

DENEYSEL KARDİYAK İSKEMİ REPERFÜZYON HASARI SONRASI ERİTROSİT ANTİOKSİDATİF ENZİM DÜZEYLERİ

Necip İLHAN¹

Şemsettin ŞAHİN²

Dilara SEÇKİN¹

Nevin İLHAN¹

¹Fırat Üniversitesi Tıp Fakültesi Biyokimya Anabilim Dalı Elazığ – TÜRKİYE

²Diyarbakır Devlet Hastanesi Diyarbakır – TÜRKİYE

Geliş Tarihi: 13.08.2002

Erythrocyte Antioxidative Enzyme Levels After Experimental Cardiac Ischemia-Reperfusion Damage

Summary

The aim of this study was to investigate the antioxidative enzymes (Superoxide Dismutase-SOD, Glutathione Peroxidase-GSH-Px, Catalase-CAT) levels in erythrocytes of rats with experimentally cardiac ischemia reperfusion injury. Additionally the effect of the aminoguanidin (AG), an antioxidant was assessed in the prevention of ischemia reperfusion.

A total of 36 rats divided equally into 4 groups were used in the study. Groups were defined as sham, ischemia-reperfusion (I/R), aminoguanidin treated group before the ischemia (I/AG), and aminoguanidin treated group before reperfusion (R/AG).

There was a statistically significant decrease in the erythrocyte SOD and GSH-Px activities except for CAT activities in ischemia reperfusion group when compared with sham group ($p<0.05$). Erythrocyte CAT activities of ischemia reperfusion group were increased when compared with sham group. In aminoguanidin receiving groups, especially in I/AG group rather than R/AG showed significant increase in the activities of SOD and GSH-Px in respect to I/R group ($p<0.05$). Erythrocyte CAT activities of I/AG group were increased when compared with R/AG group. An increase in erythrocyte SOD and GSH-Px activity in R/AG group was observed in comparison to I/R group.

In conclusion, aminoguanidin was found to increase antioxidant activity and had cardioprotective effects for prevention of cardiac ischemia reperfusion injury.

Key Words: Ischemia-reperfusion, aminoguanidin, antioxidant enzymes

Özet

Bu çalışmanın amacı deneysel olarak kardiyak iskemi reperfüzyon hasarı oluşturulmuş ratların eritrositlerinde antioksidan enzimlerin (Superoksid Dismutaz-SOD, Glutasyon Peroksidaz- GSH-Px, Katalaz- CAT) düzeylerini araştırmaktır. Ayrıca bir antioksidan olan aminoguanidinin iskemi reperfüzyon hasarının önlenmesinde etkileri ölçülmüştür.

Toplam olarak 36 adet rat 4 eşit gruba bölünerek çalışmada kullanılmıştır. Gruplar ; Sham, iskemi-reperfüzyon (I/R), iskemi öncesi aminoguanidin uygulanan grup (I/AG) ve reperfüzyon öncesi aminoguanidin uygulanan grup (R/AG) olarak belirlenmiştir.

Katalaz aktivitesi dışında iskemi reperfüzyon grubunun eritrosit SOD ve GSH-Px aktiviteleri sham grubuna göre karşılaştırıldığı zaman istatistiksel olarak anlamlı bir azalma bulunmuştur ($p<0.05$). İskemi reperfüzyon grubunun eritrosit CAT aktiviteleri sham grubuna göre artmıştır. Aminoguanidin verilen gruplarda R/AG grubundan daha ziyade özellikle I/AG grubunda I/R grubuna göre SOD ve GSH-Px aktiviteleri bakımından anlamlı bir artış saptanmıştır ($p<0.05$). I/AG grubunun eritrosit katalaz aktiviteleri; R/AG grubu ile karşılaştırıldığında artmış olarak bulunmuştur. I/R grubuna göre R/AG grubunda eritrosit SOD ve GSH-Px aktiviteleri artmıştır.

Sonuçta; aminoguanidinin antioksidan aktiviteyi arttırdığı ve kardiyak iskemi reperfüzyon hasarının önlenmesi için kardiyoprotektif etkiye sahip olduğu belirlenmiştir.

