

T1242



T.C.  
AKDENİZ ÜNİVERSİTESİ  
TIP FAKÜLTESİ  
GENEL CERRAHİ ANABİLİM DALI

# BÖBREĞİN İSKEMİ REPERFÜZYON HASARINA VERAPAMİL VE AMİFOSTİNİN ETKİSİ

T1242 [1-1]

(Uzmanlık Tezi)

**Dr. Ayşe ARDUÇOĞLU MERTER**

**Tez Danışmanı : Prof.Dr. Mustafa AKAYDIN**

"Tezimden Kaynakça Gösterilerek Yararlanılabilir"

**Antalya, 2001**

AKDENİZ ÜNİVERSİTESİ  
Merkez Kütüphanesi

# İÇİNDEKİLER

	<u>Sayfa No</u>
GİRİŞ VE AMAÇ	1-3
GENEL BİLGİLER	4-17
GEREÇ VE YÖNTEM	18-24
BULGULAR	25-37
TARTIŞMA	38-44
ÖZET	45-46
KAYNAKLAR	47-51

## 1.Giriş ve amaç

İskemi, vücutta sınırlı bir bölgeye gelen kan akımının azalması veya tamamen ortadan kalkması durumuna verilen addır. Kan akımının azaldığı ya da ortadan kaldırıldığı (iskemi) bir dokuda takiben kan akımının yeniden sağlanması (reperfüzyon) sırasında, moleküler oksijenin dokuya sunulması sonucu geri dönüşümsüz hücre zedelenmesi meydana gelebilir. Bu tablo, iskemi-reperfüzyon (I/R) hasarı olarak tanımlanmıştır (1). Bir dokunun gereksinimini karşılayamayacak ölçüde yetersiz kan akımı ile beslenmesi, daha çok myokard ve beyin dokusunda görülen tromboembolik olaylar, hipovolemik şok, sepsis, kardiak arrest, resusitasyon ve organ transplantasyonu sırasında karşılaşılan bir durumdur (2, 3). İskemi sonrası organın reperfüzyonu ile oluşan hasarın, yalnız başına iskemiden daha fazla olduğu öne sürülmüştür (4).

I/R'a bağlı doku hasarının oluşmasında temel rolün, reperfüzyondan sonra oluşan serbest radikallerdeki artış olduğu, pek çok klinik ve deneysel çalışma ile gösterilmiştir (2, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12). Canlı dokularda iskemi ve reperfüzyon, normalde sıkı bir şekilde kontrol edilen enerji metabolizmasını bozarak, oksijen radikalleri olarak bilinen süperoksit anyon radikal ( $O_2^-$ ), hidroperoksit radikali ( $HO_2^-$ ), hidrojen peroksit ( $H_2O_2$ ), hidroksil radikal ( $OH^-$ ), peroksit radikal ( $ROO^1$ ), singlet oksijen ( $^1O_2$ ) radikallerinin oluşmasına yol açar. Çevrede ve vücutta oluşan serbest radikallerin her çeşit dokuda hücreleri tahrip ettiği ve gen programlarını değiştirdiği gösterilmiştir. Serbest radikaller, parankimal hücrelerde, mitokondrilerde oksidatif fosforilasyon sürecinde, prostoglandin ve lökotrienlerin oluşumunda bulunan substratların metabolizması sırasında, inflamatuvar reaksiyonlarda üretilmektedir. Endotel hücrelerinde, ksantin oksidaz ve nötrofillerde ise NADPH oksidaz gibi enzimatik kaynaklardan köken alabileceği bilinmektedir. Serbest oksijen radikalleri, dolaşımdaki lipoproteinlerin kinetiklerini değiştirmekte, endotel hücrelerinin geçirgenliğini arttırmakta ve makrofajlar tarafından lipoproteinlerin alınmasını modüle etmektedirler.

Kompleman sisteminin aktivasyonu, kemotaktik peptidlerin oluşumu, PMN hücrelerin migrasyonu ve aktivasyonu, serbest oksijen radikallerine bağlı membran ve lipid değişiklikleri ve hücre içi serbest radikal gidericilerin tükenmesi gibi olaylar reperfüzyon zedelenmesinde rol almaktadır (11, 13, 14, 15, 16).

Serbest radikallerin dokuda oluşturdukları hasar, lipid peroksidasyonu miktarı ölçülerek gösterilebilir. Lipid peroksidasyonunun, membran hasarına bağlı fonksiyonel bozulmadan sorumlu olduğu pek çok çalışma ile gösterilmiştir. Bu nedenle organizmada lipid peroksidasyonunun önlenmesi ile serbest radikallere bağlı hücre harabiyetinin azaltılabileceği gösterilmiştir (9, 10, 11, 13). Oksidatif sisteme önlem olarak bulunan antioksidan sistemi oluşturan glutatyon peroksidaz, katalaz, süperoksid dismutaz gibi enzim sistemlerinin yetersizliği halinde oksidan yaralanma, hücrede hasarla sonuçlanmaktadır (1, 7, 8, 11, 13, 17). Lipid peroksidasyonunun miktarı, tiyobarbütirik asid (TBA) metodu ile dokuda malondialdehid (MDA) ve antioksidan mekanizmaların aktivitesi de dokuda redükte glutatyon (GSH) bakılarak değerlendirilebilir (5, 6).

İskemi sırasında dokuda ATP seviyesi düşerken, hücre membran iyon farklılığını koruyamaz ve böylece dokuda kalsiyum (Ca) birikir. Ca bazı proteazları aktive ederek, ksantin dehidrogenazın ksantin oksidaza dönüşümünü başlatır. Ksantin oksidaz, serbest oksijen radikallerinin ana kaynağıdır. Yavaş bir Ca kanal blokörü olan verapamil, iskemi sırasında, Ca iyonlarının hücre içine girişini önleyerek iskemi-reperfüzyon hasarında dokuyu koruduğu gösterilmiştir (2, 3, 11, 18, 19).

Thiol içeren bileşiklerin normal dokuyu radyasyona karşı koruma kapasiteleri 40-50 yıldır bilinmektedir. Buna karşın sodyum thiosülfat ve dietildithiokarbamat gibi serbest tioller normal doku toksisitesi ve sitotoksik antitümör etkileri beraber azalttıkları için klinik olarak kullanılamazlar. Amifostin, radyasyonun ve bazı kemoterapötik ajanların oluşturduğu serbest oksijen radikallerini giderir. Amifostinin aktif serbest thiolü, WR 1065, hücre içine girdiğinde üç etki ile koruma yapar. İlk olarak serbest oksijen radikalleri için hızlı ve etkin bir gidericidir. İkinci olarak, koruyucu etkisini, alkilleyici ve platinum

ajanların aktif türlerini hücre içi direk bağlantı yaparak detoksifiye eder. Amifostin ve özellikle WR 1065, cisplatin-DNA birleşiminin olmasını ve ters cisplatin-DNA birleşimini engeller. Diğer bir etkisi de DNA'ya hidrojen atomu transferi veya oksijen azaltılması yolu ile DNA'nın kimyasal yolla tamiri olabilir (6, 20, 21, 22, 23, 24, 25). Bu etki mekanizmaları nedeniyle, iskemik böbrekte reperfüzyon hasarını önleyebileceği düşünülebilir.

Bu çalışmanın amacı; Amifostinin böbrek sıcak iskemi modelinde, iskemi-reperfüzyon hasarı üzerine etkisini gözlemek ve böyle bir etki mevcutsa, I/R hasarını önleyici etkisinin mekanizmasını ortaya koymaktır. Amifostin, daha önce birçok kez deneysel olarak, iskemi-reperfüzyon hasarını önlemede olumlu sonuç alınan verapamil ile beraber kullanıldığında, etkisi ayrıca değerlendirilecektir. Amifostin'in iskemi reperfüzyon hasarını önleyici etkisi ile ilgili literatürde deneysel bir adet çalışma mevcuttur ve iskemi reperfüzyon hasarına karşı sıçan kalbinde koruyucu etkisi gösterilmiştir (26).

## 2.Genel bilgiler

### 2.1.İskemi-reperfüzyon hasarı

İskemik dokuda kan akımı yeniden sağlansa bile geri dönüşümsüz hasarlanma meydana gelebilir. İskeminin süresine ve yoğunluğuna bağlı olarak, farklı sayıda hücrede nekroz ve apoptozis oluşup, takiben bu hücrelerin ölümü ile sonuçlanabilir (27,28). Hücre ölümü için en önemli olaylar, hücresel enerji depolarının tükenmesi ve toksik metabolitlerin birikmesidir. Etkilenen dokularda nötrofil infiltrasyonu görülür (13,14). I/R hasarı, myokardial infarktüs, şok ve bunun gibi birçok durumda karşımıza çıkabildiği için, klinik olarak önemli bir durumdur.

İskemi sırasında doku ATP seviyesi düşer, ksantin ve hipoksantin hücre içinde birikir. Aynı anda hücre membran iyon farklılığını koruyamaz ve özellikle Ca membranı geçer. Ca bazı proteazları aktive ederek ksantin dehidrogenazın, ksantin oksidaza dönüşümünü artırır, bu da hipoksantin'in ksantine dönüşümünü artırır, bu sırada negatif oksijen oluşur ki bu da serbest oksijen radikallerinin kaynağıdır. Bu reaksiyonda gerekli olan moleküler oksijen, dokunun reperfüzyonu ile temin edilir (Şekil 2.1). I/R, normalde sıkı bir şekilde kontrol edilen enerji metabolizmasını bozarak, oksijen radikalleri olarak bilinen süperoksit anyon radikal ( $O_2^-$ ), hidroperoksit radikali ( $HO_2^-$ ), hidrojen peroksit ( $H_2O_2$ ), hidroksil radikal ( $OH^-$ ), peroksit radikal ( $ROO^1$ ), singlet oksijen ( $^1O_2$ ) radikallerinin oluşmasına yol açar (1, 7, 9, 18, 29).

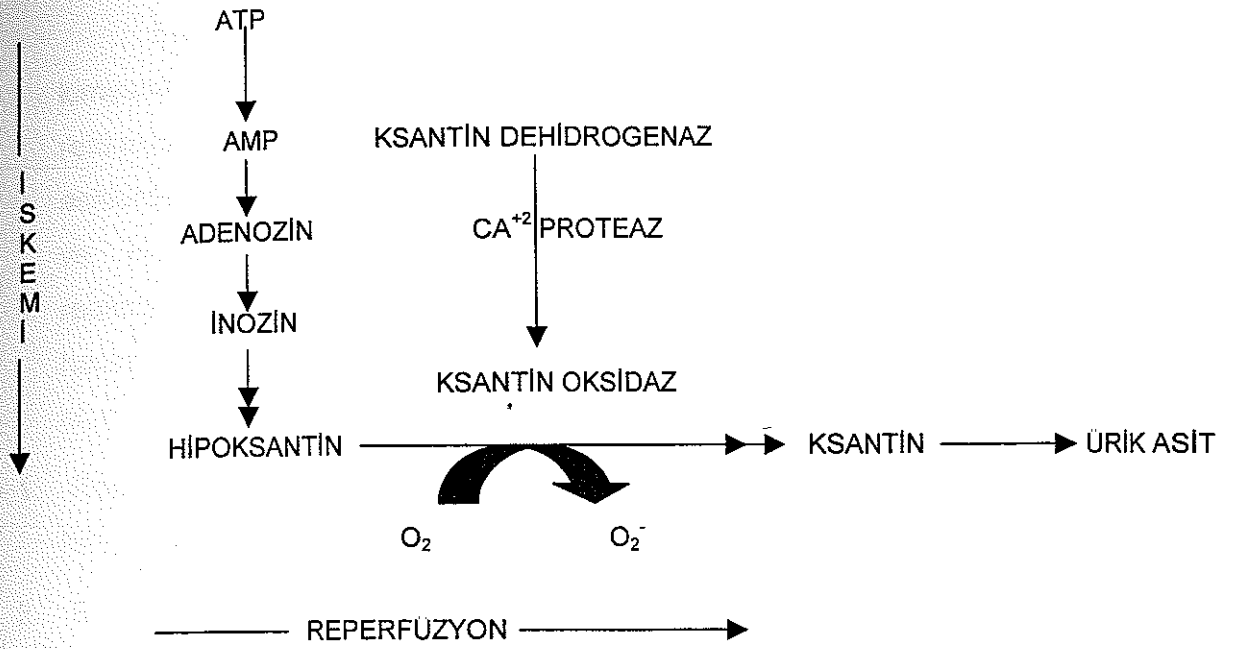
Parks ve Granger, iskemik zedelenmenin büyük oranda reperfüzyon sırasında olduğunu göstermişlerdir (30). Üç saatlik iskemi ardından bir saatlik reperfüzyon sonrası hasarın, dört saatlik iskemiden daha fazla olduğu görülmüştür. Reperfüzyon hasarında dokuya geri dönen oksijenlenmiş kanın ve moleküler oksijenden türeyen sitotoksik oksidanların başlattığı bu reaksiyonların reperfüzyona bağlı hasarlanmada önemi vardır

Reperfüzyon hasarlanmasının nasıl meydana geldiğine dair farklı görüşler vardır. Bir görüşe göre; henüz nekroz gelişmemiş ve normal şekilli iskemik hücreler, biyokimyasal olarak farklılığa uğramıştır ve reperfüzyon sırasında normal yapısını kaybetmişlerdir. Diğer bir görüş ise reperfüzyon sırasında ortaya çıkan yeni hasarlanma mekanizmalarıdır; Bunlar;

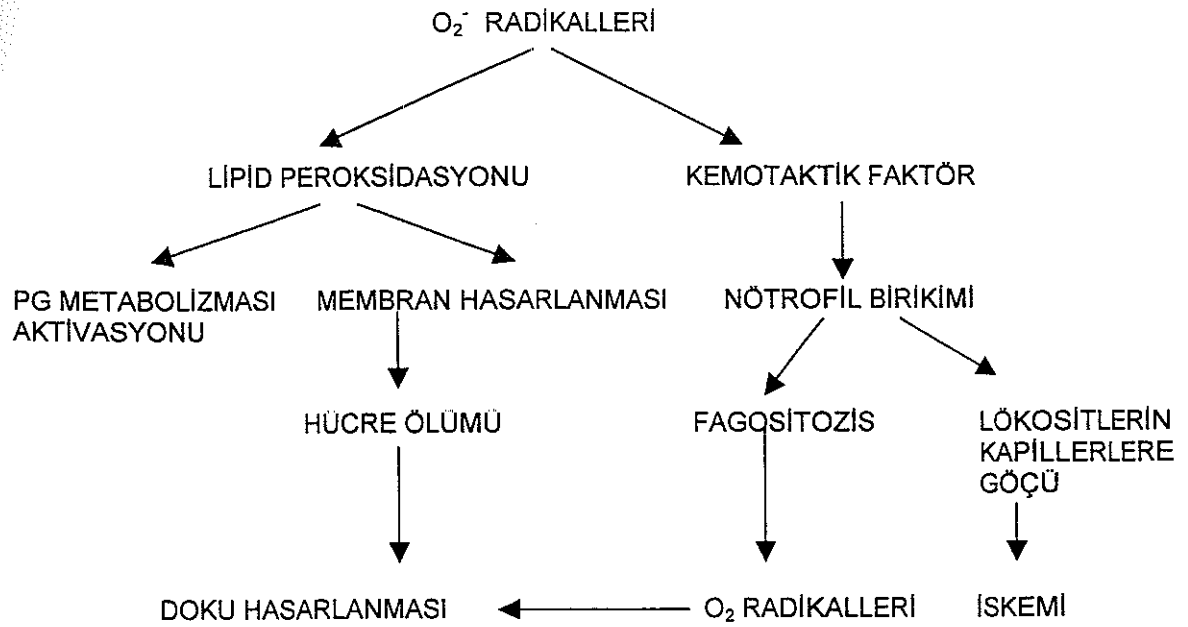
1. Reoksijenizasyon sırasında parenkimal ve endotelial serbest oksijen radikallerinin üretiminde artma ve lökosit infiltrasyonu sonucu yeni hasarlanma olabilir (13,14). Reperfüzyona uğramış dokuda; parankimal hücreler, endotelial hücreler ve lökositlerden kaynaklanan oksidazların etkisi ile ya da hasarlanmış mitokondriler tarafından, oksijende tam olmayan indirgenme sonucu süperoksit ajanlar üretilebilir. Hücresel antioksidan korunma mekanizmaları iskemi ve daha çok radikallerin birikmesi nedeniyle baskılanmış olabilir.
2. Reaktif oksijen ürünleri daha çok mitokondrial geçirgenlik üzerine etkili olarak, mitokondrial enerji üretiminde azalmaya ve dolayısıyla hücresel ATP azalmasına neden olarak hücre ölümüne sebep olur.

