

T1172



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

# TAVŞAN OTOTRANSPLANT MODELİNDE SOĞUTMA DERESESİNİN SERBEST RADİKAL HASARI VE GREFT ÜZERİNE ETKİSİ

UZMANLIK TEZİ

Dr. Abdulkadir BAŞARAN

T1172 / 1-1

Tez Danışmanı : Prof. Dr. Şükrü AKTAN

*"Bu çalışma Akdeniz Üniversitesi Araştırma Fonu tarafından 96.01.0103.10 sayılı kararı ile desteklenmiştir"*

*"Tezimden kaynakça gösterilerek faydalanılabilir"*

Antalya, 1998

## TEŐEKKÜR

Uzmanlık eğitimimde ve tezimin hazırlanmasında değerli katkılarından dolayı, Anabilim Dalı BaŐkanı Sayın Prof.Dr.Tuncer KARPUZOĞLU'na, tez danıŐmanım Sayın Prof.Dr.Şükrü AKTAN'a ve Genel Cerrahi Anabilim Dalındaki tüm hocalarım ile Sayın Prof.Dr.Gülsen ÖNER, Sayın Prof.Dr.Gülten KARPUZOĞLU, Sayın Doç.Dr.Ümit K. ŐENTÜRK, Yrd.Doç.Dr.Alper DEMİRBAŞ'a teŐekkür ederim.

Dr.Abdulkadir BAŞARAN  
Antalya, 1998

## İçindekiler

|                       | <u>Sayfa No :</u> |
|-----------------------|-------------------|
| Giriş ve Amaç .....   | 1 - 2             |
| Genel Bilgiler .....  | 3 - 15            |
| Gereç ve Yöntem ..... | 16 - 19           |
| Bulgular .....        | 20 - 29           |
| Tartışma .....        | 30 - 32           |
| Özet .....            | 33                |
| Kaynaklar .....       | 34 - 38           |

## GİRİŞ VE AMAÇ

Son safhada organ yetmezliği olan hastaların tedavisinde transplantasyon, son elli yıl içinde tıp armementarium'una giren en önemli gelişmedir. Bu hastalarda tıbbi ve cerrahi tüm tedavi yöntemlerinin tükendiği anda transplantasyon tek ve son çare olarak gündeme gelmektedir. Hızla artan tıbbi bilgi ve teknolojik gelişmeler ve transplantasyon ile tedavi endikasyonlarının genişlemesi, bir taraftan bekleme havuzundaki hasta sayısının artmasına neden olurken diğer taraftan bağışlanan greft sayısında paralel artışın sağlanamaması, arz - talep dengesini talep lehine bozmaktadır. Bu durum transplantasyon ile tedavi uygulayıcılarını, mevcut organları daha optimal koşullarda kullanmaya zorlamaktadır.

Organ transplantasyonunda amacın küratif olması yani CHIMERISM'in gerçekleştirilmesi, ulaşılmaması gereken hedef olduğu halde, istenilen başarı düzeyine henüz ulaşılabilmemiş değildir. Doku uyumu konusundaki bilgiler de istenen mükemmelliğe erişememiştir. Rejeksiyonun temel nedeni olan alıcı organizmanın nakledilen dokuya karşı doğal reaksiyonlarını bloke edebilecek fakat alıcıya zarar vermeyecek immünsüpresyon yöntemleri de ideal olmaktan uzaktır.

Diğer birçok faktörlerle birlikte nakledilen doku yada organın sıhhati, bir bakıma yeni alıcı ortamındaki fonksiyonunun belirleyicisidir. Alınan organ yada dokunun nakledilinceye kadar geçen süre içinde morfolojik ve fonksiyonel integritesinin korunması, transplantasyonla tedaviden alınacak sonuçları doğrudan etkilemektedir. Doku yada organın korunması temelde en küçük birimi olan hücrenin korunması anlamını taşımaktadır. Organ karaciğer ise hepatositlerin, pankreas ise Langerhans adacık hücrelerinin korunması şeklinde düşünülebilir. Böbrekte ise durum biraz daha farklıdır; korunması gereken böbreğin fonksiyonel ünitesi olan NEFRON'dur.

En iyi koşullarda nakledilen organda bile, sıcak iskemi, soğuk iskemi ve reperfüzyon hasarından kaçınılması hemen hemen mümkün olmayan bir süreçtir. Sıcak iskemideki dokuda

metabolik aktivite hücreyi hızla ölüme götüreceği için, bu sürenin mümkün olan en kısa bir zamanla sınırlandırılmaya çalışılması mecburiyettir. Hücresel düzeyde anoksida kalmış olan doku fonksiyonlarının korunması ve ölümün geciktirilmesi anoksik doku metabolizmasının minimal düzeye indirilmesi ile mümkündür (3,8,25,29,45). Kadavra organ vericilerinde in-situ soğuk perfüzyonla sıcak iskemiyi ihmal edilebilecek derecede kısa bir süreye indirilebilirse de, canlı donörlerdeki kaçınılmaz 1-5 dakikalık sıcak iskemik sürenin subsellüler anlamdaki önemi kesin olarak henüz açıklığa kavuşturulamamıştır.

Organ veya dokunun alıcı organizmaya nakledilinceye kadar minimal yada hiç hasarsız korunması için günümüzde kullanılan hemen hemen tek yöntem, organın ve hücrenin soğutulması yani HIPOTERMİ yöntemidir. Hipotermi bir taraftan hücre metabolizmasını yavaşlatarak hücre ölümünü geciktirirken, diğer taraftan hücre içi iyon kompozisyonu ve hücre şişmesini kontrol eden enerji gerektiren iyon pompalarını baskılayarak hücre şişmesine neden olur (5). İyon pompaları fonksiyonu reperfüzyon sonunda geri dönerken, hücre şişmesi hücrede kalıcı hasar bırakabilir.

Organ transplantasyonunda damar anastomozları tamamlanıp klemplerin açılmasıyla gerçekleşen reperfüzyonla birlikte hücrede serbest oksijen radikalleri ortaya çıkmaktadır. Serbest oksijen radikallerinin reperfüzyon hasarının başlıca nedeni olduğu bildirilmektedir (1,2,7,33,46). Reperfüzyon hasarına neden olan serbest oksijen radikalleri doğrudan ölçülememekte ancak oluşumu, hücre membranındaki lipid peroksidasyon ürünü olan Thio Barbituric Acid Reactive substance (TBARs) düzeyi ölçülerek belirlenebilmektedir (9,14,19,20,24).

Transplante edilecek organ çıkarıldıktan sonra 48-72 saat gibi uzun dönem koruma için ideal saklama ısısının 4°C ile 8°C arası olduğu yapılan çalışmalarda bildirilmektedir (4,28,40,47,48). Organın uzun süre korunmasına gerek olmadığı durumlarda, soğutma derecesinin doku hasarına etkisi konusunda fikir birliği sağlanamadığı gibi soğutma derecesinin doku fonksiyonunu hangi ölçüde etkilediği ve optimal prezervasyon sıcaklığı konularında da yeterli çalışma mevcut değildir.

Bu çalışma, reperfüzyonla birlikte gelişen serbest oksijen radikal hasarının hangi sıcaklık derecesinde en az olduğunu ve prezervasyondaki doku hasarını minimal düzeyde tutacak bir soğutma derecesinin olup olmadığını göstermeyi amaçlamaktadır.

## GENEL BİLGİLER

### RENAL TRANSPLANTASYONUN GELİŞİMİ

Ullman 1902'de hayvan modelinde böbrek transplantasyonu yaparak transplantasyon fikrini uygulamaya aktarmıştır. Aynı yıllarda Alexis Carrell'in damar anastomozu için ortaya koyduğu teknik, transplantasyon çalışmalarına hız kazandırmıştır. Y.Y.Voronoy 1933'te ilk kez insanlarda kadavra donörlü renal transplantasyonu gerçekleştirmiştir. Sir Peter Medawar 1943 yılında deri grefti çalışmaları ile transplantasyonun immünolojik yönüne ışık tutmuştur

Organ transplantasyonunun klinik ve immünolojik özelliklerinin ortaya konulması ile 1954'te Boston ve Paris'te ilk identik ikizler arası böbrek transplantasyonu gerçekleştirilmiştir. Bu merkezlerde 1958 - 1959'da identik olmayan ikizler arasında yapılan böbrek transplantasyonlarında immünosüpresyon için total vücut radyasyonu kullanılmış ve 22 aylık sağkalıma ulaşıldığı bildirilmiştir. Aynı yıllarda Schwartz ve Damshek'in 6-merkaptopurin ile alloantikör üretiminde inhibisyon olduğunu göstermeleri üzerine bu ilaç transplantasyonda klinik uygulama alanı bulmuştur. 1963 yılında Hitching 6-merkaptopurinin daha az toksik bir derivativesi olan azathiopurine'i tıbbın hizmetine sunmuştur.

İmmünosüpresyon konusundaki başarılı çalışmalar, pratik kullanıma daha birçok ajanın girmesini sağlamıştır. Bunlar arasında steroidler, azathiopurine, siklosporin, tacrolimus, mycophenolate mofetil, monoklonal antikörler (OKT3), poliklonal antikörler(ATG,ALG) sayılabilir. Ancak 1976'da Borel'in

siklosporini rapor etmesi ve Calne ve Starzl tarafından uygulamada başarılı sonuçlar alınmasından sonra, özellikle böbrek dışındaki organ nakillerinde sağkalım sonuçlarında iyi yönde belirgin bir gelişme görülmüş, kalp, karaciğer, pankreas gibi organların transplantasyonunda endikasyonlar genişlemiş ve post transplant yaşam kalitesi yükselmiştir. (29).

Bu hızlı gelişmelere rağmen organ transplantasyonu daha birçok konuda araştırmaya ve gelişmeye açık bir konudur. Son yıllarda, çalışmaların multi-organ transplantasyonu, daha iyi immünosupresif ilaçların geliştirilmesi, organların canlı saklanması ve reperfüzyon sonucunda oluşan reaktif oksijen kökenli serbest radikallere bağlı hasarın önlenmesi gibi konularda yoğunlaştığı dikkati çekmektedir (10,11,43)

### ORGAN KORUNMASI

Bir organ transplantasyonunun başarısını etkileyen en önemli faktör organın canlılığını kaybetmeden korunmasıdır. Canlı donör kullanılan organ nakillerinde, organın iskemik kalma süresi kısa olduğu için oluşacak hasarın minimal düzeyde kalacağı düşünülebilir. Buna karşın kadavradan alınan organların nakledilmesinde uygun alıcının hazırlanması ve diğer işlemlerin yapılabilmesi için organın oldukça uzun bir süre saklanması, dolayısıyla iskemik kalması gerekmektedir.

Vücudun sınırlı bir bölgesine gelen kan miktarının ortadan kalkması sonucunda anoksik bölge yaşamsal önemi olan maddelerden, özellikle oksijen ve glikozdan yoksun kalır. Bu durumda hücre aerobik metabolizmadan anaerobik metabolizmaya geçer. Oluşan toksik metabolik artıklar ortamdaki uzaklaştırılmaz ve hücre hasarına neden olurlar. Hasarın, organ ısısının düşürülmesiyle azaltılabileceğinin gösterilmesi sıcak ve soğuk iskemi kavramlarının önemini ortaya koymuştur (4,40,47). Bu nedenle organ saklanması anoksiye yönelik temel yaklaşım metabolik inhibisyon ve metabolik devamlılık olarak ele alınmaktadır (45) Günümüzde kullanılan en geçerli metabolik inhibisyon yöntemi hipotermidir

## HİPOTERMİ

Katabolizmanın inhibe edilmesi prensibine dayanan metabolik inhibisyon en iyi şekilde hipotermi ile sağlanmaktadır. Uç tür soğukta saklama yöntemi mevcuttur (47);

- 1) Pulsatil perfüzyon,
- 2) Flush perfüzyon ve perfüzyon solüsyonunda saklama,
- 3) Kryoprezervasyon ( dondurarak saklama )

Pulsatil perfüzyon tekniğinde bir pulsatil pompa aracılığıyla membran oksijenatörden geçirilen homolog plazma sistemi ile soğutma sağlanır. 72 saate kadar uzayan saklama mümkündür. Flush perfüzyon yönteminde organ içerisindeki kan önce normotermik solüsyonla yıkanır. Soğuk perfüzyonla santral soğutma (core cooling) sağlanır, takiben organ soğuk perfüzyon solüsyonu içerisinde saklanır. Bu metod ucuz ve pratik olması açısından daha geniş kullanım alanı bulmuştur. Kryoprezervasyon, organ korunması ve saklanmasında ulaşılmaması gereken amaç olmakla birlikte, henüz bu konuda yeterli başarı sağlanamamıştır

Donör organ hasadı yapılırken organın fonksiyonel ve morfolojik olarak korunmasına azami titizlik gösterilmelidir. Bu amaçla ; renal transplantasyonda donör organın çıkartılmasına kadar geçen sürede yeterli hidrasyon ve sistemik kan basıncının kontrolü önemlidir. Cerrahi işlem sırasında renal pedikülün traksiyonu uzun süreli vazospazma neden olabilir. Bu yüzden cerrahi diseksiyon nazik ve dikkatli olmalıdır. Organın kan akımının kesilmesinden soğuk perfüzyonun başlamasına kadar geçen süre SICAK İSKEMİ, soğuk perfüzyonla başlayan ve reperfüzyon gerçekleşene kadar geçen süre ise SOĞUK İSKEMİ süresidir (45).

