

T.C  
DOKUZ EYLÜL ÜNİVERSİTESİ  
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**KARACİĞER İSKEMİ REPERFÜZYON  
HASARINDA KARNOZİN VE MELATONİNİN  
KORUYUCU ETKİLERİ**

**DR.BAŞAK BAYKARA**

**HİSTOLOJİ ve EMBRİYOLOJİ DOKTORA TEZİ**

**İZMİR-2006**

T.C  
DOKUZ EYLÜL ÜNİVERSİTESİ  
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**KARACİĞER İSKEMİ REPERFÜZYON  
HASARINDA KARNOZİN VE MELATONİNİN  
KORUYUCU ETKİLERİ**

**HİSTOLOJİ ve EMBRİYOLOJİ DOKTORA TEZİ**

**DR.BAŞAK BAYKARA**

Danışman Öğretim Üyesi: Yard. Doç. Dr. Işıl Tekmen

Bu araştırma DEÜ Bilimsel Araştırma Projeleri Şube Müdürlüğü tarafından  
04.KB.SAĞ.090 sayı ile desteklenmiştir.

## İÇİNDEKİLER

	<b>Sayfa</b>
Tablo ve Resim Listesi	iii
Kısaltmalar	v
<b>1. Özet</b>	<b>1</b>
<b>2. Giriş ve Amaç</b>	<b>5</b>
<b>3. Genel Bilgiler</b>	<b>7</b>
3.1 Karaciğer Histolojisi	7
3.1.1 Hepatosit	7
3.1.2 Karaciğer Lobülleri	8
3.1.3 Portal Aralık	9
3.1.4 Sinuzoidler	9
3.1.5 Disse Aralığı	9
3.1.6 Safra Kanalikülleri	10
3.1.7 Karaciğerde Lenfatik Dolaşım	10
3.2 Karaciğer İskemi Reperfüzyon Hasarı	10
3.2.1 Reaktif Oksijen Türleri (ROT)	12
3.2.2 pH Paradoksu	14
3.2.3 Nitrik Oksit ve Endotelin	14
3.2.4 Sitokinler	15
3.2.5 Kemokinler	17
3.2.6 Lipid Mediyatörler	17
3.2.7 Hücresel Adezyon Molekülleri ve Nötrofil Lökositler	18
3.2.8 Kupffer Hücreleri	19
3.2.9 Mikrodolaşım	19
3.2.10 Kalsiyum	20
3.2.11 Hücre Ölümü	21
3.2.12 Histolojik ve Biyokimyasal Değişiklikler	22
3.3 Melatonin	22
3.4 Karnozin	24

<b>4. Gereç ve Yöntem</b>	26
4.1 Elektron Mikroskopik Doku Takip Protokolü	27
4.2 Işık Mikroskopik Doku Takip Protokolü	28
4.3 Hematoksilen-Eozin Boyama Protokolü	29
4.4 Apostain Boyama Protokolü	29
4.5 Karaciğer Dokusunda Glutasyon Redüktaz Düzeyi Ölçme Protokolü	30
4.6 Karaciğer Dokusunda MPO Doku Düzeyi Ölçme Protokolü	30
4.7 Karaciğer Dokusunda TBARS Doku Ölçme Protokolü	31
<b>5. Bulgular</b>	32
5.1 Işık Mikroskopik Bulgular	32
5.2 İmmunohistokimyasal Bulgular	45
5.3 Biyokimyasal Sonuçlar	49
5.3.1 ALT Düzeyi	49
5.3.2 AST Düzeyi	49
5.3.3 Glutasyon Redüktaz Düzeyi	50
5.3.4 MPO Düzeyi	51
5.3.5 TBARS Düzeyi	51
<b>6. Tartışma</b>	52
<b>7. Sonuç ve Öneriler</b>	56
<b>8. Kaynaklar</b>	57
<b>9. Ekler</b>	68