İskemik hasar; hipoksik parankimal ve endotelial hücreler tarafından sitokinlerin ve adezyon moleküllerinin salınmasında artışa yol açar. Bu ajanlar, reperfüze dokularda polimorfonükleer lökositlerin artışına sebep olur. İnflamasyonda artış da hasarlanmanın devamını sağlar (Şekil 2.2). Reperfüzyon hasarında nötrofil göçünün önemi, hasarlanmanın yayılmasını önlemek veya azaltmak amacıyla sitokinlere ve adezyon moleküllerine karşı antikorlar gibi antiinflamatuvar ajanların kullanıldığı deneysel çalışmalarda gösterilmiştir (15).

İskemik dokuların reperfüzyonu mikrovasküler ve parankimal zedelenmeyi daha da perçinlemektedir. İskemi süresi arttıkça reperfüzyonun etkisi ve sonuçta da nekroz ve hücre ölümü daha da artmaktadır.



Şekil 2.1. İskemi-reperfüzyonda süperoksit oluşumu



Şekil 2.2. Dokuda serbest oksijen radikallerinin direkt ve indirekt etkileri (PG: Prostaglandin)



Serbest radikaller, dış yörüngelerinde çiftleşmemiş bir elektron içeren kimyasal bileşiklerdir. Bu stabil olmayan durum nedeniyle üretilen enerji, reaksiyonlar sırasında yakınında bulunan hücre membranındaki ve nükleik asitlerdeki anahtar moleküller, protein, karbonhidrat, lipid gibi organik moleküllere ve inorganik moleküllere verilir. Ayrıca serbest radikaller, otokatalitik reaksiyonlara yol açarak, moleküllerin serbest radikallere dönüşmesine dayalı hasar zinciri oluşturabilirler. Hücrelerde serbest radikal oluşumu şu şekillerde olur;

1. Radyant enerji Emilimi (UV, X-Ray). İyonize radyasyon, suyu katalizleyerek, hidroksil (OH<sup>-</sup>) ve hidrojen (H<sup>•</sup>) gibi serbest radikallere dönüştürebilir (10)
2. Eksojen kimyasal madde veya ilaç alımının enzimatik metabolizması. Karbontetraklorür (CCl<sub>4</sub>), karbontetrakloride (CCl<sub>3</sub>) dönüşebilir.
3. Normal metabolik olaylar sırasında görülen oksidasyon-redüksiyon reaksiyonları; Normal solunum sırasında moleküler oksijen 4 elektron alarak (indirgenerek) suyu oluşturur. Bu reaksiyon sırasında, süperoksit anyon radikal (O<sub>2</sub><sup>-</sup>), hidrojen peroksit (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>), hidroksil iyonları (OH<sup>-</sup>) gibi birkaç toksik madde az da olsa üretilir. İnflamasyon sırasında aktive polimorfonükleer lökositlerden hızlı bir süperoksit üretimi görülür. Bu olay, NADPH oksidaz tarafından kullanılan bir plazma membran multiprotein kompleksi tarafından önceden kontrol altına alınmıştır. Ek olarak ksantin oksidaz gibi bazı intrasellüler oksidazların aktivasyonu ile süperoksit radikal üretimi devam eder.
4. Demir ve bakır gibi geçiş metalleri, intrasellüler reaksiyonlar sırasında ve fenton reaksiyonu gibi serbest radikal oluşumunu katalizleyen durumlarda;



serbest elektron verir veya alırlar. Çünkü çoğu intrasellüler serbest demir ferrik (Fe<sup>+3</sup>) halde bulunurlar. Fenton reaksiyonu sırasında ferröz (Fe<sup>+2</sup>) hale indirgenir. Bu indirgenme süperoksit radikalleri tarafından güçlendirilmiş olabilir. Bu demir ve süperoksit kaynağı, maksimal oksidatif hücre hasarı için gereklidir. Fe<sup>+2</sup>, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> ile reaksiyona girip reperfüzyon sırasında OH<sup>-</sup> radikali oluşturur

5. Nitrik oksit (NO), endotelial hücreler, makrofajlar, nöronlar ve diğer hücre tipleri tarafından üretilen önemli bir kimyasal mediatördür. NO, serbest radikal olarak etki gösterebilir. Ayrıca, yüksek reaktif peroksinitritanyon ( $\text{ONOO}^-$ ),  $\text{NO}_2$  ve  $\text{NO}_3^-$  e dönüşebilir (31).

$\text{O}_2$  radikallerinin oluşumu, dokularda yer alan nükleik asitler, membran lipidleri, enzimler ve reseptörler gibi pek çok yapıya hasar vermektedir. Bu reaktif ürünlerin geniş etki alanları vardır. Fakat hücre hasarına yol açan özellikle üç reaksiyon vardır:

1. **Membran lipid peroksidasyonu:** Serbest radikaller oksijen varlığında plazmada ve hücre membran lipidlerinde peroksidasyona yol açabilirler. Oksidatif hasar, doymamış membran yağ asitleri özellikle  $\text{OH}^-$  gibi serbest radikallere maruz kaldıklarında görülür. Stabil olmayan, reaktif peroksitler oluşarak, yaygın membran, organel ve hücrel hasarla sonuçlanan otokatalitik zincir reaksiyonu ortaya çıkar.  $\text{O}_2$  radikallerine bağlı lipid peroksidasyonu ve protein hasarı hücrel fonksiyonların bozulmasına ve nekrozla sonuçlanan reperfüzyon hasarına neden olur. Hücrelerin en önemli komponentleri olan proteinler, DNA ve membran fosfolipidlerinin doymamış yağ asitleri ile reaksiyona girebilir. Proteinler ve DNA'nın spesifik parçalanmasını hidroksil radikalleri katalizler. Hidroksil radikali doymamış yağ asitlerinin peroksidasyonunda en aktif serbest oksijen radikali olup, malondialdehid birikimine yol açar. Bu yıkım ürünleri (malondialdehid, formaldehid, asetaldehid, aseton ve propionaldehid), membran doymamış yağ asitlerinin oksidasyonunun en önemli göstergesi olarak kabul edilir. Lipid peroksidasyonu olarak adlandırılan bu olay lökotrienlerin, prostoglandinlerin, sitotoksik ve kemotaktik lipid peroksitlerin biyosentezinde oluşur. Lipid peroksidasyonuna yol açan  $\text{OH}^-$  radikalleri, lipidlerden konjuge dienler ve lipid hidroperoksit radikalleri gibi serbest radikallerin ortaya çıkmasına yol açar. Yapılan çalışmalar dokulardaki konjuge dien düzeylerinin iskemiden ziyade reperfüzyonda arttığını göstermiştir. Hayvanlarda yapılan deneylerde, süperoksit dismutazın (SOD), konjuge dienler konusunda da koruyucu etkisi gösterilmiştir.

2. **Proteinlerin oksidatif modifikasyonu:** Oksidatif modifikasyon, multikatalitik proteazom kompleks tarafından bazı kritik enzimlerin degradasyonunu artırır.
3. **DNA'daki lezyonlar:** Nükleer timin ve mitokondriyal DNA ile reaksiyonlar. DNA'daki tek sarmal üretimi ile sonuçlanır. Bu DNA hasarlanması, hücre yaşlanması ve malign transformasyonla sonuçlanmış olabilir.

Oksidatif türevlerin reperfüzyon sırasında oluşumu, elektron spin rezonans spektrometri yöntemiyle incelenmiştir. Bu çalışmalarda, reperfüzyondan hemen sonra 2-5 dk. süreyle oksidatif türevlerin oluştuğu gösterilmiştir. Bu şekilde oluşan reperfüzyon hasarı, SOD enzimi ile engellenebilmiştir.

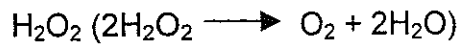
Hücrelerde hasarı minimuma indirmek ve serbest radikalleri yok etmek için çeşitli mekanizmalar geliştirilmiştir. Serbest radikaller stabil olmayan ve genellikle doğal olarak yok olan bileşiklerdir. Örneğin süperoksit stabil değildir ve ortamda su bulunduğu oksijen ve hidrojen peroksit dönüşür. Serbest radikal reaksiyonlarının etkinliğini önleyen birkaç enzimatik ve enzimatik olmayan reaksiyon vardır. Bunlar:

1. Serbest radikal oluşumunu durduran ve radikal hasarı sonlandıran antioksidanlar mevcuttur (vitamin E ve A gibi yağda eriyen vitaminler, askorbik asit, sitoplazmik glutatyon). E vitamini hücre membranında lipid peroksidasyonunu önler. Askorbik asit ise sitoplazmada ve ekstrasellüler dokularda antioksidan etkinlik gösterir ve antiproteazların oksidanlarla inaktivasyonunu engeller. Bu gruptaki diğer maddeler; indirgenmiş glutatyon, ürik asit,  $\beta$  karoten (provitamin A), taurin ve yüksek molekül ağırlıklı antioksidan olan albumindir.
2. Reaktif oksijen radikallerinin oluşmasını önleyen ve oluşanların yayılmasını engelleyen sistemler vardır. Bunlar, hidrojen peroksit ve süperoksit anyonundan hidroksil radikali oluşmasını sağlayan Haber-Weiss reaksiyonunu katalizleyen demir ve bakır iyonlarını plazmada ve hücrede bağlayan bakır transport proteini seruloplazmin ile ferritin, transferrin, laktoferrin ve mitokondrielerde doğal olarak

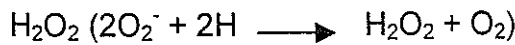
oluşan serbest radikalleri suya indirgeyen mitokondrial sitokrom oksidazdır. Bunlar, OH oluşumunu da en aza indirgerler. Haptoglobulin, yüksek dansiteli lipoproteinler (HDLP), M<sub>2</sub> makroglobulin, IgG, glikoz ve taurin ise plazmada ekstrasellüler antioksidan savunma mekanizmaları olarak bulunan diğer maddelerdir.

3. Serbest radikal-antioksidan sistemi harekete geçiren, hidrojen peroksit ve süperoksit anyonu azaltan bir seri enzim vardır. Bu enzimler, oksidanların üretim alanlarına yakın lokalize olmuş olup, süperoksit dismutaz, katalaz, glutatyon redoks siklus enzimleri (glutatyon peroksidaz, glutatyon redüktaz, glukoz-6-fosfat dehidrogenaz v.b.) gibi enzimlerdir. Süperoksit dismutaz (SOD), süperoksit anyonunu enzimatik olarak hidrojen peroksit ve moleküler oksijene dönüştürür. Hidrojen peroksit ise, iki önemli hücre içi enzim olan katalaz ve glutatyon peroksidaz ile su ve oksijene indirgenir.

- **Katalaz:** Peroksidomlarda bulunup, aşağıda tanımlanan reaksiyonu katalizler.

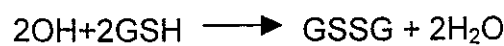
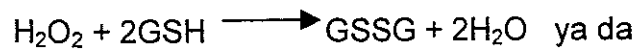


- **Süperoksit dismutaz,** birçok hücre tipinde bulunur ve süperoksidi hidrojen peroksit'e çevirir.



Bu grup, mitokondrideki manganez-süperoksit dismutaz ve sitoplazmada bulunan bakır-çinko-süperoksit dismutazı da içerir.

- **Glutatyon peroksidaz,** serbest radikal salınımını katalizleyerek hasara karşı koruyucu etki gösterir. Redükte glutatyon, hidrojen peroksit veya hidroksil anyonu ile reaksiyona girerek okside glutatyon ve su meydana getirir.



Glutasyon peroksidaz, vücut sıvıları ve dokularında lipid hidroperoksidlerin ve hidrojen peroksidlerin yıkımını katalize eder. Dolayısıyla organizmada oksidatif hasara karşı koruyucudur. Eritrosit glutasyon peroksidazı, her enzim molekülünde 4 selenyum atomu içeren bir seleno proteindir. Selenyum hücrel oksidatif hasarın önlenmesinde bu biyokimyasal molekülün gerekli bir parçasıdır. Uzun süreli selenyum yetmezliği tüm dokularda glutasyon peroksidaz aktivitesinde azalma ile sonuçlanır. Eritrositlerde hemoglobinin ve hücre membranının peroksidasyonunu glutasyon peroksidaz önlemekle yükümlüdür. Lökosit ve makrofaj gibi fagositik hücrelerde artmış glutasyon peroksidaz aktivitesi, oksidatif yıkım sırasında meydana gelen peroksidlerden fagositik hücreyi korumakla yükümlüdür. Trombositlerde azalan glutasyon peroksidaz aktivitesi kanama bozukluklarına, plazmada azalan aktivitesi kapiller membran peroksidasyonuna bağlı ödeme yol açar. Selenyum, vitamin E, glutasyon ve sülfür içeren aminoasitler, karbontetraklorür gibi oksidatif hasarı karaciğerde başlatan maddelerin bu etkilerini önlerler. Sülfür içeren aminoasitler glutasyonun etkinliğini arttırarak glutasyon peroksidazın katalize ettiği enzimatik reaksiyonda lipid peoksid yapımını engeller.

Okside glutasyonun (GSSG), indirgenmiş glutatyona (GSH) oranı, hücrenin oksidatif durumunun bir göstergesidir ve hücrenin reaktif oksijen ürünlerini detoksifikasyonu kabiliyetini gösterir (32).

OH<sup>-</sup> toplayıcısı olarak, reperfüzyon hasarını önleyen üç adet nonenzimatik madde vardır. Dimetil sülfoksid, dimetil tioüre ve mannitol.

Bu mekanizmalar normal biyokimyasal olaylar sırasında az miktarda oluşan radikalleri nötralize edebilirler. Ancak iskemi-reperfüzyon sonrası reaktif oksijen radikallerinin bol miktarda oluşması, aktive edilmiş nötrofillerle fagositlerin dokuda toplanması gibi durumlar, oksidan/antioksidan dengenin bozulmasına, antioksidan mekanizmaların tükenmesine ve sonuçta sitotoksik radikal etkinliğinin artmasına bağlı olarak hücre zedelenmesine ve ölüme yol açar.

İskemi, renal transplantasyona eşlik eden akut renal hasarın halen ana modelidir. Hasarın temel nedeni, vazomotor kollaps ve mikrovasküler

değişikliklerin neden olduğu iskemidir. İskemik renal hasarın hücresel temeli, böbrek hücresel organizasyonunun karmaşıklığı dolayısıyla karışıktır. İskemiden ziyade hipoksinin etkileri gözönünde bulundurulmalıdır. İskemik ATN, yaygın hücresel hasar, balonlaşma, normal epitel dokunun kaybedilmesi ve Na-K ATP'az aktivitesinin azalması dolayısıyla gerçekleşmektedir. İntrasellüler ATP düzeyi düşerken, intrasellüler kalsiyum düzeyi artmaktadır. Kalsiyum, nötral sitozolik sistein proteaz olan kalpain aktivitesini ve nitrik oksit (NO) üretimini artırır. Kalpain, hücre polaritesinin kaybedilmesine ve bazolateral membrandaki Na-K ATP'azın yeniden salınımına yol açar. NO, aktin iskeletini ve fırça kenarları sarsarak hücresel bağlantıların kaybedilmesine yol açar. Renal reperfüzyon hasarında NO sentazın rolü olduğuna dair son dönemde yayınlar yapılmıştır. Kalsiyum aynı zamanda fosfolipaz A<sub>2</sub> aktivitesini de artırır. Fosfolipaz A<sub>2</sub>, membranlara zarar verebilir (31, 33, 34).