Soğuk iskeminin olduğu dönemde hipoterminin sağlanması amacı ile çeşitli prezervasyon solüsyonları kullanılmaktadır. Bu solüsyonlar fizyolojik olmak zorundadır.

Y.Y. Voronoy'un uygulamalarının başarısız olmasının başta gelen nedenleri arasında, alıcı ile verici arasında kan grubu uyumuna dikkat edilmemesi yanında, sıcak ve soğuk iske mi kavramlarının henüz anlaşılma mış olması gelmektedir. 1950'li yıllarda, konuda biriken bilginin uygulamaya



aktarılmasıyla birlikte, organın nasıl bir solüsyonla perfüze edilip soğutulacağı gündeme gelmiştir. 1960'ların sonlarında Geoffry Collins tarafından geliştirilen solüsyonun daha basit bir formu olan Eurocollins solüsyonu, transplantasyon işlemlerinde geniş kullanım alanı bulmuştur (12,48). Bu solüsyonla böbreklerin 48, karaciğer ve pankreasın 8 saate kadar korunması, basitçe ve güvenle yapılabilmektedir. Bu konudaki araştırmalar, ilginin rejeksiyon mekanizması ve bunun önlenmesine yönelik çalışmalara kayması yüzünden yeterince hızlı olamamıştır. 1980'lerin sonunda F Belzer tarafından önerilen University of Wisconsin (UW) solüsyonu kullanıma girmiştir (26). Öncelikle posttransplant ödemi ve tromboz riskini azaltması açısından pankreas korunması için tasarlanmış, fakat diğer organlar için de aynı oranda etkili olduğu görülmüştür (26). Multiorgan donörlerinde kalp korunması hariç, ilk seçenek olarak geniş kullanım alanı bulmuştur.

Efektif ve uygun bir yıkama solüsyonu ; hipotermi sonucu ortaya çıkan hücre şişmesini en aza indirebilmeli, hücreyi asidozdan korumalı, yıkama süresince interstisyel aralığın genişlemesini önlemeli, özellikle reperfüzyonda serbest oksijen radikali hasarından koruma sağlamalı ve reperfüzyon sırasında yüksek enerjili fosfat bileşikleri rejenerasyonu için substrat sağlamalıdır. Yıkama solüsyonu içeriğinin nasıl olması gerektiğini anlamak için anoksi sırasında gelişen olayları daha ayrıntılı incelemek gerekmektedir. Anoksi ATP yapım hızını azaltır, bu sodyum-potasyum ATPase aktivitesinde azalmaya, potasyumun hücre dışına, sodyumun hücre içine girmesine yol açar ve sonuçta membran depolarizasyonu ortaya çıkar. Membran depolarize olduğunda voltaj bağımlı kalsiyum kanalları açılır ve kalsiyumun hücre içerisine geçişi artar. ATP olmadığı için kalsiyumun sodyumla değişerek hücre dışına çıkışı da azalır. Bu faktörler sitozoldeki kalsiyum konsantrasyonunu artırır ve kalsiyum iyonları fosfolipaz A1, A2 ve C'yi aktive eder. Bu aktivasyon membran fosfolipid hidrolizini ve serbest yağ asitleri birikimini artırır. Artış hücre ve mitokondrial membranların geçirgenliğini bozarak hücre hasarı ve kaçınılmaz hücre ölümüne neden olur. Uzun dönem saklama için hazırlanan solüsyonlara adenozin veya desoksikoformisin gibi bir adenozin diaminaz inhibitörü eklenmesiyle yüksek enerjili fosfat bağları azalması önlenir. Kalsiyum solüsyona katılmazken, daha az geçirgen olan glukonat, klor yerine kullanılır. İntrasellüler potasyum konsantrasyonu devamı için solüsyona potasyum eklenmektedir (5). Kliniğimizde kısa süreli soğutma ve yıkamada kullandığımız sıvı da potasyum içeriği artırılmış bir solüsyondur (Tablo 1)

**Tablo 1.** Kliniğimizde ve Çalışmada, Kısa Süreli Soğutma ve Yıkamada Kullanılan Solüsyon.

| İçerik (mmol/L) | Solüsyon                            |
|-----------------|-------------------------------------|
| Sodyum          | 154                                 |
| Potasyum        | 40                                  |
| Klor            | 154                                 |
| Diğer           | Heparin 10 000 U,<br>Prilocine 5 mg |

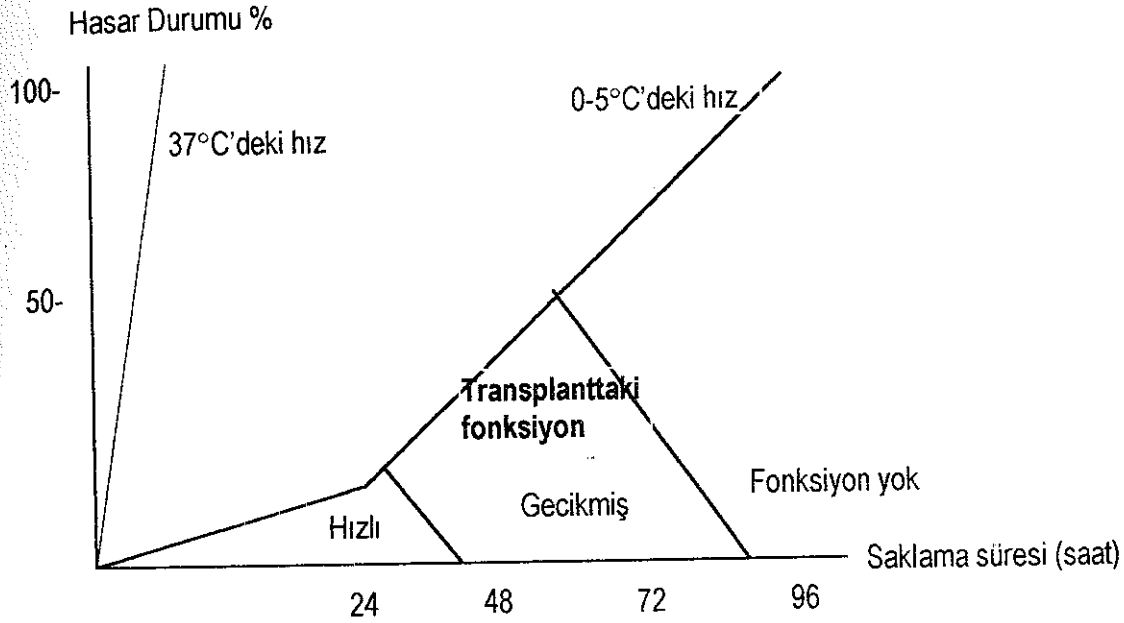
Klinik ve deneysel çalışmalarla Eurocollins veya UW solüsyonu kullanarak 48-72 saate kadar uzayan başarılı organ saklanması sağlanmıştır (47). Kliniğimizde donör organın çıkartılmasından sonra ex vivo vasküler yıkamada kullanılan ve takiben revaskularizasyon işlemleri sırasında organın içinde tutulduğu solüsyon 1978 yılından bu yana güvenle kullanılmaktadır. Günümüzde organın soğuk perfüzyonla yıkama ve sonrasında perfüzyon solüsyonu içerisinde soğukta saklanması, organ korunmasında basit ve ucuz bir yöntem olarak yaygın bir şekilde kullanılmaktadır (6). Bununla beraber her merkez Eurocollins, UW veya kendi geliştirdikleri solüsyonları kullanmakta ve birbirine benzer sonuçlar almaktadır.

Günümüzde yaygın olarak kullanılan şekliyle; organ, kadavra vericilerinde perfüzyon -soğutma - koruma sıvılarından biri ile in-situ yada canlı organ vericilerinde olduğu gibi çıkartılır çıkartılmaz, dondurulmuş perfüzyon sıvısı ile doğrudan temasa gelmemek koşulu ile eksternal soğutmaya alınmakta, daha sonra da perfüzyonla soğutmaya geçilmektedir. Perfüzyon, +4°C' deki sıvı ile, organda basınca bağlı hasar oluşturmayacak (60-100 cm H<sub>2</sub>O) fakat yeterli akım sağlayacak şekilde yapılmaktadır. Organın santral sıcaklığı (core temperature) bu yöntemle 4°C - 8°C'ye düşürülmekte ve bu iş için 200-400 ml soğutulmuş perfüzyon sıvısı yeterli olmaktadır.

Sıcak iskemi ve soğuk iskemi süreleri organ hasarında önemli faktörlerdir. Sıcak iskemi sırasında oluşan hasar doğal olarak soğuk iskemiden daha fazla olmaktadır. Sıcak iskemi sırasında hücre aerobik metabolizmadan anaerobik metabolizmaya geçmektedir. Oksijenasyonun ve venöz dönüşün olmadığı hücrede anaerobik metabolizma sonucu ortaya çıkan toksik metabolik artıklar, hücreyi hızla ölüme götürmektedir. Sıcak iskemide kalan hücreler, dokunun türüne bağlı olarak 3

dakika ile 4 saat arasındaki bir süre içerisinde tamamen ölmektedirler Hücrenin sıcak iskemik hasardan korunarak ölümünün geciktirilmesi hücre metabolizmasının yavaşlatılmasına bağlıdır.

Hücre metabolizmasını yavaşlatarak hücre ölümünü geciktirme yöntemleri arasında en yaygın olarak kullanılanı daha önce de vurgulandığı gibi organın soğutulmasıdır ( Şekil 1 ).



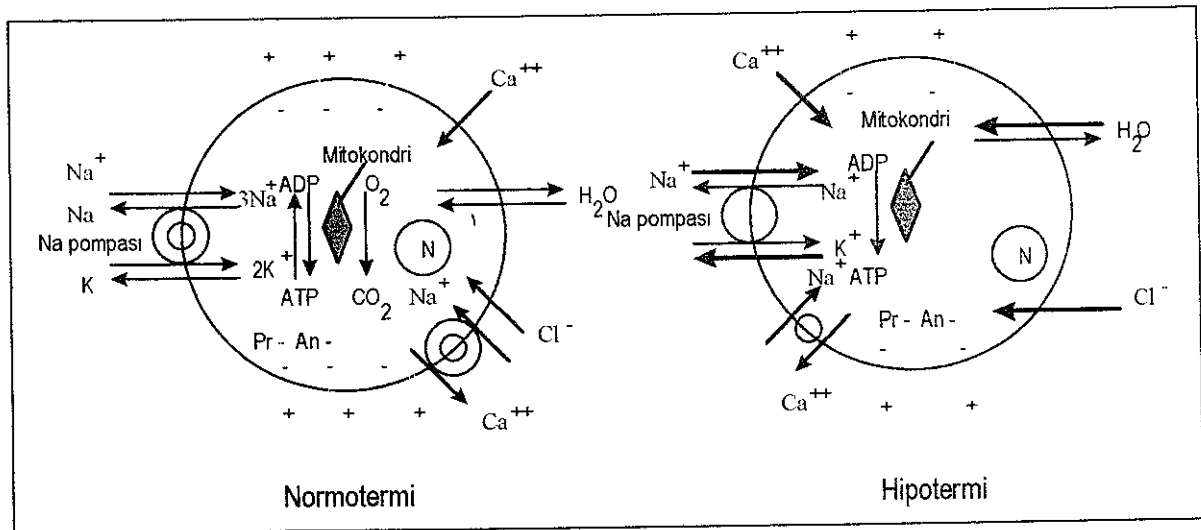
Şekil 1. Organ Hasarı Derecesine Isının Etkisi (48).