Anahtar Kelimeler: İskemi-reperfüzyon, aminoguanidin, antioksidan enzimler

Giriş

Moleküler oksijenin indirgenmesi veya uyarılması sonucu serbest oksijen radikalleri oluşmaktadır. Fizyolojik şartlarda mitokondrial elektron transport zincirinden sızma tarzında patolojik süreçlerde ise ksantin oksidaz metabolizmasından, aktive olmuş nötrofillerden, katekolamin oksidasyonundan, endotel hücrelerinden ve prostaglandinlerden serbest radikaller üretilmektedir (1). İskemi, organa gelen kan akımının yetersizliği veya dokunun bozulmuş perfüzyonu olup, uzayan iskemide hücrelerin bütünlüğü kaybolup hücre ölümü oluşabilmektedir. Kardiyak dokudaki bozuk perfüzyon enerji yetersizliğine ve oksijenden yoksun miyokard dokusunun kontraktil aktivitesinin kaybına yol açar. Etkilenen hücrelerde kardiyak metabolizma artıklarının birikmesi yanında sarkolemma boyunca iyon dengesi de bozulur. Kardiyak hücrelerde iskeminin uzamasına bağlı olarak hücre bütünlüğü kaybolur ve hücre ölümü gerçekleşir. Sitoplazmik proteinlerin aşırı salınımı hücre membranının geçirgenliğini kaybettiğini gösterir ve iskemik atak esnasında internal membranlarda ultra strüktürel değişiklikler görülür (1,2). Miyokardiyal iskemide, birbirine bağımlı veya birbirinden bağımsız bir çok fizyolojik ve patolojik sürecin sonucu olarak ortaya çıkabilir (İskemi, ateroskleroz, tromboemboli, perkütanöz transluminal koroner anjioplasti (PTCA), koroner arter bypass veya transplantasyon). İskeminin sebebi ne olursa olsun sonuçları daima aynıdır: miyokardiyal yeterli oksijen ve metabolizmayı devam ettirmeye yeterli miktarda substrat ulaşamaz. İskeminin ilk dakikalarında glikolitik yol büyük ölçüde stimüle olur, fakat daha sonra doku asidozunun gelişmesi, NADH, sitrat ve laktat birikmesi sonucu glikolitik yol inhibe olur (3). Koroner arter akımının zaman içinde yeniden sağlanması yani reperfüzyon olayı kardiyak hasarın önlenmesi için temel bir yoldur. Deneysel çalışmalar reperfüzyonun akut fazı esnasında bir miktar daha doku hasarının oluştuğunu göstermiştir. Reperfüzyon hasarı olarak bilinen bu olay, mikrosirkülasyondaki endotel hücrelere nötrofil adhezyonunu, intrasellüler enzimlerin salınımını, kalsiyum iyonlarının hücre içine girişini, sarkolemma fosfolipidlerinin bozunmasını ve serbest oksijen radikallerinin (SOR) oluşumunu artırır. Serbest oksijen radikallerinin düzeylerinin artması açıl zincirlerinin peroksidasyonuna neden olur ve sonuç da hücre ölümü gerçekleşir (4,5). İskemide meydana gelen olaylara aslında reperfüzyonda hasarı başlatacak ve hızlandıracak bir hazırlık aşaması olarak bakılabilir. İskemi aşamasındaki olaylar, reperfüzyon aşamasındaki hasarın öncüsüdür (6). Bu görülen etkilere karşı koruyucu sistem vücut da

oluşan reaktif oksijen bileşiklerini etkisizleştirmeyi sağlayan, antioksidan defans sistemidir. Antioksidan defans sisteminde vitamin E, vitamin C, glutatyon gibi bazı maddeler ile süperoksit dismutaz (SOD), glutatyon peroksidaz (GSH-Px), katalaz (CAT) gibi hücre içi enzimler de yer almaktadır (7).