## TABLO ve RESİM LİSTESİ

Resim 1: Deney sırasında iskemi oluşturmak için uygulanan Pringle Manevrası	28
Resim 2: Sham grubu karaciğer genel görünüm HEX330	33
Resim 3: Sham grubu karaciğer genel görünüm HEX 660	34
Resim 4: Sham grubu karaciğer genel görünümü H.E X 1320	34
Resim 5: Sham grubu karaciğer genel görünümü Toluidin BlueX 660	35
Resim 6: İR grubu karaciğer genel görünümü H.E x 330	35
Resim 7: İR grubu nötrofil infiltrasyonu ve konjesyon H.E x 660	36
Resim 8: İR grubu nekrotik alan, sinuzoidal genişleme ve konjesyon HEX660	36
Resim 9: İR grubu konjesyon ve nötrofil infiltrasyonu HEX660	37
Resim 10: İR grubu konjesyon HEX1320	37
Resim 11: İR grubu hücre infiltrasyonu, sinuzoid dilatasyonu,hepatosit şişmesi Toluidin BlueX660	38
Resim 12: İR grubu hepatositlerde şişme, açıklı koyulu hepatositler Toluidin BlueX660	38
Resim 13: IR+KAR grubu karaciğer genel görünüm HEX 330	39
Resim 14 IR+KAR grubu minimal sinuzoid dilatasyonu HEX 660	39
Resim 15: IR+KAR grubu karaciğer genel görünüm HEX 1320	40
Resim 16: IR+KAR grubu karaciğer genel görünüm Toluidin BlueX 660	40
Resim 17: IR+KAR grubu lipid artışı Toluidin BlueX 1320	41
Resim 18: İR+MEL grubu karaciğer genel görünüm HEX330	41
Resim 19: İR+MEL grubu minimal hücre infiltrasyonuHEX 660	42
Resim 20: İR+MEL grubu minimal sinuzoidal genişleme HEX 1320	42
Resim 21: İR+MEL grubu lipid artışı, az sayıda açık boyanmış hepatositler Toluidin BlueX660	43
Resim 22: İR+KAR+MEL grubu karaciğer genel görünüm HEX 330	43
Resim 23: İR+KAR+MEL grubu normal sinuzoidal yapı HEX 660	44

Resim 24: İR+KAR+MEL grubu karaciğer genel görünüm HEX 1320	44
Resim 25: İR+KAR+MEL grubu az sayıda açık boyanmış hepatositler Toluidin BlueX 660	45
Resim 26: Sham grubu Apostain Boyası X 660	46
<a href="#">Resim 27: İR grubu</a> Apostain Boyası X 660	47
Resim 28:İR+KAR grubu Apostain Boyası X 660	47
Resim 29: İR+MEL grubu Apostain Boyası X 660	48
Resim 30: İR+MEL+KAR grubu Apostain Boyası X 660	48
Tablo 1: Apoptotik hücre sayısı Ortalamaları	46
Tablo 2: ALT Ortalamaları	49
Tablo 3: AST Ortalamaları	50
Tablo 4: Glutatyon Redüktaz Ortalamaları	50
Tablo 5:MPO Ortalamaları	51
Tablo 6:TBARS Ortalamaları	51

## KISALTMALAR

- 1- AGE :Advanced Glycosylation Endproducts
- 2- AFMK :N1-asetil-N2-formil-5- metoksikinüramin
- 3- ALT :Alanin aminotransferaz
- 4- ATP :Adenozin Trifosfat
- 5- Ap :Apopitoz
- 6- AP-1 :Aktivatör protein-1
- 7- AST :Aspartat aminotransferaz
- 8- Ca<sup>+2</sup> :Kalsiyum
- 9- CAM :Hücre adezyon molekülleri
- 10- CINC :Sitokinle indüklenen nötrofil kemoçekicisi
- 11- DNA :Deoksiribonükleik Asit
- 12- ENA-78 :Epitelyal nötrofil aktive edici protein-78
- 13- eNOS :Endotelyal Nitrik Oksid Sentaz
- 14- ET :Endotelin
- 15- G6PD :Glukoz-6-fosfat dehidrogenaz
- 16- GdCl<sub>3</sub> :Gadolinium klorid
- 17- GER :Granüllü Endoplazmik Retikulum
- 18- GR :Glutasyon Redüktaz
- 19- GSH :Glutasyon

- 20-HE :Hematoksilen Eosin
- 21- HIF-1 :Hipoksi-uyarılabilen faktör-1
- 22- HOCl :Hipoklorik asit
- 23- H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> :Hidrojenperoksit
- 24- ICAM-1 :İntersellüler Adhezyon Molekülü-1
- 25- IDO :İndolamin 2,3-dioksijenaz
- 26- IL :İnterlökin
- 27- INF $\gamma$  :İnterferon gamma
- 28- iNOS :İnflamatuar Nitrik Oksid Sentaz
- 29- i.p :İntraperitoneal
- 30- İR :İskemi Reperfüzyon
- 31- İRH :İskemi Reperfüzyon Hasarı
- 32- KAR :Karnozin
- 33- LTB<sub>4</sub> :Lökotrien B<sub>4</sub>
- 34- MCP :Monosit kemoçekicisi
- 35- MEL :Melatonin
- 36- MIP :Makrofaj inflammatuar protein
- 37- MPO :Myeloperoksidaz
- 38- NADPH :Nikotin Adenin Dinükleotid Fosfat
- 39- NF-kB :Nükleer faktör kappa B
- 40- NL :Nötrofil Lökosit
- 41- NO :Nitrik Oksid
- 42- NOS :Nitrik Oksid Sentaz
- 43- O<sub>2</sub><sup>-</sup> :Süperoksit Anyonu
- 44- PAF :Platelet Aktivatör Faktör
- 45- PECAM : Platelet endotel hücre adezyon molekülleri