İskemi sona erince böbreklere kan akımı yeniden başlar ve reperfüzyon etkileşimleri, iskemik hasarın üstüne biner. Reperfüzyon olayındaki majör diğer bir olay, nötrofillerin, organ endoteli ile etkileşime girmesidir (Selektinler, intrasellüler adezyon molekülleri – İCAM-1). Reperfüzyon fazında reaktif oksijen türevleri ve serbest radikaller açığa çıkar. Zincirleme reaksiyonlar sonucunda membran hasarına yol açan doymamış yağ asitleri peroksidasyonu olur. Renal transplantasyonda nötrofil ve endotelin etkileşimi ile reperfüzyon hasarına yol açan bir etken ortaya çıkar. Bu olay intraoperatif olarak vasküler yapıları tutan klemplerin açılmasıyla da gelişebilir. Ancak bu olay donörde transplantasyon öncesi dönemde resusitasyonu takiben veya vazokonstrüktif maddelerin aşırı biçimde salınması ile de gelişebilir (11, 34, 35, 36, 37).

Böbreğin hasara yanıtında gen etkileşimleri de önemlidir; ppEGF(prepro-epidermal growth faktör)'ün kaybedilmesi, Fos ve Jun genlerinin devreye girmesi (yeni proteinlerin sentezi öncesinde), siklohegzimide direnç, 4 saat içinde iki ayrı kemokinin sentez edilmesi JE (MCP-1) ve KC (İnterlökin 8 ile bağlantılı bir C-X-J kemokini) Böbrek hasarında kemokinlerin rolü son dönemde yeniden gözden geçirilmiştir. Genel anlamda hasar gören böbrek, hücre bölünmesi,

dediferansiyasyon ve gen açılımında değişiklikler gibi pek çok tepki gösterebilir (11).

Polimorfonükleer (PMN) lökositlerin immün kompleksler ve aktive olmuş kompleman da dahil çeşitli aktive edici ajanlarla karşılaşması sitotoksik oksijen radikallerinin oluşumuna neden olur. PMN hücrelerin ve bunların araşidonik asit yollarının (kaskadlarının) aktivasyonunu içeren oksidan işlemlerin organların mikrosirkülatuar endotelini zedelemesi ve bu şekilde hem hayvanlarda hem de insanlarda inflamasyon ve immünite ile ilgili pek çok hastalıkta rol oynamaları beklenebilir (6, 11).

Böbrekte hasarlanma, glomerüler hasarlanma, ATN gibi farklı interstisyel inflamasyon modellerini indükler. Toksik ve iskemik renal hasarlanma sonrası ilk üç gün içinde, iyileşme fazında başlayan inflamatuvar yanıt oluşur. İskemide böbreğin derin korteks ve medullanın dış kenarı, özellikle henle lupunun asenden kulpu etkilenir. Burada ppEGF bulunur. İskemide ppEGF, hızlıca kaybolur. Böbrekte nonspesifik hasarlanma, inflamasyona yol açar. Hasarlanmaya yanıt, immün tanınma olasılığını artırır. İmmünolojik zedelenme de immün aktivasyonla sonuçlanacak olan hasar yanıtını indükler. Bu şekilde gelişen böbrek hasarlanması ve olası immünolojik yanıt önlenabilir ve erken evrelerde tedavi edilebilir (7, 11, 33).

Çoğu patolojik durumda, serbest radikaller tarafından oluşturulmuş son etkiler; serbest radikal oluşumu ve sonlanması arasındaki net dengeye bağlıdır. Serbest radikallerin, birçok patolojik ve fizyolojik olaydan sorumlu olduğu düşünülmektedir.

## 2.2.Verapamil

Verapamil, uzun yıllardan beri klinik kullanımda olan yavaş etkili bir kalsiyum (Ca) kanal blokörüdür. İskemi reperfüzyon hasarında Ca etkisi iyi bilinmektedir. İskemi sırasında hücre membran iyon farklılığını koruyamaz ve özellikle Ca membranı geçer. Ca bazı proteazları aktive ederek ksantin dehidrogenazın, ksantin oksidaza dönüşümünü artırır. Reperfüzyon zedelenmesinde rol oynayan hücresel olayları açıklayan en önemli iki neden, aşırı kalsiyum yüklenmesi ve serbest radikal hasarıdır. Ca kanal blokörlerinin etkisi bu aşamada olur ve ksantin oksidaz oluşumunu bloke eder (7, 8, 18) Bu şekilde iskemi öncesinde kullanılır ise reperfüzyon hasarını önlemektedir.

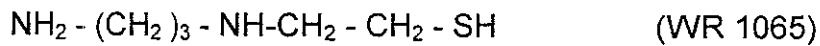
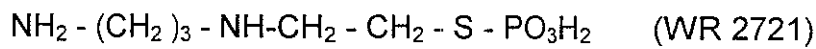
Verapamil, akut böbrek yetmezliğinin bazı modellerinde görülen kalsiyum yüklenmesini önleyerek hücresel hasarlanma üzerine etkili bir blokördür. Mitokondrial kalsiyum yüklenmesi, hem köpekte norepinefrin infüzyon modeliyle oluşturulan akut böbrek yetmezliğinde, hem de sıçanda klempleme ile oluşturulan iskemik akut böbrek yetmezliğinde gösterilmiştir (2, 19). Mitokondrial kalsiyum yüklenmesi, sıcak iskemi sonrası yeniden akım sağlandığında mitokondriyal solunumsal fonksiyon bozukluğuna yol açabilir. Bu hasarın fonksiyonel ve morfolojik kanıtlarıyla ilişkilidir. İskemi öncesi verapamille profilaktik tedavi, mitokondriyal kalsiyum yüklenmesini ve mitokondriyal solunumsal fonksiyon bozukluğunu önleyerek organ fonksiyonunu korumada yarar sağlamış ve iskemik akut böbrek yetmezliğinde ve diğer iskemik böbrek modellerinde histolojik inceleme ile iskemiye bağlı nötrofil infiltrasyonunu ve apoptozisi önleyerek, dokuyu hasardan korumaktadır (36, 37, 38, 44, 49, 50). Kalsiyum kanal blokörlerinin birkaç iskemik akut böbrek yetmezliği modelinde organ fonksiyonunu koruduğuna dair literatür bilgileri olmasına rağmen halen böbreği korumadaki rolü çok yaygın olarak çalışılmamıştır. Son çalışmalar, kalsiyumun oksijen türevi serbest radikallerin mitokondriyal elektron transport zinciri üzerindeki zararlı etkilerini NADH-Koenzim Q redüktaz aktivitesinde azaltma yaparak indüklediğini göstermiştir (2, 18).



### 2.3.Amifostin

Amifostin, ('Walter Reed' , WR 2721, US Bioscience, West Conshohocken, PA: Ethylol) soğuk savaş yıllarında Amerikan ordusu tarafından nükleer savaşın etkilerinden askeri personeli korumak için geliştirilmiş bir kimyasaldır. Amifostin, araştırılan 4400 kimyasal arasından en etkili ve güvenli radyoprotektif olduğu için seçilmiştir. Amifostinin, fare, köpek, ve eşekleri radyasyonun lethal dozlarından koruduğu deneyler ile gösterilmiştir. Klinik kanser tedavisindeki potansiyel rolü ise alkilleyici ajanlara karşı normal dokuyu korurken, tümöral dokuyu korumaması nedeniyle artmıştır (20).

**Etki mekanizması :** Thiol içeren bileşiklerin normal dokuyu radyasyona karşı koruma kapasiteleri 40-50 yıldır bilinmektedir. Buna karşın, ilk olarak kullanılan thiol bileşiklerinden sodyum thiosulfat ve dietildithiokarbamate gibi serbest tioller normal doku toksisitesi ve sitotoksik antitümör etkileri beraber azalttıkları için, klinik olarak kullanılmaları terkedilmiştir. Amifostin ise, fosforile aminothioldür. Amifostinin kemoterapi ve radyoterapiye karşın normal dokuyu koruma etkisi oldukça iyi anlaşılmıştır. Böbrek, akciğer, özofagus, periferel sinirler, barsaklar, tükürük bezleri, oral mukoza, kemik iliği, kalp, immün sistem, testisler ve genetik yapıyı korur. Nörotoksisiteyi ve ototoksisiteyi azaltır. Selektif hemoprotektif ve hemotopoezin restorasyonunda etkilidir. Radyoterapi sonrası oluşan serbest radikalleri detoksifiye eder. Aynı zamanda tedaviye bağlı DNA hasarı sonucu gelişen sekonder tümörlerin önlenmesinde etkilidir. Amifostin bir prodrugdur ve etkisi azdır. Normal dokularda selektif metabolize edilir, tercihli olarak aktif metaboliti uptake edilir ve bu da hücre koruma etkisinin temelidir. İlacın aktif hale gelmesi fosfat grubunun alkalen fosfataz tarafından uzaklaştırılması ve serbest thiol haline gelmesi ile olur (WR 1065) (20, 21, 24, 39).



WR 1065, radyasyon sonucunda meydana gelen oksijen serbest radikallerini giderici etki yaparak hücreleri sitotoksik hasardan korur (21, 26).

Amifostin intravenöz olarak verildiğinde plasmadan çok çabuk temizlenir, ve normal dokulara geçer. Alfa yarı ömrü 1 dk ve beta yarı ömrü 10 dk'dan daha azdır. Bu kısa dolaşım yarı ömrü diğer ilaçlar ile etkileşim potansiyelini azaltır. Amifostin ve metabolitlerinin sistemik dolaşım süresi kısayken, selektif dokuya geçme özelliklerinin yanında uzun doku ömürleri vardır. Tümörlü sıçanlarda yapılan çalışmalarda, radyoaktif işaretli amifostinin tek doz uygulaması sonrası dokulara uptake hızlı olmuş ve 10-15 dk sonra plato seviyeye ulaşmıştır. En önemlisi, 30 dakika sonra karaciğer, böbrek, kalp, kemik iliği gibi normal dokularda seviyeleri tümör dokusuna göre 100 kat fazladır ve en az 10 kat fazlalık 60 dakika süre ile devam etmiştir. Amifostinin 21 gün boyunca günlük dozlarının uygulaması normal dokularda birikim yaparken tümör dokusunda böyle bir etki görülmemiştir (20).

Tümör hücrelerinin amifostini yavaş uptaki, bu hücrelerdeki yapısal farklılığa bağlı olarak membrandan ilacın transport edilememesine ve hücrelerde ilacın defosforilize edilememesine bağlanabilir. Calabro-Jones ve arkadaşları normal dokularda özellikle kapiller seviyede, tümör hücrelerine göre alkalin fosfataz aktivitesinin daha fazla olduğunu göstermişlerdir. Ek olarak normal dokular tümöral dokuya göre daha nötr pH'a sahiptir. Alkalin fosfataz aktivitesi de pH ile ilişkilidir. WR 1065'in hücre membran geçiş hızının da küçük pH değişikliklerinden etkilendiği gösterilmiştir. Amifostin kan beyin bariyerini geçemez.

Hücrel korunmanın mekanizması, alkilleyici ajanlar ve platinumun aktif türlerinin thiol detoksifikasyonuna bağlıdır. Benzer olarak tioller, radyasyonun ve bazı kemoterapotik ajanların oluşturduğu serbest oksijen radikallerini giderirler. Aktif serbest thiol WR 1065, hücre içine girdiğinde 3 etki ile koruma yapar. İlk olarak serbest oksijen radikalleri için potent bir gidericidir. İkinci olarak, koruyucu etkisini hücre içi direk bağlantı yaparak gösterir, böylece alkilleyici ve

platinum ajanların aktif türlerini detoksifiye eder. Amifostin ve özellikle WR 1065 cisplatin-DNA birleşiminin olmasını ve ters cisplatin-DNA birleşimini engeller. Diğer bir potansiyel etkisi de DNA'ya hidrojen atomu transferi veya oksijen azaltılması yolu ile DNA'nın kimyasal yolla tamiri olabilir (20).

**Yan etkiler :** Genel olarak iyi tolere edilir. Geçici yan etkileri bulantı, kusma, baş dönmesi, sıcak basması, hapşırık, uykuya eğilim, serum kalsiyum konsantrasyonunda düşme ve hipotansiyondur. Hipotansiyon ve diğer yan etkileri geçicidir (21).

### 3. Gereç ve yöntemler

Bu deneysel çalışma, Akdeniz Üniversitesi Tıp Fakültesi Cerrahi Araştırma Merkezinde yapıldı. Çalışma için ağırlıkları 250-300 g arasında değişen 72 adet genç erişkin dişi cins sıçan kullanılmıştır (Tablo 3.1).

#### 3.1. Deney protokolü

Beş grup deney hayvanında çalışıldı. Tüm sıçanlara sağ nefrektomi yapıldı, böylece deney gruplarındaki tüm hayvanların renal fonksiyonları ve yaşamları sol böbreğe bağlı hale geldi.

Guruplar şunlardır:

**Grup I (Kontrol);** Sham ameliyatlı sıçanlar ( n=8 ). Bu sıçanlara sadece femoral kateterizasyon ve sağ nefrektomi yapıldı. Herhangi bir tedavi uygulanmadı.

**Grup II (İskemi kontrol);** Tedavi edilmemiş iskemik böbrekli sıçanlar ( n=16). Bu sıçanlara cerrahi uygulamada anlatılan işlem uygulandı.

**Grup III (Verapamil);** Verapamil ile tedavi edilmiş iskemik böbrekli sıçanlar (n=16) Bu sıçanlara iskemi kontrol grubuyla aynı işlem yapıldı ve heparini takiben 2 ml hacminde 0.3 mg/kg verapamil intravenöz olarak verildi.

**Grup IV (Amifostine);** Amifostin ile tedavi edilmiş iskemik böbrekli sıçanlar (n=6). Bu sıçanlara da ikinci gruba uygulanan işlem yapıldı. Farklı olarak 2 ml hacimli sıvı içinde 30 mg/kg amifostin intravenöz olarak verildi.

**Grup V (Verapamil+Amifostine);** Verapamil + amifostin ile tedavi edilmiş iskemik böbrekli sıçanlar ( n=16) İkinci gruba yapılan işleme farklı olarak Verapamil 0.3 mg/kg ve Amifostin 30 mg/kg intravenöz olarak 2 ml sıvı içinde verildi.

**Tablo 3.1. Tüm gruplar ve uygulanan protokoller**

<b>GRUPLAR</b>	<b>İskemi (45 dk.)</b>	<b>Verapamil (0.3 mg/kg)</b>	<b>Amifostin (30 mg/kg)</b>	<b>Verapamil (0.3 mg/kg) Amifostin (30 mg/kg)</b>
<i>I n=8</i>	-	-	-	-
<i>II n=16</i>	+	-	-	-
<i>III n=16</i>	+	+	-	-
<i>IV n=16</i>	+	-	+	-
<i>V n=16</i>	+	-	-	+

### **3.2.Cerrahi uygulama**

Genç erişkin, dişi sıçanlar, 35 mg/kg dozda %10'luk i.m. ketamin hidroklorid (Ketalar® flakon, Eczacıbaşı) ve hafif eter anestezisi ile uyutulduktan sonra ameliyat masasına sırt üstü pozisyonda ekstremitelerinden tesbit edildiler Sağ femoral venleri 24 G branül ile kanüle edildi. Deney başlamadan önce tüm sıçanlardan BUN ve kreatinin için 0.3-0.4 ml. kan örnekleri alındı. Karınları tıraşlanıp, povidon-iodine solusyonu ile temizlendikten sonra, orta hat insizyonu yapıp, sol renal vaskuler pedikül izole edildi. Femoral kanülden 0.5 ml 80 I.U heparin + 2.0 ml isotonik salin ilaç ile veya ilaçsız olarak total 2.5 ml sıvı infüzyonu yapıldı (verapamil, amifostin veya her ikisi). Takiben renal vasküler pedikül atravmatik klemp ile oklüze edildi. Bu işlem sham gruba yapılmadı, bu gruba sadece sağ nefrektomi yapıldı. Karın sıvı kaybını minimuma indirmek için geçici olarak kapatıldı, 45 dakika sonra klemp çıkarıldı (böbrek 4 dk gözlendi, 2 dakika içinde gözle görülür şekilde dolaşım olmadığında, vasküler tromboz olduğu kabul edilerek rat çalışmadan çıkarıldı). Hemen sağ nefrektomi yapıldı,

girişim sırasındaki sıvı ve kan kayıplarını karşılamak için, 2 ml/100 g isotonik salin periton içine verilerek, karın 3/0 ipek ile 2 tabakada devamlı kapatıldı. Her gruptan 6 sıçan, sham operasyonu hariç, reperfüzyondan 5 dakika sonra öldürülerek sol nefrektomi yapıldı. İmmünohistopatolojik inceleme, TBARS (Thiobarbitüric acid reactive substance) ve GSH seviye incelemesi için ayrıldı. Diğer sıçanlar 7 gün boyunca takip edildi. 3. ve 7.gün kuyruk veninden BUN ve Kr çalışılmak için kan alındı. 7. gün sıçanlara, anestezi altında sol nefrektomi yapıldı. Reperfüzyon sonrası 5. dk ve 7.günde çıkarılan sol böbrek materyalinin yarısı hemen formaldehide konuldu ve daha sonra, kör olarak, patolojik inceleme yapıldı. Kalan diğer yarısı hemen nitroz oksitte dondurularak ve -70 C de saklanarak daha sonra MDA ve GSH düzeyi çalışıldı.