Aminoguanidin (AG), yapısında hidrazine bağlı guanido grubu içeren bir bileşiktir. Diyabetin oluşumu ve komplikasyonlarının önlenmesinde özellikle etkili olan aminoguanidinin, prooksidan ve antioksidan özellikleri olduğu yapılan çalışmalar ile gösterilmiştir. Aminoguanidinin başlıca etkileri olarak; nitrik oksit sentetaz ve diamin oksidaz enzimlerinin inhibisyonu, S- adenosil dekarboksilaz enzim stabilizasyonu ve LDL oksidasyonunu önlemesi sayılabilir (8,9).

Bu çalışmanın amacı deneysel olarak kardiyak iskemide reperfüzyon hasarı oluşturulan ratlarda antioksidan özelliği olan aminoguanidinin eritrositlerde bulunan antioksidan enzimler (SOD, GSH-Px, CAT) üzerine olan etkilerini araştırmaktır.

Materyal ve Metot

Bu çalışmada T.C. Tarım ve Köy İşleri Bakanlığı Elazığ Veteriner Kontrol ve Araştırma Enstitüsü Müdürlüğünden sağlanan Wistar-Albino cinsi 250-350 g ağırlığındaki erkek sıçanlar kullanıldı. Çalışmada toplam 36 adet erkek sıçan kullanılmış olup bu sıçanlar; rastgele örnekleme yöntemiyle seçilerek sham (n: 9), iskemide-reperfüzyon (n: 9), iskemide-AG (n: 9) ve reperfüzyon-AG (n: 9) grubu olarak oluşturuldu. Aminoguanidin hemisülfat tuzu, (A-7009, Sigma Chemical Co. St. Louis, MO, ABD) iskemide grubuna intravenöz olarak jüğüler venden 10mg/kg dozda oklüzyondan 10 dakika önce verildi. Reperfüzyon grubuna 10mg/kg dozda aminoguanidin, iskeminin sonunda reperfüze edilmeden 1-2 dakika önce jüğüler venden intravenöz olarak verilerek reperfüzyon sağlandı. Sham grubuna sadece torakotomi uygulanarak cerrahi iplik koroner arterin çevresinden geçirildi fakat okluze edilmedi.

Deney hayvanlarına anestezi; 1.2-2.4 g/kg dozda uretan'ın intraperitoneal (ip) uygulaması ile yapıldı. Yapay solunum için, trakea, ilaç uygulaması için de jüğüler ven kanülasyonu yapıldı. Karotid artere konan bir kanül, transdüser (Harvard model, 50-8952) ve bir kaydedici (Harvard Universal penrecorder) yardımıyla kan basıncı, kalp hızı ve EKG takibi yapıldı. Göğsün sol tarafından girilerek sol torakotomi yapıldı. Bu esnada içerideki negatif basıncı dengelemek ve solunumun devamı için, ventilasyon cihazıyla (Harvard Animal Rodent

Ventilatör) 1.5ml/100g'lık hacim ve 60 atım/dakikalık bir hızla oda havası verilerek pozitif basınçlı solunum uygulanmaya başlandı. Daha sonra kalp dışarı alınarak 6/0 ipek sutur sol ana koroner arterin altından miyokard dokusunu da hafifçe içine alacak şekilde hızlıca geçildi ve 20 dakika stabilizasyon için beklendi. Lambeth Conventions'da belirlenen değerlendirme kriterleri göz önüne alınarak bu işlemlere bağlı herhangi bir aritmi görülmesi ya da ortalama kan basıncının oklüzyon öncesi 70mmHg'nin altına düşmesi halinde denek çalışma dışı bırakıldı (10). 20 dakika stabilizasyon periyodu sonunda damarın altından geçirilmiş olan ip bir klemp yardımıyla sıkıştırılarak damarın kapatılması sağlandı. On dakikalık iskemi süresi tamamlandığında klemp açılarak yeniden kanlanma (reperfüzyon) sağlandı. Reperfüzyon süresi 10 dakika olarak uygulandı. Deneklerin vena cava inferiorlarından (VCI) kan örnekleri alınarak sakrifiye edildi. Hazırlık sırasında ve iskemi reperfüzyon dönemlerinde EKG, kan basıncı ve kalp hızı kaydedildi.

