kılavuz'una (NIH basım no.85-23, 1985 revize edildi) uygun olarak yapıldı. Her grupta 7 rat olmak üzere randomize olarak 4 grup oluşturuldu. Gruplar:

Oluşturulmuş olan bu gruplar 10 gün süreyle beslenme programına alındı.

Grup 1 (Sham); 10 gün boyunca likopen içeriğı yüksek olduğı bilinen gıdalar dışındaki beslenme ürünleriyle oral yoldan beslenen, sadece anestezi verilerek karın eksplorasyonu yapılan ve abdominal aortaya kros klemp konulmadan çalışma grupları için öngörülen İ/R süresi boyunca izlenen grup.

Grup 2 (Kontrol); 10 gün boyunca likopen içeriğinin yüksek olduğı gıdalar dışında oral yolla beslenen ve aortik İ/R modeli oluşturulan grup.

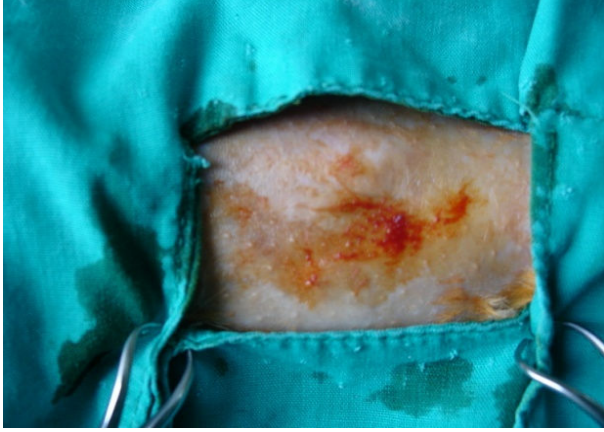
Grup 3 (Düşük doz likopen); 10 gün boyunca grup 1 ve 2' deki oral alımlarına ek olarak orogastrik lavaj ile 1 mg/kg/gün likopen (Good'n Natural 10 mg kapsül USA) ile beslenen ve aortik İ/R modeli oluşturulan düşük doz likopen grubu.

Grup 4 (Yüksek doz likopen); 10 gün boyunca grup 1 ve 2' deki oral alımlarına ek olarak 40 mg/kg/gün likopen alacak şekilde orogastrik beslenen ve aortik İ/R modeli oluşturulan yüksek doz likopen grubu.

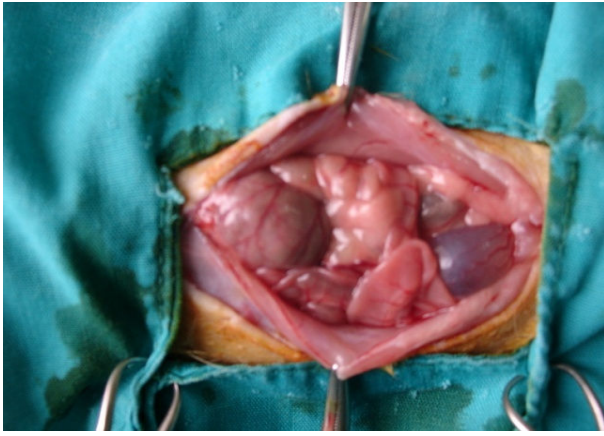
Grup 3-4 de orogastrik lavaj ile verilen likopen dışında her 4 gruptaki ratlarda aynı besin maddesiyle beslendi.

2.1. ANESTEZİ ve CERRAHİ YAKLAŞIM

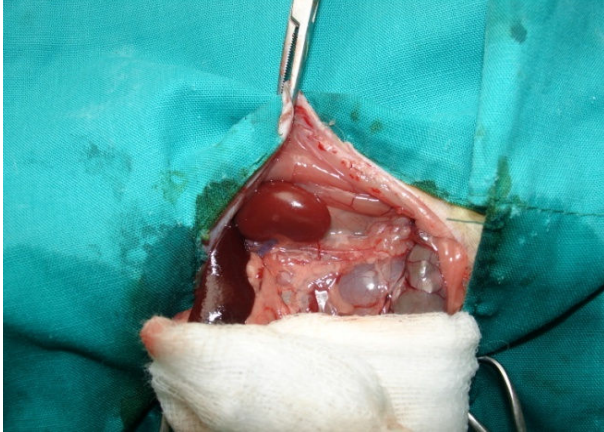
Cerrahi işlemden 12 saat önceden itibaren aç bırakılan ratlar, 40 mg/kg intramuskuler (İM) sodyum thiopental (pentothal sodium, Abbot, USA) ile uyutulmuş olarak ekstremitelelerinden ameliyat masasına bağlandı. Karın tıraş edilmiş, povidone-iodine solüsyonu (Polyod, Drogosan, Türkiye) ile silindikten sonra steril koşullarda örtülerek (Resim1) median laparotomi yapıldı (Resim2). Bağırsaklar sağa doğru dışarı alınarak ısı ve sıvı kaybını önlemek için sıcak ıslak kompreslerle sarıldı. Retroperitona ulaşılarak abdominal aortanın üzeri açıldı. Abdominal aort sol renal venin altından dönülüp askıya alındıktan sonra 150 Ü/kg intraperitoneal heparin Na (Nevparin, Mustafa Nevzat, Türkiye) ile antikoagülasyon sağlandı. Heparin verildikten sonra infrarenal abdominal aortaya mikrovasküler klemp konuldu. 45 dakika boyunca total aortik oklüzyon sağlandı. Bu esnada ısı ve sıvı kaybını engellemek amacıyla ıslak steril örtü ve intraperitoneal 10 ml ılık % 0,9 serum fizyolojik uygulandı. Süre sonunda klemp kaldırılarak reperfüzyon başlatıldı. Reperfüzyon arter vurumlarının tekrar belirmesi ve klemp distalinde manuel olarak nabzın alınması ile kontrol edildi. Tüm deneklerde heparinin etkisini nötralize etmek için 1 mg/kg intraperitoneal protamin (protamin sülfat, Sanofi-Synthelabo, Türkiye) uygulandı. Kanama kontrolünü takiben bağırsaklar içeriye yerleştirilerek karın kapatıldı ve ratlar 120 dakika süreyle reperfüzyon sürecine alındı. Reperfüzyonun ardından median sternotomi ile ratların göğüs boşluğu açıldı. Eşzamanlı intrakardiyak olarak kan örnekleri alındı ve trakeadan kesilerek her iki akciğer toraks boşluğundan çıkarıldı. Sağ bronş kleplendi. Trakea yoluyla sol akciğere 2 cc izotonik (% 0,9 NaCL) mayi verilerek bronkoalveolar lavaj (BAL) yapıldı. Serum fizyolojik ile akciğer yüzeyi yıkanarak temizlendi. Sağ akciğer histopatolojik ve biyokimyasal tetkikler için iki eşit parçaya ayrıldı. Parçalardan biri histopatolojik inceleme için % 10' luk formaldehite konuldu diğeri ise tampon fosfat solüsyonu içerisinde alınarak biyokimyasal tetkikler için BAL sıvısı ile birlikte -80°C'de saklandı.



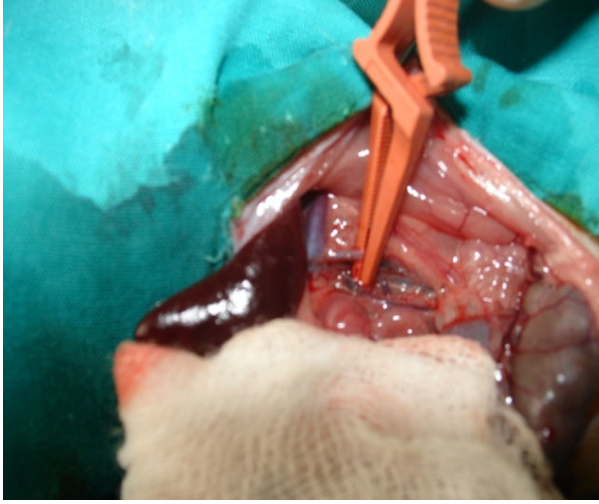
Resim 1. Deneğin steril olarak örtülmüş hali.



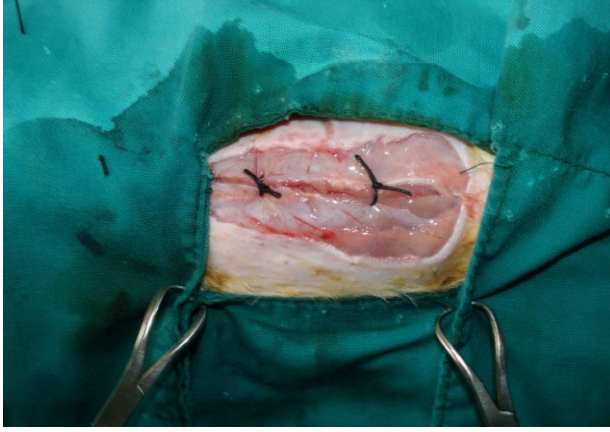
Resim 2. Deneğin karnının açılmış hali.



Resim 3. Bağırsakların karın dışına ıslak gazlı bez içine alınarak retroperitoneal bölge eksplorasyonunun yapılması.



Resim 4. Hassas damar klempinin infrarenal bölgede aortaya konulması.



Resim 5. Reperfüzyon sürecinde karnın kapatılarak takibi.



Resim 6. Reperfüzyon süresi sonunda deneklerin intrakardiyak kan örneklerinin alınması.

2.2. DOKU ÖRNEKLERİNİN HAZIRLANMASI

Rat akciğer doku örnekleri pH 'sı 7,4 olan fosfat tamponu kullanılarak (1g doku + 9ml tampon) IKA (K-Ultra Turrax Basic) T 18 model homojenizatör ile buz banyosu içerisinde homojenize edildi ve UP50 H ultraschall prozesor (TUV Berlin Brander GS) model sonikatör kullanılarak sonike edildi. Homojenatlar 5000 rpm 'de +4°C de 10 dakika santrifuj edildi. Santrifuj sonrası süpernatantlar numune olarak kabul edildi. Süpernatanttan Fluka Protein Quantification Kiti (Sigma Aldrich Chemie GmbH, Japan) ile protein düzeyleri, TNF- α , MDA düzeyleri ve GSH-Px ve SOD aktiviteleri ölçüldü. Sonuçlar TNF- α , MDA ve GSH- Px için g protein, SOD için mg protein başına verildi.

2.3. PLAZMA-ERİTROSİT SÜSPANSİYONU

Kan numuneleri EDTA-K3 antikoagulan içeren tüplere alındı ve 3000 rpm 'de 10 dakika santrifuj edildi. Santrifuj sonrası üstte kalan plazma ependorf tüplerine alınıp analiz edilinceye kadar -80°C'de saklandı. Ardından eritrositler % 0,9 'luk NaCl solusyonu ile 3 defa yıkandı. Her yıkama sonrası 3000 rpm 'de 10 'ar dakika santrifuj edildi. Her santrifuj sonrası süpernatant aspire edilerek atıldı. Hazırlanan eritrosit paketi ependorf tüplerine alınıp analiz edilinceye kadar -80°C'de saklandı. Plazmadan TNF- α ve MDA düzeyleri çalışıldı. Eritrositlerden hemolizat hemoglobin tayini yapıldı ve GSH-Px ve SOD aktiviteleri ölçüldü. Sonuçlar U/g Hb olarak verildi.

Hemolizat Hemoglobin Tayini:

Prensip: Drapkin çözeltisinde bulunan ferrisiyanür Hb 'deki +2 değerlikli demiri(ferro= Fe^{+2}) +3 değerlikli demire (Ferrik= Fe^{+3}) çevirerek methemoglobine dönüştürür. Sonra potasyum siyanür ile birleşerek stabil bir molekül olan siyanmethemoglobin meydana gelir. Siyanmethemoglobinin 540 nm 'de ölçülen absorbansı hemoglobin ile doğru orantılıdır (123).

Drapkin Reaktifi:

Sodyum bikarbonat(NaHCO₃) %1

Potasyum ferrisiyanür(K₃Fe(CN)₆)%0,2

Potasyum siyanür (KCN) %0.05

Distile Su 200 ml

Buzlu Su 1000 ml

Prosedür

Hazırlanan hemolizattan 10 µl bir tüpe alındı. Üzerine drapkin reaktifinden 3 ml eklendi ve tüpler iyice çalkalanıp 15 dakika oda ısısında bekletildi. Standart olarak kontrol kanı, kör olarak drapkin çözeltisi kullanılarak tüm örnekler 540 nm dalga boyunda ölçüldü.