Histopatolojik inceleme, sıçan böbreğinde Jablonsky ve arkadaşlarının nekroz gradeleme yöntemi uygulanarak değerlendirildi (9,10).

Ayrıca IgG, IgM, IgA, CD8 ve NK immün boyaları ile boyanarak immünolojik yönden değerlendirildi.

### **3.3. Tiyobarbütirik asit reaktif substanları (TBARS) ölçümü**

Derin dondurucuda  $-70^{\circ}\text{C}$  de saklanan böbrek dokularındaki TBARS analizi esnasında dokular sürekli buz içinde saklandı. Böbrekler korteks ve medulla kısmına ayrılarak homojenizatör (Tri-R Sti-R marka K43 model) ile 10.000 rpm'de 2 dk boyunca 2 ml homojenizasyon sıvısında homojenize edildi. Total volüm yine homojenizasyon sıvısı ile 10 ml.'ye tamamlandı.

Homojenizasyon sıvısı  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ ,  $\text{K}_2\text{HPO}_4$ , KCL, EOTA, Trito-X, bütihidroksi toluen kullanılarak hazırlandı ve pH'sı 7.4'e ayarlandı. Protein çöktürmek amacı ile Triklorasetik asit (TCA), %56'lık konsantrasyonda kullanıldı. Lipid peroksidasyon ürünleri ile renk vermesi için Thiobarbütirik asit (TBA) 5 gramı, 25 ml 1 N NaOH'de çözülerek 500 ml'ye tamamlandı. Standart olarak 1.1.3.3 tetraetoksipropan kullanıldı ve bir milyon kez sulandırılarak en yoğun konsantrasyon olan 4050 nmol/L'ye getirildi.

Proteinlerin çöktürülmesi, 3 ml homojenize doku süspansiyonuna 2 ml TCA eklenerek 4000 rpm'de 15 dk santrifüj uygulanarak yapıldı. Proteini çöken berrak süpernatandan 3 ml alınarak 1 ml TBA eklendi ve 15 dk kaynar suda tutuldu. Daha sonra soğutulan tüpler, köre karşı 532 nm dalga boyunda spektrofotometrede (Spectronic 20D) okundu. Numunelerin absorbanlarına, çizilen standart grafiğinde karşılık gelen konsantrasyon değeri nmol/L olarak saptandı. Kör ve standartlarda TCA ile proteinlerin çöktürme aşamasından itibaren aynı işlemler uygulandı. Sonuçlar homojenizatların protein değerleri ölçüldükten sonra nmol/g protein olarak ifade edildi (30).

### 3.4. Protein ölçümü

Protein ölçümünde Lowry'nin tanımladığı metod kullanıldı (31,32). Homojenize doku süspansiyonlarına 100 µl, 1 N NaOH (100 µl) eklendikten sonra günlük olarak hazırlanan D reaktifinden 1 ml. konularak 20 dk. karanlık bir dolapta bekletildi. Son aşamada folin reaktifi (100 µl) eklenen numuneler 30 dk. daha karanlıkta bekletilerek spektrofotometrede köre karşı 500 nm. dalga boyunda absorbanları saptandı. Kör ve standart (bovine serum albumine) dilüsyonlara da aynı işlem uygulandı. Sonuçlar µg/ml. olarak ifade edildi. TBARS düzeyleri nmol/g protein olarak ifade edildi.

### 3.5. Redükte glutatyon (GSH) tayini

**Prencip:** Fairbanks ve arkadaşlarının tariflediği yöntem kullanılır. Bir disülfid kromojen olan 5, 5'-Dithiobis (2-nitrobenzoik asit) (DTNB)'in, redükte glutatyonun yapısında bulunan sülfidril grupları tarafından indirgenmesiyle oluşan koyu sarı renk değişikliğinin 412 nm dalga boyunda verdiği absorbanın ölçümüne dayanır (35).

**Reaktifler:** Presipite edici solüsyon: 1.67 g glasiel metafosforik asit (Metaphosphoric Acid, Sigma, M-5043), 0.20 g EDTA (Ethylenediamine-

Tetraacetic Acid, Tetrasodium salt, Sigma, ED4SS), 30 g NaCl (Natrimchlorid, Merck, 6400) tartılarak distile su içerisinde çözülür ve volüm 100 ml'ye tamamlanır.

Fosfat solüsyonu:  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  (Sodium Phosphate anhydrous, Sigma, S-0876), 0.3ml

DTNB solüsyonu: 40 mg DTNB (5, 5'-Dithiobis-(2-Nitrobenzoik Acid), Sigma, P-8281) 1g/dL'lik sodyum sitrat (tri-Sodium citrate 5-5'-hidrat extra pure) ile çözülerek volüm 100 ml'ye tamamlanır.

GSH standardı: 100mg/dL'lik GSH (Glutathione Reduced Form, Sigma, G-4251) stok solüsyonundan hazırlanan dilüsyonlarla standart çalışması yapılır.

**İşlemler:** 200  $\mu\text{L}$  homojenize böbrek dokusu üzerine 1.8 ml distile su eklenerek oluşturulan hemolizatın üzerine 3 ml presipite edici solüsyon ilave edilerek oda ısısında 5 dk bekletildi ve filtre kağıdından süzüldü. Elde edilen filtrat ölçüm için kullanıldı. Numune tübüne 500  $\mu\text{L}$  filtrat, kör tübüne 300  $\mu\text{L}$  presipite edici solüsyon ve 200  $\mu\text{L}$  distile su konulduktan sonra her iki tübe 2 ml fosfat solüsyonu eklendi. Tüplere en son DTNB eklenip karıştırılarak 4 dk içerisinde, 412 nm dalga boyunda absorbanları ölçüldü (Schimadzu UV 1600).

**Hesaplama:** Daha önceden hazırlanmış olan 100 mg/dL'lik stok standart solüsyonundan 10, 20, 30, 40 ve 50 mg/dL'lik dilüsyonlar hazırlandı ve standart çalışması yapıldı. Elde edilen absorban değerleri ile konsantrasyon değerleri arasında yapılan regresyon analizi sonucunda;

Konsantrasyon =  $(\text{OD} + 0.0048) / 0.0316$  şeklinde bir ilişki saptandı (korelasyon  $r=0.962$ ). Lowry yöntemine göre değerlendirilen doku protein düzeyleri de hesaplanarak böbrek GSH konsantrasyonu, nmol/g doku proteini olarak ifade edildi.

### 3.6. İmmünohistopatolojik değerlendirme

Yüzde onluk tamponlu formaldehit (formalin) fikse, parafine gömülü dokularda 5 mikrometre kalınlığında kesitler alınıp deparafinizasyon ve rehidratasyon işlemlerinden sonra Hematoksilen-Eozin ve histokimyasal PAS



(periodik asit schiff solüsyonu), 'Masson Trichrome' boya ve immünohistokimyasal IgG, IgM, IgA, CD8, NK ile boyanarak incelendi. Histopatolojik değerlendirilmede Jablonsky'nin tariflediği nekroz gradeleme sistemi kullanıldı (10) (Tablo 3.2). İmmünohistokimyasal boyamada tüm antikorlar için 800 W'lık mikrodalga fırında sitrat buffer içinde 10 dk. ısıtma yöntemiyle antijen retrieval yapıldı. Proteinaz K ile inkübe edildi. Otomatik Dako TechMate 500 immün boyama aleti ile standart streptoavidin-biotin yöntemi ile boyandı. Hidrojen peroksit ve endojen peroksit aktivitesinin önlenmesini takiben preparatlar primer antikorlar, IgG (Dako, MO828, 1/50 sulandırma), IgA (Dako, MO728, 1/50 sulandırma), IgM (Dako, MO702, 1/50 sulandırma), CD8 (Dako, N1592), NK (Novacastra, NCL-NK1, 1/50 sulandırma)'da 40 dk. bekletildi. Kesitler biotinlenmiş sekonder antikorlar damlatılarak (Antimouse IgG/IgM ve antirabbit IgG) 30 dk. bekletildi. Distile su ile yıkayıp 30 dk. streptoavidin-biotin kompleksi ile işleme kondu. Distile su ile yıkayıp son ürün, diaminobenzidine ve hidrojen peroksit ile görüntülenip mayer-hematoksilen ile karşıt boya uygulandı. Sonuçlar semi kantitatif olarak boyanan alan yüzdesi ve boyanma şiddetine göre değerlendirildi.

İmmüno Histokimyasal yöntem ile boyanan hücreler boyanan hücrelerin yüzdesine (B. Y ) göre ve boyanma şiddetine (B. Ş.) göre puanlandı:

- B. Y. Puanı; 0 (% 0 boyanan hücre),*  
*B. Y. Puanı; 1 (% 25'den az boyanan hücre),*  
*B. Y. Puanı; 2 (%25-75 arasında boyanan hücre),*  
*B. Y. Puanı; 3 (% 75'den fazla boyanan hücre) ve*  
*B. Ş. Puanı; 0 (boyanma yok),*  
*B. Ş. Puanı; 1 (hafif),*  
*B. Ş. Puanı; 2 (orta),*  
*B. Ş. Puanı; 3 (şiddetli)*

olarak 0 ile 3 arası puanlandırma yapıldı

Tüm immünohistopatolojik boyama sonuçlarını değerlendirmek amacıyla yapılacak istatistiksel analizde 'Ki kare' testi kullanılacağı için, veriler pozitif ve negatif olarak skorlandırıldı. 0 ve 1 değerleri negatif, birin üzerindeki değerler, pozitif olarak kabul edildi.

*Tablo 3.2 Sıçan böbreklerinde histopatolojik (H-E ve PAS boyama yöntemi) olarak nekroz gradelenmesi*

<i>Grade</i>	<i>Açıklama</i>
<i>Grade 0</i>	<i>Normal.</i>
<i>Grade 1</i>	<i>Bazı hücrelerde mitozlar ve nekroz var</i>
<i>Grade 2</i>	<i>Canlı proksimal kıvrıntılı tübüllere komşu hücrelerde nekroz</i>
<i>Grade 3</i>	<i>Proksimal kıvrıntılı tübüllerin distal üçte birinde nekroz ile iç kortekse uzanan bant nekrozu.</i>
<i>Grade 4</i>	<i>Proksimal kıvrıntılı tübüllerin tüm üç segmentinde de nekroz.</i>

### **3.7.İstatistiksel değerlendirme**

Deney sonuçları ortalama  $\pm$  standart sapma (Std) olarak verildi. Grupların BUN, Kreatinin, MDA, GSH değerleri arası farklılıklar, "Kruskal Vallis" testi, iki grup arası ortalamanın karşılaştırılmasında, "Mann Whitney U" testi kullanıldı. Histopatolojik inceleme sonuçları pozitif ve negatiflik olarak sınıflandırılıp, karşılaştırılmasında "Ki kare" ve beklenen değer 5'in altındaysa, "Fisher'in kesin ki kare" testi kullanıldı. Tüm istatistiksel değerlendirmelerde,  $P < 0.05$  anlamlı olarak kabul edildi.

İstatistiksel değerlendirmeler, SPSS (Statistical Package for Social Sciences) for Windows 10.0 ile yapıldı.

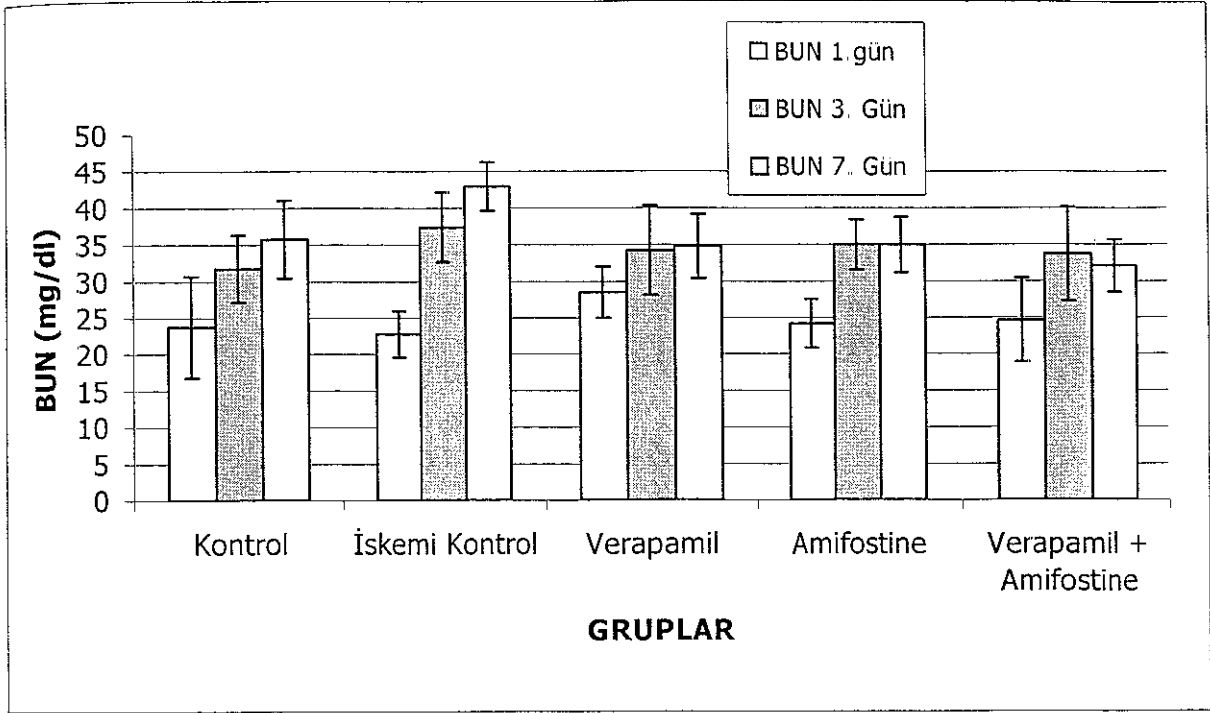
## 4. Bulgular

### 4.1. Yedi gün yaşatılan sıçanlarda ortalama BUN değerleri

Yedi gün yaşayan çalışma gruplarının hepsinde, 1., 3. ve 7. günlerde, ortalama BUN değerleri farklı bulundu, farklar istatistiksel olarak anlamlı idi (gruplar sırasıyla,  $p=0.002$ ,  $p=0.000$ ,  $p=0.011$ ,  $p=0.002$ ,  $p=0.001$ ) (Tablo ve grafik 4 1) Yine tüm gruplarda, 3. ve 7. gün ortalama BUN değerleri istatistiksel anlamlı olarak, 1. gün ortalama BUN değerinden yüksek bulundu. Gruplar, 1. gün-3. gün sırasıyla  $p=0.012$ ,  $p=0.005$ ,  $p=0.013$ ,  $p=0.005$ ,  $p=0.005$ , 1. gün-7. gün  $p=0.012$ ,  $p=0.005$ ,  $p=0.007$ ,  $p=0.005$ ,  $p=0.012$ . Sadece iskemi-kontrol grubunda, 7. gün ortalama BUN değeri, 3. gün ortalama BUN değerinden istatistiksel anlamlı olarak yüksekti ( $p=0.018$ ). Beş grubun da 7. günlerdeki ortalama BUN değerleri, farklı olarak bulundu ( $p=0.000$ ). 1. ve 3. günlerde ortalama BUN değerleri arasında anlamlı fark yoktu ( $p > 0.005$ ) 7. günde iskemi-kontrol grubu ortalama BUN değeri, diğer tüm gruplardan istatistiksel anlamlı olarak yüksek bulundu ( $p=0.000$ ).