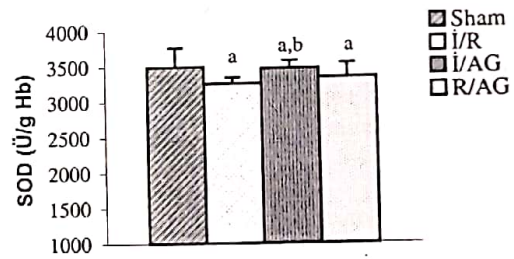
EDTA'lı tüplere alınan kan örnekleri 3000 rpm'de 5 dakika santrifüj edilerek plazmaları ayrıldı. Kalan eritrosit süspansiyonu 3 kez izotonik solüsyonla yıkanıp eritrosit paketi hazırlandı. Yöntemlerine uygun dilüsyonlar yapılarak hemogloblin (Hb), SOD, GSH-Px ve CAT tayinleri yapıldı. Süperoksit dismutaz aktivitesi Sun ve arkadaşlarının metodu ile Durak ve arkadaşlarının yapmış olduğu modifikasyona göre tayin edildi (11). Glutatyon Peroksidaz aktivitesi Paglia ve arkadaşlarının metoduna göre çalışıldı (12). Katalaz aktivitesi Aebi metoduna göre çalışıldı (13). Histopatolojik incelemede; miyokarddaki koagülasyon nekrozu, intramiyokardiyal kanama, kontraksiyon bantları, iltihabi hücre infiltrasyonu, değerlendirildi.

İstatistiksel analizler Windows 2000 uyumlu SPSS® 10.0 programı kullanılarak yapıldı. Grupların dağılımları non-parametrik testlerden one-sample Kolmogorov-Smirnov Z Testi ile değerlendirildi. Grupların normal dağılım göstermesinden dolayı grupların karşılaştırılmasında parametrik testlerden one-way ANOVA testi ve Post Hoc testlerden LSD kullanıldı. Değerler ortalama ± standart sapma olarak verildi. İstatistiksel anlamlılık için $p < 0.05$ olan değerler anlamlı olarak kabul edildi.

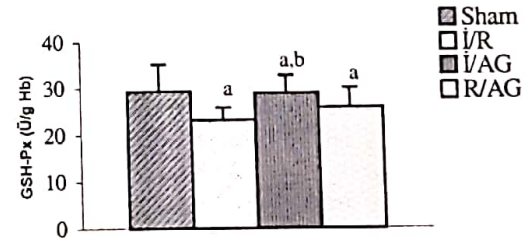
Bulgular

Kardiyak iskemi reperfüzyon hasarı oluşturulan ratlarda aminoguanidinin etkilerini inceleyen bu çalışmada eritrosit SOD, GSH-Px, CAT aktiviteleri ölçülmüştür. İskemi reperfüzyon grubunun eritrosit

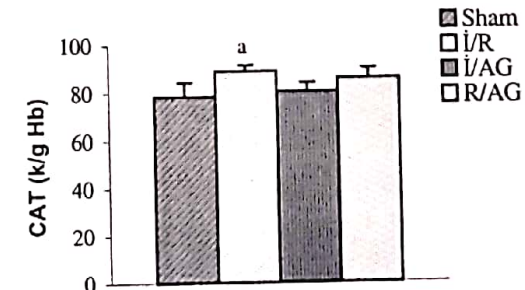
SOD ve GSH-Px aktiviteleri sham grubuna göre karşılaştırıldığı zaman istatistiksel olarak anlamlı bir azalma bulunmuştur ($p < 0.05$). Aminoguanidin verilen gruplarda R/AG grubundan daha ziyade özellikle I/AG grubunda I/R grubuna göre SOD ve GSH-Px aktiviteleri bakımından anlamlı bir artış saptanmıştır ($p < 0.05$). I/R grubuna göre R/AG grubunda da eritrosit SOD ve GSH-Px aktiviteleri artmış fakat bu artış anlamlılık ifade etmiyordu. İskemi reperfüzyon grubunun eritrosit CAT aktiviteleri sham grubuna göre istatistiksel olarak artmış bulundu ($p < 0.05$). I/AG grubunun eritrosit katalaz aktiviteleri; R/AG grubu ile karşılaştırıldığında artmış olarak bulunmuş ancak bu farklılık istatistiksel olarak anlamlı değildi. (Şekil 1-3).