Hipotermi ısıya çok duyarlı olan enzimatik reaksiyonlar açısından önemlidir Enzimatik reaksiyonlarda kataliz hızı ile sıcaklık arasındaki ilişki Arrhenius ve van't Hoff tarafından gösterilmiştir (40). Van't Hoff çalışmalarında birçok enzimatik reaksiyonda her 10°C sıcaklık azalması için 1.5 - 2.5 (ortalama 2) kat reaksiyon hızında azalma olduğunu göstermiştir. Bu ilişkinin matematiksel ifadesi şu şekildedir :

$$Q_{10} = \frac{[K_2] [10/T_2 - T_1]}{[K_1]}$$

$Q_{10}$  = 10°C ısı değişimi için van't Hoff sabiti  
 $K_1$  ve  $K_2$  =  $T_1$  ve  $T_2$  ısılarında reaksiyon hızı

Bu formülden 37°C (normotermi) sıcaklıktan, 0°C (teorik koruma sıcaklığı) sıcaklığa düşme durumunda,  $Q_{10}$ 'u 2 olan enzimatik bir reaksiyonun hızının 12-13 kat azalacağı hesaplanabilir (5,48). Aslında bu, metabolik reaksiyonların termodinamik değişikliklerinin tümünü yansıtmaz ve tüm reaksiyonlar için geçerli değildir. Fakat olayın boyutunu göstermesi açısından çarpıcı bir örnektir. Eğer bir organ bir saatlik sıcak iskemi (37°C) ile canlılığını kaybediyorsa teorik olarak soğuk iskemi (0°C) ile canlılığını 12-13 saatte kaybedecek demektir. Özetle hangi metabolik reaksiyonların yavaşladığı ve organ korunmasında canlılığın devamını sağladığı açık değildir (40). Ancak, hipotermiye indüklenen glikoliz hızını azaltarak hidrojen iyonu birikmesi ve dolayısıyla asidozu suprese ederek sıcak iskemik hasardan organı koruduğuna inanılmaktadır. Hipotermi ayrıca fosfolipazlar, proteazlar, lizozomal hidrolazlar gibi doku hasarına yol açan katabolik enzimleri suprese etmekte, metabolizma hızının azalması sonucunda oksijene olan ihtiyaç da azalmaktadır. Hipotermiye bu yararlarına karşın, normal koşullarda hücre hacmini regüle eden hücre membranı iyon pompalarında meydana getirdiği hasarlar hücre şişmesine neden olmaktadır (Şekil 2).



Şekil 2 Hipotermiye İndüklediği Hücre Şişmesi (48)

Sodyum pompası hücre hacmi regülasyonunda katkısı olan önemli bir enzim sistemidir. Bu pompa sistemi sodyumu dışarı atarken hücre içerisine potasyum almak amacıyla mitokondrial oksidatif fosforilasyonla sağlanan ATP'yi kullanır. Sodyum pompası (Na-K ATPase) aktivitesinin etkilenmesi sonucu ortaya çıkan, sodyum klor ve suyun hücre içerisine diffüzyonu sonrası hücre şişmesi ortaya çıkmaktadır. Bu olayda iyonize kalsiyumun da katkısı büyüktür. Normal koşullarda hücre dışında kalsiyum konsantrasyonu hücre içerisinden 1000 kat fazladır, bu nedenle kalsiyum hücre içerisine girme eğilimindedir. Kalsiyum iyonları Na-Ca ATPase sisteminde sodyum iyonları ile bire bir değiştirilerek dışarı pompalanır. Hipotermik koşullarda pompaların işlevleri durur ve membran potansiyeli de bozulur. Böylece klor sodyumla birlikte hücre içine girer. Bu evrede kalsiyumun hücre içine girmesini engelleyecek bir bariyer yoktur. Aynı zamanda intrasellüler depolardan kalsiyum salınır ve sitozoldeki kalsiyum konsantrasyonu artar. Sitozoldeki artmış kalsiyum konsantrasyonu fosfolipaz A<sub>1</sub>, A<sub>2</sub> ve C'yi aktive eder. Bu aktivasyon membran fosfolipid hidrolizini artırır, hücre ve mitokondrial membranların bozulmasına ve hücre harabiyetine yol açar.

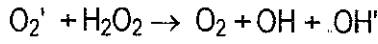
Reaktif oksijen kökenli serbest radikallerin iskemi - reperfüzyon hasarındaki rolü, hücre ve organ fonksiyonunun ısı ve reaktif oksijen metabolitleri ile ilişkisi, organ nakli uygulamalarında özel bir önem arz etmektedir.

## SERBEST OKSİJEN RADİKALLERİ

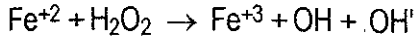
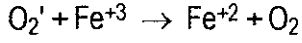
Bir serbest radikal dış yörüngesinde bir veya daha fazla eşleşmemiş elektron bulundurabilen herhangi bir molekül olarak tanımlanabilir. Serbest oksijen radikalleri oksijenin belirli koşullarda kısmen indirgenmesi sonucu oluşan çok kısa ömürlü ve güçlü oksidan nitelikli oksijen metabolitleridir. Bunlar hidrojen peroksit (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>), superoksit anyonu (O<sub>2</sub><sup>-</sup>), hidroksil radikali (OH<sup>•</sup>), singlet oksijendir. Oksijenin dış moleküler yörüngesine bir veya daha fazla eşleşmemiş elektronun eklenmesi yaygın olarak bulunan oksijenin güçlü bir toksik madde olan serbest oksijen radikaline dönüşmesine neden olur. Bu radikallerden süperoksit anyonu ve hidroksil radikali diğer moleküllerden elektronları çekerek enerji gereksinimlerini karşılayabildiklerinden oksitleyici ajanlar olarak kabul edilirler. Serbest oksijen

radikallerinin hepsi aynı derecede toksik değildir. Süperoksit anyon radikalleri sulu çözeltilerde hidrojen peroksit oluşturur. Süperoksitten farklı olarak hidrojen peroksit hücrelere girebilir. Hücre içine girdikten sonra serbest demir veya bakır iyonlarının katalizlediği bir reaksiyonla hidroksil radikali oluşabilir (21,23,27,39,49).

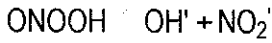
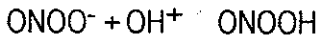
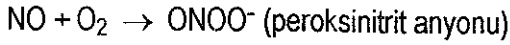
Hidroksil radikali ve singlet oksijen en reaktif ve en sitotoksik radikallerdir. Hidrojen peroksit ve süperoksit anyonunun birbirleri ile reaksiyona girdikleri ve demir iyonunun da katkısının olduğu olaylar zinciri sonucunda hidroksil radikali ve singlet oksijen oluşur. Bu olaya HABER- WEISS reaksiyonu denir.



Fizyolojik pH'da bu reaksiyonun hız sabiti demir tarafından katalizlenen aşağıdaki iki basamaklı reaksiyon ile karşılaştırıldığında çok yavaştır

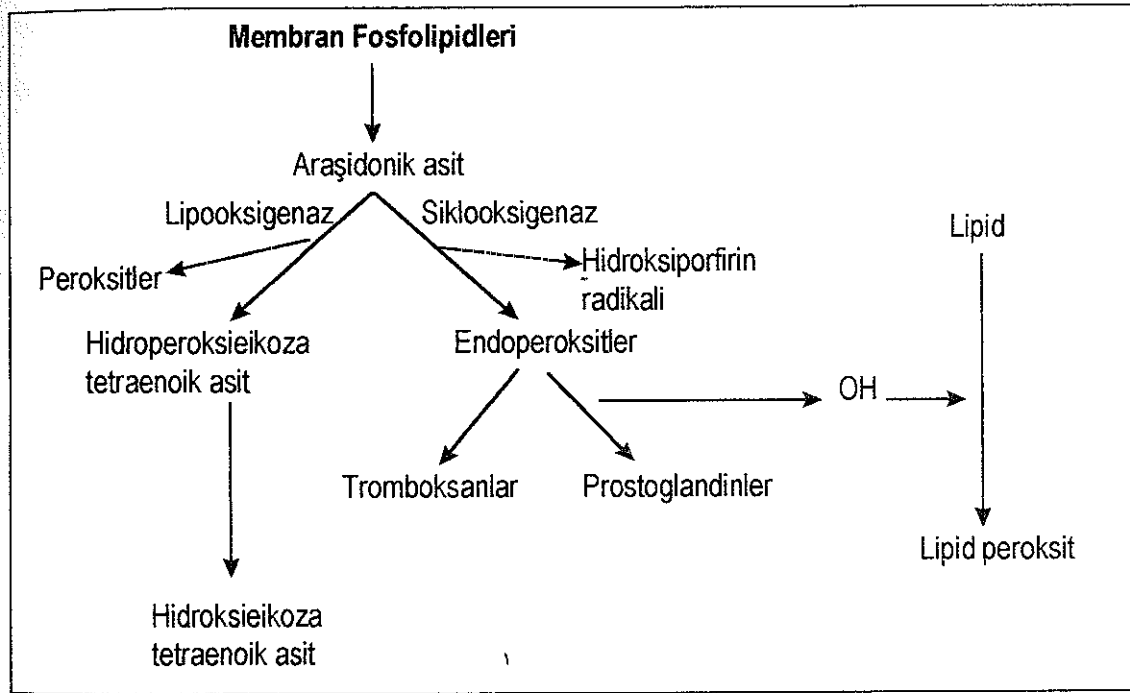


Bu iki basamaklı reaksiyon süperoksit ile oluşan FENTON reaksiyonu olarak adlandırılır. Hidroksil radikali, oksijen ve nitrik oksit etkileşimini içeren, demir bağımsız bir reaksiyonla da oluşabilir.



Hidrojen peroksit ile klorür veya bromür etkileşimi sonucu son ürün olarak hipokloröz asitleri oluşur. Hipokloröz asitler güçlü oksidan olup, direkt olarak hücreleri zedeleyebilir veya latent jelatinaz ve kollagenazı aktive ederek indirekt doku zedelenmesi oluşturabilir. Serbest oksijen radikalleri oluşumu aynı zamanda hücre biyokimyasının bir parçasıdır. Zararlı etkileri yanında serbest radikaller transport ve hücre büyümesinin regülasyonu gibi hücresel işlevlerde de rol oynarlar. 50 nmol/L - 50 µmol/L arasındaki düşük dozlarda hidrojen peroksit, prostanoitlerin oluşumunu stimüle eder. Sitolitik olmayan konsantrasyonlarda endotel hücrelerince cGMP üretimini uyarır. Prostanoidler ve cGMP vasküler tonusun regülasyonu ve hücrelerarası iletişimde etkilidirler (16,17,35)

Hidroksil radikali hücrelerin en önemli komponentlerinden 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 radikal olup, malondialdehid birikimine yol açar. Malondialdehid, formaldehid, asetaldehid, aseton ve propionaldehid bu yıkım ürünleri olup, membran doymamış yağ asitlerinin oksidasyonunun en önemli göstergesi olarak kabul edilir. LİPİD PEROKSİDASYONU olarak adlandırılan bu olay lökotrienlerin, prostaglandinlerin, sitotoksik ve kemotaktik lipid peroksidlerin biyosentezinde oluşur (Şekil 3) (17,21,27,35,54,55)



Şekil 3. Lipid Peroksidasyonu (17)

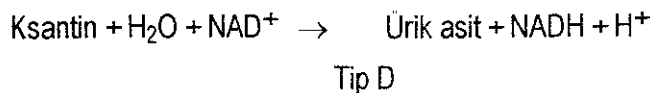
Serbest oksijen radikalleri tüm hücre komponentleri ile, özellikle sülfhidril içeren aminoasit ve poliansatüre yağ asitleri ile etkileşerek proteinlerin denatürasyonuna, membran lipidlerinin peroksidasyonuna, kemotaktik faktörlerin oluşumuna, kollagen sentezinin bozulmasına neden olur. Bunlara ek olarak polisakkaridlerin depolimerizasyonuna, deoksiribonükleotidlerin yıkılmasına, hücrelerin yapısal proteinlerinin sülfhidril gruplarının oksitlenmesine ve çapraz bağlanmasına,

antiproteazların inhibisyonu sonucu proteolitik enzimlerin aktivasyonuna neden olur. Ayrıca proteoglikan ve glikozaminoglikan moleküllerinin oksidatif zedelenmesinde rol oynarlar.

Son araştırmalar iskemik dokularda büyük miktarda serbest oksijen radikallerinin oluştuğunu göstermektedir. İskemi ile oluşan hastalıklar günümüzde en yaygın görülen ölüm nedenlerindedir. Yeterli kan akımı olmaksızın organlar fonksiyonlarını devam ettiremezler. Kısa bir iskemi periyodu sonrası belirli dokularda oluşan zedelenme beklenenden çok fazla olmaktadır. Çünkü zedelenmenin asıl nedeni iskemi olmayıp, reperfüzyon yada daha spesifik olarak reoksijenasyondur. Reperfüzyon zedelenmesi, organın reperfüzyonu sırasında moleküler oksijenin yeniden sunumu sonucu değişik derecelerde ortaya çıkan hücre zedelenmesidir. Bu tanım oksijenin dokuya yeniden sunumunun zedelenmeye neden olduğu anlamına gelmektedir (22,32,36,38).