2.4. BAL ÖRNEKLERİNİN ALINMASI

BAL'dan Fluka Protein Quantification Kiti (Sigma Aldrich Chemie GmbH, Japan) ile protein düzeyleri, TNF- α , MDA düzeyleri ve GSH-Px ve SOD aktiviteleri ölçüldü. Sonuçlar TNF α , MDA ve GSH-Px için g protein, SOD için mg protein başına verildi.

2.5. ÇALIŞMADA BAKILAN OKSİDAN-ANTIOKSİDAN PARAMETRELER

2.5.1. MDA

2.5.2. Rat TNF- α

2.5.3. SOD

2.5.4. GSH-Px

2.5.1.MDA

Numune hazırlığı: 100 µl plazma ile 500 µl presipitasyon reaktifi alınıp 10 saniye karıştırılarak 13000 rpm'de 5 dakika santrifüj edildi. 500 µl süpernatant alınıp 100µl derivatizasyon reaktifi ilave edildi ve 95 °C'de 60 dakika inkübe

edildi. İnkübasyon sonrası soğutularak 500 µl nötralizasyon buffer ilave edildi ve Agilent 1100 series HPLC cihazında uygun kolon kullanılarak çalışıldı.

Reaktifler: Chromsystems marka ticari kitler ve kolon kullanıldı.

Chromsystems Instruments & Chemicals GmbH

Heimburgstrasse 3 81243 München Germany

2.5.2. RAT TNF - α

Rat TNF- α ölçümü için Biosource marka Rat TNF- α ticari ELİSA kiti kullanıldı. (Invitrogen Corporation, Carlsbad, CA 92008.USA). Absorbans okuması Trinity Biotech Captia Reader cihazında yapıldı. (Trinity Biotech PLC, Bray CO. Wicklow, IRELAND).

2.5.3. SOD

SOD aktivitesi ölçümü Cayman marka Superoxide Dismutase Assay Kit ile yapıldı (Cayman Chemical Company, 1180 E. Ellsworth Rd, Ann Arbor, MI 48108). Absorbans okuması Trinity Biotech Captiva Reader cihazında yapıldı (Trinity Biotech PLC, Bray CO. Wicklow, IRELAND).

2.5.4. GSH-Px

GSH-Px aktivitesi Randox-Ransel marka GSH-Px ticari kiti kullanılarak ölçüldü. (Randox Laboratories LTD. Ardmore, United Kingdom). Absorbans ölçümü Shimadzu UV-1601 model UV-Visible spektrofotometre cihazında yapıldı.

2.6. AKCİĞER DOKU ÖRNEKLERİNİN HİSTOPATOLOJİK OLARAK İNCELENMESİ

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 seri kesitler hazırlanarak, Hemotoksilen-Eozin (HE) boyası ile boyandı. Hazırlanan preperatlar gruplara kör olan tek bir patolog tarafından, ışık mikroskopunda (Nikon UFX-IIA, Japan) akciğer dokusu interstisyum ve alveollerdeki iltihabi hücreleri incelendi.

2.7. BİYOKİMYASAL ve HİSTOPATOLOJİK SONUÇLARIN İSTATİSTİKSEL ANALİZİ

Veriler ortalama \pm standart sapma (s.s.) olarak sunuldu. Verilerin normallik dağılımının kontrolü için Shapiro-Wilk testi kullanıldı. Gruplar arasındaki farklılığı saptamak için normal dağılım gösteren verilere tek yönlü ANOVA ve normal dağılım göstermeyen verilere ise Kruskal Wallis H testi uygulandı. Farklı olan grubun saptanması için ise post hoc testlerinden Tukey HSD testi kullanıldı. Anlamlılık düzeyi $p < 0.05$ olarak kabul edildi. İstatistiksel analiz için SPSS (SPSS 10.01, SPSS Inc. Chicago, IL, USA) bilgisayar programı kullanıldı.

III. BULGULAR ve SONUÇLAR

3.1. BİYOKİMYASAL BULGULAR

Eritrositlerde bakılan parametreler ANOVA testi ile değerlendirildi.

Tablo 1. Eritrositlerde bakılan biyokimyasal parametrelerin değerleri.

	Sham	Kontrol	Düşük Doz	Yüksek Doz	P
GSH-Px	215,71±58,15 a	349,14±102,40 a	1529,14±421,81 b	2420,14±648,97 c	0,0001
SOD	1763,71±332,08 a	3232,42±1514,41 a	12008,86±2868,14 b	20382,71±6839,39 c	0,0001

a,b,c Her bir satırdaki farklı harfler gruplar arasında farklılık olduğunu göstermektedir.

Plazmada bakılan TNF- α Kruskal Wallis testi ile, MDA ise ANOVA testi ile değerlendirildi.

Tablo 2. Plazmada bakılan biyokimyasal parametrelerin değerleri.

	Sham	Kontrol	Düşük Doz	Yüksek Doz	P
TNF- α	18,71±15,65 b	68,46±8,48 c	25,77±7,03 a	19,71±6,83 a,b	0,0001
MDA	0,43±0,17 a	2,04±0,57 b	0,95±0,36 a	0,88±0,19 a	0,0001

a,b,c Her bir satırdaki farklı harfler gruplar arasında farklılık olduğunu göstermektedir.

Akciğer dokusunda bakılan parametrelerden SOD ANOVA testi ile diğerleri ise Kruskal Wallis testi ile değerlendirildi.

Tablo 3. Dokuda bakılan biyokimyasal parametrelerin değerleri

	Sham	Kontrol	Düşük Doz	Yüksek Doz	P
TNF- α	0,52±0,50 a	2,75±0,67 b	1,61±0,27 a	1,26±0,27 c	0,0001
MDA	0,018±0,01 a	1,02±0,30 b	0,87±0,32 a	0,06±0,04 c	0,0001
GSH-Px	19,83±7,35 c	6,25±3,35 b	35,24±17,22 a	105,26±22,70 a	0,0001
SOD	12,29±6,51a	10,02±4,54 a	30,19±14,98 b	71,77±16,77 c	0,0001

a,b,c Her bir satırdaki farklı harfler gruplar arasında farklılık olduğunu göstermektedir.

BAL’da bakılan parametreler; GP-x, SOD, TNF- α parametreleri için ANOVA ve Tukey HSD testi, MDA için ise Kruskal Wallis testi kullanıldı.

Tablo 4. BAL sıvısında bakılan biyokimyasal parametrelerin değerleri .

	Sham	Kontrol	Düşük Doz	Yüksek Doz	P<0,05
TNF- α	12,63 \pm 8,45 a	94,84 \pm 19,55 c	38,59 \pm 10,40 b	20,17 \pm 5,25 a	0,0001
MDA	0,079 \pm 0,09 a	0,38 \pm 0,19 c	0,08 \pm 0,078 a,b	0,12 \pm 0,20 b	0,009
GSH-Px	218 \pm 23,90 a	191,57 \pm 7,54 a	186,28 \pm 40,20 a	366,71 \pm 93,86 b	0,0001
SOD	266,28 \pm 54,65 a	266,85 \pm 39,15 a	272,71 \pm 50,27 a	270,28 \pm 52,45 a	0,994

a,b,c Her bir satırdaki farklı harfler gruplar arasında farklılık olduğunu göstermektedir.

3.2. HİSTOPATOLOJİK BULGULAR

Tossiopoulos ve ark. (52) kullandıkları skorlama sistemi modifiye edilerek akciğerlerde oluşan hasarın miktarı saptandı. Sonuçlar ortalama \pm SS olarak ifade edildi.

0 puan= Değişlik yok (Skor 0)

1 puan= Fokal, hafif değişiklikler (Skor 1)

2 puan= Multifokal orta dereceli değişiklikler (Skor 2)

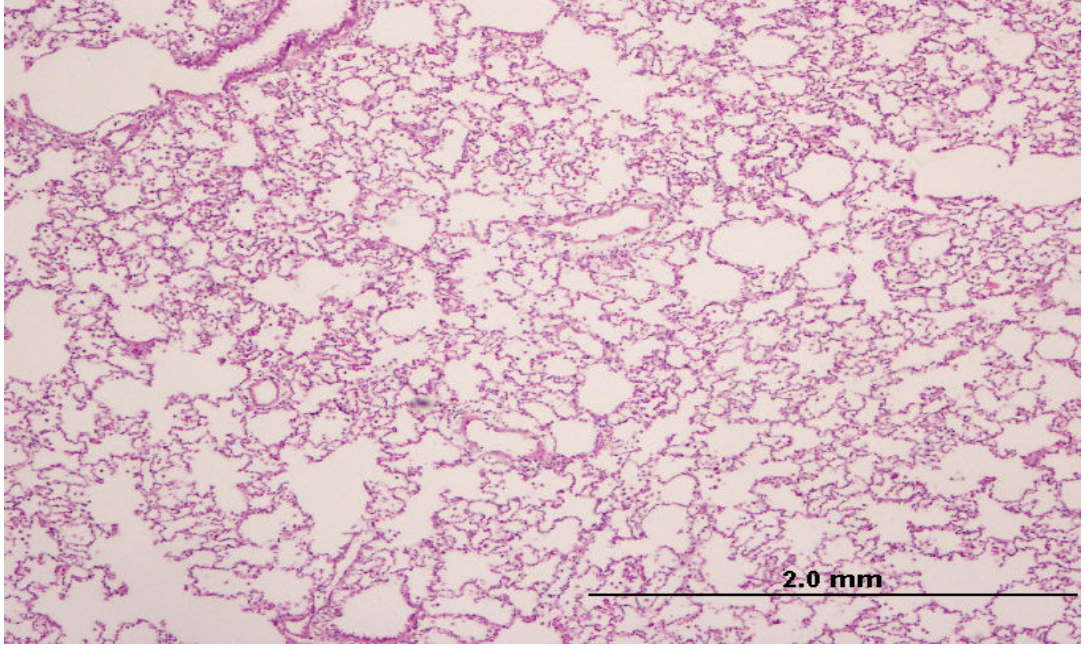
3 puan= Multifokal belirgin değişiklikler (Skor 3)

4 puan= Yaygın belirgin değişiklikler (Skor 4) olarak değerlendirildi.

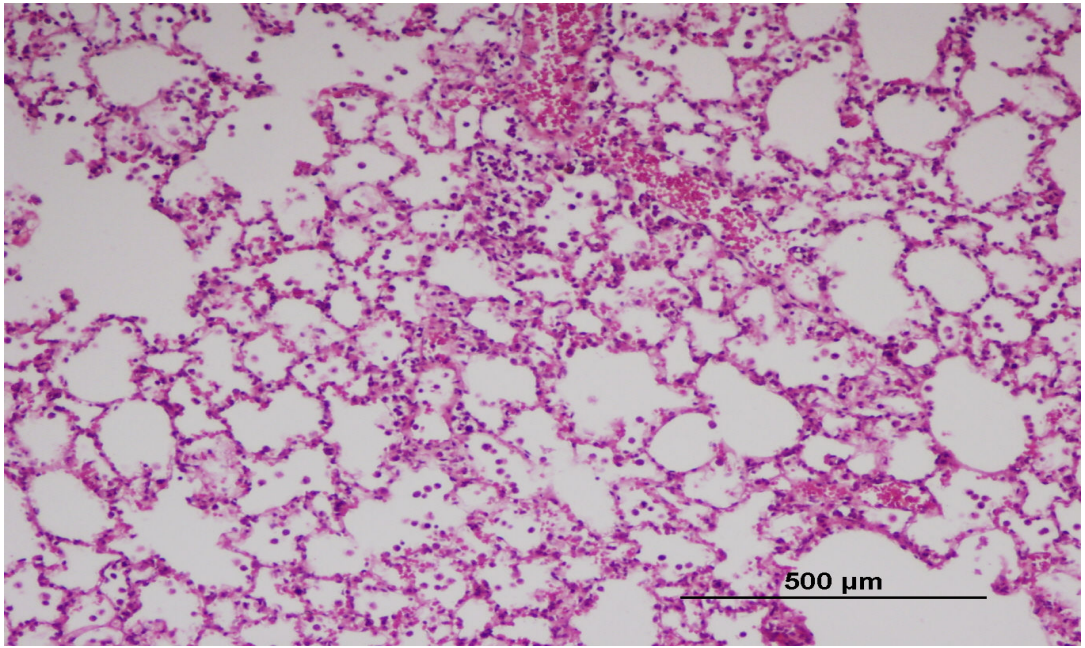
Tablo 5. Gruplar arası akciğer hasarı değerleri.