Şekil 1. Eritrosit SOD aktivitelerinin değişimi
^a $p < 0.05$ Sham grubu ile karşılaştırma; ^b $p < 0.05$ I/R grubuna göre karşılaştırmada



Şekil 2. Eritrosit GSH-Px aktivitelerinin değişimi
^a $p < 0.05$ Sham grubuna göre ; ^b $p < 0.05$ I/R grubuna göre karşılaştırmada



Şekil 3. Eritrosit CAT aktivitelerinin değişimi
^a $p < 0.05$ Sham grubuna göre karşılaştırmada

Histopatolojik incelemede; Sham grubu ile iskemi-reperfüzyon (I/R) grubu karşılaştırıldığında; Işık mikroskopisi kesitlerinde; I/R grubunda kalp kasında yaygın koagülasyon nekrozu, kontraksiyon bantları, dilate damar, damar içi konjesyon ve yaygın intramiyokardiyal kanama izlendi. İskemi öncesi aminoguanidin (I/AG) verilen grupta; yer yer kanama ve kontraksiyon bantları görülmekle beraber kontraksiyon bantları, nekroz ve ödem görülmemektedir. Reperfüzyon öncesi AG (R/AG) verilen grupta ise, orta derecede kontraksiyon bantları, intramiyokardiyal kanama, ödem ve nekroz alanları izlenmiştir.

Tartışma

Serbest radikaller iskemi-reperfüzyon sırasında hücrel yapılar da morfolojik ve fonksiyonel değişikliklere yol açan reaktif bileşiklerdir. Serbest radikallerin hücrel kaynakları, rol aldıkları reaksiyonlar ve radikal bileşiklere karşı geliştirilen koruyucu sistemlerin ortaya çıkartılması, çeşitli fizyolojik (vasküler tonus, pıhtılaşma iletişim, fagositoz vb) ve fizyopatolojik (akut miyokard infarktüsü, diyabet, sepsis, ateroskleroz, hipertansiyon) olayların mekanizmasını aydınlatma kavuşturacaktır. Akut miyokard infarktüsü (AMİ) son yıllarda ölüm nedenleri arasında ilk sıralarda yer almakta olup akut miyokard infarktüsünden korunma; infarktüsün erken teşhisi, tedavisi ve tedavi sonrası; infarktüs sonucu oluşan hasarın giderilmesi ve kalbin fonksiyonlarının normale döndürülmesi için çok önemlidir. Bu yüzden günümüzde kalpte hasara neden olan etkenler ve bunlardan koruyucu bileşikler üzerindeki çalışmalar artmıştır. Kalbin antioksidan sistemi; miyokardiyal hasarın önlenmesinde önemli bir koruyucu mekanizmayı oluşturmaktadır (14-16).

SOD enzimi, süperoksit iyonlarının dismutasyonunu sağlayarak potansiyel zararlı etkilere karşı savunmada çok önemli bir rol oynar. Kan örneklerinde ve homojenize edilmiş doku örneklerinde SOD ve GSH-Px düzeylerine bakılarak canlıların iskemi-reperfüzyon hasarından ne derecede etkilendiği belirlenebilir. Antioksidan bir enzim olan SOD'un aktivitesinin ölçülmesinin yanı sıra deneysel olarak dışarıdan verilmesi ile oluşan koruyucu etkisi de bilinmektedir (17,18).

Glutasyon peroksidaz; mitokondri, sitoplazma, lizozomlarda ve katalazın daimi bulunduğu memeli peroksizomlarında tespit edilmiştir. Peroksizomlarda GSH-Px'in lokalize olmasının nedeni hidrojen peroksit ve diğer peroksitlerin detoksifikasyonu için katalaza alternatif bir enzim sistemi olarak rol almıştır (19). Çalışmamızda; iskemi-reperfüzyon

hasarı sonucu oluşan serbest radikallere bağlı olarak GSH-Px enzim aktivitelerinde anlamlı bir azalma görülmüştür ($p<0.05$). Koruyucu olarak verilen aminoguanidine bağlı olarak enzim aktiviteleri iskemiden önce verilen grupta, I/R grubuna göre anlamlı olarak yükselmiştir ($p<0.05$). Aynı zamanda reperfüzyondan önce verilen grupta da enzim aktivitelerinde anlamlı bir yükselme saptanmış olmasına rağmen istatistiksel olarak anlamlı bulunmamıştır.