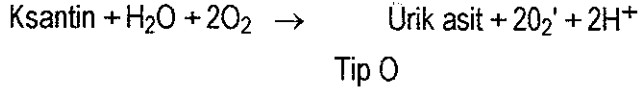
Reperfüzyon zedelenmesinde rol oynayan hücresel olayları açıklayan en önemli iki mekanizma aşırı kalsiyum yüklenmesi ve serbest radikal hasarıdır. Kalsiyumun önce ekstrasellüler alandan tamamen uzaklaştırılması, sonra yeniden sunulmasıyla masif doku yıkımı, belirgin enzim salınımı ile birlikte şiddetli hücresel zedelenme olmaktadır. Mitokondriler yeniden fonksiyon kazandıklarında enerjilerini sitozolden aşırı kalsiyum alınması için kullanırlar. Bu olay solunum zincirini şiddetle zedeleyerek bu yolla oluşan enerji üretimini azaltır. Aniden reoksijene olan mitokondriler tarafından hızlı ve aşırı kalsiyum alınması enerji kaybına, sitozolik kalsiyum kontrolünün bozulmasına, sarkolemmal zedelenmeye yol açmaktadır. Kalsiyum paradoksunda mitokondriyel zedelenme aşırı kalsiyum yüklenmesine bağlı olmasına karşın, oksijen paradoksunda mitokondriyel zedelenmeye başlangıçta serbest radikaller aracılık etmekte ve bunu aşırı kalsiyum yüklenmesi izlemektedir.

Postiskemik dokularda süperoksid radikalının ana kaynağı ksantin oksidaz enziminin katalizlediği reaksiyondur. Bu enzim süperoksid radikalının bildirilen ilk biyolojik kaynağıdır. Bu enzim özellikle barsak, akciğer, karaciğer ve böbrek gibi dokularda yaygın olarak bulunur ve ksantin dehidrogenaz (Tip D) olarak sentezlenir. Enzimin bu tipi sağlıklı bir dokuda total aktivitenin %90'ını oluşturur. Dehidrogenaz, süperoksid ve hidrojen peroksid oluşturmak üzere elektronları moleküler oksijene transfer edemez, fakat NAD<sup>+</sup>'yi indirger ;

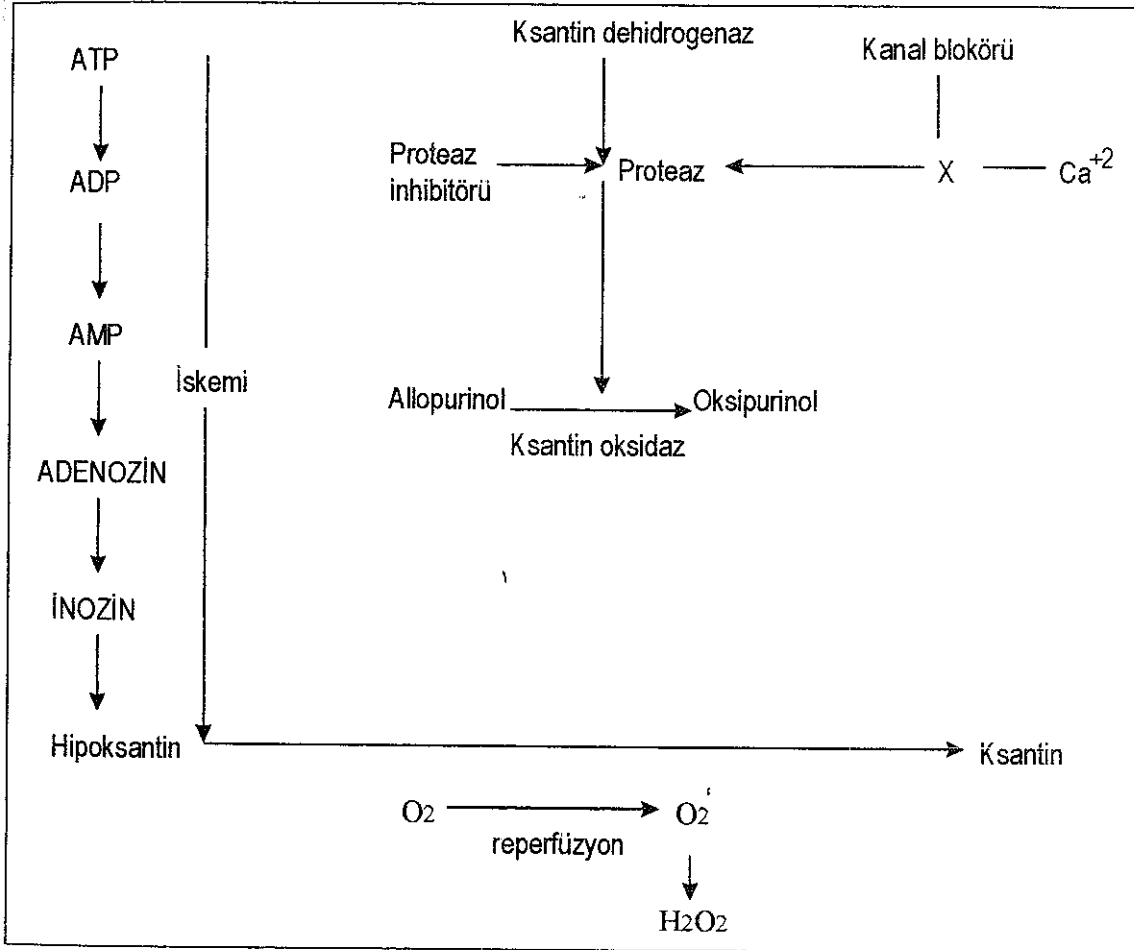




Ksantin oksidaz ise, NAD+ yerine moleküler hidrojeni kullanır ve süperoksit, hidrojen peroksit yada her ikisini de oluşturur ;



Dokulara kan akımının ATP oluşumu için gerekli oksijeni sağlayamayacak kadar azalması Tip D aktivitesinin, Tip 0 aktivitesine dönüşümüne yol açar. Tip 0 aktivasyonu sonucunda da süperoksit radikali ve hidrojen peroksit oluşumunda bir patlama olur (Şekil 4) (24,39,49).



Şekil 4. İskemi-reperfüzyonda serbest oksijen radikali oluşumu (49)

Nakledilecek organ çıkartıldıktan sonra koruma zamanının uzun tutulmasının zorunlu olmadığı durumlarda bile, soğutmaya bağlı olarak değişik düzeyde hücre şişmesi ve hücre hasarı olması beklenen bir olaydır. Bunun yanında reperfüzyon sırasında ortaya çıkan serbest oksijen radikallerine bağlı olarak böbrek hasarı beklenmelidir. Bu konuda birçok çalışma yapılmış olmasına rağmen, henüz istenen başarı sağlanabilmiş değildir. Hasarı en az seviyeye indirmek için optimal sıcaklığın ne olması gerektiği konusunda bir fikir birliği de mevcut değildir.

Transplantasyon işlemi uygulanırken organ vücut içerisine alındığı için ortam ısısına bağlı olarak belli bir derecede ısınması kaçınılmazdır (2. sıcak iskemi süresi). Anastomozların bitimini takiben reperfüzyon sağlanmakta ve kısa bir sürede reoksijenizasyona bağlı reperfüzyon hasarı oluşmaktadır. Organın revaskülarizasyon işlemleri sırasındaki ısınma hızı ve ulaştığı sıcaklık cerrahinin süresine paralellik göstermektedir. Fakat bu konuda elimizde yeterli veriler yoktur.

Nakledilecek organın soğutulması konusunda pek çok çalışma olmakla beraber, soğutulma hızı ve organın hangi sıcaklık derecesinde minimal hasarla saklanabileceği ve hangi sıcaklık derecesinde saklanan organda en az reperfüzyon hasarı gelişeceği konularında, gözden geçirdiğimiz literatürde, yeterli ve tatmin edici bilgiye rastlanmamıştır.

Bu çalışmada, transplantasyonda vasküler anastomozları takiben klemler açıldığı zaman oluşan reperfüzyon sırasında ortaya çıkan serbest oksijen radikal hasarının hangi sıcaklık derecesinde en az olduğunun gösterilmesi amaçlanmıştır.

## GEREÇ VE YÖNTEMLER

Bu çalışma, Akdeniz Üniversitesi Tıp Fakültesi Cerrahi Araştırma Merkezi'nde yapıldı. Çalışmada her grupta 8 tavşan olmak üzere 6 grupta toplam 48 adet genç erişkin, erkek tavşan kullanıldı.

Tüm hayvanlarda ağırlığın ölçülmesini takiben 1 gr/kg intraperitoneal ürethan verilerek anestezi sağlandı. Ameliyat masasına tespit edilen tavşanda sağ kulak venine 22 G polietilen branül konularak deney süresince 0.5 ml/dk hızla serum fizyolojik infüzyonu uygulandı. Deney süresince kan basıncı ve nabız monitörizasyonu için sağ karotis arter kullanıldı. Orta hat kesisi ile karına girildi. Barsaklar dışarı alınıp vücut ısısında ıslak kompresle korundu. Sol üreter serbestleştirildi ve kanüle edildi, sol renal arter ve ven serbestleştirildi.

### GRUPLAR

**Grup I (Kontrol Grubu) :** Yukarıdaki işlemleri takiben sol renal arter ve ven klemlenerek sıcak iskemi başlatıldı. 3 dakika beklenerek klemler açıldı. Bu grupta böbrek perfüzyonu uygulanmadı. Klemp açıldıktan sonra 60 dakika beklenip nefrektomi uygulandı. Bu sırada idrar miktarı kaydedildi.

**Grup II ( $5 \pm 1^\circ\text{C}$  Grubu) :** Rutin işlemleri takiben sol renal arter ve ven kleplendi. Sol böbrek vücut dışına alındı. Sıcak iskemi süresi kaydedildi. Böbrek ağırlık ve hacmi ölçüldükten sonra renal arter ve ven 24 G polietilen kateterle kanüle edildi. Santral sıcaklık ölçümü için sıcaklık probu böbreğe yerleştirildi. Böbrek 100 cm H<sub>2</sub>O basınç altında çalışma solüsyonu ile  $5 \pm 1^\circ\text{C}$  sıcaklığa ininceye kadar perfüze edildi. Böbrek  $5 \pm 1^\circ\text{C}$  sıcaklıktaki solüsyon içerisinde 15 dakika bekletildi. Böbreğin ağırlık ve

hacmi tekrar ölçüldü. Renal arter aortaya, renal ven ise vena kava inferiora kanüle edildi. Bu işlem Francis ve arkadaşları ile Dunn'ın teknikleri modifiye edilerek gerçekleştirildi (13,15) Kanülasyon sonrası klempeler açıldı. Soğuk iskemi süresi hesaplandı. Klempeler açıldıktan sonraki 60 dakikalık sürede idrar miktarı kaydedildi. Bu süre sonunda nefrektomi uygulandı.

**Grup III ( $10 \pm 1^\circ\text{C}$  grubu)** : Grup II'deki rutin işlemlerden farklı olarak böbrek  $10 \pm 1^\circ\text{C}$  santral sıcaklığa ininceye kadar perfüze edildi. Perfüzyon sonrası  $10 \pm 1^\circ\text{C}$  sıcaklıktaki solüsyon içerisinde 15 dakika bekletildi

**Grup IV ( $15 \pm 1^\circ\text{C}$  grubu)** : Yine rutin işlemlerden farklı olarak böbrek  $15 \pm 1^\circ\text{C}$  santral sıcaklığa ininceye kadar perfüze edildi. Perfüzyon sonrası  $15 \pm 1^\circ\text{C}$  sıcaklıktaki solüsyon içerisinde 15 dakika bekletildi

**Grup V ( $20 \pm 1^\circ\text{C}$  grubu)** : Bu grupta Grup IV'den farklı olarak böbrek  $20 \pm 1^\circ\text{C}$  santral sıcaklığa ininceye kadar perfüze edildi. Perfüzyon sonrası  $20 \pm 1^\circ\text{C}$  sıcaklıktaki solüsyon içerisinde 15 dakika bekletildi.

**Grup VI ( $35 \pm 1^\circ\text{C}$  grubu)** : Bu grupta ise  $35 \pm 1^\circ\text{C}$  santral sıcaklık sağlanacak şekilde perfüzyon uygulandı. Perfüzyon sonrası böbrek  $35 \pm 1^\circ\text{C}$  sıcaklıktaki solüsyon içerisinde 15 dakika bekletildi (Tablo 2).

Tüm gruplarda deney bitiminde böbrek ve idrar numuneleri alınarak denekler sakrifiye edildi. Alınan böbrekler TBARs düzeyi ölçümü, idrar numuneleri LDH ve GGT düzeyi ölçümü için  $-60^\circ\text{C}$ 'de saklandı.