Tablo 4 1 Yedi gün yaşayan sıçanlarda ortalama BUN değerleri  $\pm$  standart sapmaları

Gruplar	BUN 1	BUN 3	BUN 7	P
1. Kontrol	23.8 $\pm$ 6.94	31.8 $\pm$ 4.59	35.8 $\pm$ 5.26	0.002
2. İskemi kontrol	22.8 $\pm$ 3.16	37.4 $\pm$ 4.77	43.0 $\pm$ 3.33	0.000
3. Verapamil	28.5 $\pm$ 3.54	34.2 $\pm$ 6.14	34.8 $\pm$ 4.39	0.011
4. Amifostine	24.2 $\pm$ 3.36	35.0 $\pm$ 3.43	35.0 $\pm$ 3.80	0.002
5. Verapamil+Amifostine	24.6 $\pm$ 5.74	33.7 $\pm$ 6.41	32.1 $\pm$ 3.60	0.001
P	0.060	0.110	0.000	



Grafik 4.1 Yedi gün yaşayan sıçanlarda ortalama BUN değerleri

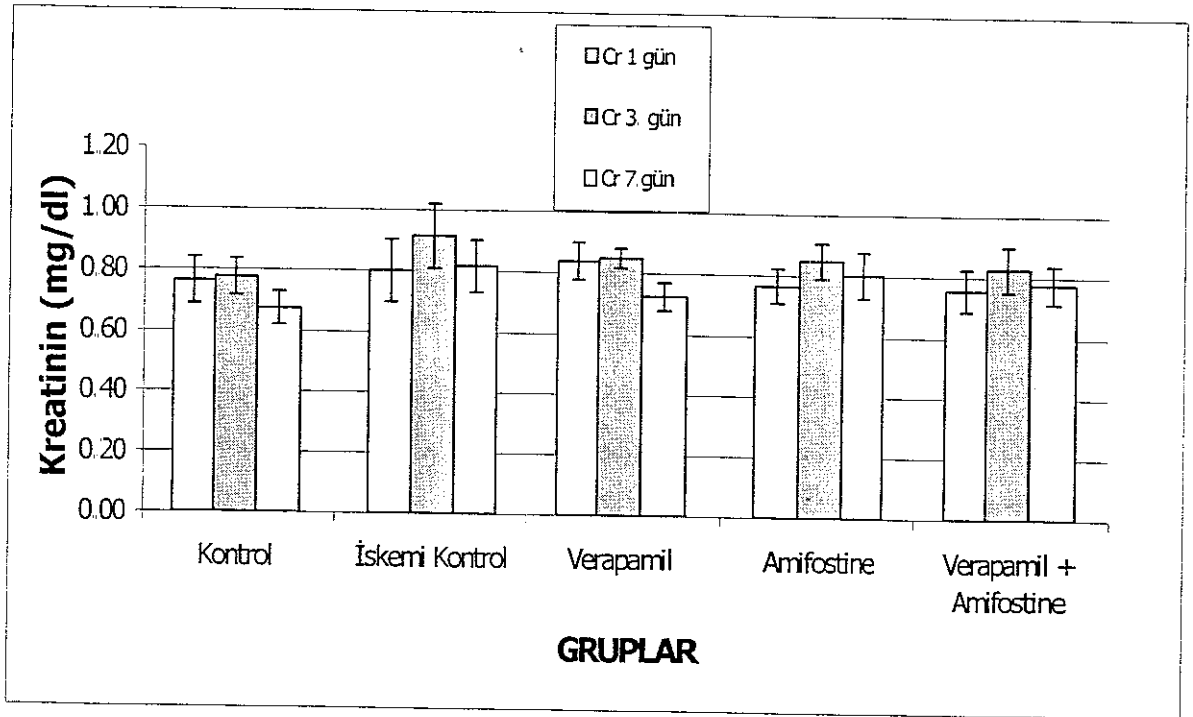
#### 4.2. Yedi gün yaşatılan sıçanlarda ortalama serum Kreatinin değerleri

Yedi gün yaşayan çalışma gruplarının hepsinde, 1, 3. ve 7. günlerde ortalama serum kreatinin değerleri farklı bulundu. Farklar sadece ilaç tedavisi uygulanan üç grupta istatistiksel olarak anlamlı idi (sırasıyla  $p > 0.005$ ,  $p > 0.005$ ,  $p = 0.002$ ,  $p = 0.025$ ,  $p = 0.014$ ). Bu üç grupta 3. gün serum kreatinin değerleri, 1. gün ve 7. gün serum kreatinin değerlerinden istatistiksel anlamlı olarak daha yüksekti ( $p = 0.005$ ). Diğer gruplarda ise istatistiksel olarak anlamlı farklılık saptanmadı.

Beş grubun 3. ve 7. günlerdeki ortalama serum kreatinin değerleri farklı olarak bulundu (sırasıyla  $p = 0.007$ ,  $p = 0.001$ ). 7. gün ortalama serum kreatinin değerleri iskemi-kontrol grubunda en yüksek değer olarak saptandı.

Tablo 4.2. Yedi gün yaşayan sıçanlarda ortalama Kreatinin değerleri±standart sapmaları

Gruplar	Kreat 1	Kreat 3	Kreat 7	P
1. Kontrol	0.764 ± 0.077	0.776 ± 0.059	0.675 ± 0.055	0.072
2. İskemi kontrol	0.801 ± 0.102	0.915 ± 0.105	0.818 ± 0.085	0.091
3. Verapamil	0.839 ± 0.061	0.850 ± 0.032	0.726 ± 0.046	0.002
4. Amifostine	0.766 ± 0.056	0.849 ± 0.058	0.803 ± 0.075	0.025
5. Verap + Amifostine	0.756 ± 0.069	0.827 ± 0.074	0.776 ± 0.062	0.014
P	0.106	0.007	0.001	



Grafik 4.2 Yedi gün yaşayan sıçanlarda ortalama serum kreatinin değerleri

### **4.3. Yedinci gün ve 0. gün alınan böbreklerde ortalama MDA değerleri**

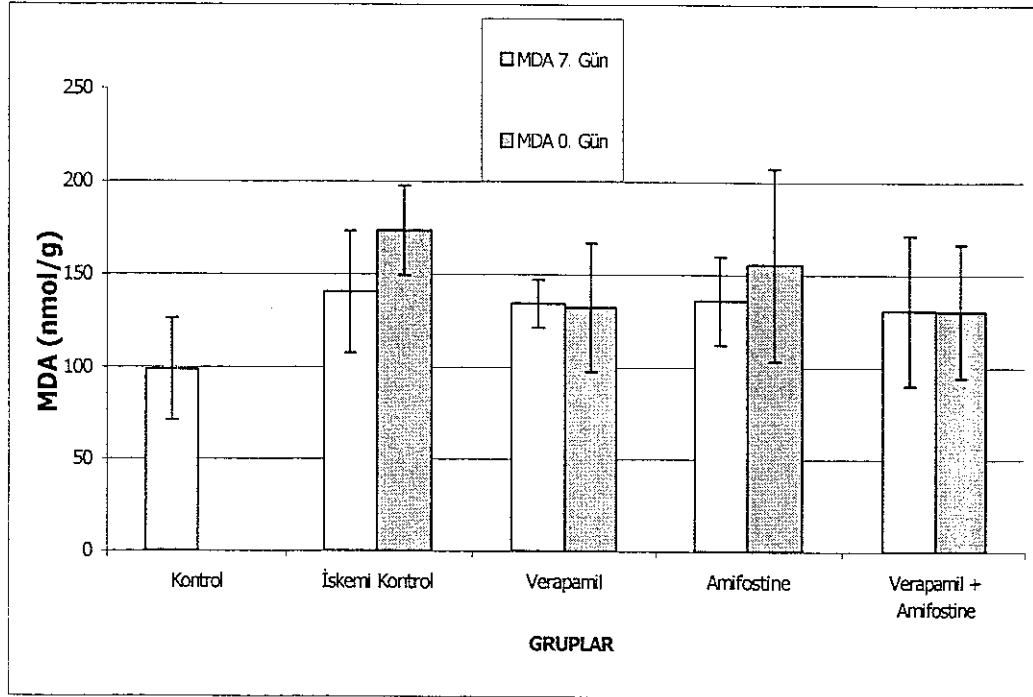
Yedi gün yaşayan beş gruptaki toplam 48 sıçanın 7. gün alınan sol böbreklerinden çalışılan ortalama MDA düzeyleri arasında istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık saptanmadı ( $P=0.105$ ). 0. gün öldürülen sıçanların böbreklerinden yapılan MDA sonuçları arasında yine anlamlı istatistiksel fark saptanmadı ( $P=0.211$ ) (Tablo ve grafik 4.3).

### **4.4. Yedinci gün ve 0. gün alınan böbreklerde ortalama GSH değerleri**

Yedi gün yaşayan beş gruptaki toplam 48 sıçanın 7. gün alınan sol böbreklerinden çalışılan ortalama GSH düzeyleri arasında istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık saptandı ( $P=0.00$ ) Kontrol grubunda ortalama GSH düzeyi 85.58 nmol/g iken, iskemi kontrol grubunda belirgin düşme (66.05 nmol/g) mevcuttu ( $P=0.010$ ) En yüksek GSH düzeyi verapamil grubundaydı (104.58 nmol/g). Iskemi kontrol grubuyla verapamil uygulanan grup arasında anlamlı bir yükseklik saptandı ( $P=0.003$ ). Iskemi kontrol grubuyla amifostin grubu arasında artma yönünde anlamlı bir farklılık saptandı ( $P=0.000$ ). 0 gün öldürülen sıçanların sol böbreklerinden çalışılan GSH sonuçları arasında anlamlı istatistiksel fark saptandı ( $P=0.003$ ) En düşük değer iskemi kontrol grubundaydı (60.86 nmol/g), en yüksek değer ise amifostin grubundaydı. (104.46 nmol/g) (Tablo ve grafik 4.4).

Tablo 4.3. 7 gün ve 0 gün alınan böbreklerde ortalama MDA değerleri ve standart sapmaları

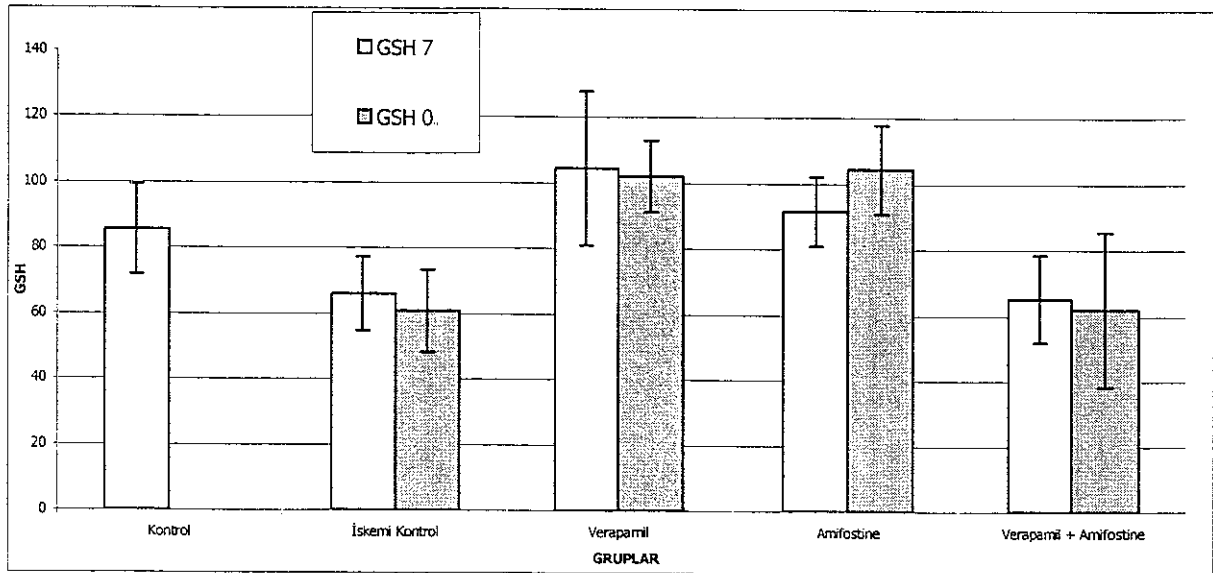
Gruplar	MDA 7.ort. ± Std. (nmol/g Pr)	MDA 0.ort. ± Std. (nmol/g Pr.)
1. Kontrol	98.7 ± 27.7	
2. İskemi kontrol	140.4 ± 32.9	173.75 ± 24.16
3. Verapamil	134.4 ± 12.9	132.44 ± 34.72
4. Amifostine	135.9 ± 23.7	155.46 ± 52.06
5. Verapamil+Amifostine	130.9 ± 40.6	130.40 ± 36.07
P	0.105	0.211



Grafik 4.3 Yedinci gün ve 0 gün alınan böbreklerde ortalama MDA değerleri

Tablo 4 4 Yedinci gün ve 0 gün alınan böbreklerde ortalama GSH (nmol/g Protein) değerleri ve standart sapmaları

Gruplar	GSH 7.ort. ± Std. (nmol/g Pr.)	GSH 0.ort. ± Std. (nmol/g Pr.)
1. Kontrol	85.58 ± 13.77	
2 İskemi kontrol	66.05 ± 11.10	60.86 ± 12.46
3 Verapamil	104.58 ± 23.45	102.22 ± 10.84
4 Amifostine	91.63 ± 10.60	104.46 ± 13.55
5 Verapamil+Amifostine	65.27 ± 13.16	62.05 ± 23.61
P	0.000	0.003



Grafik 4 4 Yedinci gün ve 0 gün alınan böbreklerde ortalama GSH (nmol/g Protein) değerleri



#### 4.5. İmmünohistopatolojik değerlendirme

Kontrol grubunda postoperatif 7. gün alınan 8 böbrekten hiç birinde nekroza rastlanmadı. İskemi-kontrol grubunda postoperatif 0. gün alınan 6 böbrekten üçünde grade 2 nekroz saptandı (resim 4.2). Diğer üç böbrekte ise grade 1, 3 ve 4 nekrozlar görüldü (resim 4.1 ve resim 4.3). Postoperatif 7. gün ise 5 böbrekte grade 1 ve grade 2, diğer 5 böbrekte de grade 3 ve grade 4 nekrozlar saptandı. İlaç tedavisi uygulanan üç grupta da hem postoperatif 0. gün hem de postoperatif 7. gün grade 4 ileri dereceli nekroz saptanmadı. Postoperatif 7. gün alınan böbreklerden HE boyasıyla birleştirilmiş nekroz gradine göre değerlendirmede tüm gruplar arasında anlamlı bir istatistiksel fark mevcuttu ( $p < 0.05$ ) (Tablo 4. 5.a).

Postoperatif 0. gün alınan böbreklerde CD8 boyasıyla yapılan incelemede gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark mevcuttu ( $p = 0.0125$ ). İskemi kontrol grubunda CD8 (+) lenfositlerin bulunduğu böbrek sayısı 4 iken, 2 böbrekte CD8 lenfositleri görülmedi. İlaçlı gruplarda ise sadece bir böbrekte CD8(+) lenfositler saptandı (Tablo 4. 5.e) (resim 4.4).