Grup	Sayı	Ortalama değer+ standart sapma
Sham	7	0,571 \pm 1,133 c
Kontrol	7	3,571 \pm 0,534 b
Düşük doz	7	2,428 \pm 0,786 a
Yüksek doz	7	1,428 \pm 0,534 c,d

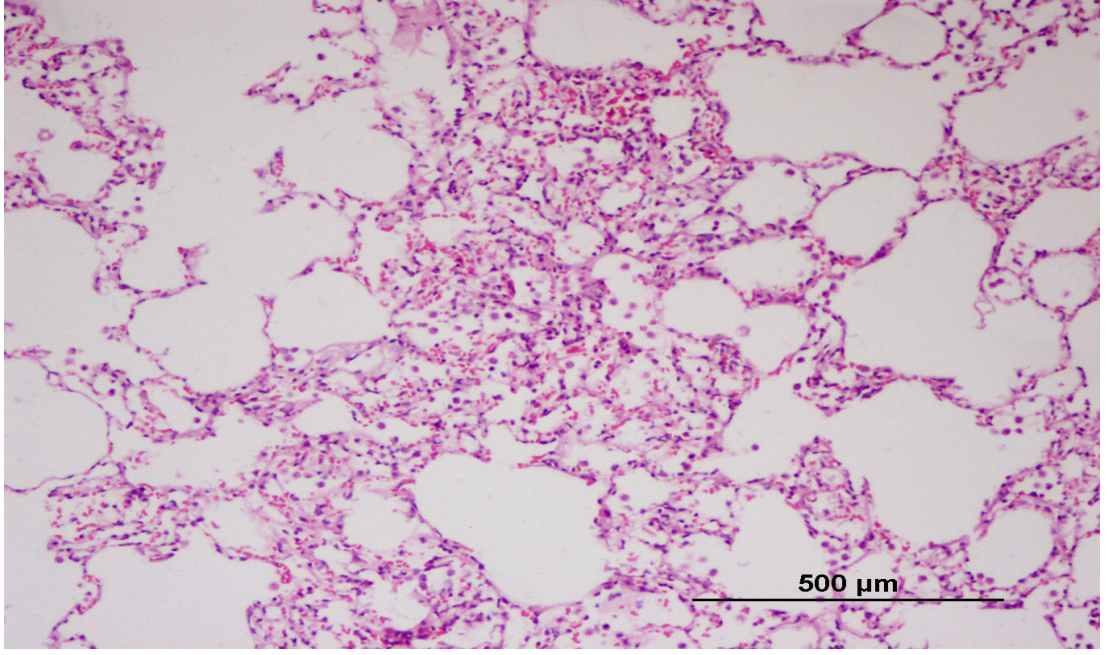
a,b,c,d Her bir satırdaki farklı harfler gruplar arasında farklılık olduğunu göstermektedir.



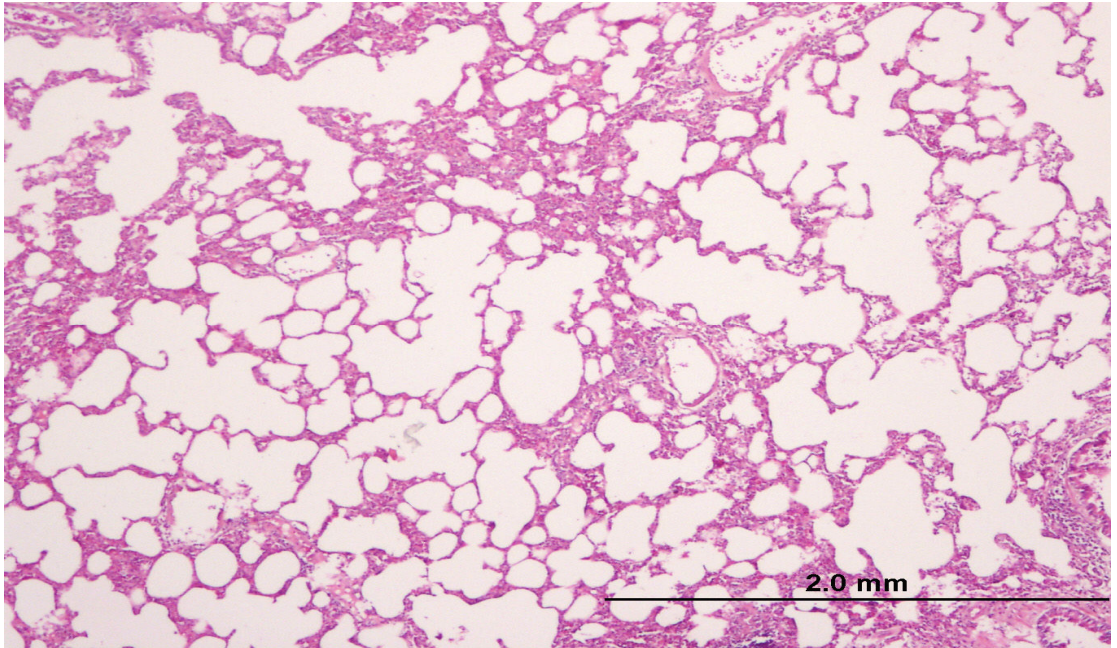
Resim 7. Skor 0 (Değişiklik yok)



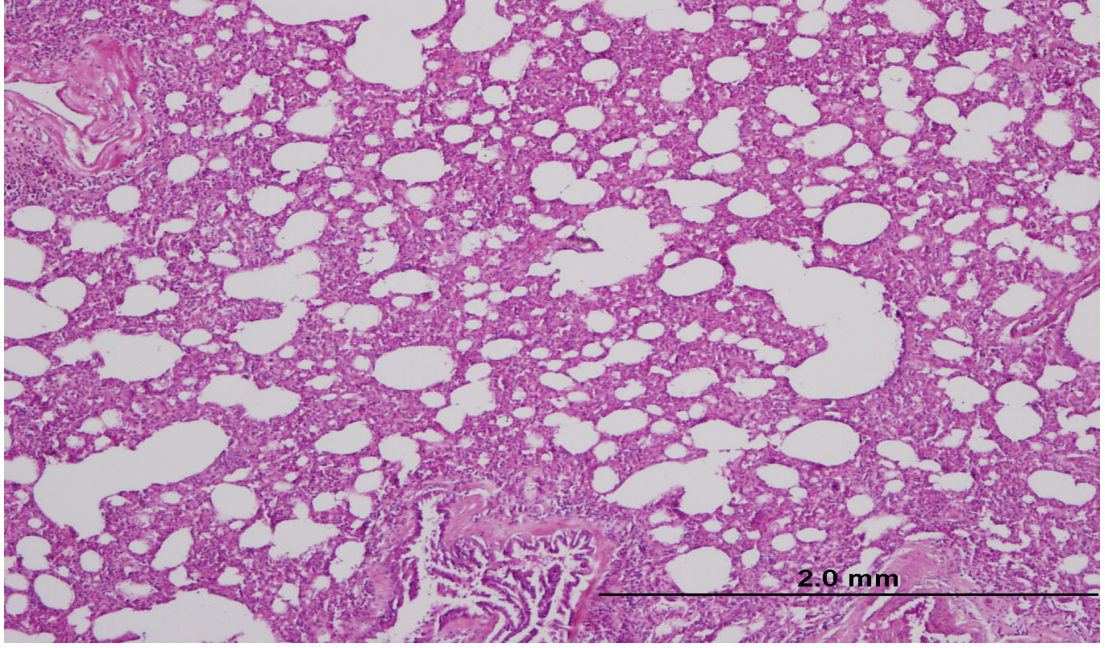
Resim 8. Skor 1 (Fokal, hafif değişiklikler)



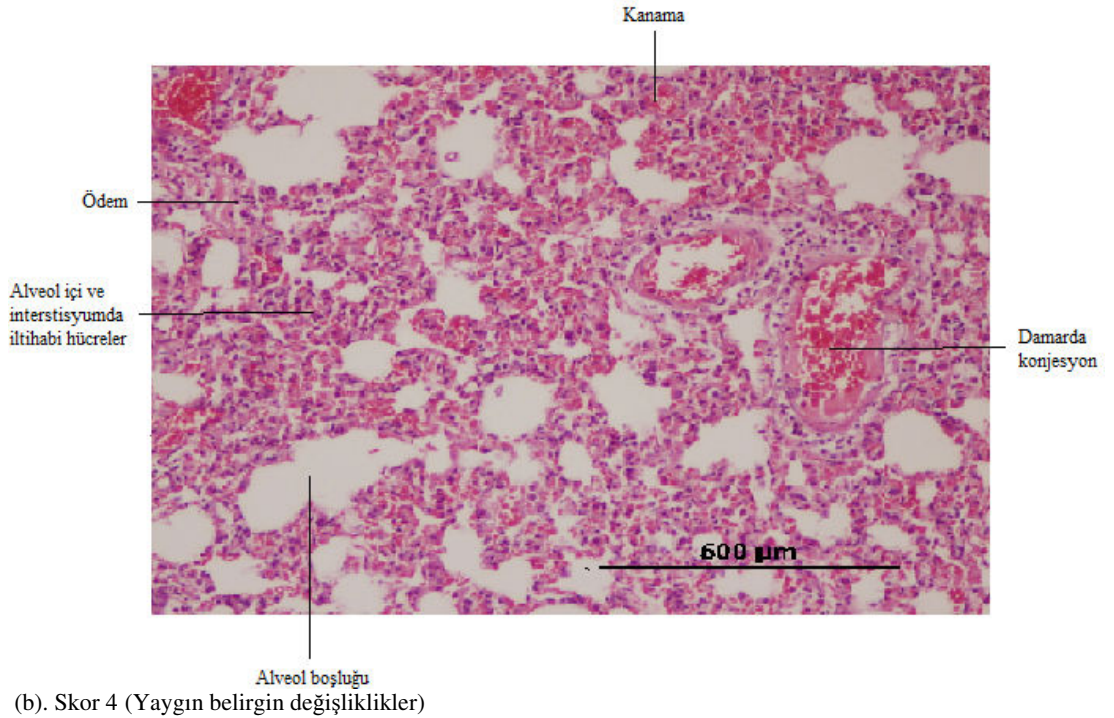
Resim 9. Skor 2 (Multifokal orta dereceli değişiklikler)



Resim 10. Skor 3 (Multifokal belirgin değişiklikler)



Resim 11 (a). Skor 4 (Yaygın belirgin değişlikler)



(b). Skor 4 (Yaygın belirgin değişlikler)

IV. TARTIŞMA

Akut ekstremitte iskemisi, aort cerrahisi, periferik vasküler cerrahi, ekstremitelerin reimplantasyonu, crush yaralanma, periferik vasküler yaralanmalar ya da akut arteriyel tıkanıklıklar sırasında karşılaşılan bir durumdur. Ekstremitte reperfüzyonu tam olarak sağlansa bile reperfüzyon sonrasında ekstremitte kaybı, akut böbrek ve solunum yetmezliği, kalp, bağırsak, beyin, dalak gibi dokularda fonksiyon bozuklukları görülebilir (124).

İ/R süreci sonucunda doğrudan hedef organların yanı sıra başta akciğerler olmak üzere uzak organlarda da önemli ölçüde patolojik değişikliklerin olduğu çeşitli çalışmalarda gösterilmiştir (60,125,126). Akciğer hasarı bazı olgularda ameliyat sonrası dönemde uzamış ventilatör ve inotropik destek gereksinimine neden olabilmektedir (127). Akciğerdeki bu değişikliklerin ARDS'li hastalarda görülenlere benzer olduğu belirtilmiş ve ALI (Akut Akciğer Hasarı) kapsamında değerlendirilmiştir (8).