**Tablo 2.** Grupların Sıcaklığa Göre Dağılımı

| Grup     | Sıcaklık ( $^\circ\text{C}$ ) |
|----------|-------------------------------|
| Grup I   | Kontrol                       |
| Grup II  | $5 \pm 1$                     |
| Grup III | $10 \pm 1$                    |
| Grup IV  | $15 \pm 1$                    |
| Grup V   | $20 \pm 1$                    |
| Grup VI  | $35 \pm 1$                    |

## TBARs ÖLÇÜMÜ

Derin dondurucuda  $-60^{\circ}\text{C}$ 'de saklanan böbrek dokuları TBARs ölçümü süresince sürekli buz içinde saklandı. Böbrekler korteks ve medulla kısmına ayrılarak homojenizatör (Tri-R Sti-R marka K43 model) ile 10 000 rpm'de 2 dakika boyunca 2 ml homojenizasyon sıvısında homojenize edildi. Total volüm yine homojenizasyon sıvısı ile 10 ml'ye tamamlanarak aynı gün çalışılincaya kadar buzlukta bekletildi.

TBARs ölçümü sırasında homojenizasyon aşamasında Stone ve arkadaşlarının (52), standart kullanımda Rao ve arkadaşlarının (42), deneyin yapılışında ise Stocks ve Dormandy'nin (51) çalışmaları referans alındı.

Homojenizasyon sıvısı  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ ,  $\text{K}_2\text{HPO}_4$ , KCl, EDTA, Trito-X, bütilhidroksitoluen 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 4050 nmol/L konsantrasyona getirildi.

Proteinlerin çöktürülmesi, 3 ml homojenize doku süspansiyonuna 2 ml TCA eklenerek 4000 rpm'de 15 dakika santrifüj uygulanarak yapıldı. Proteini çöken berrak süpernatandan 3 ml alınarak, 1 ml TBA eklendi ve 15 dakika 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/gram protein olarak ifade edildi.

Protein ölçümünde Lowry'nin tanımladığı metod kullanıldı (30). Homojenize doku süspansiyonlarına 100 ml, 1 N NaOH eklendikten sonra günlük olarak taze hazırlanan D reaktifinden (%2  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  10 ml, %1  $\text{CuSO}_4$  0.1 ml, %1 sodyum potasyum tartarat 0.1 ml) 1 ml konularak 20 dakika karanlık bir dolapta bekletildi. Son aşamada fulin reaktifi (100 ml) eklenen numuneler 30 dakika daha karanlıkta bekletilerek spektrofotometrede köre karşı 500 nm dalga boyunda absorbanları saptandı. Kör

ve standart (bovine serum albumine) dilusyonlara da aynı işlem uygulandı. Sonuçlar mgr/ml olarak ifade edildi.

#### LAKTAT DEHİDROGENAZ ÖLÇÜMÜ

Toplanan idrarlarda LDH, Spinreact ticari kiti (İspanya) ile kinetik yöntem aracılığı ile Mannheim Boehringer marka 4010 model fotometrede 37°C ortam ısısında 340 nm dalga boyunda ölçüldü.

#### GAMA GLUTAMİL TRANSFERAZ ÖLÇÜMÜ

Toplanan idrarlarda GGT, Spinreact ticari kiti ile (İspanya) kinetik yöntem aracılığı ile Mannheim Boehringer marka 4010 model fotometrede 37°C ortam ısısında 340 nm dalga boyunda ölçüldü.

#### BÖBREK SANTRAL SICAKLIK ÖLÇÜMÜ

Deney süresince böbreğin santral sıcaklığının takibinde Dual Thermometer (Shimadzu Co., Japan) kullanıldı.

#### İSTATİSTİKSEL DEĞERLENDİRME

Deney sonuçları ortalama  $\pm$  standart sapma olarak verildi. Sonuçların istatistiksel olarak önemliliğine Kruskal-Wallis Tek Yönlü Anova, gruplararası farklılığına ise Mann-Whitney U Testi ile bakıldı. 0.05'den küçük p değerleri anlamlı kabul edildi.

## BULGULAR

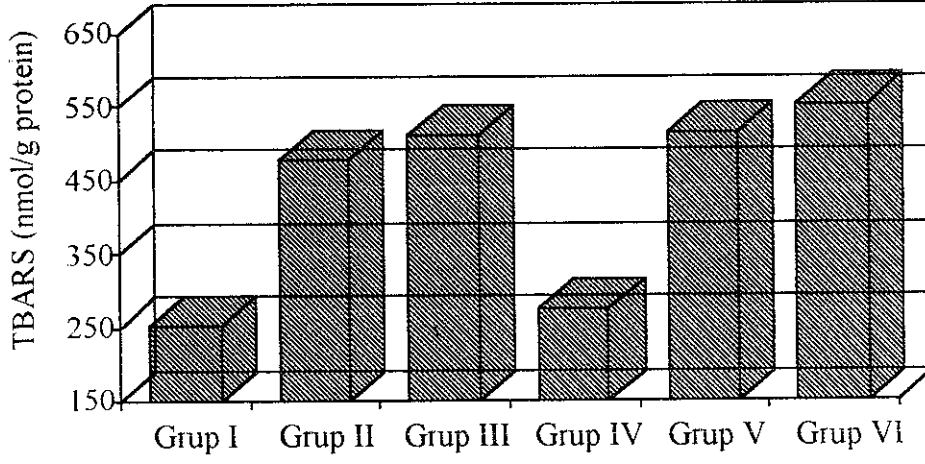
### BÖBREK MEDULLA TBARs DÜZEYLERİ

Böbrek medulla ve korteksinde ayrı ayrı yapılan ölçümlerden lipid peroksidasyonunun göstergesi olarak kabul edilen TBARs düzeyleri soğutma derecesine bağlı olarak gruplar arasında farklılıklar gösterdi.

Medulla TBARs düzeyi Grup I'de  $251.23 \pm 56.63$  nmol/g protein iken, solüsyonla perfüzyon uygulanan Grup II'de  $476.46 \pm 152.99$  nmol/g protein, Grup III'de  $510.8 \pm 170.89$  nmol/g protein, Grup IV'de  $273.62 \pm 88.36$  nmol/g protein, Grup V'de  $513.27 \pm 192.74$  nmol/g protein, Grup VI'da  $552.1 \pm 236.42$  nmol/g protein olarak ölçüldü (Tablo 3) TBARs artışı kontrol grubu (Grup I) ile Grup II, Grup III, Grup V, Grup VI arasında istatistiksel olarak anlamlı sınırlara ulaşırken ( $p < 0.05$ ), Grup IV ile arasında anlamlı fark bulunmadı. Grup IV ile Grup II, III, V ve VI arasındaki fark da istatistiksel olarak anlamlı bulundu ( $p < 0.05$ ). Grup II, III, V ve VI arasında ise istatistiksel olarak anlamlı fark bulunmadı ( $p > 0.05$ ) (Şekil 5).

**Tablo 3** Ortalama Böbrek Medulla TBARs Düzeyleri (Ortalama  $\pm$  SD nmol/g protein).

| Grup     | TBARs               |
|----------|---------------------|
| Grup I   | 251.23 $\pm$ 56.63  |
| Grup II  | 476.46 $\pm$ 152.99 |
| Grup III | 510.80 $\pm$ 170.89 |
| Grup IV  | 273.62 $\pm$ 88.36  |
| Grup V   | 513.27 $\pm$ 192.74 |
| Grup VI  | 552.10 $\pm$ 236.42 |



**Şekil 5.** Ortalama Böbrek Medulla TBARs Düzeyleri.

#### BÖBREK KORTEKS TBARs DÜZEYLERİ

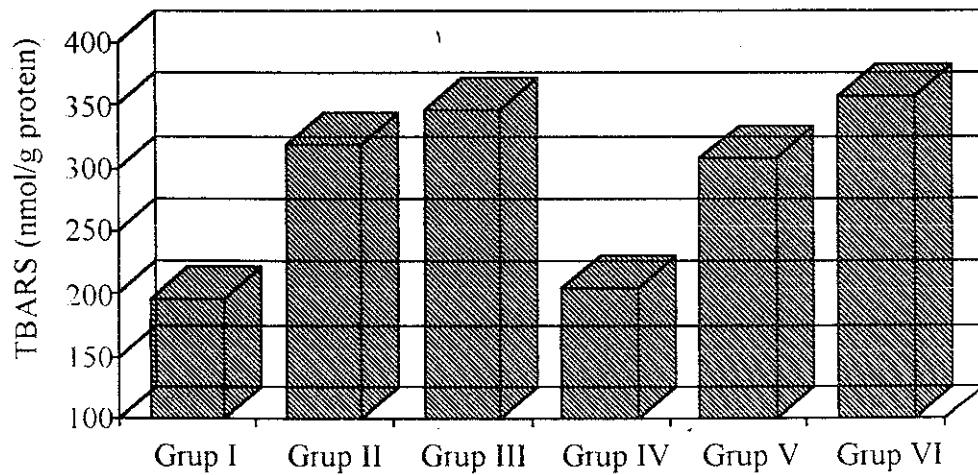
Korteks TBARs düzeyi Tablo 4'de görüldüğü gibi solüsyonla perfüzyon uygulanan gruplarda kontrol grubuna göre artış gösterdi. Bu artış Grup II, III, V ve VI'da istatistiksel olarak anlamlı bulunurken ( $p < 0.05$ ), Grup IV ile kontrol grubu arasında istatistiksel olarak anlamlı fark bulunmadı. Grup



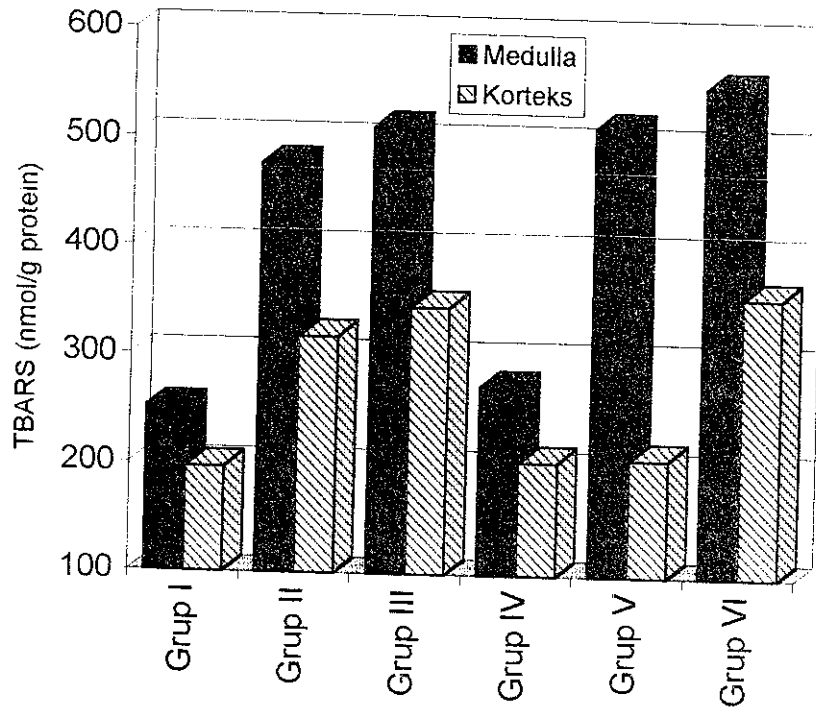
IV ile Grup II, III, V ve VI'nin karşılaştırılmasında TBARs düzeyleri arasındaki farkın istatistiksel olarak anlamlı olduğu, Grup IV'de bulunan TBARs düzeyinin bu gruplara göre düşük olduğu bulundu ( $p < 0.05$ ). Grup II, III, V ve VI arasında ise istatistiksel olarak anlamlı fark bulunmadı ( $p > 0.05$ ) (Şekil 6 ve 7)

**Tablo 4.** Ortalama Böbrek Korteks TBARs Düzeyleri (Ortalama  $\pm$  SD nmol/g protein).

| Grup     | TBARs               |
|----------|---------------------|
| Grup I   | 197.21 $\pm$ 61.05  |
| Grup II  | 317.57 $\pm$ 109.18 |
| Grup III | 345.40 $\pm$ 88.28  |
| Grup IV  | 204.63 $\pm$ 62.80  |
| Grup V   | 308.08 $\pm$ 88.56  |
| Grup VI  | 357.63 $\pm$ 121.27 |