- 46- ROT : Reaktif Oksijen Türleri
- 47- SEH : Sinuzoidal Endotel Hücreler
- 48- SOD : Süperoksitdismutaz
- 49- SPAK : Stresle aktive olan protein kinaz
- 50-TBARS : Thiobarbituric acid reactive substances
- 51- TNF $\alpha$  : Tümör Nekroz Faktör alfa
- 52- TUNEL : Terminal deoksinükleotidil transferaz aracılı dUTP labeling
- 53- VCAM : Vasküler hücre adezyon molekülleri

## **ÖZET**

### **Karaciğer İskemi Reperfüzyon Hasarında Karnozin ve Melatoninin Koruyucu Etkileri**

Dr. Başak Baykara

Dokuz Eylül Üniversitesi Tıp Fakültesi Histoloji ve Embriyoloji A.D. Inciraltı-İzmir

## **AMAÇ**

Karaciğer iskemisi ardından gelen reperfüzyon, hepatosit hasarı ve apoptozis ile sonuçlanmaktadır. Bu çalışmanın amacı karaciğer iskemisi reperfüzyon hasarında, antioksidan ajan olan karnozin (KAR) ve melatonin (MEL) verilerek, etkilerini ışık mikroskopik, immunhistokimyasal ve biyokimyasal olarak incelemektir.

## **YÖNTEM**

5 çalışma grubu oluşturuldu. I. Sham, II. İskemi/reperfüzyon (İR), III. İR+MEL, IV. İR+KAR V. İR+ MEL+KAR. Total hepatik iskemisi 1 saat, reperfüzyon 4 saat uygulandı. KAR 250 mg/kg, MEL 10 mg/kg iskemiden 30 dakika önce ve reperfüzyondan hemen önce intraperitoneal yolla verildi. Işık mikroskopik incelemeler için takip yapılan dokulardan elde edilen kesitler hemotoksilen eosin ile, elektron mikroskopik takip yapılan dokulardan alınan ince kesitler ise toluidin blue ile boyandı. Apoptotik hücre boyanma farklılıkları apostain boyası ile gösterildi. Serumda ALT (alanin aminotransferaz), AST (aspartat aminotransferaz), karaciğer doku homojenatlarında TBARS (thiobarbituric acid reactive substances ), MPO (myeloperoksidaz), Glutasyon Redüktaz (GR) düzeyleri ölçüldü.

## **BULGULAR**

İR grubunda yaygın hepatosit hasarı, sinuzoid dilatasyonu, konjesyon, nötrofil infiltrasyonu gözlenirken tedavi gruplarında bu bulgular oldukça azalmış olarak izlendi. İR grubunda artan ALT, AST, MPO düzeyi tedavi gruplarında azalmış olarak bulundu. GR düzeyi İR grubunda düşükken KAR ve KAR+MEL verilen grupta artış gösterdi. TBARS ölçümlerinde gruplar arası anlamlı fark bulunmadı. Apostain boyası

ile boyanan kesitlerde İR grubunda artan apoptotik hücre sayısının, tedavi verilen gruplarda azaldığı gözlemlendi.

## **SONUÇ**

İR hasarına bağlı oluşan yapısal ve biyokimyasal değişikliklerin geri dönüşümünde MEL' e göre KAR daha etkilidir. MEL + KAR'ın bir arada verilmesi bu maddelerin ayrı ayrı verilmesinden çok daha iyi sonuçlar elde edilmesine neden olmuştur.

**Anahtar Sözcükler:** Karaciğer, iskemi, reperfüzyon, karnozin, melatonin

## **ABSTRACT**

### **Protective Effects of Carnosine and Melatonin on Hepatic Ischemia-Reperfusion Injury**

Dr. Başak Baykara

Histology and Embryology Department, Faculty of Medicine, Dokuz Eylül University, İnciraltı, İzmir, Turkey

#### **AIM**

Hepatic ischemia and subsequent reperfusion cause hepatic injury and apoptosis. The aim of this study is to investigate the light microscopic, biochemical and immunohistochemical effects of antioxidant agents, carnosine (CAR) and melatonin (MEL), in hepatic ischemia reperfusion injury.