Postoperatif 7 gün alınan böbreklerde IgM boyası ile yapılan incelemede kontrol grubunda sadece bir böbrekte IgM(+) saptanırken, iskemi-kontrol grubu ve ilaçlı gruplar arasında anlamlı bir fark saptanmadı (Tablo 4. 5.h)

Tablo 4.5.a. Postoperatif 0. ve 7. gün alınan böbreklerin HE boyasıyla yapılan değerlendirmede nekroz gradelemesi

Histopatolojik	Postoperatif 0. gün						Postoperatif 7 gün					
	0	1	2	3	4	n	0	1	2	3	4	n
Grade												
Kontrol	0	0	0	0	0	0	8	0	0	0	0	8
İskemi Kontrol	0	1	3	1	1	6	0	3	2	3	2	10
Verapamil	2	1	2	1	0	6	3	5	2	0	0	10
Amifostine	2	2	2	0	0	6	3	5	1	1	0	10
Verap+Amifos	1	1	2	2	0	6	2	4	3	1	0	10

Tablo 4 5 b Postoperatif 7 gün alınan böbreklerde HE boyasında birleştirilmiş nekroz grade'ine göre değerlendirme

Gruplar	NEKROZ		
	Pozitif	Negatif	Toplam
1. Kontrol	0	8	8
2. İskemi-Kontrol	7	3	10
3. Verapamil	2	8	10
4. Amifostine	3	7	10
5. Verapamil+Amifostine	4	6	10

P= 0.045

Tablo 4 5 c Postoperatif 0. gün alınan böbreklerde HE boyasıyla yapılan inceleme

Gruplar	HE Grade		
	Pozitif	Negatif	Toplam
1. İskemi-Kontrol	4	2	6
2. Verapamil	3	3	6
3. Amifostine	3	3	6
4. Verapamil+Amifostine	5	1	6

P= 0.581

Tablo 4 5 d Postoperatif 7 gün alınan böbreklerde CD8 boyasıyla yapılan inceleme

Gruplar	CD8		
	Pozitif	Negatif	Toplam
1. Kontrol	2	6	8
2. İskemi-Kontrol	4	6	10
3. Verapamil	5	5	10
4. Amifostine	3	7	10
5. Verapamil+Amifostine	1	9	10

P= 0.373

Tablo 4.5.e Postoperatif 0. gün alınan böbreklerde CD8 boyasıyla yapılan inceleme

Gruplar	CD8		
	Pozitif	Negatif	Toplam
1. İskemi-Kontrol	4	2	6
2. Verapamil	1	5	6
3. Amifostine	0	6	6
4. Verapamil+Amifostine	0	6	6

*P* = 0.0125

Tablo 4.5.f Postoperatif 7 gün alınan böbreklerde NK boyasıyla yapılan inceleme

Gruplar	NK		
	Pozitif	Negatif	Toplam
1. Kontrol	1	7	8
2. İskemi-Kontrol	4	6	10
3. Verapamil	2	8	10
4. Amifostine	2	8	10
5. Verapamil+Amifostine	4	6	10

*P* = 0.547

Tablo 4.5.g Postoperatif 0 gün alınan böbreklerde NK boyasıyla yapılan inceleme

Gruplar	NK		
	Pozitif	Negatif	Toplam
1. İskemi-Kontrol	3	3	6
2. Verapamil	4	2	6
3. Amifostine	1	5	6
4. Verapamil+Amifostine	0	6	6

*P* = 0.0576

Tablo 4 5 h. Postoperatif 7. gün alınan böbreklerde IgM boyasıyla yapılan inceleme

Gruplar	IgM		
	Pozitif	Negatif	Toplam
1. Kontrol	1	7	8
2. İskemi-Kontrol	8	2	10
3. Verapamil	8	2	10
4. Amifostine	6	4	10
5. Verapamil+Amifostine	8	2	10

P=0 0129

Tablo 4 5 i. Postoperatif 0 gün alınan böbreklerde IgM boyasıyla yapılan inceleme

Gruplar	IgM		
	Pozitif	Negatif	Toplam
1. İskemi-Kontrol	4	2	6
2. Verapamil	4	2	6
3. Amifostine	3	3	6
4. Verapamil+Amifostine	3	3	6

P= 0 9154

Tablo 4 5 j. Postoperatif 7. gün alınan böbreklerde IgA boyasıyla yapılan inceleme

Gruplar	IgA		
	Pozitif	Negatif	Toplam
1. Kontrol	2	6	8
2. İskemi-Kontrol	8	2	10
3. Verapamil	6	4	10
4. Amifostine	8	2	10
5. Verapamil+Amifostine	5	5	10

P= 0 0969

Tablo 4 5. k. Postoperatif 0. gün alınan böbreklerde IgA boyasıyla yapılan inceleme

Gruplar	IgA		Toplam
	Pozitif	Negatif	
1. İskemi-Kontrol	2	4	6
2. Verapamil	3	3	6
3. Amifostine	3	3	6
4. Verapamil+Amifostine	3	3	6

P=0.918

Tablo 4 5. l. Postoperatif 7. gün alınan böbreklerde IgG boyasıyla yapılan inceleme

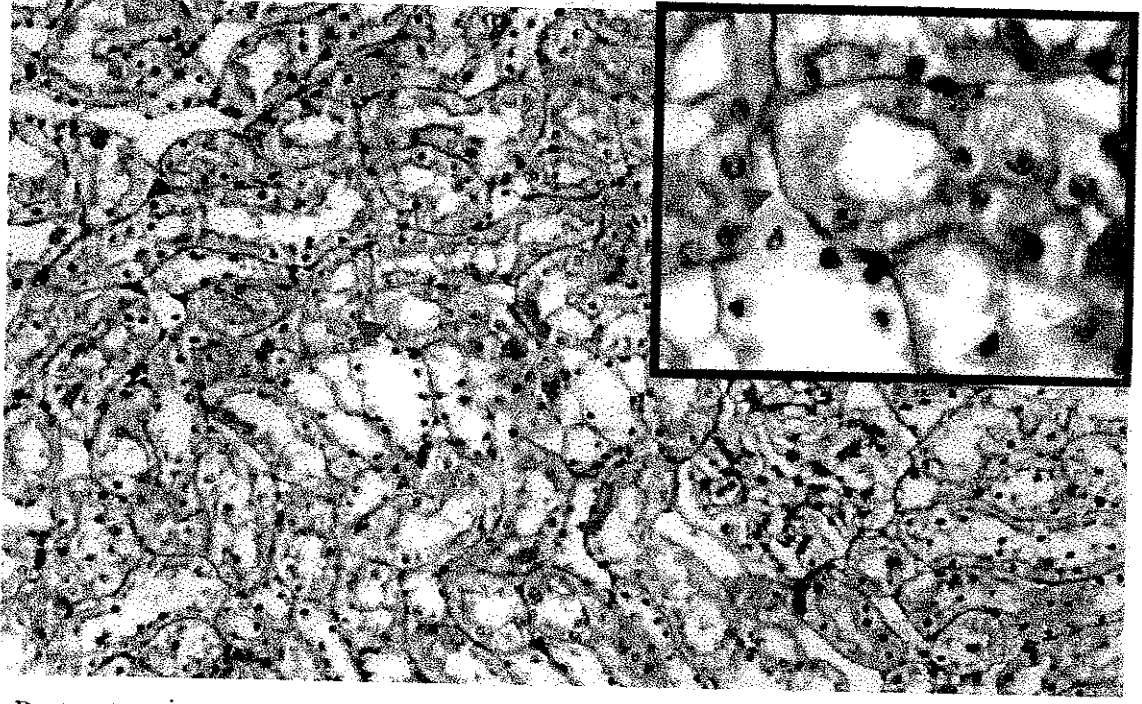
Gruplar	IgG		Toplam
	Pozitif	Negatif	
1. Kontrol	3	5	8
2. İskemi-Kontrol	5	5	10
3. Verapamil	6	4	10
4. Amifostine	5	5	10
5. Verapamil+Amifostine	5	5	10

P= 0.924

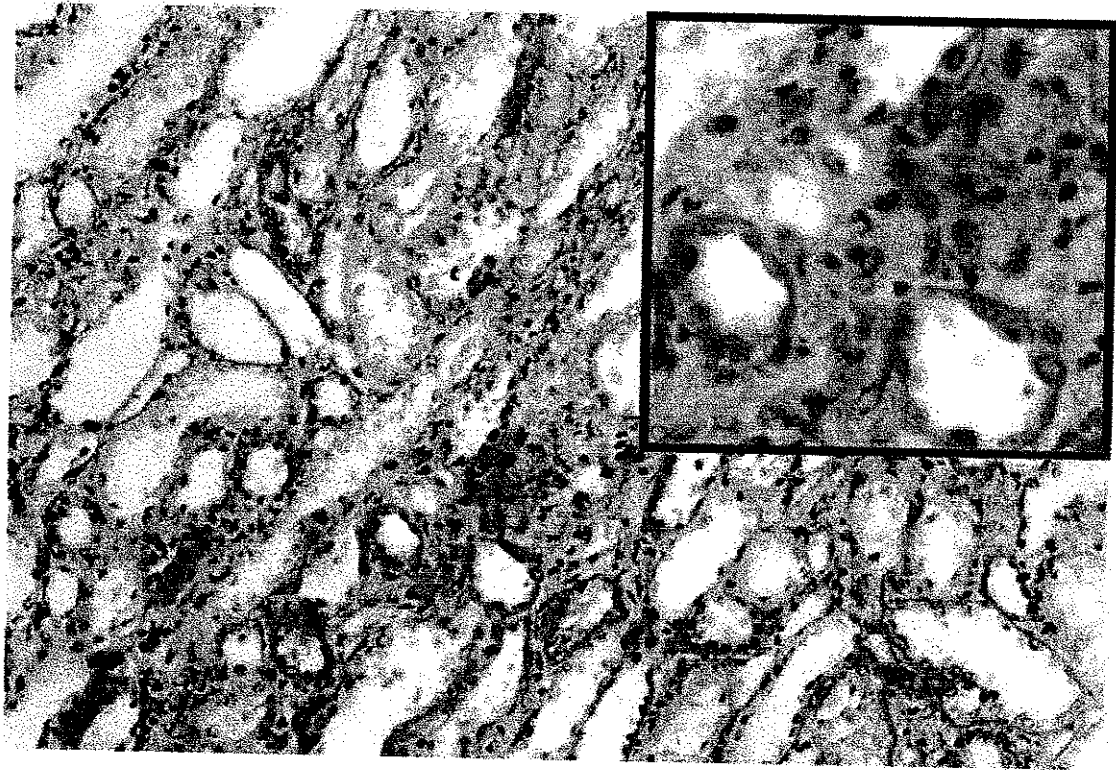
Tablo 4 5. m. Postoperatif 0. gün alınan böbreklerde IgG boyasıyla yapılan inceleme

Gruplar	IgG		Toplam
	Pozitif	Negatif	
1. İskemi-Kontrol	4	2	6
2. Verapamil	3	3	6
3. Amifostine	4	2	6
4. Verapamil+Amifostine	4	2	6

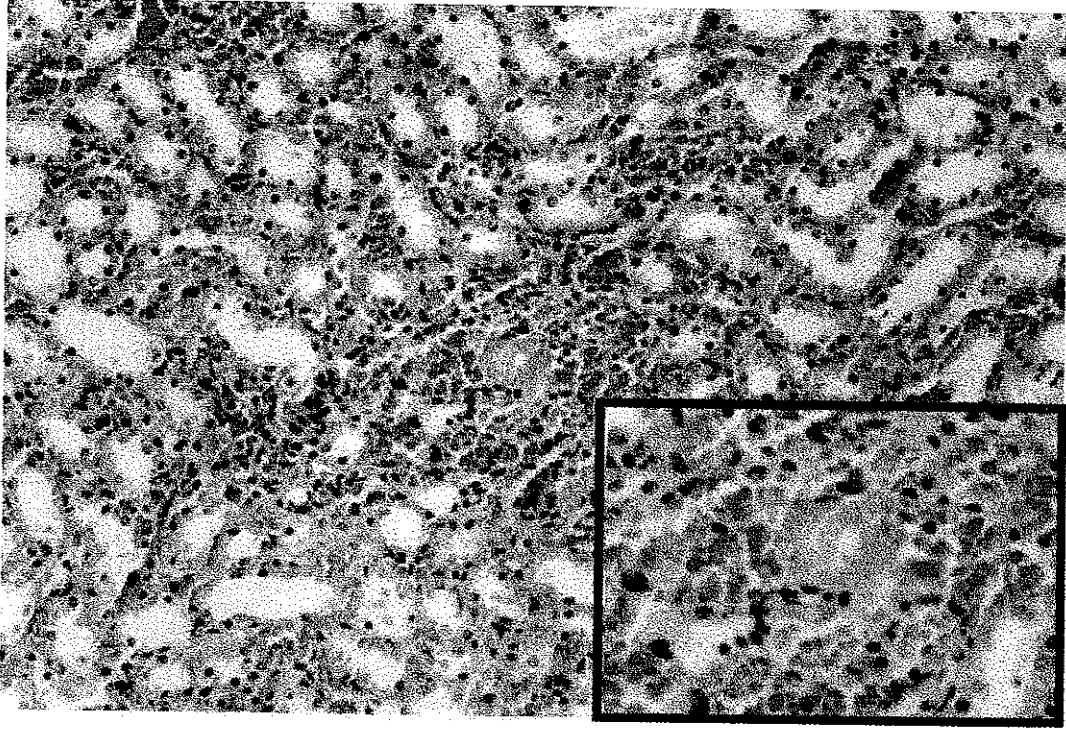
P= 0.911



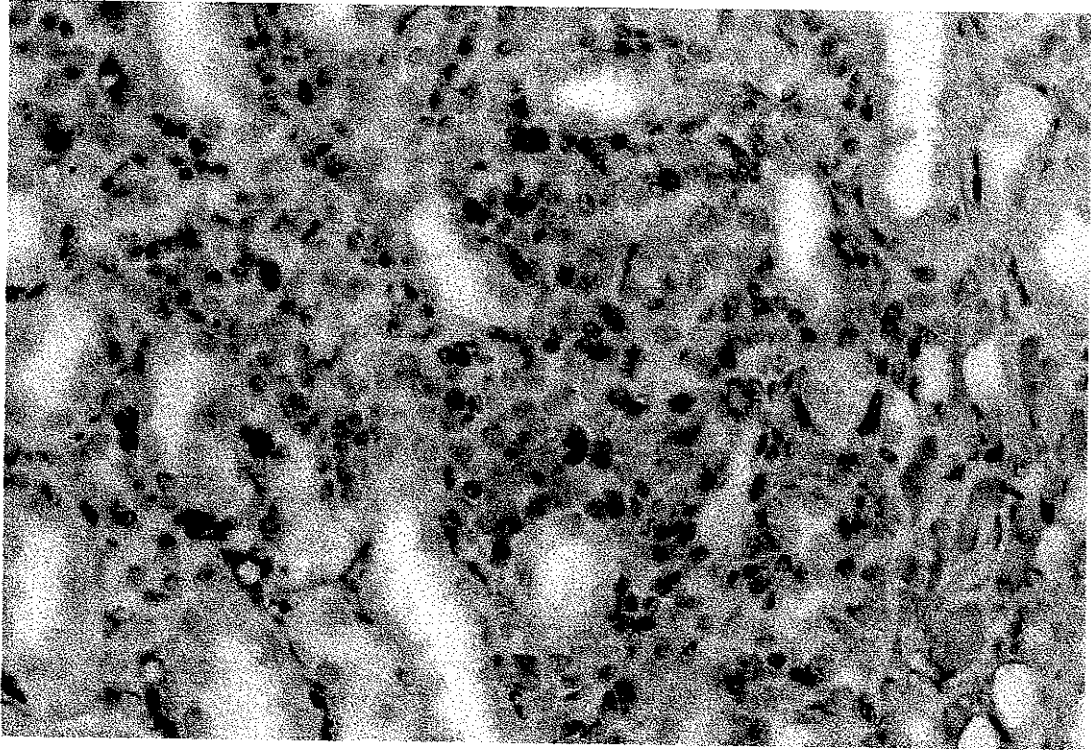
*Resim 4.1. İskemi-kontrol grubu postoperatif 0. gün alınan böbrek dokusunda grade 1 nekroz. Okla işaretli alan, proksimal tübüllerde tek hücre nekrozunu belirtmektedir. x200, PAS*



*Resim 4.2. İskemi-kontrol grubu postoperatif 7. gün alınan böbrek dokusunda grade 2 nekroz. Proksimal kıvrımlı tübüllere komşu hücrelerde nekroz. x200, HE*



*Resim 4.3. İskemi-kontrol grubu postoperatif 0. gün alınan böbrek dokusunda grade 3 nekroz. Proksimal tübüllerin distal üçte birinde nekroz ile iç kortekse uzanan bant nekrozu. x200, HE*



*Resim 4.4. İskemi-kontrol grubu postoperatif 7. gün alınan böbrek dokusunda CD8 ile boyanan T hücreleri görülmektedir. x400.*

## 5. Tartışma

İskemi ve reperfüzyonun organda yaratmış olduğu hasarda serbest radikal olarak bilinen oksijen türevi moleküllerin, önemli roller üstlendiklerinin gösterilmesinden sonra araştırmacılar bu konuya yönelmişler ve pek çok antioksidan özelliğe sahip kimyasal madde bulmuşlardır. Yapılan klinik ve deneysel çalışmalar sonucunda serbest radikallerin dokuda oluşturdukları hasarı tamamen ortadan kaldıran bir kimyasal madde keşfedilmiş değildir. Sadece organ transplantasyonu değil, pankreatit, myokart infarktüsü, ateroskleroz, pulmoner yetmezlik, serebral iskemi gibi birçok ölüm nedeninin ardındaki patolojik olaylarda serbest radikal aracılı doku hasarının önemli olduğu gösterilmiştir. Serbest radikallerin hangi aşamada etkili oldukları, neden yada sonuç ilişkisinin hangi noktasında önemli oldukları tam olarak ortaya konamamıştır.