**Şekil 6.** Ortalama Böbrek Korteks TBARs Düzeyleri.



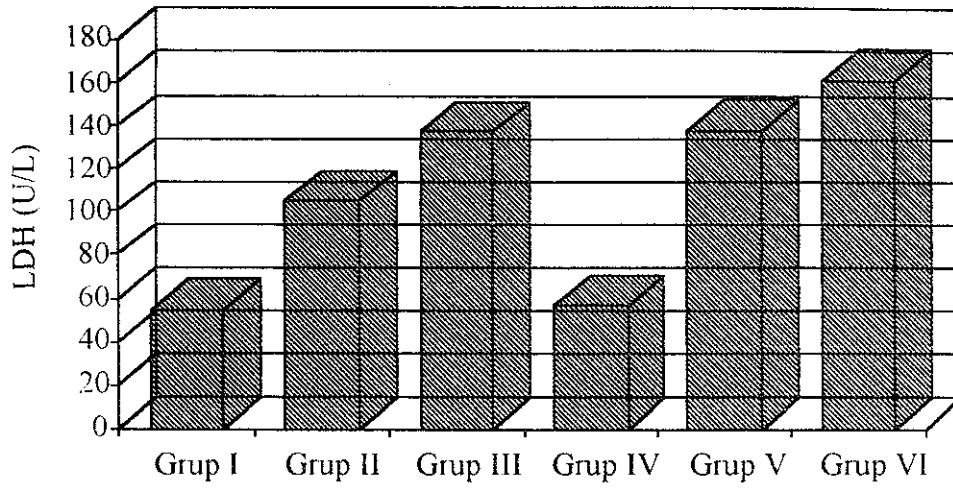
Şekil 7 Gruplarda Ortalama Medulla ve Korteks TBARS Düzeylerinin Karşılaştırılması

#### İDRAR LDH DÜZEYLERİ

Tübüler hücre hasarının göstergelerinden birisi olan idrar LDH düzeyi ölçümlerinde kontrol grubuna göre solüsyonla perfüzyon uygulanan gruplarda Tablo 5'de görüleceği gibi LDH düzeyinde artış saptandı. Bu artış Grup II, III, V ve VI'da istatistiksel olarak anlamlı bulunurken ( $p < 0.05$ ), Grup IV ile Grup I arasında istatistiksel olarak anlamlı fark bulunmadı. Grup IV ile solüsyonla perfüzyon uygulanan diğer gruplar arasındaki fark da istatistiksel olarak anlamlı bulundu ( $p < 0.05$ ) Grup II, III, V ve VI arasında ise idrar LDH düzeyi ölçümünde istatistiksel olarak anlamlı fark bulunmadı ( $p > 0.05$ ) (Şekil 8)

Tablo 5 Grupların İdrar LDH Düzeyleri (Ortalama  $\pm$  SD U/L)

| Grup     | LDH                 |
|----------|---------------------|
| Grup I   | 54.62 $\pm$ 8.81    |
| Grup II  | 104.91 $\pm$ 38.32  |
| Grup III | 137.21 $\pm$ 88.43  |
| Grup IV  | 56.63 $\pm$ 15.66   |
| Grup V   | 137.98 $\pm$ 107.03 |
| Grup VI  | 161.75 $\pm$ 141.14 |



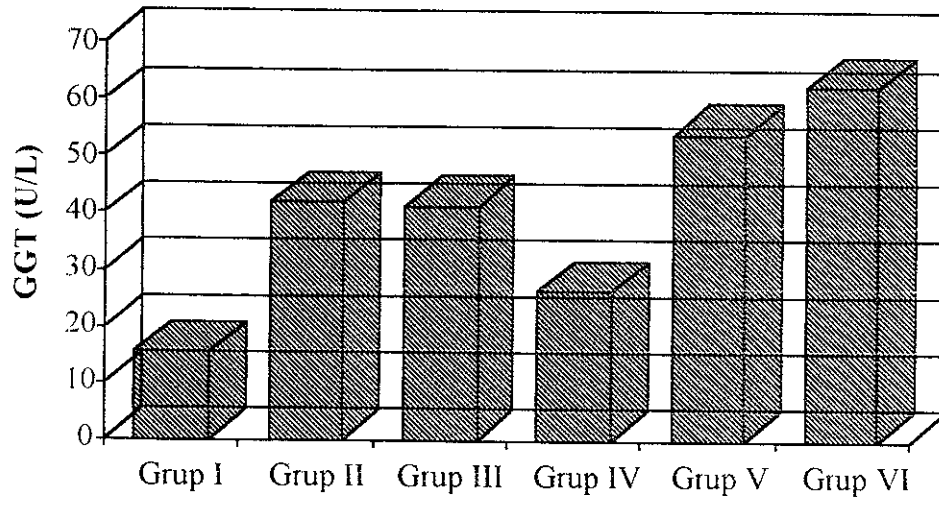
**Şekil 8.** Grupların İdrar LDH Düzeyleri.

#### İDRAR GGT DÜZEYLERİ

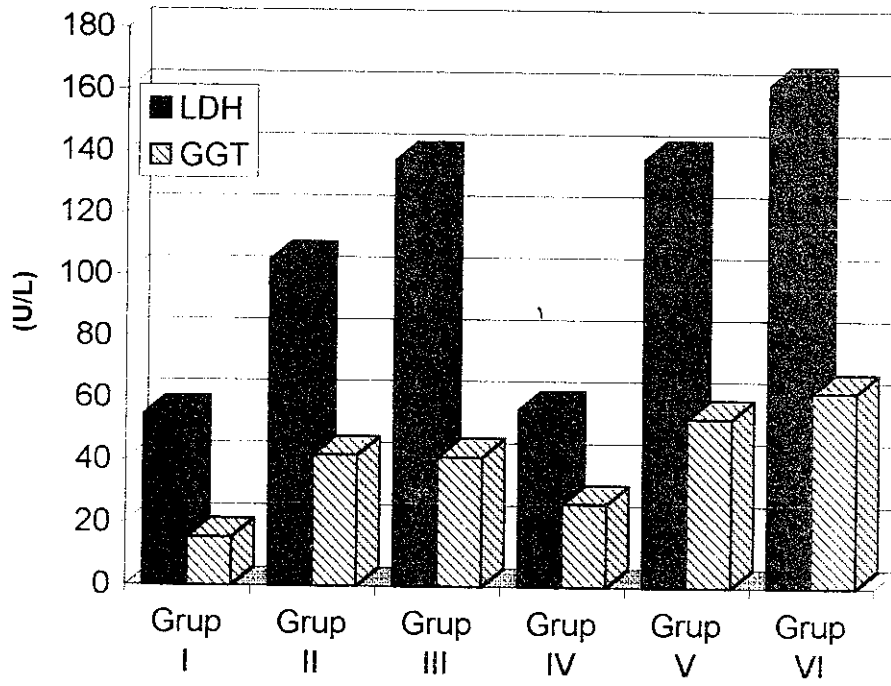
İdrar GGT düzeyi ölçümlerinde kontrol grubuna göre solüsyonla perfüzyon uygulanan gruplarda Tablo 6'da da görüleceği gibi GGT düzeyinde artış saptandı. Bu artış Grup II, III, V ve VI'da istatistiksel olarak anlamlı bulunurken ( $p < 0.05$ ), Grup IV ile Grup I arasında istatistiksel olarak anlamlı fark bulunmadı. Grupların kendi aralarında yapılan değerlendirmede Grup II ile Grup VI arasındaki ve Grup IV ile Grup V ve VI arasındaki fark istatistiksel olarak anlamlı bulundu ( $p < 0.05$ ) (Şekil 9 ve 10).

**Tablo 6.** Grupların İdrar GGT Düzeyleri (Ortalama  $\pm$  SD U/L).

| Grup     | GGT               |
|----------|-------------------|
| Grup I   | 15.52 $\pm$ 7.04  |
| Grup II  | 41.94 $\pm$ 22.36 |
| Grup III | 41.35 $\pm$ 26.34 |
| Grup IV  | 26.41 $\pm$ 14.34 |
| Grup V   | 54.01 $\pm$ 33.88 |
| Grup VI  | 62.39 $\pm$ 18.8  |



Şekil 9. Grupların İdrar GGT Düzeyleri



Şekil 10. Grupların Ortalama İdrar LDH ve GGT Düzeylerinin Karşılaştırılması

## İDRAR MİKTARI

Böbreğin solüsyonla perfüzyonu ve reperfüzyonu sonrasında bir saat süre ile toplanan idrar miktarlarının karşılaştırılmasında kontrol grubunda toplanan idrar miktarı diğer gruplara göre istatistiksel olarak anlamlı derecede fazla bulundu ( $p < 0.01$ ). Diğer gruplar arasında ise istatistiksel olarak anlamlı fark bulunmadı (Tablo 7)

**Tablo 7.** İdrar Miktarı (Ortalama  $\pm$  SD ml).

| Grup     | İdrar Miktarı    |
|----------|------------------|
| Grup I   | 2 760 $\pm$ 0.7  |
| Grup II  | 0 165 $\pm$ 0.05 |
| Grup III | 0.174 $\pm$ 0.03 |
| Grup IV  | 0.361 $\pm$ 0.05 |
| Grup V   | 0.14 $\pm$ 0.04  |
| Grup VI  | 0.09 $\pm$ 0.03  |

**Tablo 8.** Grup I Böbrek Medulla ve Korteks TBARs Düzeyleri, İdrar LDH ve GGT Düzeyleri, İdrar Miktarı.

| Denek No          | TBARs              |                    | LDH              | GGT              | İdrar           |
|-------------------|--------------------|--------------------|------------------|------------------|-----------------|
|                   | Medulla            | Korteks            |                  |                  |                 |
|                   | nmol/gr            | nmol/gr            | U/L              | U/L              | ml              |
| 1                 | 266.50             | 282.4              | 58.14            | 13.09            | 2.9             |
| 2                 | 191.20             | 197.5              | 70.737           | 19.04            | 2.7             |
| 3                 | 365.5              | 127.6              | 41.667           | 13.09            | 3.1             |
| 4                 | 294.7              | 267.9              | 58.14            | 13.09            | 4.0             |
| 5                 | 205.0              | 147.1              | 49.419           | 9.52             | 2.3             |
| 6                 | 225.0              | 239.6              | 47.481           | 5.95             | 3.2             |
| 7                 | 227.2              | 185.9              | 58.14            | 26.16            | 2.1             |
| 8                 | 234.7              | 129.7              | 53.295           | 24.26            | 1.8             |
| Ortalama $\pm$ SD | 251.23 $\pm$ 56.63 | 197.21 $\pm$ 61.05 | 54.62 $\pm$ 8.81 | 15.52 $\pm$ 7.04 | 2.760 $\pm$ 0.7 |

**Tablo 9** Grup II Böbrek Medulla ve Korteks TBARs Düzeyleri, İdrar LDH ve GGT Düzeyleri, İdrar Miktarı.

| Denek No    | TBARs              |                    | LDH<br>U/L   | GGT<br>U/L  | İdrar<br>ml |
|-------------|--------------------|--------------------|--------------|-------------|-------------|
|             | Medulla<br>nmol/gr | Korteks<br>nmol/gr |              |             |             |
| 9           | 392.4              | 356.2              | 116.28       | 14.28       | 0.15        |
| 10          | 569.0              | 302.3              | 58.14        | 52.36       | 0.15        |
| 11          | 189.6              | 294.0              | 160.85       | 16.66       | 0.2         |
| 12          | 450.2              | 507.6              | 45.15        | 27.37       | 0.25        |
| 13          | 550.7              | 211.4              | 126.95       | 76.16       | 0.15        |
| 14          | 444.6              | 182.3              | 131.84       | 53.53       | 0.10        |
| 15          | 497.3              | 427.5              | 101.97       | 61.88       | 0.11        |
| 16          | 717.9              | 259.3              | 98.14        | 33.32       | 0.21        |
| Ortalama±SD | 476.46±152.99      | 317.57±109.18      | 104.91±38.32 | 41.94±22.36 | 0.165±0.05  |

**Tablo 10.** Grup III Böbrek Medulla ve Korteks TBARs Düzeyleri, İdrar LDH ve GGT Düzeyleri, İdrar Miktarı.

| Denek No    | TBARs              |                    | LDH<br>U/L   | GGT<br>U/L  | İdrar<br>ml |
|-------------|--------------------|--------------------|--------------|-------------|-------------|
|             | Medulla<br>nmol/gr | Korteks<br>nmol/gr |              |             |             |
| 17          | 706.9              | 443.0              | 241.88       | 17.8        | 0.15        |
| 18          | 268.3              | *                  | 116.28       | *           | 0.17        |
| 19          | 593.8              | 307.2              | 156.21       | 46.41       | 0.14        |
| 20          | 331.2              | 429.7              | 287.60       | 26.18       | 0.18        |
| 21          | 622.2              | 413.4              | 41.66        | 92.82       | 0.23        |
| 22          | 428.6              | 355.8              | 125.19       | 44.36       | 0.20        |
| 23          | 713.3              | 286.4              | 48.45        | 46.41       | 0.17        |
| 24          | 422.1              | 202.3              | 80.42        | 15.47       | 0.15        |
| Ortalama±SD | 510.80±170.89      | 345.40±88.28       | 137.21±88.43 | 41.35±26.34 | 0.174±0.03  |

\* : Teknik nedenlerle değerler okunamamıştır.