İ/R sonrası uzak organ olarak akciğerlerin diğer organlara göre neden daha fazla etkilendiği tam olarak açık olmamakla birlikte, reperfüze dokuda oluşan humoral faktörlerin lökositleri aktive ettiği ve aktive lökositlerin akciğer kapillerinde kümelenerek vasküler endotel hücrelerine yapıştığı ve degranülasyon sonrasında artan ROS ve proteazların akciğer endotel hasarına ve buna bağlı olarak artmış akciğer kapiller permeabiliteye sebep olduğu kabul edilmektedir (125,128,129). Artan ROS ile birlikte, plazmada bulunan proenflamatuvar ajanlardan kompleman (özellikle C3a, C5a ve C5b-9), selektinler, sitokinler (IL-6 ve 8), PAF, TxA₂, LTB₄ akciğerdeki hasarı daha da arttırırlar (130-132). Akciğerde bulunan makrofaj ve mast hücreleri gibi enflamatuvar hücrelerin ürettikleri enflamatuvar mediatörlerin ve yine mast hücrelerinden salınan histamin ve serotoninin akciğerdeki reperfüzyon hasarını daha da arttırdığı gösterilmiştir (133,134).

XDH ve XO enzimlerinin en yüksek düzeyde aktivite gösterdikleri dokular karaciğer ve bağırsaklardır (135). Karaciğer vücuttaki en büyük mononükleer fagosit (MNF) sistemi bulundurur. Bu yüzden iskemik dokunun reperfüzyonu ve dokuyu sulayan kanın transhepatik geçişi sonrasında bu MNF sistem aktive olmakta ve sitokin salınımı artmaktadır (136). İskemik kalan dokularda XO aktivasyonu sonucunda oluşan ROS ve reperfüzyonla bu ROS'un özellikle hepatoenterik yolla sistemik dolaşıma yayılmalarıyla beraber reperfüze olan dokulardaki PMNL ve makrofaj aktivasyonu neticesinde bu PMNL'ler yoğunlukla akciğerde birikmektedir (137-139).

Akciğerlerdeki İ/R hasarı sonrasında gelişen permeabilite artışını göstermeye yönelik yapılan bir çalışmada Indium ile işaretlenmiş transferinin transvasküler transport hızı saptanmış ve akciğer alveola-kapiller permeabilite artışının göstergesi olarak 'pulmonary leak index' ortaya konulmuştur. Aortik cerrahi sonrası akciğerde mikrovasküler permeabilitenin 3. saatte artıp postoperatif 24. saatte normale döndüğü saptanmıştır (140-42).

Günümüzde yukarıda bahsedilen mekanizmalarla oluşan İ/R sonrasında ortaya çıkan serbest oksijen radikallerinin akciğerler üzerine olan olumsuz etkilerini ortadan kaldırmak için SOD, allopürinol, CAT, mannitol, vitamin C, pravastatin, α - tokoferol, L-karnitin, pentoksifilin gibi çeşitli maddelerin etkinlikleri deneysel çalışmalarda araştırılmış ve çeşitli derecelerde etkileri gösterilmiştir. Bu antioksidan maddeler ya akciğer mikrovasküler permeabilite artışını ve PMNL akümülyasyonunu önleyerek ya da antioksidan sistemi aktive etmek suretiyle etki göstermektedirler (143-146).

Likopenin antioksidan etkinliği epidemiyolojik ve kısıtlı deneysel çalışmalarda gösterilmiştir ve literatürde İ/R sonrasında oluşan uzak organ hasarına etkisini araştıran herhangi bir çalışma mevcut değildir.

Bizim yapmış olduğumuz çalışmamızda bilateral alt ekstremitte İ/R sonrası akciğerlerde oluşan uzak organ hasarına likopenin koruyucu etkisinin olup olmadığını araştırdık.

İ/R hasarının akciğerlere olan etkilerinin saptanması ve buna yönelik koruyucu tedavi yöntemlerinin geliştirilmesi amacıyla günümüze kadar yapılmış bu çalışmalarda alt ekstremitelerdeki iskemi modelleri şu şekillerde oluşturulmuştur (147-150);

1. Dışarıdan ekstremiteye turnike uygulaması
2. Bilateral inguinal bölgeden femoral arterin eksplorasyonu ve oklüzyonu
3. İntraabdominal olarak abdominal aortun distal segmentinin oklüzyonu
4. Abdominal aortanın sol renal arter altından oklüzyonu

Bizde çalışmamızda oklüzyon seviyesini mümkün olduğu kadar proksimal segmentten, distale doğru gidildikçe oluşabilecek kollateral akımlar nedeniyle iskemi modelinin bozulmasını engellemeyi amaçlayarak sol renal arterin hemen altından abdominal aortayı tamamen oklüde ederek iskemi oluşturduk.

İskemiye karşı her dokunun dayanıklılığı farklıdır. Bu yüzden İ/R ve bunun dokular üzerindeki olumsuz etkilerinin araştırıldığı çalışmalarda iskemi süreleri dikkate alınmalıdır. Literatürde İ/R sonrasında oluşan akciğer hasarına yönelik çalışmalarda iskemi süresi en kısa 30 dakika ve reperfüzyon süresinde en kısa 120 dakika olacak şekilde uygulanmıştır. Bizde çalışmamızı 45 dakika iskemi süresi ve 120 dakika reperfüzyon süresi olacak şekilde gerçekleştirdik.

Likopenin antiinflamatuvar, antikanserojen, antiaterosklerotik etkilerinin olduğu epidemiyolojik ve deneysel çalışmalarla ortaya konmuştur. Bu amaçla yapılmış çalışmalarda antioksidan etkinliğini göstermek amacıyla vücutta bulunan endojen antioksidan enzim düzeylerine etkisi, lipid peroksidasyonuna etkisi ve doku düzeyinde hasar oluşumunu azaltıcı etkilerine bakılarak etkinliği ortaya konulmuştur (92,97,99,100). Bizde çalışmamızda likopenin antioksidan etkinliğini

MDA, SOD, TNF- α , GSH-Px parametrelerini ve akciğer dokusunun histopatolojik olarak değerlendirmesini yaparak saptamayı amaçladık.

Literatürde likopenin antiinflamatuvar ve antioksidan etkinliğini araştıran çalışmaları 3 grupta altında toplayacak olursak;

1.Toksik moleküllerin dokularda oluşturduğu oksidatif hasarı azaltıp azaltmadığı araştırılan deneysel çalışmaların olduğu grup. Bu alışmalar;

Karahan ve ark. tarafından ratlarda cisplatin ve gentamisinin kan ile karaciğerde oluşturdukları oksidatif stres üzerine likopenin etkisini araştırılmış. Deneklere 5 gün süreyle 4mg/kg/gün likopen verilmiş. Çalışma sonucunda doku ve kanda MDA ve GSH düzeyleri bakılmış. Bu çalışmada likopenin, cisplatinin oluşturduğu oksidatif stresi azaltıcı etkisi olduğu belirtilmiştir (151).

Kurt ve ark. ratlarda karbon tetra klorürün (CCL4) oluşturduğu oksidatif hasarda likopenin bu hasarı azaltıcı etkisinin olup olmadığı dokuda MDA, CAT, GSH-Px seviyelerine bakılarak araştırılmış ve likopenin olumlu etkilerinin olduğu belirtilmiştir (152).

2.Epidemiyolojik çalışmalarla likopenin antioksidan etkinliklerinin araştırıldığı çalışmaların bulunduğu grup. Bu çalışmalarda likopenin oral alımı sonrasında lipid peroksidasyon seviyelerindeki değişiklikler, antioksidan enzim düzeylerindeki değişiklikler araştırılmış ve likopenin lipid peroksidasyonunda azalma ve antioksidan enzim düzeylerinde artış oluşturduğu yönünde sonuçlar belirtilmiştir (92,153). Bu grup çalışmalar özellikle kronik enflamatuvar hastalıkların etyolojisinde anahtar rol oynayan enflamatuvar ve oksidatif sürecin üzerine likopenin etkisi araştırılarak yapılmış olan çalışmalardır (89,102-114).

3.Deneysel olarak direk iskemi oluşturulmuş dokularda İ/R hasarına likopenin etkisini araştıran çalışmaların olduğu grup. Bu alışmalar;

Bignotto ve ark. ratların karaciğerinde İ/R sonrasında oluşan hasara likopenin etkisinin olup olmadığı araştırılmış. Burada hasar belirteci olarak karaciğer enzimleri ve lipid peroksidasyon belirteci olan MDA düzeyleri değerlendirilmiş. Likopen alan grupta lipid peroksidasyonunun daha az olduğu MDA düzeylerindeki düşüklük saptanarak belirtilmiştir. Sonuçta likopenin karaciğer İ/R hasarına olumlu etkisinin olduğu vurgulanmıştır. (154).

Bansal ve ark. miyokardiyal İ/R modeli oluşturarak likopenin antioksidan etkisini araştırmış. Miyokard da doku düzeyinde lipid peroksidasyonu üzerine etkisi değerlendirilmiş. Sonuç olarak likopenin iskemiye maruz kalmış miyokard dokusunda lipid peroksidasyonunu azaltıcı ve miyokardiyal hasarı azaltıcı etkisi olduğu belirtilmektedir (155).

Hsiao ve ark. ratlarda orta serebral arter oklüzyonu sonrasında beyin dokusundaki iskemik infarkt ve sonrasında reperfüzyon hasarına likopenin etkisini araştırmış. Doku düzeyinde lipid peroksidasyonuna bakılarak ve nöronal mikroglia fonksiyonların baskılanma düzeyi bakılarak antienflamatuvar etkinliği belirtilmiştir (156).

Likopenin İ/R sonrasında uzak organlarda oluşan hasarda etkisinin olup olmadığını araştıran herhangi bir çalışma yoktur. İ/R sonrasında en çok etkilenen organ olan akciğerlerin hasarının önlenmesinde ve azaltılmasında likopenin etkisini araştırdığımız bu deneysel çalışmada elde ettiğimiz sonuçlar şöyledir.

1.Eritrositlerde antioksidan enzimlerden GSH-Px ve SOD için yapılan değerlendirmede likopen alan her iki grupta da kontrol grubuna göre anlamlı düzeyde GSH-Px ve SOD değerlerinde artış saptadık. Farklı dozlarda likopen alan iki grup arasında da yüksek dozda likopenin verildiği grubun GSH-Px ve SOD değerleri daha yüksek saptandı.

2.Plazmada bakılan MDA düzeyleri açısından yapılan değerlendirmede kontrol grubuna göre likopen alan gruplarda plazma MDA düzeylerinde anlamlı

derecede düşüklük saptandı. Farklı dozda alınan likopenin oluşturduğu bu iki grup arasında istatistiksel olarak anlamlı fark saptanmadı.

TNF- α düzeyleri likopen alan her iki grupta kontrol grubuna göre anlamlı olarak farklı bulundu. Farklı dozda alınan likopenin oluşturduğu bu iki grup arasında istatistiksel olarak anlamlı fark saptanmadı.

3.Doku düzeyinde MDA değerleri, likopen alan her iki grupta kontrol grubuna göre anlamlı olarak düşük saptandı ve likopenle MDA düzeyindeki azalma doz ile ilişkili bulundu.

TNF- α değerleri, likopen alan her iki grupta kontrol grubuna göre anlamlı olarak düşük saptandı ve likopenle TNF- α düzeyindeki azalma doz ile ilişkili bulundu.

GSH-Px değerleri, likopen alan her iki grupta kontrol grubuna göre anlamlı olarak yüksek saptandı ancak farklı dozda alınan likopenin oluşturduğu bu iki grup arasında farklılık olmasına rağmen bu fark istatistiksel olarak anlamlı bulunmadı.

SOD değerleri likopen alan her iki grup ve kontrol grubu arasında anlamlı farklılık mevcuttu. Farklı dozda alınan likopenin oluşturduğu bu iki grup arasında istatistiksel olarak anlamlı fark mevcuttu.

4.BAL sıvısında TNF- α düzeyleri düşük doz ve yüksek doz likopen alan grupta İ/R grubuna göre farklılık gösterdiği saptandı. Ayrıca düşük ve yüksek doz grupları arasında da doz bağımlı olarak TNF- α düzeylerinde farklılık vardı.

MDA düzeyleri, likopen alan gruplarda kontrol grubuna göre anlamlı farklılık mevcuttu ve bu farklılık lipid peroksidasyonunun azaldığı yönündeydi. Ancak likopen alan gruplar arasında doza bağımlı anlamlı farklılık saptanmadı.

GSH-Px düzeyleri, sadece yüksek doz alan grupta diğer gruplardan farklılık oluşturacak şekilde bir artma mevcuttu.

SOD düzeylerinde anlamlı bir farklılık gruplar arasında saptanılmadı.