#### **MATERIAL AND METHOD**

Five study groups were formed. The groups are; I. Sham-operated, II. Ischemia/reperfusion (IR), III. IR+MEL, IV. IR+CAR, V. IR+CAR+MEL Total hepatic ischemia is applied for 1 hour and reperfusion period is applied for 4 hours. CAR (250/mg/kg) and MEL (10/mg/kg) were administered 30 minutes prior to the ischemia period and immediately before the reperfusion period, intraperitoneally. Tissue samples were prepared for light microscopy. Light microscopic preparations were stained with hematoxylin-eosine. Electron microscopic semithin preparations were stained with toluidin blue. Apoptotic cells were demonstrated by apostain ALT, AST levels were measured in serum. TBARS, MPO and GR were measured in hepatic tissue homogenate.

#### **RESULTS**

In ischemia reperfusion group, diffuse hepatocyte injury, dilated sinusoids, congestion and neutrophil infiltration was observed however in treatment groups these changes

were seen much less than ischemia reperfusion group. ALT, AST and MPO levels were increased in IR group, also those levels were decreased in treatment groups. GR level was decreased in IR group, on the contrary, increased in KAR and KAR+MEL groups. There was no difference in TBARS levels between groups. Number of apoptotic cells were increased in IR group and decreased in treatment groups, in apostain stained sections.

## **CONCLUSION**

Treatment of carnosine is much more effective than melatonin for recovering of structural and biochemical changes in ischemia reperfusion injury, nevertheless treatment of melatonin and carnosine together is much more effective for recovering from ischemia reperfusion injury.

**Key Words:** Liver, ischemia, reperfusion injury, carnosine, melatonin

## **2. GİRİŞ VE AMAÇ**

İskemi, hücre enerji düzeyinin düşmesine ve toksik metabolitlerin dokuda birikimine yol açarak, hücre fonksiyon bozukluğundan hücre ölümüne kadar giden bir dizi biyokimyasal reaksiyonu başlatır. İskemik dokunun tekrar kanlanması reperfüzyondur, enerji gereksiniminin geri kazanılması ve toksik metabolitlerin ortamdaki uzaklaştırılması için gereklidir. Ancak, iskemi sırasında oluşmuş toksik metabolitlerin ve çeşitli inflamatuvar mediatörlerin sistemik dolaşıma verilmesi ile ciddi metabolik bozukluklar oluşabilir ve reperfüzyon daha ileri doku hasarına yol açabilir (1).

İskemi reperfüzyon hasarı (İRH), hipoksik organın tekrar oksijenlenmesi ardından ortaya çıkan hücre hasarlarıdır. Karaciğerde iskemi-reperfüzyon hasarı ilk kez 1975'de Toledo-Pereyra ve arkadaşlarının deneysel olarak gerçekleştirdikleri karaciğer naklinde gözlenmiştir. Nakledilmiş karaciğerde konjesyon, ilerleyici trombozis, organ yetmezliği ile sonuçlanan greft nekrozu gelişmiştir (2).

Karaciğer iskemisi nakil cerrahisinden başka, travma, kanser, safra yolu tıkanmaları ve darlıkları nedeniyle ameliyat edilen hastalarda, ayrıca cerrahi girişim olmaksızın bir hemodinamik veya kardiyojenik şok periyodunu takiben oluşabilmektedir. Karaciğer İRH patofizyolojisi, karaciğer hasarına yol açan birçok mekanizmanın katılımından meydana gelir. Kupffer hücre aktivasyonu, reaktif oksijen türlerinin (ROT) oluşumu, sitokin ve kemokin salgılanması, vazokonstriksiyon, nitrik oksit ve endotelin dengesindeki bozulma, nötrofil lökositlerin toplanması, mitokondriyal geçirgenliğin değişikliğe uğraması, kalsiyumun ( $Ca^{+2}$ ) hücre içine dengelenmemiş geçişi ve pH paradoksu gibi çeşitli hücre ve moleküler etkileşimler söz konusudur. Bu kompleks mekanizmalar hücre ölümüne, organ fonksiyon bozukluğuna ve en sonunda da organ kaybına neden olmaktadır (3).