**Tablo 11** Grup IV Böbrek Medulla ve Korteks TBARs Düzeyleri, İdrar LDH ve GGT Düzeyleri, İdrar Miktarı

| Denek No    | TBARs        |              | LDH         | GGT         | İdrar      |
|-------------|--------------|--------------|-------------|-------------|------------|
|             | Medulla      | Korteks      |             |             |            |
|             | nmol/gr      | nmol/gr      | U/L         | U/L         | ml         |
| 25          | 210.0        | 238.2        | 61.04       | 5.95        | 0.3        |
| 26          | 284.6        | 269.6        | 77.52       | 30.44       | 0.4        |
| 27          | 288.0        | 119.6        | 66.28       | 17.85       | 0.35       |
| 28          | 264.1        | 149.1        | 29.07       | 28.56       | 0.32       |
| 29          | *            | 263.1        | 67.83       | *           | 0.45       |
| 30          | 209.1        | 175.3        | 61.04       | 29.52       | 0.35       |
| 31          | 456.1        | 149.5        | 45.15       | 20.23       | 0.38       |
| 32          | 203.5        | 272.7        | 45.15       | 52.36       | 0.34       |
| Ortalama±SD | 273.62±88.36 | 204.63±62.80 | 56.63±15.66 | 26.41±14.34 | 0.361±0.05 |

\* : Teknik nedenlerle değerler okunamamıştır

**Tablo 12.** Grup V Böbrek Medulla ve Korteks TBARs Düzeyleri, İdrar LDH ve GGT Düzeyleri, İdrar Miktarı.

| Denek No    | TBARs         |              | LDH           | GGT         | İdrar     |
|-------------|---------------|--------------|---------------|-------------|-----------|
|             | Medulla       | Korteks      |               |             |           |
|             | nmol/gr       | nmol/gr      | U/L           | U/L         | ml        |
| 33          | 790.0         | 463.9        | 58.14         | 52.36       | 0.15      |
| 34          | 432.7         | 332.1        | 31.97         | 4.16        | 0.11      |
| 35          | 262.8         | 255.8        | 164.36        | 29.75       | 0.23      |
| 36          | 733.1         | 335.8        | 77.52         | 40.46       | 0.11      |
| 37          | 405.7         | 176.5        | 58.14         | 99.36       | 0.10      |
| 38          | 396.2         | 272.7        | 255.04        | 93.41       | 0.14      |
| 39          | 572.4         | 319.8        | 332.95        | 58.54       | 0.13      |
| 40          | *             | *            | 125.77        | *           | 0.18      |
| Ortalama±SD | 513.27±192.74 | 308.08±88.56 | 137.98±107.03 | 54.01±33.88 | 0.14±0.04 |

\* : Teknik nedenlerle değerler okunamamıştır

**Tablo 13.** Grup VI Böbrek Medulla ve Korteks TBARs Düzeyleri, İdrar LDH ve GGT Düzeyleri, İdrar Miktarı

| Denek No    | TBARs              |                    | LDH<br>U/L    | GGT<br>U/L | İdrar<br>ml |
|-------------|--------------------|--------------------|---------------|------------|-------------|
|             | Medulla<br>nmol/gr | Korteks<br>nmol/gr |               |            |             |
| 41          | 315.7              | 480.4              | 336.05        | 83.3       | 0.04        |
| 42          | 934.0              | 534.2              | 306.98        | *          | 0.11        |
| 43          | 474.0              | 246.8              | 34.884        | 59.5       | 0.12        |
| 44          | 423.3              | 336.7              | 48.45         | 48.79      | 0.10        |
| 45          | 355.9              | 257.4              | 54.264        | 39.27      | 0.08        |
| 46          | 561.7              | 428.8              | 336.05        | 45.22      | 0.14        |
| 47          | 896.9              | 386.6              | 145.35        | 77.35      | 0.12        |
| 48          | 455.3              | 190.2              | 31.977        | 83.3       | 0.07        |
| Ortalama±SD | 552.10±236.42      | 357.63±121.27      | 161.75±141.14 | 62.39±18.8 | 0.09±0.03   |

\* : Teknik nedenlerle değerler okunamamıştır.



## TARTIŞMA

Transplantasyon, organizmada herhangi bir organın fonksiyonunu yitirmesi sonucu yerine yenisinin konmasıdır. Her türlü tedavinin bittiği yerde tek çaredir. Organ transplantasyonundan başarılı sonuç alınabilmesi için nakledilecek organın morfolojik ve fonksiyonel bakımdan optimal düzeyde olması gerekmektedir.

Özellikle iskemi ve reperfüzyon sırasında organda ortaya çıkan hasarda serbest radikaller olarak bilinen oksijen türevi moleküllerin önemli etkisinin olduğu çeşitli çalışmalarla gösterilmesi bu hasarın ortadan kaldırılmasına yönelik pek çok çalışmanın yapılmasına neden olmuştur (31,34,37). Organ transplantasyonu dışında, akut myokard infarktüsü, ateroskleroz, serebral iskemi, akut pankreatit, şok ve ARDS gibi birçok patolojik durumlarda serbest radikallere bağlı gelişen doku hasarının önemli olduğu gösterilmiştir (36,39,41). Antioksidan özelliğe sahip kimyasal maddelerin transplantasyon işleminde reperfüzyon sonrası ortaya çıkan serbest radikal hasarını en aza indirilebileceği bildirilmiştir (10,23,44,50).

Jacobsen ve arkadaşları tavşanlarda (25), Collins ve arkadaşları ise köpeklerde (8) yaptıkları çalışmalarda böbreği, 100 cm H<sub>2</sub>O hidrostatik basınç ile organda mekanik hasar oluşturmadan, perfüze ettiklerini belirtmişlerdir. Biz de çalışmamızda bu perfüzyon basıncını kullanmayı uygun bulduk. Hoshino ve arkadaşları domuzlarda yaptıkları bir çalışmada, serbest radikal hasarı önleyici tedavinin başarısını, iskemi sürecinden çok, reperfüzyon sürecinin etkilediğini göstermişlerdir (24). Gower ve Green de yaptıkları çalışmalarda, reperfüzyon hasarının ilk 60 dakikada en yüksek oranda olduğunu ortaya koymuşlardır (18, 20). Bu düşünceyle çalışmada, sadece sıcak iskemi uygulanan kontrol grubu hariç, diğer gruplarda böbrek, sıcak iskemi sonrası çeşitli sıcaklıklarda soğuk iskemiye maruz bırakılmıştır. Santral sıcaklığı soğuk perfüzyonla kendi grubu için öngörülen sıcaklığa getirilen böbrek,

aynı sıcaklıktaki solüsyonda 15 dakika bekletilmiştir. Bu süre sonunda böbreğin damarları kanüle edilerek klemplerin açılması ile tüm gruplara 60 dakika reperfüzyon uygulanmıştır. Çalışma sırasında, sıcak iskemi ve soğuk iskemi süreleri gruplar arasında fark oluşturmaması için eşit tutulmuştur.

Jacobsen ve arkadaşları tavşanda yaptıkları çalışmada 0°C'de flush preservasyon uygulanan grupta, 10°C'de pulsatil perfüzyon uygulanan gruplar arasında, soğutma yöntemi farklı olmasına rağmen greft fonksiyonu yönünden anlamlı fark saptamamışlardır (25). Southard'ın çalışmasında 0°C - 4°C flush perfüzyonla karşılaştırıldığında 8°C'de pulsatil perfüzyonun 48 saat üzeri saklama sürelerinde daha iyi sonuç verdiği bildirilmektedir (47).

Literatürde ise, uzun süreli koruma için ideal koruma sıcaklığının 4°C - 8°C arası olması gerektiği öne sürülmektedir (4,40,47,48). Çalışmamızda ise böbrek, medulla ve korteks TBARs ölçümlerinden 15°C'de oluşan serbest oksijen radikali hasarının en az olduğu sonucuna varılmıştır. Tubüler hasarın göstergesi olarak kullanılan idrar LDH ve idrar GGT düzeyi ölçümlerinde ise, her iki parametre de 15°C'de en az hasar oluştuğunu ima eder mahiyettedir. İdrar GGT düzeyi için bulunan sonuç diğer gruplarla anlamlı farklılık göstermese de, kontrol grubu ile arasında anlamlı fark saptanmamış ve göreceli olarak diğer gruplardan daha düşük bulunmuştur. İdrar LDH ve GGT düzeyi ölçümleri bu şekliyle medulla ve korteks TBARs ölçümlerine paralellik göstermektedir. Gruplar arasında idrar miktarı açısından yapılan karşılaştırmada ise kontrol grubundaki değerlerin diğer gruplara göre çok yüksek olduğu görülmektedir. Bunun nedeninin sıcak iskemiye bağlı tübüler hasar oluşması ve tübüler reabsorbsiyon mekanizmasının bozulması olabileceği düşünülmüştür. Sonuçlarda da görüldüğü gibi, kontrol grubunda böbrek medulla TBARs düzeylerinin korteks TBARs düzeylerine göre yüksek bulunması bunu desteklemektedir.

Pegg yaptığı çalışmada, hipotermide hücre şişmesi yanında, biyolojik membranların destrüksiyonu gibi ek hasarların da görülmesi üzerine bunu açıklayacak mekanizmalar üzerinde çalışmalar yapmıştır. Pegg'e göre düşük sıcaklıklarda oksidatif fosforilasyonun bozulması mitokondrial bir defekti gösterir (40). Çünkü izole mitokondrilerin oksijen tüketimi ve mitokondriyal enzim aktivitesi sıcaklık azaldıkça düşer. Düşük sıcaklıktaki preservasyon solüsyonlarında mitokondriyal enzim aktivitesinin azalması aerobik metabolizmanın bozulması sonucu oluşmaktadır. Bu enzimlerden adenin nükleotid transferaz düşük sıcaklıklarda hız kısıtlayıcı etki göstermektedir. Bu etki 15°C altında daha

belirgin olmaktadır (40) Çalışmada 15°C grubunda, 5°C ve 10°C gruplarına göre daha iyi sonuçların elde edilmesi Pegg'in bulguları ile paralellik göstermektedir

Szostek ve arkadaşları yaptıkları klinik çalışmada vasküler anastomozu takiben kortikal ısı ölçümlerine ve transplantasyon sonrası greft fonksiyonuna bakarak  $14.86 \pm 3.6^{\circ}\text{C}$  perfüzyon öncesi sıcaklık saptanan olgulara oranla,  $19.71 \pm 5.07^{\circ}\text{C}$  sıcaklık saptanan olgularda akut tubüler nekrozun daha fazla oluştuğunu görmüşlerdir (53) Szostek'in klinikte elde ettiği sonuçlar çalışmamızı desteklemektedir.

Çalışmada elde edilen sonuçlara göre ;

1.  $15 \pm 1^{\circ}\text{C}$  soğutma derecesi grubunda böbrek medulla ve korteks TBARs düzeyleri anlamlı olarak diğer gruplara göre düşük bulunurken ( $p < 0.05$ ), kontrol grubuna göre anlamlı bir fark görülmemiştir.
2.  $15 \pm 1^{\circ}\text{C}$  soğutma derecesi grubunda idrar LDH düzeyi diğer gruplara göre düşük bulunurken ( $p < 0.05$ ), kontrol grubuna göre anlamlı bir fark saptanmamıştır.
3. İdrar GGT düzeyleri ise gruplara göre incelendiğinde  $15 \pm 1^{\circ}\text{C}$ 'lık grup ile, kontrol grubu,  $5 \pm 1^{\circ}\text{C}$ 'lık grup ve  $10 \pm 1^{\circ}\text{C}$ 'lık grup arasında anlamlı fark saptanmamıştır.
4. Kontrol grubu ile, soğuk solüsyonla perfüzyon ve 60 dakika reperfüzyon uygulanan gruplar arasında idrar miktarı yönünde anlamlı fark gözlenmiştir.  $15 \pm 1^{\circ}\text{C}$ 'lık soğutma grubunda ise diğer gruplara göre idrar miktarı daha fazla olmasına rağmen, bu fark istatistiksel olarak anlamlı bulunmamıştır.
5. Böbrek, medulla TBARs düzeyinin tüm gruplarda kortekse oranla daha yüksek olduğu görülmüştür. Bu da, böbrek medullasının kortekse göre serbest oksijen radikal hasarına daha hassas olduğunu düşündürmektedir.