Akciğerlerdeki patolojik değişikliklerin derecesini ifade edebilmek için kullanılan semikantitatif değerlendirmede hesaplanan hasar-skor puanında en düşük değer sham grubunda olduğu görüldü. Bu grubun hasar skor-puanı ortalaması 0,57 olarak bulundu. İskemi-reperfüzyon grubunda (kontrol) hasar-skor puanı ortalaması 3,5, düşük doz likopen alan grupta 2,4 ve yüksek doz likopen alan grupta ise 1,4 olarak hesaplandı.

Kontrol grubu ile düşük doz ve yüksek doz likopen alan grupların ortalama hasar- skor puanları karşılaştırıldıklarında aralarında istatistiksel olarak anlamlı fark saptandı ($p<0.05$). Bu durum likopenin akciğer İ/R hasarının önlenmesinde etkin olduğunu göstermiştir.

V. SONUÇ

Bu çalışmada İ/R sonrasında mortalite ve morbiditeyi ileri derecede etkileyen akciğer hasarının önlenmesinde bir antioksidan olarak likopenin yararlı olduğunu saptadık. Araştırmamızın -bir ilk olması nedeniyle- yeni çalışmalarla desteklenmesi gerekmektedir. Bu çalışmanın İ/R konulu araştırmalara yol gösterici olabileceği kanısındayız.

VI. ÖZET

AMAÇ: Özellikle torakoabdominal aort cerrahisi esnasında meydana gelen İ/R sürecinde uzak organ konumundaki akciğerlerde oluşan hasarın önlenmesi ve azaltılmasında bir antioksidan olan likopenin etkisini deneysel rat modelinde araştırmayı amaçladık.

GEREÇ ve YÖNTEM: Çalışmada 28 adet Sprague Dawley cinsi erkek, sağlıklı rat kullanıldı. Denekler her grupta 7 adet olacak şekilde 4 gruba ayrıldı. Denekler 10 gün süreyle beslenme programına alındı. Grup 1; 10 gün boyunca likopen içeriği yüksek olan gıdalar dışındaki beslenme ürünleriyle oral yoldan beslenen grup. Grup 2; 10 gün boyunca likopen içeriği yüksek olduğu gıdalar dışında oral yolla beslenen ve İ/R modeli oluşturulan grup. Grup 3; 10 gün boyunca grup 1 ve 2 deki oral alımlarına ek olarak orogastrik lavaj ile 1 mg/kg/gün likopen (Good'n Natural 10 mg kapsül USA) ile beslenen ve İ/R modeli oluşturulan grup. Grup 4; 10 gün boyunca grup 1 ve 2 deki oral alımlarına ek olarak orogastrik lavaj ile 40 mg/kg/gün likopen ile beslenen ve İ/R modeli oluşturulan grup. Beslenme süreci sonrasında grup 1' deki ratlara uygun anestezi altında karın eksplorasyonu yapıldı ve diğer gruplara uygulanan 45 dakikalık iskemi ve 120 dakikalık reperfüzyon süresi kadar beklenildikten sonra kan ve akciğer doku örnekleri alınarak sakrifiye edildi. Grup 2, 3, 4' deki ratlar uygun anestezi altında karın eksplorasyonu yapıldıktan sonra sol renal arter altından abdominal aortaya kros klemp konularak aortik total oklüzyon sağlandı. 45 dakikalık iskemik süresinden sonra klemp alınarak 120 dakika süreyle reperfüzyon sağlandı. Bu süre sonunda kan ve akciğer doku örnekleri alınarak denekler sakrifiye edildi. Alınan kan ve doku örneklerinden Eritrositlerde SOD, GSH-Px, plazmada TNF- α , MDA, akciğer dokusunda MDA, TNF- α , GSH-Px, SOD, BAL sıvısında MDA, TNF- α , GSH-Px, SOD parametrelerine bakıldı.

BULGULAR: Eritrositlerde bakılan parametrelerden SOD için gruptaki ortalama ve standart sapma değerleri sırasıyla; sham (1763,71 \pm 332,08), kontrol (3232,42 \pm 1514,41), düşük doz (12008,86 \pm 2868,14), yüksek doz

(20382,71±6839,39) (p<0,05) olarak saptandı. Likopen verilen her iki grupta kontrol grubuna göre SOD seviyelerinde artma saptandı. SOD'daki bu artışın likopen dozu ile de ilişkili olduğu görüldü.

GSH-Px için değerler ise sham (215,71±58,15), kontrol (349,14±102,40), düşük doz (1529,14±421,81), yüksek doz (2420,14±648,97) (p<0,05) olarak saptandı. Likopen verilen her iki grupta kontrol grubuna göre GSH-Px seviyelerinde artma saptandı. GSH-Px'deki bu artışın likopen dozu ile arttığı saptandı.

Plazmada bakılan parametrelerden TNF- α için gruptaki ortalama ve standart sapma değerleri sırasıyla; sham (18,71±15,65), kontrol (68,46±8,48), düşük doz (25,77±7,03), yüksek doz (19,71±6,83) (p<0,05), olarak saptandı. Likopen alan her iki grupta kontrol grubuna göre TNF- α değerlerinde azalma saptandı ancak bu azalma verilen farklı likopen dozlarıyla ilişkili bulunmadı.

MDA için değerler ise sham (0,43±0,17), kontrol (2,04±0,57), düşük doz (0,95±0,36), yüksek doz (0,88±0,19) (p<0,05) olarak saptandı. Likopen alan her iki grupta kontrol grubuna göre MDA değerlerinde azalma saptandı ancak bu azalma verilen farklı likopen dozlarıyla ilişkili bulunmadı.

Akciğer dokusunda bakılan parametrelerden TNF- α için gruptaki ortalama ve standart sapma değerleri sırasıyla; sham (0,52±0,50), kontrol (2,75±0,67), düşük doz (1,61±0,27), yüksek doz (1,26±0,27) (p<0,05) olarak saptandı. Likopen verilen her iki grupta kontrol grubuna göre TNF- α seviyelerinde düşme saptandı. TNF- α daki bu azalma likopen dozu ile ilişkili olduğu saptandı.

MDA için sham (0,018±0,01), kontrol (1,02±0,30), düşük doz (0,87±0,32), yüksek doz (0,06±0,04) (p<0,05) olarak saptandı. Likopen verilen her iki grupta kontrol grubuna göre MDA seviyelerinde azalma saptandı. MDA daki bu azalmanın likopen dozu ile ilişkili olduğu görüldü.

GSH-Px için sham (19,83±7,35), kontrol (6,25±3,35), düşük doz (35,24±17,22), yüksek doz (105,26±22,70) (p<0,05) olarak saptandı. Likopen alan her iki grupta kontrol grubuna göre GSH-Px değerlerinde artma saptandı ancak bu artış verilen farklı likopen dozlarıyla ilişkili bulunmadı.

SOD için sham (12,29±6,51), kontrol (10,02±4,54), düşük doz (30,19±14,98), yüksek doz (71,77±16,77) (p<0,05) olarak saptandı. Likopen verilen her iki grupta kontrol grubuna göre SOD seviyelerinde artma saptandı. SOD daki bu artışın likopen dozu ile ilişkili olduğu saptandı.

BAL sıvısında bakılan parametrelerden TNF- α için gruptaki ortalama ve standart sapma değerleri sırasıyla; sham (12,63±8,45), kontrol (94,84±19,55), düşük doz (38,59±10,40), yüksek doz (20,17±5,25) (p<0,05) olarak saptandı. Likopen verilen her iki grupta kontrol grubuna göre TNF- α seviyelerinde azalma saptandı. TNF- α ' daki bu azalmanın likopen dozu ile ilişkili olduğu saptandı.

MDA için sham (0,079±0,09), kontrol (0,38±0,19), düşük doz (0,08±0,078), yüksek doz (0,12±0,20) (p<0,05) olarak saptandı. Likopen alan her iki grupta kontrol grubuna göre MDA değerlerinde azalma saptandı ancak bu azalma verilen farklı likopen dozlarıyla ilişkili bulunmadı.

GSH-Px için sham (218±23,90), kontrol (191,57±7,54), düşük doz (186,28±40,20), yüksek doz (366,71±93,86) (p<0,05) olarak saptandı. Likopenin düşük dozda verildiği grupta kontrol grubuna göre herhangi anlamlı farklılık saptanmadı ancak yüksek doz likopen alan grupta kontrol grubuna göre GSH-Px değerleri anlamlı olarak yüksek bulundu.

SOD için sham (266,28±54,65), kontrol (266,85±39,15), düşük doz (272,71±50,27), yüksek doz (270,28±52,45) (p<0,05) olarak saptandı. Likopen alan her iki grupta kontrol grubuna göre SOD değerlerinde farklılık saptanmadı.

Akciğerlerdeki patolojik değişikliklerin derecesini ifade edebilmek için kullanılan semikantitatif değerlendirmede hesaplanan hasar skor puanında en düşük değerin sham grubunda olduğu görüldü. Bu grubun hasar skor puanı ortalaması 0,57 olarak bulundu. İ/R grubunda (kontrol) hasar skor puanı ortalaması 3,5 düşük doz likopen alan grupta 2,4 ve yüksek doz likopen alan grupta ise 1,4 olarak hesaplandı.

SONUÇ: İ/R sonrası gelişen akciğer hasarı özellikle vasküler cerrahi kliniklerinde mortalite ve morbiditeyi arttıran önemli bir faktördür. Yapmış olduğumuz çalışmamızda kan ve akciğer dokusu incelemelerinde likopenin antioksidan enzim düzeylerinde artış, enflamatuvar olay ve lipid peroksidasyonunda gerilemeye neden olduğunu saptadık. Literatürde farklı bir örneğine rastlamadığımız çalışmamızın yeni çalışmalara klavuz olacağı ve yapılacak yeni çalışmalarla klinik uygulamalarda İ/R sonrasında akciğer hasarının önlenmesinde yer bulacağı kanısındayız.

VII. SUMMARY

PURPOSE: The aim of this study was to determine whether I/R could have an important role on lung injury and to determine whether lycopene could have a preventive effect on this injury in the rat model of abdominal aorta cross clamping.

MATERIAL and METHOD: Sprague Dawley rats (n=28) were randomly assigned to 4 groups as sham (grup 1), control (grup 2), low dose of lycopene (grup 3) and high dose lycopene (grup 4). Grup 1; All the rats in this group were fed orally with normal pellet mouse food for 10 days. Group 2; All the rats in this group were fed orally with normal pellet mouse food for 10 days, Grup 3; The rats in the third group were administered 1mg/kg/day of lycopene (Good'n Natural 10 mg capsule USA) with orogastric lavage. Group 4; The rats in the fourth group were administered 40 mg/kg/day of lycopene (Good'n Natural 10 mg capsule USA) with orogastric lavage. After the nutrition program for a period of 10 days in group 1 with appropriate anesthesia only the abdominal exploration has been made. Than blood and lung tissue samples were taken with sacrifice of the rats. With appropriate anesthesia rats in groups 2, 3, and 4 the abdominal exploration has been made and than below the left renal artery the abdominal aortic total occlusion was achieved with cross clamp. After 45 minutes of clamping time 120 minutes reperfusion provided by declamping with the aorta. Than blood and lung tissue samples were taken with sacrifice of the rats.

We measured the levels of SOD and GSH-Px in red blood cells, TNF- α and MDA in plazma, MDA, TNF- α , GSH-Px, SOD in lung tissue, MDA, GSH-Px, TNF- α , SOD in BAL fluid.

RESULTS: Red blood cell SOD, the average and standard deviation values for the groups, respectively; sham (1763,71 \pm 332,08), control (3232,42 \pm 1514,41), low dose lycopene (12008,86 \pm 2868,14) , high dose lycopene (20382,71 \pm 6839,39) (p<0,05) olarak as revealed. Statistically significant high

SOD levels in group 3 and 4. In control group statistically low SOD levels. The levels of SOD between group 3 and 4 were statistically significant.

GSH-Px, the average and standard deviation values for the groups, respectively; sham (215,71±58,15), control (349,14±102,40), low dose lycopene (1529,14±421,81), high dose lycopene (2420,14±648,97) (p<0,05) as revealed. Statistically significant high GSH-Px levels in group 3 and 4. In control group statistically low GSH-Px levels. The levels of GSH-Px between group 3 and 4 were statistically significant.

Plasma TNF- α , the average and standard deviation values for the groups, respectively; sham (18.71 \pm 15.65), control (68.46 \pm 8.48), low dose (25.77 \pm 7.03), high dose (19.71 \pm 6.83) (p <0.05), as revealed. Statistically significant low TNF- α levels in group 3 and 4. In control group statistically high TNF- α levels. The levels of TNF- α between group 3 and 4 were not statistically significant.