İRH'den sorumlu olduğu düşünülen patofizyolojik mekanizmaları bloke edeceği düşünülen birçok hepatosit koruyucu ajan; allopurinol,  $\alpha$ - tokoferol, mannitol, dopamin, prostoglandin, aktive karbon hemoperfüzyonu, glukagon, melatonin, karnitin, klorpromazin, aprotonin, metil prednizolon, deferoksamin, siklosporin, katalaz, aspartik asit, ubiquinon, trombosit aktive edici faktör antagonistleri, adenozin

trifosfat (ATP), verapamil, nifedipin, süperoksit dismutaz tanımlanmış ve bunların İRH üzerine iyileştirici etkileri deneysel İR modellerinde araştırılmıştır (4,5).

Karnozin (KAR) ( $\beta$ -alanyl-L-histidine), 1900'lerde keşfedilmiş ilk nöropeptiddir. Kas ve sinir dokuda geniş dağılım gösterir. KAR'ın antioksidan etkisi 1984'de ilk kez gösterilmiş birçok çalışma ile doğrulanmıştır. KAR, suda erime özelliğine bağlı olarak, suda çözünen oksidasyon mediatörlerinin (metaller ve oksijen radikalleri) yüksek olduğu sitozolde fonksiyon görür. Aktif oksijen radikallerini temizleyen biyolojik fonksiyonuna bağlı olarak antioksidan özelliğe sahiptir. Hidroksil ve süperoksit radikallerinin ve çok kuvvetli olarak da singlet oksijen molekülünün temizleyicisidir. Bu özelliği nedeniyle beyin, böbrek ve iskelet kası iskemi reperfüzyon hasarında KAR'ın koruyucu etkisi araştırılmış ve olumlu sonuç alınmıştır (6–11). Ancak literatürde KAR'ın karaciğer İRH üzerine etkisi ile ilgili herhangi bir çalışma bulunmamaktadır.

Melatoninin (MEL) (N-asetil-5-metoksitriptamin) dolaşımdaki asıl kaynağı pineal bezdir. Ayrıca çok daha düşük oranda retina, gastrointestinal sistem, lökositlerde de üretilmektedir. MEL küçük bir moleküldür (12). Yüksek lipofilik özelliği vardır, bu nedenle hücrenin tüm bölümlerinde bol miktarda bulunur. Burada MEL, oksidatif hasara karşı DNA, lipid ve proteinleri korur (13–16). MEL'in serbest radikal temizleyicisi ve antioksidan etkisi olduğu çeşitli çalışmalarla gösterilmiştir (17–21).

Biz bu çalışmamızda KAR'ın İRH'yi düzeltici özelliği olduğunu düşünerek, koruyucu etkisi karaciğer İRH' de kanıtlanmış olan MEL ile karşılaştırıp etkilerini, histolojik ve biyokimyasal yönlerden karşılaştırmayı amaçladık.

### **3. GENEL BİLGİLER**

#### **3.1 Karaciğer Histolojisi**

Karaciğer; sindirim kanalından emilen besinlerin işlendiği, depolandığı bir organdır. Ağırlığı yaklaşık 1,5 kg dır. Organa kanın %70-80'i portal venden, geri kalan bölümü hepatik arterden gelir. Sindirim kanalından emilen şilomikronlar dışındaki maddeler portal ven yoluyla karaciğere ulaşır. Hilumda portal ven, hepatik arter ve sinirler girer, sağ ve sol hepatik kanallar ve lenfatikler çıkar (1). Glisson kapsülü hilusta organın içine girer ve organı lobüllere ayırır. Lobüllerin birbiriyle birleştiği bölümlerde bağ dokusu artarak, enine kesitte üçgen biçiminde alanlar olarak görülür. Arter, ven ve safra duktusunu içeren bağ dokusu alanlara "portal aralık-Glisson üçgeni" denir. Karaciğer, diyafragma ve arka yüzünde abdomenle temas eden bir bölümü dışında periton ile örtülüdür. Karaciğerdeki hücrelerin %65'ini, karaciğer hacminin %80'ini hepatositler oluşturur. Parankimde, hepatositlerin dışında Kupffer hücreleri (sinuzoidal makrofajlar) ve perisinuzoidal yıldızlı hücreler (İto hücreleri) bulunur.

##### **3.1.1 Hepatosit**

Hepatosit adını alan karaciğer hücreleri, polihedral şekilli, altı ya da daha fazla yüzeyli ve 20–30µm çapındadır. Hepatosit, bir ya da iki tipik nükleolus içeren bir ya da iki yuvarlak nukleusa sahiptir. Bol miktarda granüllü ve agranüler endoplazmik retikulumu vardır. Bu organellerde inaktivasyon ya da detoksifikasyon için gerekli oksidasyon, metilasyon, konjügasyon gerçekleşir.