SOD aktiviteleri, artan serbest radikallere bağlı olarak I/R grubunda anlamlı olarak azalmıştır ($p<0.05$). Antioksidan olan aminoguanidin verilen gruplarda iskemi öncesi verilen grupta daha fazla olmak üzere SOD aktiviteleri I/R grubuna göre anlamlı bir şekilde artmıştır ($p<0.05$). Reperfüzyondan önce verilen grupta da enzim aktivitelerinde anlamlı bir yükselme saptanmış olmasına rağmen istatistiksel olarak anlamlı bulunmamıştır.

Sonuçlar değerlendirildiğinde aminoguanidin hasara bağlı olarak oluşan serbest radikalleri temizlediği söylenebilir. Loeper ve arkadaşları tarafından yapılan bir çalışmada (20), miyokard infarktüsü ve anjina pektorisli kişilerde eritrosit SOD ve GSH-Px aktiviteleri araştırılmış, infarktüstün sonra geçen zamana bağlı olarak enzim aktivitelerinin düzensiz bir şekilde değiştiği fakat genel olarak enzim aktivitelerinin azaldığı bulunmuştur. Miyokardiyal iskemi-reperfüzyon oluşturulmuş ratlarda doğal bir antioksidan olan EGB 761 (Extract Ginkgo Biloba 761) kullanılarak yapılan bir diğer çalışmada ise; kardiyak iskemi-reperfüzyon hasarında Ginkgo Bilobanın çeşitli biyolojik serbest radikal hasarı modellerine karşı koruyucu olduğu bildirilmiştir (21). Katalaz aktiviteleri açısından sham grubuna göre diğer gruplarda bir artış görülmekle beraber istatistiksel olarak anlamlı bulunmamıştır.

Aminoguanidin antioksidan etkisini; hasar ile oluşan süperoksit ve hidroksil radikallerini temizleyerek göstermesiyle beraber floresans bir protein olan allofikosyanin'in oksidasyonunu peroksil ve hidroksil radikallerinin oluşumunu önleyerek de gösterir (9). Giardino ve arkadaşları yapmış oldukları bir çalışmada (22), aminoguanidin antioksidan etkisini ve SOR oluşumunu azalttığını ayrıca lipid peroksidasyon ürünlerine (MDA) karşı hücre ve dokuları koruduğunu göstermişlerdir. Bu çalışmada; serbest oksijen radikallerine karşı enzimatik korunmayı sağlayan SOD, GSH-Px enzim aktivitelerinin iskemi reperfüzyon hasarı sonucu azaldığı bulunmuştur. İskemi öncesi aminoguanidin uygulanan gruplarda bu üç enzimin aktivitesi yüksek bulunmuş olup bu

durum aminoguanidinin antioksidan özelliğe sahip olduğunu göstermektedir.

Sonuç olarak; aminoguanidinin kardiyak hasardan korunma ve hasarı önlemede önemli rolleri olduğu, kardiyovasküler yapılar için doğrudan veya dolaylı olarak toksik etkileri olan ürünlerin oluşumunu engellediği, serbest radikal giderici özelliği ile

vücuttaki antioksidan enzimleri artırmasından dolayı kardiyak dokuda oluşan iskemi-reperfüzyon hasarına karşı korumada etkili olduğu bulunmuştur. Aminoguanidinin antioksidan özelliği ile ilgili daha başka çalışmaların yapılmasının oluşan hasarın önlenmesi ve mekanizmasının aydınlatılması açısından önemli olabileceği düşünülmektedir.