Plasma MDA the average and standard deviation values for the groups, respectively; sham (0,43±0,17), control (2,04±0,57), low dose lycopene (0,95±0,36), high dose lycopene (0,88±0,19) (p<0,05) as revealed. Statistically significant low MDA levels in group 3 and 4. In control group statistically high MDA levels. The levels of MDA between group 3 and 4 were not statistically significant.

Lung tissue TNF- α the average and standard deviation values for the groups, respectively; sham (0,52±0,50), control (2,75±0,67), low dose lycopene (1,61±0,27), high dose lycopene (1,26±0,27) (p<0,05) as revealed. Statistically significant low TNF- α levels in group 3 and 4. This decrease was detected associated with the different doses of lycopene.

MDA the average and standard deviation values for the groups, respectively; sham (0,018±0,01), control (1,02±0,30), low dose lycopene (0,87±0,32), high dose lycopene (0,06±0,04) (p<0,05) as revealed. Statistically significant low

MDA levels in group 3 and 4. This decrease was detected associated with the different doses of lycopene.

GSH-Px, the average and standard deviation values for the groups, respectively; sham (19,83±7,35), control (6,25±3,35), low dose lycopene (35,24±17,22), high dose lycopene (105,26±22,70) (p<0,05) as revealed. Statistically significant high GSH-Px levels in group 3 and 4. In control group statistically low GSH-Px levels. The levels of GSH-Px between group 3 and 4 were statistically non significant.

SOD the average and standard deviation values for the groups, respectively; sham (12,29±6,51), control (10,02±4,54), low dose lycopene(30,19±14,98), high dose lycopene (71,77±16,77) (p<0,05) as revealed. Statistically significant high SOD levels in group 3 and 4. In control group statistically low SOD levels. The levels of SOD between group 3 and 4 were statistically significant.

BAL fluid TNF- α the average and standard deviation values for the groups, respectively; sham (12,63±8,45), control (94,84±19,55), low dose lycopene (38,59±10,40), high dose lycopene (20,17±5,25) (p<0,05) as revealed. Statistically significant low TNF- α levels in group 3 and 4. This decrease was associated with the different doses of lycopene.

MDA, the average and standard deviation values for the groups, respectively MDA için sham (0,079±0,09), control (0,38±0,19), low dose lycopene (0,08±0,078), high dose lycopene (0,12±0,20) (p<0,05) as revealed. Statistically significant low MDA levels in group 3 and 4. This decrease was not associated with the different doses of lycopene.

GSH-Px, the average and standard deviation values for the groups, respectively; sham (218±23,90), control (191,57±7,54), low dose lycopene (186,28±40,20), high dose lycopene (366,71±93,86) (p<0,05) as revealed. Statistically significant high GSH-Px levels in group 4. In control group

statistically low GSH-Px levels. The levels of GSH-Px between group 3 and 4 were statistically significant.

SOD the average and standard deviation values for the groups, respectively; sham (266,28±54,65), control (266,85±39,15), low dose lycopene (272,71±50,27), high dose lycopene (270,28±52,45) (p<0,05) as revealed. Statistically no significant difference between groups 2, 3 and 4.

Pathological changes in the lungs are used to express the degree calculated to assess the damage semiquantitative the lowest score for score as seen in the sham group. This group's average score of the damage score was 0.57. Ischemia-reperfusion group (control) the average damage score of 3.5 points and 2.4 in the low dose group, high dose of lycopene in the high dose group was calculated as 1.4.

CONCLUSION: Lung injury occurs after the surgery involving the temporary aortic cross clamping with subsequent ischemia/reperfusion of the lower extremities is an important cause of high mortality and morbidity rate in vascular surgery. The results of the study indicate that lycopene was decreased the lipid peroxidation rate and inflammatory process in serum and pulmonary tissue induced by I/R. Our study is a new and a different research by lycopene on I/R injury about the lungs. It would also be a guide to new studies.

VIII. KAYNAKLAR

1. Lehninger AL. Generation of ATP in anaerobic cells. In: Bioenergetics, ed 2. Menlo Park, Calif: Wa Benjamin, 1971: 53-71.
2. Krause GS, White BC, Aust SD, Nayini NR, Kumar K. Brain cell death following ischemia and reperfusion: a proposed biochemical sequence. Crit Care Med. 1988; 16 (7): 714-26
3. Cook HW, Lands WE. Mechanism for suppression of cellular biosynthesis of prostaglandins. Nature 1976; 15 (5): 630-2
4. Kubler W, Katz AM. Mechanism of early "pump" failure of the ischemic heart: possible role of adenosine triphosphate depletion and inorganic phosphate accumulation. Am J Cardiol. 1977; 40 (3): 467-71
5. Siesjo BK. Cell damage in the brain: a speculative synthesis. Acta Psychiatr Scand Supplement 1984; 313: 57-9
6. Hamberg M, Svensson J, Samuelsson Thromboxanes: a new group of biologically active compounds derived from prostaglandin endoperoxides. Proc Natl Acad Sci U S A. 1975; 72 (8): 2994-8
7. Kuzu MA, Köksoy C, Kale İT, Tanık A, Terzi C, Elhan AH. Reperfusion injury delays healing of intestinal anastomosis in a rat. Am J of Surgery 1998; 176: 348-351
8. Grace PA. Ischaemia-reperfusion injury. British J of Surgery 1994; 81: 637-647
9. Zimmerman BJ, Granger DN. Reperfusion injury. Surgical Clinics of North America 1992; 72: 65-83
10. Guan W, Osanai T, Kamada T, Hanada H, Ishizaka H, Onodera H, et al. Effect of allopurinol pretreatment on free radical generation after primary coronary angioplasty for acute myocardial infarction. J Cardiovasc Pharmacol 2003; 41: 699-705.
11. Tsujita K, Shimomura H, Kaikita K, et al. Long-term efficacy of edaravone in patients with acute myocardial infarction. Circ J 2006; 70: 832-837.

12. Zweier JL, Talukder MA. The role of oxidants and free radicals in reperfusion injury. *Cardiovasc Res* 2006; 70: 181-90
13. Semenza GL. Cellular and molecular dissection of reperfusion injury: ROS within and without. *Circ Res*
14. Beckman JS., Chen J., Ischiropoulos H., Crow JP. Oxidative chemistry of peroxynitrite. *Meth Enzymol* 1994; 233: 229-40
15. Cadenas E. Biochemistry of oxygen toxicity. *Ann Rev Biochem* 1989; 58: 79–100.
16. Valko M, Izakovic M, Mazur M, Rhodes CJ, Telser J. Role of oxygen radicals in DNA damage and cancer incidence. *Mol Cell Biochem* 2004; 266: 37–56
17. Poli G, Leonarduzzi G, Biasi F, Chiarotto E. Oxidative stress and cell signalling. *Curr Med Chem* 2004; 11: 1163–1182.
18. Halliwell B. Antioxidants in human health and disease, *Ann Rev Nutr* 1996;16: 33–50.
19. Halliwell B, Gutteridge JMC. *Free Radicals in Biology and Medicine*, 3rd ed, Oxford University Press, 1999.
20. Carden D.L., Granger D.N. Pathophysiology of ischemia-reperfusion injury. *J Pathol* 2000: 255-66.
21. Desideri A, Falconi M. Prokaryotic Cu, Zn superoxidies dismutases. *Biochem Soc Trans* 2003; 31: 1322–1325.
22. Stohs SJ, Bagchi D. Oxidative mechanisms in the toxicity of metal-ions. *Free Rad Biol Med* 1995; 18: 321–336.
23. Leonard SS, Harris GK, Shi XL. Metal-induced oxidative stress and signal transduction, *Free Rad Biol Med* 2004; 37: 1921–1942
24. Liochev SI, Fridovich I. The Haber-Weiss cycle 70 years later: an alternative view, *Redox report* 2002; 7: 55–57.
25. Carr AC, McCall MR, Frei B. Oxidation of LDL by myeloperoxidase and reactive nitrogen species—reaction pathways and antioxidant protection. *Arterioscl. Thromb Vasc Biol* 2000; 20: 1716–1723.

26. Esterbauer H, Schaur RJ, Zollner H. Chemistry and biochemistry of 4-hydroxynonenal, malonaldehyde and related aldehydes. *Free Rad Biol Med* 1991; 11: 81–128.
27. Pinchuk I, Schnitzer E, Lichtenberg D. Kinetic analysis of copperinduced peroxidation of LDL, *Biochim Biophys Acta- Lipids Lipid Metab* 1998; 1389: 155–172.
28. Nyska A, Kohen R. Oxidation of biological systems: oxidative stress phenomena, antioxidants, redox reactions, and methods for their quantification., *Toxicol Pathol* 2002; 30: 620–650.
29. Girotti AW. Lipid hydroperoxide generation, turnover, and effector action in biological systems. *J Lipid Res* 2000; 39: 1529-1542.
30. Ertan T, Soran A, Kılıç M, Aşlar AK, Koç M, Cengiz Ö. Kan Malondialdehid ve total antioksidan seviyesinin (TAS) önemi. *Cerrahi Tıp Bülteni* (2000); 4: 154-167.
31. Kumar V., Cotran R., Robbins S.L. *Basic Pathology*. 6th edition.2000: P:6-10, 30-36.
32. Huang HY, Helzlsouer KJ, Appel LJ. The effects of vitamin C and vitamin E on oxidative DNA damage: Results from a randomized controlled trial. *Cancer Epidemiology, Biomarkers & Prevention* 2000; 9: 647-652.
33. Marnett LJ. Oxyradicals and DNA damage. *Carcinogenesis* 2000; 3: 361-370
34. Lemasters JJ, Bond JM, Chacon E, Harper IS, Kaplan SH, Ohata H, et al. The pH paradox in ischemia-reperfusion injury to cardiac myocytes. *EXS* 1996; 76: 99-114.
35. Piper HM, Garcia-Dorado D, Ovize M. A fresh look at reperfusion injury. *Cardiovasc Res* 1998; 38: 291-300.
36. Carter MB, Wilson MA, Wead WB, Garrison RN. Platelet-Activating Factor mediates pulmonary macromolecular leak following intestinal ischemia-reperfusion. *Journal of Surgical Research* 1996; 2: 403-408
37. Menown B, Adgey AA. Cardioprotective therapy and sodium-hydrogen exchange inhibition: current concepts and future goals, *J Am Coll Cardiol* 2001; 38: 1651-3.

38. Smith JA. Neutrophils, host defense, and inflammation: a double-edged sword. *J Leukocyte Biol* 1994; 56: 672–686
39. Cohen JJ. Apoptosis. *Immunol Today* 1993; 14: 126–130.
40. Meagher LC, Savill JS, Baker A, et al. Phagocytosis of apoptotic neutrophils does not induce macrophage release of thromboxane B₂. *J Leuko Biol* 1992; 52: 269–274.
41. Lechin AE, Varon J. Akut respiratory distress syndrome: the basics. *J Emerg Med* 1994; 12: 63–68.
42. Weyrich AS, Ma XL, Lefer AM. The role of L-arginine in ameliorating reperfusion injury after myocardial ischemia in the cat. *Circulation* 1992; 86: 279-88.
43. 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.
44. Panes J., Perry M., Granger D.N. Leukocyte endothelial cell adhesion: Avenues for therapeutic intervention. *Br J Pharmacol* 1999;126: 537-550.
45. Weinbroum AA, Hochhauser E, Rudick V, et al. Multiple organ dysfunction after remote circulatory arrest: Common pathway of radical oxygen species. *J Trauma* 1999; 47: 691-8
46. Archer S. Measurement of nitric-oxide in biological models, *FASEB J* 1993;7: 349–360
47. Chiueh CC, Neuroprotective properties of nitric oxide, *Ann NY Acad Sci* 1999; 89: 301–311.
48. Ono H, Osanai T, Ishizaka H, Hanada H, Kamada T, Onodera H, et al. Nicorandil improves cardiac function and clinical outcome in patients with acute myocardial infarction undergoing primary percutaneous coronary intervention: role of inhibitory effect on reactive oxygen species formation. *Am Heart J* 2004; 148: E15-E15.
49. Duebener LF, Sakamoto T, Hatsuoka S, Stamm C, Zurakowski D, Vollmar B, et al. Effects of hematocrit on cerebral microcirculation and tissue oxygenation during deep hypothermic bypass. *Circulation* 2001; 104:260-4.