Karaciğer hücrelerinde glikojen elektron yoğun granüller halinde görülür. Kan glikozu normalin altına düşerse mobilize olur. Lizozomlar, hücre içi organel yıkımında görevlidir. Golgi kompleksi yassılaştırmış sisternalar küçük veziküller ve safra kanalikülü yakınında yer alan daha büyük vakuollerden oluşmuştur. Nükleus tipik veziküler çekirdektir. Agranüler endoplazmik retikulumda maddeler, sülfat ya da glukronid ile birleştirilerek inaktive ya da detoksifiye olur. Peroksizom oksidatif enzimleri içerir, endoplazmik retikulumdan oluşmaktadır. Hücreyi hidrojen peroksit (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) ile aşırı yüklenmekten korur.



Enine kesitte karaciğer hücreleri altıgen biçimlidir, her hücrenin 3 yüzü vardır. 1)Perisinuzoidal aralığa bakan yüz: Çok sayıda düzensiz şekil ve büyüklükte uzun mikrovilluslar bulunur. Mikrovilluslar sekresyon ve absorpsiyon için geniş yüzey oluşturur.

2)Safra kanalikülü oluşturan yüz: Karşılıklı olarak komşu karaciğer hücre membranlarının kıvrılmasıyla tübüler bir aralık oluşur. Bu yüzde de mikrovilluslar bulunur. Salgı olmadığı zaman mikrovillusların boyu artarak lümeni kapatır.

3)Komşu karaciğer hücresiyle sıkı temastaki yüz: Zonula okludens ve gap junction ile sıkıca birbirine tutunurlar.

### **3.1.2 Karaciğer Lobülleri**

1)Klasik karaciğer lobülü: Enine kesitlerde lobül altıgen şeklindedir. Her köşesinde Glisson üçgeni ortasında vena sentralis bulunur. Vena sentralis çevresinde ışınal seyirli karaciğer hücreleri vardır. Tek hücre kalınlığındaki karaciğer hücre kordonlarına "Remark hücre kordonları" denir.

2)Portal lobül: Safra salgılanışı göz önüne alınmıştır. Portal aralık içindeki bir safra duktusuna safra veren komşu karaciğer hücrelerince oluşturulur. Üç klasik karaciğer lobülünün vena sentralislerinin birleştirilmesiyle oluşur.

3)Asinüs: İki komşu klasik lobül içinde aynı interlobüler venden kanlanan hücre gruplarıdır. Lobüller arasında ilerleyen interlobüler ven komşu iki lobüle dağılır. Sınırları iki vena sentralis ve iki portal aralığın birleştirilmesi ile oluşur.

Hepatositler kanlanmaya göre 3 zona ayrılır.

1)Periferik zon: Glikojen, oksijenden en zengin kanla karşılaşan hücreler vardır. Glikojenin en çok depolandığı yerdir.

2)Santral zon: Vena sentralis çevresindeki dinlenme evresindeki hücrelerdir. Yağ birikimi bu zondaki hücrelerde başlar.

3)Ara zon: Periferik ve santral zon arasında kalan alandır.

### **3.1.3 Portal Aralık**

Üç karaciğer lobülünün birleştiği yerdeki bağ dokusu alandır. Çevresindeki karaciğer hücreleri bir hücre kalınlığında kordonlar oluşturur. Arteria hepatica, vena porta ve duktus hepatica biliferiyi içerir. Portal ven, superior ve inferior mezenterik venler ile splenik venden gelen kanı, arteria hepatica abdominal aortun çölyak dalından gelen kanı taşır. Safra kanalı kübik epitelle örtülüdür. Hepatositlerden gelen safrayı taşır. En büyük safra duktusunda epitel silindiriktir.