Biz bu deneysel çalışmada, radyoterapi ve bazı kemoterapötik ajanların sitotoksik etkilerine karşı, normal dokuyu korumak amacıyla medikal onkolojide sıklıkla kullanım alanına girmiş olan amifostinin, böbrekte oluşturulan İ/R hasarında da dokuyu koruyucu etkisinin olup olmadığını araştırmak ve böylece organ transplantasyonu dahil İ/R'la seyreden birçok klinik durumda kullanım alanı bulmayı amaçladık. Bunu araştırırken, daha önce birçok kez deneysel olarak böbrek İ/R hasarında farklı mekanizmalarla önleyici etkisi gösterilen bir Ca kanal blokörü olan verapamille, amifostinin etkisini karşılaştırıp, birbirlerinin etkisini potansiyalize edip etmediklerini araştırdık. Bu değerlendirmede, böbrek fonksiyon testleri (BUN, serum kreatinin), serbest oksijen radikalleri tarafından oluşturulan membran lipid peroksidasyon ürünü malondialdehid (MDA), serbest radikal giderici etkisi olan redükte glutatyon (GSH) düzeyleri bakıldı. Ayrıca 0. gün ve 7 gün alınan böbrek dokuları, ışık mikroskopuyla immünohistokimyasal olarak değerlendirildi. HE, PAS, boyaları ile iskemi ve reperfüzyona bağlı nekroz gradelemesi yapılırken, IgM, IgG, IgA, CD8, NK boyaları ile de böbrekte İ/R'a bağlı immünojenik değişiklik mevcudiyeti ve ilaç tedavisiyle gerileme olup olmadığı araştırıldı.



Tüm gruplarda 1., 3. ve 7 gün bakılan BUN değerlerinde artma ( $P < 0.05$ ) olmasına rağmen, ilaç tedavisi uygulanan üç grupta da iskemi-kontrol grubundaki kadar yükselme saptanmadı. Üçüncü gün serum kreatinin değerleri, tüm gruplarda ilk günden daha yüksek olmasına rağmen 7. günde azalma vardı. En belirgin düzelme, verapamil ile tedavi edilmiş gruptaydı ( $P < 0.05$ ) (Tablo 4.1. ).

Membran lipid peroksidasyonu ürünü olan ve dokuda bakılan MDA düzeylerinde 0. ve 7 gün tüm gruplar arasında anlamlı bir fark saptanmadı. I/R hasarı bizim deneyimizde membran lipid peroksidasyonu ürünlerinde artışa yol açmadı. Antioksidan savunma mekanizmalarından olan, GSH düzeyleri, iskemi-kontrol grubunda düşükken, verapamil ile tedavi edilen grupta 0. ve 7. gün yüksek düzeylerde saptandı ( $P < 0.05$ ). Verapamil+amifostin grubunda ise düşme mevcuttu ve iki ilacın birlikte uygulanmasıyla koruyucu etkinin artmadığı saptandı.

Aktan ve arkadaşları, 60 dk. lık sıcak iskemi ve reperfüzyona maruz bırakılan Wistar albino sıçanlarda iskemi-reperfüzyon hasarında stabil bir prostasiklin analogu olan iloprost (ZK 36374) ile bir kalsiyum kanal blokörü olan verapamilin hücre koruyucu etkisini araştırmışlardır (3). Böbrek iskemi reperfüzyon modelinde 7 günlük survive analizi bakıldı. Kreatinin konsantrasyonu, 3. gün, verapamil+iloprost grubunda iskemi grubundan daha düşüktü, fakat farklılık belirgin değildi. Kreatinin düzeyi, 7. günde, verapamil ve iloprost gruplarında, kontrol grubundan düşüktü. Reperfüzyon sonrası tüm gruplardaki böbrek korteks dokusundaki MDA konsantrasyonları normalden yüksekti. GSH düzeyleri iskemi grubunda, diğer gruplardan daha düşüktü. Bu sonuçlar verapamil ve iloprostun 60 dk. iskemi ve reperfüzyon uygulanan böbrek dokularında ayrı ayrı birbirinden bağımsız hücre koruyucu etkileri olduğunu göstermektedir. Her iki ilaç birlikte kullanıldığında etkide artma olmuştur. Hücre koruma mekanizması sadece lipid peroksidasyonunu süprese ederek değildir. Bu çalışmada hematoksilen-eosin boyasıyla yapılan histopatolojik değerlendirmede gruplar arasında belirgin istatistiksel fark saptanmamıştır (3)

Kalp ve barsaklar dahil birçok organda iskemi-reperfüzyona bağlı doku hasarı incelenmiştir. Baker ve arkadaşları, serbest radikal giderici olan süperoksit

dismutazın dokuyu iskemi sonrası reoksijenizasyon sırasındaki yapısal hasarlardan koruduğunu saptamışlardır (10).

Bizim çalışmamızda, Aktan ve arkadaşlarının da belirttiği gibi verapamil, kreatinin değerlerinde istatistiksel olarak anlamlı bir düşüş sağlarken, amifostin ile birlikte kullanıldığında da aynı etkiyi göstermiştir. MDA düzeyleri arasında 5 grupta da fark saptanmadı. Fakat GSH düzeylerinde, tüm tedavi uygulanan gruplarda, iskemi-kontrol grubuna göre anlamlı bir yükselme saptandı. Bu çalışmadan farklı olarak biz, H-E ve PAS boyaları ile yaptığımız nekroz gradelemede istatistiksel olarak anlamlı fark bulduk. İskemi-kontrol grubunda oluşturulan yüksek dereceli nekrozlara tedavi uygulanmış 3 grupta da rastlanmadı. Reperfüzyon sonrası ilk 5 dakikada yapılan nefrektomi materyallerinin incelenmesinde, proksimal kıvrıntılı tüplerin etrafında mononükleer hücre infiltrasyonu gördük.

Caroline Spencer ve arkadaşlarının yapmış olduğu amifostin ile ilgili araştırmalar sonucunda, WR 2721'in aktif metaboliti WR 1065, sıçan kalbinde, in vitro olarak kemoterapi ilaçlarının oluşturduğu hasarda koruyucu olduğu ve intrasellüler glutatyon seviyelerinde artma (%33-%74) yaptığı gösterilmiştir. Ayrıca böbrekte amifostin, küçük dozlarda birden çok defa kullanıldığında, tek kullanımından daha büyük oranda koruyucudur (21).

Pissarek ve arkadaşlarının yaptığı yaptığı bir deneysel çalışmada; WR 2721'in kanser hücrelerinde radioprotektif etkinliğinde, radikal giderici madde olduğu gösterilmiş ve reperfüze kalpte koruyucu potansiyeli test edilmiştir. İn vitro olarak 30 dk. iskemi ve takiben 30 dk. reperfüzyon uygulanan izole sıçan kalbinde elektron paramanyetik rezonans spin trap tekniğiyle bir radikal jenerasyon sistemde radikal giderici özellikleri araştırılmıştır. Anestezi altında göğsü açılan sıçanlarda 60 dk. bölgesel iskemiye takiben 60 dk. reperfüzyon sırasında yüksek enerjili fosfatların etkisi fosforil nükleer manyetik rezonans spektroskopisi yöntemiyle sol ventriküler sistolik segmental uzunluk değişimi üzerine etkinliği incelenmiştir. WR 2721, radikallerin vasküler konsantrasyonunu 5 ve 12.5 dk. ılık reperfüzyon süresi sonunda, %78'e kadar düşürmüştür. Mevcut verilerle WR 2721'in reperfüze kalbin endojen olarak salınan serbest radikallere

maruz kalma oranında azalma, yüksek enerjili fosfatlarda parsiyel bir korunma ve postiskemik kontraktilitedeki artış nedeniyle myokard hasarlanması konusunda ileri çalışmalar gerekmektedir (26).

Bizim çalışmamız da Pissarek ve arkadaşlarının bulduğu netice doğrultusundadır. Amifostin uygulanan grupta da verapamil uygulanan gruptaki gibi GSH düzeylerinde yükselme, kreatinin düzeylerinde düşme ve histopatolojik incelemede düşük gradeli nekrozlara rastlanmıştır (Tablo 4.2. ).

Shapiro ve arkadaşları, izole, perfüze sıçan böbreği kullanarak, renal allogreft korunmasında bir kalsiyum kanal blokörü olarak verapamilin kullanım potansiyelini araştırmışlardır (2). İskemik hasar oluşturmada iki model kullanılmıştır. Birinci modelde, böbrek, perfüzyon sırasında 37 °C de ve 40 dk iskemiye maruz bırakılmış. 2.5, 5 ve 100 mM dozlarında verapamilin perfüzyon solüsyonuna eklenmesi ile inülin klirensinde (Cin) ve iskemiye takiben reperfüzyon sırasındaki total sodyum absorpsiyonunda belirgin artış saptanmıştır.

Bizim çalışmamızda, histopatolojik değerlendirme neticesinde iskemi-kontrol grubunda 7. gün alınan böbreklerde yüksek dereceli nekrozlar tesbit edildi. Nekrozla birlikte proksimal kıvrıntılı tübüllerde mononükleer hücre infiltrasyonu ve yaygın hemorajik alanlar mevcuttu. Verapamil grubunda 2, amifostin grubunda 3, verapamil+amifostin grubunda ise 4 sıçanda nekroz bulundu. İskemi-kontrol grubunda 0. gün 4 adet sıçan böbreğinde CD8 pozitif hücre saptanırken, verapamil grubunda bir böbrekte ve diğer ilaçla tedavi uygulanmış gruplarda CD8 pozitif hücre saptanmadı.

Lopez-Nebolina ve arkadaşları, sıçan böbrek iskemi modelinde, verapamilin koruma mekanizmasını araştırmışlar. I/R hasarlanmasında, sorumlu faktörlerden biri olan nötrofil infiltrasyonunu önlediği ve bu mekanizmayla iskemik hasarda böbreği koruduğu gösterilmişlerdir (50). Toronyi ve Rafaat ise yaptıkları deneysel çalışmada verapamilin renal iskemiden sonra reperfüzyon fazında, renal tübül epitelyal hücrelerde hücre ölümü anlamına gelen apoptozisi önlediğini göstermişlerdir (48, 49).

İskemi-reperfüzyon hasarlanmasında yapılan çok sayıdaki immünohistokimyasal incelemede, böbreklerde mononükleer hücre infiltrasyonu ve peritübüler T lenfositler saptanmıştır. Fakat iskemi-reperfüzyon patogenezinde T hücrelerinin rolü halen tam olarak bilinmemektedir (1, 6, 14).

Zwacka ve arkadaşlarının fare karaciğerinde iskemi-reperfüzyonun indüklediği inflamatuvar yanıtta T lenfositleri ve CD4/CD8 oranındaki değişiklikler araştırılmış. İskemi-reperfüzyon sonrası subakut dönemde (16-20 saat), nötrofil inflamatuvar yanıtta T lenfositlerinin anahtar rol oynadığı ve CD8(+) T lenfositlerde soliter olarak artış saptanmıştır (43).

Rabb ve arkadaşlarının fare böbreğinde oluşturdukları iskemi-reperfüzyonda T lenfositlerinin rolünü araştırdıkları çalışmalarında, iki saatlik iskemiye takiben bir saatlik reperfüzyon sonrası T hücre adezyonunda artma saptanmıştır. İnfiltratif T hücrelerinin renal tübüler hücrelere yapışması, postiskemik tübüler disfonksiyonun potansiyel bir mekanizması olabileceği sonucuna varılmıştır. Ayrıca CD4(+) ve CD8(+) hücrelerin tübüler nekrozda rol oynadığı saptanmıştır (44).

Bizim yaptığımız deneysel çalışmada CD8(+) T lenfositler araştırıldı. Akut dönemde (iskemi-reperfüzyon sonrası ilk 5 dakika), iskemi-reperfüzyona yanıt olarak CD8 hücrelerde artma ve medikasyonla diğer gruplarda belirgin azalma saptandı (P=0.012).

Malec ve arkadaşları, tek doz i.v. verapamilin duodenal ülser hastalarında immün yanıtta etkilerini araştırmışlar, verapamil 0.15 mg/kg dozunda verilerek yapılan değerlendirme, periferik kanda mononükleer hücreler araştırılmıştır. Verapamilin tek doz kullanılmasıyla T hücreler, T helper, T supressör lenfositlerde geçici artış ve IL-1, IL-2 sentezinde geçici azalma saptanmıştır. Kalsiyum kanal blokörleri, immüno-regülasyonda geçici olarak hasara yol açıyor olabileceği sonucuna varmışlardır (45).

Kalsiyum kanal blokörleri, CD8(+) T lenfositlerinin oluşumunu ve natural killer hücre aktivitesini inhibe eder. Tietz ve arkadaşları, uzun süreli viral enfeksiyonu olan ve verapamil hidroklorid kullanan bir hastalarında, fitohemaglutinin ve tetanoz antijenine yanıtın baskılandığını, influensa aşısına

yanıtın olmadığını saptamışlar. Tedavi rejimlerini başka bir antihipertansifle değiştirdiklerinde, hastanın immün yanıtının normale döndüğünü ve influenza aşısına yanıtın olduğunu görmüşler. Bu vakada da görüldüğü gibi verapamil immün yanıtı baskılıyor olabilir (47)

Biz verapamille tedavi edilmiş iskemi-reperfüzyon uygulanan gruplarda, erken dönemde sadece CD8(+) hücre aktivitesinde istatistiksel olarak anlamlı bir azalma saptadık. Geç dönemde ise (7. gün), IgM hücre aktivitesinde azalma mevcuttu. Erken (0. gün) ve geç (7. gün) dönemde ayrı ayrı baktığımız IgA, IgG ve natural killer boyanma derecelerinde belirgin istatistiksel fark yoktu.