50. Beckman JS. Rebounding from nitric oxide. *Circ Res* 2001; 89: 295-297.
51. Ishii H, Ichimiya S, Kanashiro M, Amano T, Imai K, Murohara T, et al. Impact of a single intravenous administration of nicorandil before reperfusion in patients with ST-segment-elevation myocardial infarction. *Circulation* 2005; 112: 12-28.
52. Tassiopoulos AK, Carlin RE, Gao Y, Pedoto A, Finck CM, Landas SK, et al. Role of nitric oxide and tumor necrosis factor on lung injury caused by ischemia/reperfusion of the lower extremities. *J Vasc Surg* 1997; 26: 647-56.
53. Groeneveld AB, Raijmakers PG, Rauwerda JA, Hack CE. The inflammatory response to vascular surgery-associated ischaemia and reperfusion in man: effect on postoperative pulmonary function. *Eur J Vasc Endovasc Surg* 1997; 14: 351-9.
54. Baltarli A, Göksin I, Sirin H, Ortaç R, Onem G, Baltarli B, et al. Does Antiinflammatory Therapy Attenuate the Lung Injury Caused by Ischemia/Reperfusion of the Lower Extremities in the Rabbit. *The Internet Journal of Thoracic and Cardiovascular Surgery* 2006; 14: 054-058.
55. Baltarlı A, Önem G, Göksin, Rendeci O, Saçar M, Çolakoğlu N. İskemik preconditioning, sıçanlarda bilateral alt ekstremite iskemi/reperfüzyonuna bağlı gelişen akciğer hasarını artırır. *Türk Göğüs Kalp Damar Cer Derg* 2000; 8: 537-40.
56. Şirin H, Sarıbülbül O, Cerrahoğlu M, Aksoy Ö, Baltarlı A, Saçar M. Alt ekstremite iskemi reperfüzyonunun yol açtığı pulmoner hasarda aprotininin koruyucu etkinliği. *Türk Göğüs Kalp Damar Cer Derg* 2001; 9: 233-7.
57. Berkan Ö, Katrancıoğlu N, Günay İ, Yıldız E. Alt ekstremite iskemi reperfüzyona bağlı gelişen akciğer hasarında askorbik asidin etkisi. *Türk Göğüs Kalp Damar Cer Derg* 2001; 9: 238-41.
58. Tekeli A, Akgün S, Civelek A, Çelbir S, Ak K, Çobanoğlu A. Alt ekstremite iskemi reperfüzyonu sonucunda gelişen akciğer hasarının önlenmesinde farklı bir ajan: FK 506 (Takrolimus). *Türk Göğüs Kalp Damar Cer Derg* 2001; 9: 242-6.
59. Deffebach M, Charan N, Lakshminarayan S, Butler J. The bronchial circulation: small but vital attribute of the lung. *Am Rev Respir Dis* 1987; 135: 463-71.

60. İşbir S, Akgün S, Ak K et al. Akut alt ekstremitte iskemi/reperfüzyon hasarının akciğer serbest oksijen radikalleri üzerine olan etkisi. *Türk Göğüs Kalp Damar Cer Derg* 2000; 8: 632-34.
61. Seekamp A, Mulligan MS, Till GO, Ward PA. Requirements for neutrophil products and L-arginine in ischemiareperfusion injury. *Am J Pathol* 1993; 142: 1217-26.
62. Bless NM, Warner RL, Padgaonkar VA, et al. Roles for C-XC chemokines and C5a in lung injury after hindlimb ischemia-reperfusion. *Am J Physiol* 1999; 276: 57-63.
63. Acer E, Mohan C, Geennaro M, Cupo S. Interleukin-1 and tromboxane release after skeletal muscle ischemia and reperfusion. *Ann Vasc Surg* 1992;.6: 69-73.
64. De Perrot M. At al. *Am J Respir Crit Care Med* 2003; 167: 490-511
65. 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* 2001; 88: 464-468.
66. V Simpson R, Alon R, Kobzik L, Valeri R, Shepro D, Hechtman HB. Neutrophil and Vnonneutrophil-mediated injury in intestinal ischemiareperfusion. *Ann Surg* 1993; 218: 444-454.
67. Mc Cord JM, Fridovich I. Superoxide dismutase an enzymic function for erythrocyte (hemocuprein), *J Biol Chem* 1969; 244: 409-455.
68. Landis GN, Tower J. Superoxide dismutase evolution and life span regulation, *Ech Ageing Dev* 2005; 126: 365-379.
69. Mates JM, Perez-Gomez C, De Castro IN. Antioxidant enzymes and human diseases, *Clin Biochem* 1999;32; 595-603.
70. Cervello I, Lafuente A, Giralt M, Mallol J. Enhanced glutathione Stransferase (GST) activity in pregnant rats treated with benzo(a)preyne. *Placenta* 1992; 13: 273-280.
71. Dragsted LO, Strube M, Larsen JC. Cancer-protective factors in fruits and vegetables: biochemical and biological background. *Pharmacol Toxicol* 1993; 72: 116-135.

72. Ziegler RG. Vegetables, fruits, and carotenoids and the risk of cancer. *Am J Clin Nutr* 1991; 53: 251S–259S.
73. Forman MR, Yao SX, Graubard BI, Qiao YL, McAdams M, Mao BL, Taylor P. The effect of dietary intake of fruits and vegetables on the odds ratio of lung cancer among yunnan tin miners. *Int J Epidemiol* 1992; 21: 437–441.
74. Gaziano JM, Manson JE, Branch LG, Colditz GA, Willett WC, Buring JE. A prospective study of consumption of carotenoids in fruits and vegetables and decreased cardiovascular mortality in the elderly. *Ann Epidemiol* 1995; 5: 255–260.
75. Halliwell B, Gutteridge JM. Role of free radicals and catalytic metal ions in human disease: an overview. *Method Enzymol* 1990; 186: 1–85
76. Stahl W, Sies H. Lycopene: a biologically important carotenoid for humans? *Arch Biochem Biophys* 1996; 336: 1–9.
77. Subhash C, Bose K, Agrawal BK. Effect of lycopene from cooked tomatoes on serum antioxidant enzymes, lipid peroxidation rate, lipid profile and glycated hemoglobin in type II diabetes. *Indian J Nutr Diet* 2006; 43: 153-60.
78. Ford ES, Will JC, Bowman BA, Narayan KM. Diabetes mellitus and serum carotenoids findings from the Third National Health and Nutritional Examination Survey. *Am J Epidemiol* 1999; 149: 168-76
79. Rissanen TH, Voutilainen S, Nyyssonen K, et al. Serum lycopene concentrations and carotid atherosclerosis: the Kuopio Ischaemic Heart Disease Risk Factor Study. *Am J Clin Nutr* 2003; 77: 133-8.
80. Rissanen T, Voutilainen S, Nyyssonen K, Salonen R, Salonen JT. Low plasma lycopene concentration is associated with increased intima-media thickness of the carotid artery wall. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2000; 20: 2677-81.
81. Kohlmeir L, Kark JD, Gomez-Gracia E, Martin BC, Steck SE, Kardinal AFM, Ringstad J, Thamm M, Masaev V, Riemersma R, Martin-Moreno JM, Huttunen JK, Kok FJ. Lycopene and myocardial infarction risk in the EURAMIC study. *Am J Epidemiol* 1997; 146: 618–626.
82. Di Mascio P, Kaiser S, Sies H. Lycopene as the most efficient biological carotenoid singlet oxygen quencher. *Arch Biochem Biophys* 1989; 274: 532-8.

84. Stahl W, Sies H. Uptake of lycopene and its geometrical isomers is greater from heat-processed than from unprocessed tomato juice in humans. *J Nutr* 1992; 122: 2161–2166.
83. Nguyen ML, Schwartz SJ. Lycopene: chemical and biological properties. *Food Tech* 1999; 53: 38–45.
85. Zechmeister L, LeRosen AL, Went FW, Pauling L. Prolycopene, a naturally occurring stereoisomer of lycopene. *Proc Natl Acad Sci USA* 1941; 21: 468–474.
86. Clinton SK, Emenhiser C, Schwartz SJ, Bostwick DG, Williams AW, Moore BJ, Erdman JW. Cis-trans lycopene isomers, carotenoids and retinol in the human prostate. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 1996; 5: 823–833.
87. Zhang L-X, Cooney RV, Bertram JS. Carotenoids enhance gap junctional communication and inhibit lipid peroxidation in C3H/ 10T1/2 cells: relationship to their cancer chemopreventive action. *Carcinogenesis* 1991; 12: 2109–2114.
88. Zhang L-X, Cooney RV, Bertram JS. Carotenoids up-regulate connexin43 gene expression independent of their provitamin A or antioxidant properties. *Cancer Res* 1992; 52: 5707–5712.
89. Levy J, Bosin E, Feldmen B, Giat Y, Miinster A, Danilenko M, Sharoni Y. Lycopene is a more potent inhibitor of human cancer cell proliferation than either a-carotene or b-carotene. *Nutr Cancer* 1995; 24: 257–266.
90. Nagasawa H, Mitamura T, Sakamoto S, Yamamoto K. Effects of lycopene on spontaneous mammary tumour development in SHN virgin mice. *Anticancer Research* 1995; 15: 1173–1178.
91. Kobayashi T, Iijima K, Mitamura T, Toriizuka K, Cyong JC, Nagasawa H. Effects of lycopene, a carotenoid, on intrathymic T cell differentiation and peripheral CD4/CD8 ratio in a high mammary tumor strain of SHN retired mice. *Anti-Cancer Drugs* 1996; 7: 195–198.
92. Bose K S C, Agrawal B. Effect of lycopene from cooked tomatoes on serum antioxidant enzymes, lipid peroxidation rate and lipid profile in coronary heart disease. *Singapore Med J* 2007; 48: 415-20.
93. Lenzi A, Picardo M, Gandini L, et al. Glutathione treatment of dyspermia: effect on lipoperoxidation process. *Hum Reprod* 1994; 9: 2044-50.

94. Moilanen E, Molianen T, Knowles R, Charles I, Kadoya Y, al-Saffar N, Revell PA, Moncada S. Nitric oxide synthase is expressed in human macrophages during foreign body inflammation *Am J Pathol* 1997; 150: 881-7.
95. Sautebin L Prostaglandins and nitric oxide as molecular targets for antiinflammatory therapy. *Fitoterapia* 2000; 71: 48-55.
96. Conelly L,Palacios-Callender M,Amexia C,Moncada S,Hobbs AJ. Biphasic regulation of NF-kappa B activity underlies the pro-and anti-inflammatory actions of nitric oxide. *J Immunol* 2001; 166: 3873-81.
97. Liang YC, Huang YT, Tsai SH, Lin-Shiau SY, Chen CF, Lin JK. Supression of inducible cyclooxygenase and inducible nitric oxide synthase by apigenin and related flavonoids in Mouse macrophages. *Carcinogenesis* 1999; 20: 1945-52.
98. Pruthi RS, Wallen EM. Cyclooxygenase-2:a therapeutic target for prostate cancer. *Clin Genitourin Cancer* 2005; 4: 203-11
99. Barnes PJ, Karin M. Nuclear factor -Kb-a pivotaltranscription factor in chronic inflammatory diseases. *N.Engl J Med* 1997; 336:1066-71
100. Palmer RM, Hickery MS., Charles IG,Moncada S,Bayliss MT. Induction of nitric oxide synthase in human chondrocytes, *Biochem Biophys Res Commun* 1993; 193: 398-405
101. Giovannucci (Giovannucci E. Tomatoes, tomato-based products, lycopene, and cancer: review of the epidemiologic literature. *J Natl Cancer Inst* 1999; 91: 317–331.
102. Rao AV, Fleshner N, Agarwal S. Serum and tissue lycopene and biomarkers of oxidation in prostate cancer patients: a case control study. *Nutr Cancer* 1999; 33: 159–164.
103. Amir H, Karas M, Giat J, Danilenko M, Levy R, Yermiahu T, Levy J, Sharoni Y. Lycopene and 1,25-dihydroxyvitamin D3 cooperate in the inhibition of cell cycle progression and induction of differentiation in HL-60 leukemic cells. *Nutr Cancer* 1999; 33: 105–112.
- 104.Colditz GA, Branch LG, Lipnic RJ. Increased green and yellow vegetables intake and lowered cancer death in an elderly population. *Am J Clin Nutr* 1985; 41: 32–36.