### **3.1.4 Sinuzoidler**

Vena portae ve arteria hepatica'dan gelen kan hücre kordonları arasında bulunan sinuzoidlere boşalır. Kapiller, pencereci endotel tabakasından oluşur. Endotel hücreleri altlarında bulunan hepatositlerden "Disse aralığı" adı verilen subendotelyal boşlukla ayrılmıştır. Bu aralıkta hepatositlerin mikrovillusları vardır. Kan, vena sentralise sonra vena interkalarise dökülür. Vena interkalarislerin birleşmesiyle toplayıcı ven oluşur, vena hepaticayı yaparak vena cava inferiora açılır. Sinuzoidler kapillerden daha geniş çaplıdır. Lümen seyri boyunca genişleme ve daralmalar görülür. Duvarında fagositoz yapan "Kupffer hücreleri" bulunur. Bunlar tipik makrofajlardır. Bu hücreler endotel hücrelerinden daha büyüktür. Nükleusu oval ve büyük, nükleolusu çok belirgindir. Peroksidaz (+)'tir, bu özellikleri endotel hücrelerinden ayırımında kullanılır. Kupffer hücreleri eritrositleri metabolize eder, hemoglobini yıkar, immunolojik olaylarla ilgili proteinleri salgılar. Yağ depolayan İto hücreleri Disse aralığına yerleşmiş yıldız hücrelerdir. A vitamini lipid damlaları içinde retinil esterleri şeklinde biriktirme kapasitesine sahiptirler. Endotel hücrelerinin koyu boyanan yassı nükleusu vardır. Sitoplazmada küçük veziküller bulunur.

### **3.1.5 Disse Aralığı**

İntersitisyel aralıktır. İçinde bulunan sıvı plazmadır. Karaciğerde lenf yapımında rol oynar. Lobülün periferinde "Mall aralığı" ile devam eder. Portal aralıktaki safra duktusu ve damarların çevresinde bulunur. Bu aralıktan kör uçlar halinde lenf

damarları başlar. Disse içinde hem endotel hem Kupffer hücrelerinden türeyen perisinuzoidal hücreler bulunur. Retiküler ve kollagen fibril sentezi, fetal karaciğerde hemotopoezi sağlayan stem cell olarak görev yaptığı düşünülmektedir. Daha çok ara ve periferik zonda bulunurlar.

### **3.1.6 Safra Kanalikülleri**

Karaciğer hücreleri arasında bulunurlar. Gümüşleme ya da alkalin fosfataz reaksiyonu ile seçilebilir. Çapı salgılama sırasında genişler. Duvarları gerilince mikrovilluslar azalır. Safra akımı lobülün merkezinden periferine doğrudur. Lobülün periferinde safra kanaliküllerinin duvarını oluşturan karaciğer hücreleri sitoplazması soluk boyanan koyu nukleuslu organelce fakir kübik hücrelere dönüşür. Bu hücreler belirgin bazal membrana otururlar. Bu bölge “Hering kanalı” adını alır. Duktus biliferileri kübik ya da silindirik epitelle döşeli epitel dışında belirgin bağ dokusu kılıfı olan geniş lümenli tübüler yapılardır.

### **3.1.7 Karaciğerde Lenfatik Dolaşım**

Karaciğerdeki lenf diğer lenf sıvılarından daha fazla protein içerir. Albümin/globülin oranı plazmadan daha yüksektir. Torasik duktusa gelen lenfin büyük bir bölümü karaciğerden, az bir bölümü mezenterik lenfatikler yoluyla barsaklardan gelir. Lobül içinde lenfatik damar yoktur. Disse aralığı lenfin olduğu aralıktır. Plazma Disse aralığına geçer. Lenf sıvısı lobülün periferine ilerler, “Kiernan aralığı”nda lenfatik damarlara boşalır. Septumlarda ve Glisson kapsülünde zengin bir pleksus oluşturur çapı büyür, hilusa yakın en büyük hacime ulaşır (22,23).

## **3.2 Karaciğer İskemi Reperfüzyon Hasarı**

İRH, hipoksik organın tekrar oksijenlenmesinden sonra ortaya çıkan hasarlanmadır. Karaciğere gelen kanın %70–80'i portal venden, geri kalan kısmı ise hepatik arterden gelmektedir. Karaciğerin dolaşım sistemindeki yeri, metabolitlerin biriktirilip taşınması, toksik maddelerin nötralize ve elimine edilmesi için oldukça

uygundur (22). İkili kan desteği ve glikojen depolarının yüksek anaerobik metabolizma kapasitesine rağmen karaciğerde hipoksik hasarlanma meydana gelebilmektedir. Porta hepatitis'in çapraz klemplenmesi ile hepatik arter ve portal venin oklüzyonu "Pringle manevrası" olarak adlandırılır. Karaciğerin geniş yaralanmalarında onarma, karaciğer nakli, hepatik rezeksiyon sırasında kanama kontrolü için yararlı bir manevradır. Ancak klemleme süresi uzun tutulduğunda karaciğer İR hasarına neden olabilir.