Kaynaklar

1. Kukreja RC, Kontos HA, Hess ML, Ellis EF. PGH synthase and lipoxygenase generate superoxide in the presence of NADH or NADPH. *Circ Res* 1986; 59: 612-9.
2. Van Der Vusse GJ, Bilsen MV, Reneman RS. Ischemia and reperfusion induced alterations in membrane phospholipids: An overview. Das DK ed. *Cellular, Biochemical and molecular aspects of reperfusion injury*. Ann NY Acad Sci 1994; 723: 1-14.
3. Neely JR, Whitmer JI and Rovetto MJ. Effects of coronary blood flow on glycolytic flux and intracellular pH in isolated rat hearts. *Circ Res* 1975; 37: 733-741
4. Flaherty JT, Zweier JL. Role of oxygen radicals in myocardial reperfusion injury: Experimental and clinical evidence. *Wien Klin Wochenschr* 1991; 69: 1061-1065.
5. Mohanlal Rw, Mauve I, Zoet Acm . Reperfusion induced enzyme release: washout effect or manifestation of reperfusion idamage? *Cardiovasc Res* 1988; 22: 603-610.
6. McCord JM. Oxygen-derived free radicals in postischemic tissue injury. *New Engl J Med* 1985; 312: 159-163.
7. Halliwell B, Gutteridge JM. *Free Radicals in Biology And Medicine*. 2nd ed. Oxford. Oxford University Press, 1989.
8. Nilson BO. Biological effects of aminoguanidin: An update. *Inflamm Res Review* 1999; 48: 509-515.
9. Courderot-Masuyer C, Dalloz F, Maupoil V, Rochette L. Antioxidant properties of aminoguanidine. *Fundam Clin Pharmacol*. 1999; 13: 535-540.
10. Walker MJ, Curtis MJ, Campbell RWF. et al. The Lambeth conventions; guidelines for the study of arrhythmias in ischemia infarction and reperfusion. *Cardiovasc Res* 1988; 22: 447-455
11. Sun Y, Oberley LW, Ying L. A simple method for clinical assay of superoxide dismutase. *Clin Chem* 1988; 34 :497-500.
12. Durak I, Yurtarslan Z, Canbolat O, Akyol O. A methodological approach to superoxide dismutase (SOD) activity assay based on inhibition of nitroblue tetrazolium (NBT) reduction. *Clin Chim Acta* 1993; 214: 103-104.
13. Paglia DE, Valentine WN. Studies on the quantitative and qualitative characterisation of erythrocyte glutathione peroxidase. *J Lab Clin Med* 1967; 70: 158-169.
14. Grace PA. Ischemia-reperfusion injury. *Brit J Surg* 1994; 81: 637-647.
15. Petty MA, Grisar JM, De Jong W. Protective effects of an alpha-tocopherol analogue against myocardial reperfusion injury in rats. *Eur J Pharmacol* 1992; 210: 85-90.
16. Weisiger RA. Oxygen radicals and ischemic tissue injury. *Gastroenterology* 1986; 90: 494-496.
17. Bannister JV and Bannister WH. Isolation and characterization of superoxide dismutase. *Methods Enzymol* 1984; 105: 88-93.
18. İlhan N. Deneysel Olarak Karaciğer İskemi Reperfüzyon Hasarı Oluşturulan Kobaylarda Oksidan ve Antioksidan Sistemin İncelenmesi. Doktora Tezi, Elazığ FÜ Sağlık Bilimleri Enstitüsü, 1998.
19. Faraji B, Kang HK and Valentine JL. Methods compared for determining glutathione peroxidase activity in blood. *Clin Chem* 1987; 33: 539-543.
20. Loeper J, Goy J, Rosensztajn L, Bedu O, Moisson P. Lipid peroxidation and protective enzymes during myocardial infarction. *Clin Chim Acta* 1991; 196: 119-126.
21. Haramaki N, Aggarwal S, Kawabata T, et al. Effects of natural antioksidant ginkgo biloba extract (EGB 761) on myocardial ischemia-reperfusion injury. *Free Radic Biol Med* 1994; 16: 789- 794
22. Giardino I, Fard AK, Hatchell DL, et al. Aminoguanidine inhibits reactive oxygen species formation, lipid peroxidation and oxidant-induced apoptosis. *Diabetes* 1988; 47: 1114-1119.