105. Gann P, Ma J, Giovannucci E, Willett W, Sacks FM, Hennekens CH, Stampfer MJ. Lower prostate cancer risk in men with elevated plasma lycopene levels: results of a prospective analysis. *Cancer Res* 1999; 59: 1225–1230.
106. Zhang L-X, Cooney RV, Bertram JS: Carotenoids enhance gap junctional communication and inhibit lipid peroxidation in C3H/ 10T1/2 cells: relationship to their cancer chemopreventive action. *Carcinogenesis* 1991; 12: 2109–2114.
107. Franceschi S, Bidoli E, LaVeccia C, Talamini R, D’Avanzo B, Negri E. Tomatoes and risk of digestive-tract cancers. *Int J Cancer* 1994; 59: 181–184.
108. Potischman N, McCulloch CE, Byers T, Nemoto T, Stubbe N, Milch R, Parker R, Rasmussen KM, Root M, Graham S, Campbell TC. Breast cancer and dietary and plasma concentrations of carotenoids and vitamin A. *Am J Clin Nutr* 1990; 52: 909–915.
109. Jarvinen R, Knekt P, Sapanen R, Teppo L. Diet and breast cancer risk in a cohort of Finnish women. *Cancer Lett* 1997; 114: 251–253.
110. Zhang S, Tang G, Russell RM, Mayzel KA, Stampfer MJ, Willett WC, Hunter DJ. Measurement of retinoids and carotenoids in breast adipose tissue and a comparison of concentrations in breast cancer cases and control subjects. *Am J Clin Nutr* 1997; 66: 626–632.
111. VanEewyck J, Davis FG, Bowen PE. Dietary and serum carotenoids and cervical intraepithelial neoplasia. *Int J Cancer* 1991; 48: 34–38.
112. Helzlsouer KJ, Comstock GW, Morris JS. Selenium, lycopene, a-tocopherol, b-carotene, retinol, and subsequent bladder cancer. *Cancer Res* 1989; 49: 6144–6148.
113. Pool-Zobel BL, Bub A, Muller H, Wollowski I, Rechkemmer G. Consumption of vegetables reduces genetic damage in humans: first result of a human intervention trial with carotenoid-rich foods. *Carcinogenesis* 1997; 18: 1847–1850.
114. Kucuk O, Sakr FH, Djuric Z, Li YW, Velazquez F, Banerjee M, Bertram JS, Crissman JD, Wood DP. Lycopene supplementation in men with prostate cancer (Pca) reduces grade of preneoplasia (PIN) and tumor, decreases serum prostate specific antigen and modulates biomarkers of growth and differentiation. *Intl Conf Diet Prev Cancer, Tampere, Finland, 1999; P1.13.*

115. Diaz MN, Frei B, Vita JA, Keaney JF Jr. Antioxidants and atherosclerotic heart disease. *N Engl J Med* 1997; 337: 408-16.
116. Cai H, Harrison DG. Endothelial dysfunction in cardiovascular diseases: the role of oxidative stress. *Circ Res* 2000; 87: 840-4
117. Parthasarathy S. Mechanism by which dietary antioxidants may prevent cardiovascular diseases. *J Med Food* 1998; 1: 45–51.
118. Parthasarathy S, Steinberg D, Witztum JL. The role of oxidized low-density lipoproteins in pathogenesis of atherosclerosis. *AnnRev Med* 1992; 43: 219–225.
119. Hodis HN, Mack WJ, LaBree L, Cashin-Hemphill L, Sevanian A, Johnson R, Azen SP. Serial coronary angiographic evidence that antioxidant vitamin intake reduces progression of coronary artery atherosclerosis. *JAMA* 1995; 273: 1849–1854.
120. Witztum JL. The oxidation hypothesis of atherosclerosis. *Lancet* 1994; 344: 793–795.
121. Kristenson M, Zieden B, Kucinskiene Z, Elinder LS, Bergdahl B, Elwing B, Abaravicius A, Razinkoviene L, Calkauskas H, Olsson A. Antioxidant state and mortality from coronary heart disease in Lithuanian and Swedish men: concomitant cross sectional study of men aged 50. *BMJ* 1997; 314:629–633.
122. Rao AV, Agarwal S. Effect of diet and smoking on serum lycopene and lipid peroxidation. *Nutr R145*. Parks, D. A., and D. N. Granger. Xanthine oxidase: biochemistry, distribution and physiology. *Acta Physiol. Scand* 1986; 548: 87–99.
123. Fairbanks V.F., Klene G.G. Biochemical aspects of hematology. In: Burtis CA, Ashwood ER, eds. *Tietz Textbook of Clinical Chemistry* 3 rd ed. Philadelphia: WB Saunders, 1999: 1696-1697
124. Hobson II RW, Milazzo VJ, Duran WN. Pathophysiology of skeletal muscle ischemia - reperfusion injury. In Haimovici H, editor. *Vascular Surgery*. New York: Blackwell Science 1996: 497-508.
125. Nelson K, Herndon B, Reisz G. Pulmonary effects of ischemic limb reperfusion: evidence for a role for oxygen-derived radicals. *Crit Care Med* 1991; 19(3): 360-3.

126. Harkin DW, Barros D'Sa AA, McCallion K, Hoper M, Campbell FC. Ischemic preconditioning before lower limb ischemia--reperfusion protects against acute lung injury. *J Vasc Surg* 2002; 35: 1264-73.
127. Rocker GM. Ischaemia/reperfusion, inflammatory responses and acute lung injury. *Thorax* 1997; 52: 841-2.
128. Pararajasingam R, Nicholson ML, Bell PR, Sayers RD. Noncardiogenic pulmonary oedema in vascular surgery. *Eur J Vasc Endovasc Surg* 1999; 17: 93-105.
129. Anner H, Kaufman RP, Kobzik L, Valeri CR, Shepro D, Hechtman HB. Pulmonary leukosequestration induced by hind limb ischemia. *Ann Surg.* 1987; 206(2): 162-7.
130. Kyriakides C, Austen WG Jr, Wang Y, Favuzza J, Moore FD Jr, Hechtman HB. Neutrophil mediated remote organ injury after lower torso ischemia and reperfusion is selectin and complement dependent. *J Trauma* 2000; 48: 32-8.
131. Arumugam TV, Shiels IA, Woodruff TM, Granger DN, Taylor SM. The role of the complement system in ischemiareperfusion injury. *Shock* 2004; 21: 401-9.
132. Welbourn R, Goldman G, O'Riordain M, Lindsay TF, Paterson IS, Kobzik L, et al. Role for tumor necrosis factor as mediator of lung injury following lower torso ischemia. *J Appl Physiol* 1991; 70: 2645-9.
133. Welbourn R, Goldman G, Kobzik L, Paterson IS, Valeri CR, Shepro D, et al. Role of neutrophil adherence receptors (CD 18) in lung permeability following lower torso ischemia. *Circ Res* 1992; 71: 82-6.
134. Welbourn CR, Goldman G, Paterson IS, Valeri CR, Shepro D, Hechtman HB. Neutrophil elastase and oxygen radicals: synergism in lung injury after hindlimb ischemia. *Am J Physiol* 1991; 260: H1852-6.
135. Parks, D. A., and D. N. Granger. Xanthine oxidase: biochemistry, distribution and physiology. *Acta Physiol. Scand.* 1986; 548: 87-99.
136. Tullis, M.J. Brown, S.& Gewertz, B.L. Hepatic influence on pulmonary neutrophil sequestration following intestinal ischemia-reperfusion. *J. Surg. Res* 1996; 66,143-146.

137. Klausner, J. M., H. Anner, I. S. Paterson, L. Kobzik, C. R. Valeri, D. Shepro, and H. B. Hechtman. Lower torso ischemia-induced lung injury is leukocyte dependent. *Ann. Surg* 1988; 208: 761–767.
138. Terada, L. S. , J. J. Dormish, P. F. Shanley, J. A. Leff, B. O. Anderson, and J. E. Repine. Circulating xanthine oxidase mediates lung neutrophil sequestration after intestinal ischemia-reperfusion. *Am. J. Physiol* 1992; 263: 394–401.
139. Koike, K., F. A. Moore, E. E. Moore, R. A. Read, V. S. Carl, and A. Banerjee. Gut ischemia mediates lung injury by a xanthine oxidase- dependent neutrophil mechanism. *J. Surg. Res* 1993; 54: 469–473.
140. Raijmakers PGHM, Groeneveld ABJ, Rauwerda JA, Schneider AJ, Teule GJJ, Hack CE, et al. Transient increase in interleukin-8 and pulmonary microvascular permeability following aortic surgery. *Am J Respir Crit Care Med* 1995; 151: 698-705.
141. Pieter G H M Raijmakers et al. Diagnostic criteria for adult respiratory distress syndrome: time for reappraisal. *Lancet* 1989; i: 120-123
142. Sinclair DG, Braude S, Haslam PL, Evans TW. Pulmonary endothelial permeability in patients with severe lung injury. Clinical correlates and natural history. *Chest* 1994; 106: 535–9.
143. Kearns SR, Kelly CJ, Barry M, Abdih H, Condron C, Leahy A, et al. Vitamin C reduces ischaemia-reperfusion-induced acute lung injury. *Eur J Vasc Endovasc Surg* 1999; 17: 533-6.
144. Berkan Ö, Güneç F, Katranıcıoğlu N, Günay I, Doğan K, Yıldız E. İskemi ve reperfüzyona bağlı olarak ortaya çıkan akciğer hasarını önlemede pentoksifilin, karnitin ve askorbik asidin etkileri. *Türk Göğüs Kalp Damar Cer Derg* 2002; 10: 92-5.
145. Yeniterzi M, Yefliltay M, Vatansev H, Görmül N. İskelet kas sisteminde reperfüzyon hasarının önlenmesinde mannitol etkili mi? *Selçuk Üniversitesi Tıp Fakültesi Dergisi* 2001; 17: 231-4.
146. Novelli GP, Adembri C, Gandini E, Orlandini SZ, Papucci L, Formigli L, et al. Vitamin E protects human skeletal muscle from damage during surgical ischemia-reperfusion. *Am J Surg* 1997; 173: 206-9.

147. Uysal A., Burma O., Akar i., Özsin K.K., Rahman A., Üstündağ, B., Özercan İ. Alt ekstremite iskemii reperfüzyonunun yol açtığı akciğer hasarında melatoninin koruyucu etkinliği Türk Göğüs Kalp Damar Cer Derg 2006; 14 (4): 308-314.
148. Gökşin İ, Akbulut M, A. Baltalarlı ve ark. Normovolemik hemodilüsyonun alt ekstremite iskemii-reperfüzyonu sonrası oluşan akciğer hasarı üzerine olan etkisi Turkish J Thorac Cardiovasc Surg 2006; 14 (1): 54-58.
149. Okutan H, Savas C, Delibas N. The antioxidant effect of melatonin in lung injury after aortic occlusion–reperfusion. Interactive CardioVascular and Thoracic Surgery 2004; 3: 519–522.
150. Köksel ve ark. Inhibition of poly (ADP-ribose) polymerase attenutes lung tissue damage after hind limb ischemia- reperfusion in rats. Pharmacological Research 2005; 51: 453-462
151. Karahan İ., Yılmaz S., Şahin A. A. Ratlarda cisplatin ve gentamisinin kan ile karaciğerde oluşturdukları oksidatif stres üzerine likopenin etkileri. F.Ü. Sağlık Bil. Dergisi, 2006; 20 (1): 39-43
152. Kurt H, Basaran A, Aral E, (2005) Sıçanlarda Karbon Tetraklorit'in Olusturduğu Oksidatif Stresin Likopen ile Önlenmesi. Türkiye Klinikleri J Med Sci 2005; 25: 167-173
153. Bose K S C, Agrawal B. Effect of lycopene from cooked tomatoes on serum antioxidant enzymes, lipid peroxidation rate and lipid profile in coronary heart disease K Singapore Med J 2007; 48 (5) : 415.
154. Bignotto L., Rocha J., Sepodes B. Anti-inflammatory effect of lycopene on carrageenan-induced paw oedema and hepatic ischaemia-reperfusion in the rat. Br J Nutr. 2009; 10: 1-8.
155. Bansal P, Gupta SK, Ojha SK,. Cardioprotective effect of lycopene in the experimental model of myocardial ischemia-reperfusion injury Mol Cell Biochem. 2006; 289 (1-2):1-9
156. Hsiao G, Fong TH, Tzu NH, Lin. A potent antioxidant, lycopene, affords neuroprotection against microglia activation and focal cerebral ischemia in rats. In Vivo 2004; 18 (3): 351-6