Nonspesifik bağışıklık sistemi parametresi olan IgM'in artması dokuda yıkım olasılığını gösterir. I/R sonrası erken dönemde IgM ve CD8 hücrelerin dokuda görülüyor olması dolaşımda var olan şekilli elemanların vasküler endotel geçirgenliğinde artma sonucu dokuya geçtiğini gösterir. Nonspesifik savunma mekanizmalarında görülen bu durumun, bizim çalışmamızda sadece bu iki hücrede görülüyor olması, spesifik bir immün yanıtı başlatıyor olabileceğini düşündürdü. Ayrıca reperfüzyon sonrası dokuda arttığı gösterilen adezyon molekülleri (ICAM-1), nötrofillerin hareketinden sorumludur ve anti-ICAM-1 verilerek böbreğe doğru olan nötrofil infiltrasyonunun önlenmesiyle I/R'a bağlı hasar sınırlandırılmış olur (36). Çalışmamızda kullanılan verapamil ve amifostin, endotel geçirgenliğini önleyerek bağışıklık sistemine ait hücrelerin dokuya salınmasına engel oluyor olabilir. Bir diğer mekanizma da, MHC Class-1 aracılı aktive olan CD8 hücreleri (sitotoksik T hücreleri), apoptozis aracılı hücre ölümüne sebep olurlar. Memelilerde görülen apoptozisin patofizyolojisi, tam olarak bilinmemekle birlikte değişik klinik sonuçlar doğurur. Rafaat ve arkadaşları, sıçan böbreğinde I/R hasarında görülen apoptotik yanıtı araştırmışlar ve verapamilin I/R'un neden olduğu DNA zincirinde meydana gelen yapı hasarı ve apoptozisi önlediğini göstermişlerdir (49).

Sonuç olarak, araştırmamızdan elde edilen verilere göre, verapamil ve amifostin ayrı ayrı verildiklerinde böbrekte oluşan iskemi-reperfüzyon hasarını önlemektedir. MDA düzeylerinde anlamlı istatistiksel farklılık saptanmadığı için, bu etkilerini membran lipid peroksidasyonunu önleyerek değil, farklı

mekanizmalarla sağladıkları düşünülebilir. Oksijen radikal giderici olarak organizmada mevcut GSH düzeylerinde artma, her iki ilacın ayrı ayrı bu mekanizmayı aktive ettiğini göstermiştir. İmmünohistopatolojik olarak da nekroz, iskemi-kontrol grubunda gösterilmiştir. İlaç tedavisinin nekrozu önlediği saptanmıştır. Çalıştığımız immünojenik parametrelerden sadece CD8 hücrelerinde reperfüzyona belirgin yanıt saptanmış ve bu yanıtın ilaçlarla önlediği gösterilmiştir. Her iki ilaç birlikte kullanıldığında bu etki görülmemiştir. Literatürde, amifostinin böbrek I/R'u üzerine etkisi konulu bir çalışmaya rastlanmamıştır. Bu açıdan ve verapamilin I/R'da koruyucu olarak, immün yanıtta CD8 üzerinden meydana getirdiği baskılayıcı etkisi açısından, bu konuda yeni başka araştırmaların da yapılabileceği sonucuna varılmıştır.

## 6. Özet

Verapamil ve amifostinin böbreğin iskemi-reperfüzyon hasarında etkisini araştırmak amacı ile yapılan bu deneysel çalışmada 72 adet genç, erişkin dişi cins sıçan kullanıldı. Tüm sıçanlara sağ nefrektomi yapıldı. Her bir grupta, sham grubu hariç, 16 sıçan olmak üzere çalışma 5 grupta yapıldı. Sham grubunda (8 sıçan), yalnızca laparotomi ve sağ nefrektomi; İskemi-kontrol grubunda 45 dk iskemi ve reperfüzyon; Verapamil grubunda iskemi öncesi verapamil 0.3 mg/kg i.v. verildi takiben 45 dk iskemi ve reperfüzyon uygulandı. Amifostin grubunda, amifostin 30 mg/kg i.v. verildi, takiben 45 dk iskemi ve reperfüzyon uygulandı. Verapamil+amifostin grubunda, her iki ilaç diğer gruplarla aynı dozlarda verildi, takiben 45 dk iskemi ve reperfüzyon uygulandı. Her gruptan, sham grubu hariç, 6 sıçana reperfüzyondan 5 dk sonra, dokuda MDA, GSH düzeyleri ve immünohistopatolojik çalışma için, sol nefrektomi yapıldı. Tüm sıçanlardan 1., 3 ve 7. gün BUN ve serum kreatinin düzeyleri için kan örnekleri alındı. Yedinci gün sıçanlara sol nefrektomi yapıp böbrek dokusunda MDA, GSH düzeyleri bakıldı ve immünohistopatolojik çalışma yapıldı.

Elde edilen sonuçlara göre, iskemi-reperfüzyonda artmış böbrek fonksiyon testlerinden, BUN ve serum kreatinin değerlerinde, verapamil ve amifostin verilen gruplarda, ayrı ayrı düşme saptandı. Dokuda bakılan TBARS (MDA) düzeylerinde gruplar arasında, anlamlı bir fark saptanmadı. Yine dokuda bakılan GSH düzeylerinde anlamlı bir artış saptandı. İskemi-kontrol grubunda düşük olan GSH değerleri, ilaç tedavisi uygulanan üç grupta da arttı. Histopatolojik olarak, iskemi-kontrol grubunda belirgin olarak oluşan yüksek dereceli nekrozlara ve mononükleer hücre infiltrasyonlarına ilaç tedavisi uygulanan gruplarda rastlanmadı. Fakat iki ilacın birlikte uygulandığı grupta, daha çok sayıda nekroz görüldü. İmmünohistopatolojik olarak sadece CD8 hücreleri, iskemi-kontrol grubunda dokuda saptanırken, ayrı ayrı ilaç tedavisi uygulanan iki grupta da CD8 hücre infiltrasyonunun önlendiği görüldü. Her iki ilacın birlikte uygulandığı grupta bu etkide anlamlı bir istatistiksel fark saptanmadı. Bu etki verapamil ve amifostinin

immüniteyi baskılamasına bağılı nonspesifik bir yanıt olabileceğı gibi daha ileri araştırmalarla her iki ilacın da immün yanıtta spesifik bir baskılama mekanizmasına yol açıp amadığı araştırılabilir.

Bu araştırmada görölmüştür ki; Verapamil ve amifostinin birbirlerine üstünlükleri olmadan ayrı ayrı kullanıldıklarında böbrekte süperoksit anyon radikalleri tarafından meydana getirilen membran lipid peroksidasyonunu önlememiş, fakat iyi bilinen bir oksijen radikal giderici olan redükte glutatyon düzeyini arttırarak dokuyu İ/R'un zararlı etkilerinden korumuştur. Bu konuda yapılacak yeni çalışmalarla beraber yürütölen immünohistopatolojik analizler, bu süreçte yer alan mekanizmaları anlamak açısından, daha verimli bir yaklaşım olacaktır.



## 7. Kaynaklar

1. Carden D.L, Granger N Pathophysiology of ischemia-reperfusion injury. *Journal of pathology* 2000, 190:255-266.
2. Shapiro J, Cheung C, Itabashi A, et al. The effect of verapamil on renal function after warm and cold ischemia in the isolated perfused rat kidney. *Transplantation* 1985, 40:596-600.
3. Döşlüoğlu H.H, Aktan A.Ö, Yeğen C, Okboy N, Yalçın A.S, Yalın R, Ercan S. The cytoprotective effects of verapamil and iloprost (ZK 36374) on ischemia/reperfusion injury of kidneys. *Transpl Int* 6:138, 1993
4. Guarnieri C, Flamigini F, Caldarera CM : Role of oxygen in the cellular damage induced re-oxygenation of hypoxic heart *J Mol Cell Cardiology* 1980,12:797-803.
5. Southorn P.A, Powis G. Free radicals in medicine. II. Involvement in human disease. *Mayo Clin Proc* 1988, 63:390-408
6. Mc Cord J.M. Oxygen derived free radicals in postischemic tissue injury. *The New Eng Med* 1985, 312:159-162.
7. Toyokuni S Reactive oxygen species-induced molecular damage and its application in pathology *Pathology international* 1999, 49:91-102.
8. Sussman M.S, Bulkley G.B. Oxygen-derived free radicals in reperfusion injury. *Methods in enzymology.* 1990, 186:712-714.
9. Knight JA. Diseases related to oxygen-derived free radicals. *Ann Clin Lab Sci* 1995, 25:111.
10. Baker G.L, Corry R.J, Autor A.P. Oxygen Free Radical Damage in kidneys subjected to warm ischemia and reperfusion. *Ann Surg* 1985, 202:628-638

11. Barbara J. Zimmermann, D. Neil Granger: Reperfusion injury. *Surg. Clin North America* 1992, 72:65-83.
12. Rau B, Baver A, Wang A, Gansauge F, Weidenbach H. Modulation of endogenous nitric oxide synthase in experimental acute pancreatitis: role of anti-ICAM-1 and oxygen free radical scavengers. *Annals of surgery* 2001, 233: 195-209.
13. Lefer AM, Lefer DJ. Pharmacology of the endothelium in ischemia-reperfusion and circulatory shock. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 1993, 33:71.
14. Thiagarajan RR, et al. The role of leukocyte and endothelial adhesion molecules in ischemia-reperfusion injury. *Thromb Haemost* 1997, 78:310.
15. Grinyo JM. Reperfusion injury. *Transplant Proc* 1997, 29:59.
16. Riley PA. Free radicals in biology : Oxidative stress and the effects of ionizing radiation. *Int J Radiat Biol* 1994, 65:27
17. Schoenberg M.H, Beger H.G. Reperfusion ischemia after intestinal ischemia. *Critical care medicine* 1993, 21:1376-1384.
18. Nauta R.J, Tsimoyiannis E, Uribe M, Walsh D.B, Miller D, Butterfield A. The role of calcium ions and calcium channel entry blockers in experimental ischemia/reperfusion-induced liver injury *Ann Surg* 1991, 213:137-142.
19. Wait R, White G, Davis T. Beneficial effects of verapamil on postischemic renal failure. *Surgery* 1983, 94:276-282.
20. Capizzi R.L., Scheffler B.J, Schein P.S. Amifostine-mediated protection of normal bone marrow from cytotoxic chemotherapy. *Cancer* 1993, 72:3495-3501.
21. Spancer C.M, Goa K.L. Amifostine. A review of its pharmacodynamic and pharmacokinetic properties, and therapeutic potential as a radioprotector and cytotoxic chemoprotector. *Drugs* 1995, 50:1001-1031.
22. Mabro M, Faivre S, Raymond E. A risk-benefit assessment of amifostine in cytoprotection. *Drug saf* 1999, 21:367-87.

23. Lindemann K. Administration of the cytoprotectant amifostine. *Clin J Oncol Nurs* 1998, 2(3):101-4.
24. Delaney J.P, Bonsack M.E. Radioprotection of the rat small intestine with topical WR-2721. *Cancer* 1994, 74:2379-2384.
25. Capizzi Robert. Clinical status and optimal use of Amifostine. *Oncology* 1999
26. Pissarek M, Krause EG, Tapp E. Cardioprotective potency of the radical scavenger S-2- (3 aminopropylamino ) ethylphosphorothioic (WR 2721) acid in the post-ischemic rat heart *Mol Cell Biochem* 1995, 26:121-129.
27. Choi DW. Ischemia induced neuronal apoptosis. *Curr Opin Neurobiol* 1996, 6:667.
28. Mac Lellan WR, Schneider MD. Death by design. Programmed cell death in cardiovascular biology and disease. *Circ Res* 1997, 81:137
29. Ferrari R, Ceconi C, Cargnoli A. Role of oxygen free radicals in ischemic and reperfused myocardium. *Am Journal Clin Nutr* 1991, 53:215-222.
30. Parks DA, Williams TK, Beckman JS. Conversion of xanthine dehydrogenase to oxidase in ischemic rat intestine. A reevaluation. *Am j physiol* 1988, 254:G768
31. Matsumura Y, Nishiura M, Deguchi S. Protective effect of FK409, a spontaneous nitric oxide releaser, on ischemic acute renal failure in rats. *The journal of pharmacology and experimental therapeutics* 1998, 287:1084-91
32. Fairbanks VF, Klee GG. Biochemical Aspects of Hematology In *Textbook of Clinical Chemistry*. Ed. Tietz NW, Philadelphia, Saunders Company, 1986, pp 1498-1535.
33. Philip F. Halloran. Renal injury and preservation in transplantation. *Kidney Transplant Rejection* 1998, 149-176
34. Halloran PF, Homik J, Goes N The 'injury response': a concept linking non-specific injury, acute rejection and long term transplant outcomes *Transplant Proc* 1997: 29: 79-81
35. Jordan J.E, Zhao Z.Q, Johansen V.J The role of neutrophils in myocardial ischemia reperfusion injury *Cardiovascular research* 1999, 43:860-878.

36. Dicken D. H. Koo, Kenneth I. Welsh, Justin A. Roake, Peter J. Morris, Susan V. Fuggle. Ischemia/reperfusion injury in human kidney transplantation: An immunohistochemical analysis of changes after reperfusion: *Am J of Pathology* 1998 153: 557-566
37. Iwao Kurose, Lawrence W. Argenbright, Robert Wolf, Liao Lianxi, Neil Granger. Ischemia/reperfusion –induced microvascular dysfunction: role of oxidants and lipid mediators. *Am J Physiol* 1997, 272,H2976-82
38. Lopez-Neblina F, Toledo-Pereyra LH, Suzuki S, Mirmiran R. Protective effect of combined allopurinol and verapamil given at reperfusion in severe renal ischemia. *J Invest Surg* 1995 8: 57-63
39. Weichert-Jacobsen K.J, Bannowski A, Küppers F. Direct amifostine effect on renal tubule cells in rats. *Cancer research* 1999, 59:3451-3453.
40. Stock J, Dormandy TL . The autoxidation of human red cell lipids induced by hydrogen peroxide. *Br J Hematol* 1971, 20:95-111.
41. Stone RC, Cotton W, Frayer AA, Jones P, Bell J, Hume R. Lipid peroxidation and expression of copper-zinc and manganese superoxide dismutase in lungs of premature infants with hyaline membrane disease and bronchopulmonary dysplasia. *Clin Lab Med* 1990, 116:666-773.
42. Rao N, Fernandez MA, Cid L, Romero J, Sevenian A. Retinal lipid peroxidation in experimental uveitis. *Arch Ophtalmol* 1987, 105:1712-1716.
43. Zwacka RM, Zhang Y, Halldorson J, Schlossberg H CD4(+) T-lymphocytes mediate ischemia/reperfusion-induced inflammatory responses in mouse liver. *J Clin Invest* 1997, 100: 279-89
44. Rabb H, Daniels F, O'Donnell M, Saba SR, Keane W, Tang WW. Pathophysiologic role of T lymphocytes in renal ischemia-reperfusion injury in mice. *Am J Physiol Renal Physiol* 2000, 279: F525-31
45. Malec P, Tchorzewski H, Markiewicz K, Zeman K, Baj Z, Pokoca L. Effect of a single intravenous dose of verapamil on some immune parameters in duodenal ulcer patients. *Pol J Pharmacol Pharm* 1998, 40: 373-80

46. Singh AB, Hiehle K, Casale P, Gerber S, Nayar S, Mann RA. Modulation of murine in vitro immune response by verapamil. *Immunopharmacology* 1990, 20: 165-74
47. Tietz NW, Thompson J. Possible concentration-dependent suppression of immune response by verapamil. *Arch Fam Med* 1995, 4: 368-9
48. Toronyi E, Hamar J, Perner F, Szende B. Prevention of apoptosis reperfusion renal injury by calcium channel blockers. *Exp Toxicol Pathol* 1999 51: 209-12
49. Rafaat AM, Murray MT, McGuire T, DeFrain M, Franko AP, Zafar RS, Palmer K, Diebel L, Dulchavsky SA. Calcium blockade reduces renal apoptosis during ischemia reperfusion. *Shock* 1997, 8: 186-92
50. Lopez-Neblina F, Paez-Rollys AJ, Toledo-Pereyra LH. Mechanism of protection of verapamil by preventing neutrophil infiltration in the ischemic rat kidney. *J Surg Res* 1996 61: 469-72