Sonuç olarak çalışmadan elde edilen bulgulara göre  $15 \pm 1^{\circ}\text{C}$ 'de, soğuk perfüzyon sonrası reperfüzyona bağlı lipid peroksidasyonu ve hücre hasarı, kontrol grubu dışında kalan gruplara göre daha düşük bulunmuştur. Kısa süreli organ korunmasında bu sıcaklığın uygulamaya konulması böbreğin reperfüzyondan korunması bakımından önemlidir. Çalışmada saptanan sonucun klinik çalışmalarla desteklenmesi ile, evrensel bilgiye katkı şekli alabilmesi çok muhtemeldir

## ÖZET

Değişik soğutma derecelerinde sıcaklığın hücre ve greft üzerine etkisi ve reperfüzyona bağlı oluşan serbest radikal hasarı miktarını araştırmak amacı ile bu deneysel çalışma yapıldı. Çalışmada her grupta 8 adet tavşan olmak üzere, toplam 48 adet genç erişkin erkek tavşan kullanıldı. Grup I'de yalnızca laparotomi ve sıcak iskemiye takiben 60 dakika reperfüzyon uygulanırken; diğer gruplarda sıcak iskemi sonrası, Grup II'de  $5\pm 1^\circ\text{C}$ , Grup III'de  $10\pm 1^\circ\text{C}$ , Grup IV'de  $15\pm 1^\circ\text{C}$ , Grup V'de  $20\pm 1^\circ\text{C}$  ve Grup VI'da  $35\pm 1^\circ\text{C}$  sıcaklığa kadar soğuk perfüzyon uygulandı. Tüm gruplarda kanülasyonları takiben 60 dakika reperfüzyon uygulandı. Bu süre sonunda nefrektomi yapıldı. Bu 60 dakikalık reperfüzyon süresinde ölçümler için idrar toplandı ve kaydedildi. Böbrek, medulla ve korteks TBARs düzeyleri ölçüldü. Bu ölçümler sonrası böbrek, medulla ve korteksi arasında TBARs düzeylerinde fark saptandı. Bu fark medulla TBARs düzeyi için daha yüksek bulundu. İdrarda tübüler hasarın göstergesi olan LDH ve GGT ölçümleri yapıldı.

Çalışmada  $15\pm 1^\circ\text{C}$  soğuk perfüzyon uygulanan grupta, reperfüzyon hasarına bağlı lipid peroksidasyonu sonucu oluşan hücre hasarının, diğer sıcaklık derecelerine göre daha düşük olduğu sonucuna ulaşıldı. Bu çalışmanın sonucunda, organ çıkartıldıktan sonra saklama süresinin uzun olmasının gerekli olmadığı durumlarda, organın  $15\pm 1^\circ\text{C}$  sıcaklığa kadar soğutulmasının yeterli olduğu kanısına varıldı. Ancak organın koruma süresinin uzun olduğu durumlarda farklı soğutma sıcaklıkları etkilerinin klinik ve deneysel çalışmalarla incelenmesi gerekmektedir.

## KAYNAKLAR

1. Angel FM, Ramasastry SS, Swartz WM : Free radicals : basic concepts concerning their chemistry, pathophysiology, and relevance to plastic surgery *Plastic and Reconstructive Surgery*, 79(6); 990-6, 1987.
2. Baker GL, Corry RJ, Autor AP : Oxygen free radical induced damage in kidneys subjected to warm ischemia and reperfusion. *Ann Surg*, 202(5); 628-40, 1985.
3. Baron P, Marin OG, Casas C : Renal preservation after warm ischemia using oxygen free radical scavengers to prevent reperfusion injury. *Journal of Surgical Research*, 51(1); 60-5, 1991
4. Belzer FO, Southard JH : Organ preservation and transplantation. In: *Transplantation : approaches to graft rejection*. Alan R.Liss Inc , 1986.
5. Belzer FO, Southard JH : Principles of solid-organ preservation by cold storage *Transplantation*, 45(4); 673-6, 1988
6. Brent L, Sells RA : Notes on the history of tissue and organ transplantation In: *Organ transplantation. Current clinical and immunological concepts* Brent L, Sells RA, eds WB Saunders Co., London, 1989.
7. Bulkley GB : The role oxygen free radicals in human disease processes *Surgery*, 94(3); 407-11, 1983
8. Collins GM, Shugarman MB, Terasaki PI : Kidney preservation for transplantation. *Lancet* 1969; 6: 1219-22.
9. Cotterill LA, Gower JD, Fuller BJ : Oxidative damage to kidney membranes during cold ischemia *Transplantation*, 48(5); 745-51, 1989.

- 10 Demirbaş A, Bozoklu S, Özdemir A : Effect of alpha tocopherol on the prevention of reperfusion injury caused by free oxygen radicals in the canine kidney transplantation model. *Transplant Proc* , 25(3); 2274, 1993.
- 11 Döşlüoğlu HH, Aktan AO, Yeğen C : The cytoprotective effects of verapamil and iloprost (ZK 36374) on ischemia-reperfusion injury of kidneys. *Transplant Int* , 6(3); 138-42, 1993
- 12 Dreikorn K, Horsch R, Röhl R : 48 to 96 hours preservation of canine kidneys by initial perfusion and hypothermic storage using Eurocollins solution. *Eur Urol* , 6; 221, 1980.
- 13 Dunn DC : Orthotopic renal transplantation in the rabbit. *Transplantation*, 22(5); 427-33, 1976
- 14 Foschi D, Castoldi L, Lesma A, et al : Effects of ischemia and reperfusion on liver regeneration in rats. *Eur J Surg*., 159(8); 393-8, 1993.
- 15 Francis DM, Miller RJ, Dumble LJ : Model of orthotopic renal transplantation in the rabbit *Aust NZJ Surg*., 60(1); 45-9, 1990.
- 16 Freeman BA, Crapo JB : Biology of disease free radicals and tissue injury. *Laboratory Investigation* , 47(5); 412-26, 1982.
- 17 Goode HF, Webster NR : Free radicals and antioxidants in sepsis. *Critical Care Medicine*, 21(11); 1770-6, 1993.
- 18 Gower JD, Healing G, Fuller BJ : Protection against oxidative damage in cold stored rabbit kidneys by desferrioxamine and indomethacin. *Cryobiology*, 26; 309-17, 1989.
- 19 Grech ED, Bellamy CM, Jackson MJ : Free radical activity after primary coronary angioplasty in acute myocardial infarction. *American Heart Journal*, 127(6); 1443-9, 1994.
- 20 Green CJ, Healing G, Lunec J : Evidence of free radical-induced damage in rabbit kidneys after simple hypothermic preservation and autotransplantation *Transplantation*, 41(2); 161-5, 1986.
- 21 Halliwell B, Gutteridge JM : Oxygen toxicity, oxygen radicals, transition metals and disease. *Biochem J.*, 219; 1-14, 1984

22. Halliwell B, Gutteridge JM : The importance of free radicals and catalytic metal ions in human diseases. *Mol Aspects Med.*, 5; 89-93, 1985.
23. Halliwell B, Gutteridge JM, Cross CE : Free radicals, antioxidants, and human disease : where are we now ? *J Lab Clin Med.*, 119(6); 598-620, 1992.
24. Hoshino T, Maley WR, Bulkley GB : Ablation of free radical mediated reperfusion injury for the salvage of kidneys taken from non-heart beating donors. *Transplantation*, 45(2); 284-9, 1988.
25. Jacobsen IA, Pegg DE, Starklint H, et al : Hypothermic preservation of rabbit kidneys for 48 hours using low ionic strength solution. *Cryobiology*, 27; 423-9, 1990.
26. Kootstra G, Wijnen R, Maessen JG : Preservation of the kidney and other organs into the nineties. In: *Organ transplantation*, Abouna GM, Kumar MSA, White AG, eds. Kluwer Academic Publishers, Netherlands, 1991
27. Krinsky NI : Membrane Antioxidants. *Annals NY Acad Sci.*, 551; 17-32, 1988.
28. Kruuv J, Glofchenski D, Cheng KH : Factors influencing survival and growth of mammalian cells exposed to hypothermia. *J Cell Physiol.*, 1983 May; 115(2): 179-85.
29. Lee HM : Reflections on the development of organ transplantation. In: *Organ transplantation*, Abouna GM, Kumar MSA, White AG, eds. Kluwer Academic Publishers, Netherlands, 1991
30. Lowry OH, Rosenbrough NS, Farr AL, Randle RJ : Protein measurement with folinphenol reagent. *Journal of Biological Chemistry* 193; 265-75, 1951.
31. Marubayashi S, Dohi K, Ochi K : Role of free radicals in ischemic rat liver cell injury; Prevention of damage by  $\alpha$ -tocopherol administration. *Surgery* 97(2); 184-91, 1986.
32. McCord JM : Oxygen-derived free radicals in postischemic tissue injury. *N Engl J Med.*, 312; 159-63, 1985
33. Menasche P, Piwnica A : Free radicals and myocardial protection : a surgical viewpoint. *Ann Thorac Surg.*, 47; 939-45, 1989

34. Menasche P, Pradier F, Peynet J, et al : Limitation of free radical injury by reduced glutathione. *Transplant Proc.*, 23(5); 2440-2, 1991.
35. Miller JK, Brzezinska E : Oxidative stress, antioxidants, and animal function. *J Dairy Sci.*, 76; 2812-23, 1993
36. Minor T, Isselhard W : Role of the hepatovasculature in free radical mediated reperfusion damage of the liver *Eur Surg Res.*, 25; 287-93, 1993.
37. Minor T, Isselhard W, Yamamoto Y, et al : The effects of allopurinol and SOD on lipid peroxidation and energy metabolism in the liver after ischemia in an aerobic/anaerobic persufflation. *Surg Today*, 23(8); 728-32, 1993.
38. Özdem SS, Şadan G : Myokardial iskemi-reperfüzyon zedelenmesi ve farmakolojik tedavisi *Med J Akdeniz Uni.*, 10(1,2); 93-102, 1993.
39. Özdem SS, Şadan G : Serbest oksijen radikallerinin oluşumu ve klinik açıdan önemi *Med J Akdeniz Uni.*, 11(1); 63-71, 1994.
40. Pegg DE : Organ Preservation. *Surg Clin North Am.*, 66(3); 617-32, 1986.
41. Prasad K, Kalra J, Bharadwaj B : Increased oxygen free radical activity in patients on cardiopulmonary bypass undergoing aortocoronary bypass surgery. *American Heart Journal*, 123(1); 37-45, 1992.
42. Rao N, Fernandez MA, Cid LL, et al : Retinal lipid peroxidation in experimental uveitis *Arch Ophthalmol.*, 105; 1712-6, 1987.
43. Serino F, Grevel J, Napoli KL : Generation of oxygen free radicals during the metabolism of cyclosporine A; a cause-effect relationship with metabolism inhibition. *Molecular and Cellular Biochemistry*, 122(2); 101-12, 1993.
44. Shapiro JI, 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*, 40(6); 596-600, 1985
45. Simmons RL, Ildstad ST, Smith CR, et al : Transplantation In: Principles of surgery, Schwartz SI, Shires GT, Spencer FC, eds. McGraw-Hill, New York, 1994.



46. Slater TF : Free radical mechanisms in tissue injury *Biochem J.*, 222: 1-15, 1984
47. Southard JH : Development of solutions for organ preservation and transplantation. In: *Living in the cold*, Malon A, Canguilham B, eds John Libbey Eurotext Ltd., 1989
48. Southard JH, Belzer FD : Organ preservation by simple cold storage, Thomas G. Ferguson Associates Inc., 1989.
49. Southorn PA, Powis G : Free radicals in medicine II involvement in human medicine *Mayo Clinic Proc.*, 63; 390-408, 1988.
50. Stein HJ, Mathys MJ, Hinder RA : Effects of verapamil on hepatic ischemia/reperfusion injury *Am J Surg.*, 165; 96-100, 1993.
51. Stocks J, Dormandy TL : The autooxidation of human red cell lipid induced by hydrogen peroxid. *Br J Haematol.*, 20; 95-111, 1971.
52. Stone RC, Cotton W, Frayer AA, et al : 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.*, 116; 666-773, 1990.
53. Szostek M, Pacholczyk M, Lagiwska B, et al : Effective surface cooling of the kidney during vascular anastomosis decreases the risk of delayed kidney function after transplantation. *Transplant Int.*, 1996; 9 Suppl 1: 84-5.
54. Török B, Röth E, Zsoldos T, et al : Lipid peroxidation in lung of rats exposed to hyperoxic, hypoxic and ischemic effects. *Exp Pathol.*, 29; 221-6, 1986.
55. Wong SH, Knight JA, Hopfer SM : Lipoperoxides in plasma as measured by liquid chromatographic separation of malondialdehyde-thiobarbituric acid adduct. *Clinical Chemistry*, 33(2); 214-20, 1987