Karaciğer reperfüzyon hasarı, sıcak İRH ve soğuk-depolama reperfüzyon hasarı olarak sınıflanabilir. Sıcak İRH klinik olarak karaciğer cerrahisi ile ilişkilidir. Karaciğer nakli, hipovolemik şok, bazı tip toksik karaciğer hasarları, veno-okluziv hastalıklar, Budd-Chiari Sendromu gibi durumlarda meydana gelir. Soğuk depolama reperfüzyon hasarı ise nakil öncesi organ korunması sırasında oluşmaktadır (5).

Sıcak İRH'ında iki evre söz konusudur. Başlangıç evresi ( reperfüzyon ardından iki saatten kısa) oksidan stresle karakterizedir. ROT üretimi ve salgılanması doğrudan hepatositlerde hasarlanmaya neden olur. Geç evre ise hepatik reperfüzyondan 6–48 saat sonraki dönemdir. İnflamatuvar durum toplanan nötrofil lökosit (NL) aracılığıyla gerçekleşir (24).

İR patofizyolojisinde karmaşık mekanizmalar rol oynar. Erken dönemde endotel hücrelerinin şişmesi, vazokonstrüksiyon, NL birikimi, sinuzoidlerde trombosit birikimi olur ve mikrodolaşım bozulur. İntrasellüler ödem nedeniyle, sinuzoidal endotel hücreler (SEH) ve Kupffer hücresinde şişme meydana gelir. İskeminin neden olduğu enerji azalması sonucunda aktif membran transport yetmezliği meydana gelir (25).

Vazokonstrüksiyon, nitrik oksit (NO) ve endotelin (ET) dengesindeki bozulma sonucu ortaya çıkar. Sinuzoidal lümen daralır, bunu takiben NL'nin hızı yavaşlar. NL'nin endotel ile temas süresi artar ve böylece lökostazis gerçekleşir. Bu durumda sinuzoidal dolaşım engellenir (25-27). Bu durum hipoksiyi uzatır. Ardından Kupffer hücreleri, NL'ler aktive olur, inflamatuvar sitokinler (27) ve oksijen kökenli serbest radikaller (1,4,5,24,25) ortaya çıkar, hepatik hasar daha da şiddetlenir.

### **3.2.1 Reaktif Oksijen Türleri**

ROT'lar hücre fonksiyonları sonucunda endojen olarak ortaya çıkan yapılardır. Normal koşullar altında, moleküler oksijenin büyük bir kısmı hücre içi sitokrom oksidaz sistemi ile dört değerli indirgenmeye uğrayarak suya dönüşür. Ancak İR durumunda sadece bir elektron transferi ile tek değerli indirgenme olur ve oldukça reaktif serbest radikaller meydana gelir. Serbest radikal, herhangi bir atom ya da molekülün dış yörüngesinde çift oluşturmamış bir elektron içermesi durumu olarak tanımlanır. Reperfüzyon ile birlikte, İR hasarı gelişiminde önemli rol oynayan superoksit anyonu ( $O_2^-$ ), hipoklorik asit (HOCl) ve hidrojen peroksit ( $H_2 O_2$ ) gibi ROT'lar oluşur. En genel ROT kaynağı mitokondridir. Mitokondriyal elektron transport sıkıca düzenlenmiştir ancak bazı kaçaklar her zaman meydana gelmektedir. Bu kaçaklar ROT oluşumuna yol açar (28). Organizmada serbest radikal ve reaktif oksijen türlerinin oluşmasına yol açan endojen ve ekzojen kaynaklar bulunmaktadır (29).

#### **Endojen kaynaklar:**

- 1- Mitokondriyal ve endoplazmik retikulum elektron transport zinciri
- 2- Nötrofil fagositoz sistemi
- 3- Ksantin oksidaz sistemi
- 4- Araşidonik asit metabolizması
- 5- Enzimatik olmayan reaksiyonlar
- 6- Lenfosit, fibroblast ve endotelden düzenleyici moleküller olarak salgılanma
- 7- Diğer oksidazlar

#### **Ekzojen kaynaklar:**

- 1- İyonizan radyasyon (X-ışını )
- 2- Hepatotoksinler (Karbon tetraklorür )
- 3- Ksenobiyotikler
- 4- Redoks siklusu yapan maddeler
- 5- Kemoterapötikler (Adriamisin )
- 6- Hava kirliliği, UV ışınları, sigara

Geçici olarak ROT artışı, çeşitli düzenleyici fonksiyonlar açısından önemlidir. Ancak bu artış yüksek ve/veya uzun süreli olduğunda DNA, lipid ve proteinlerin çok ciddi hasarına neden olabilmektedir. ROT birikimine karşı bir takım savunma sistemleri bulunmaktadır. Bunlar enzimatik olmayan moleküller (örneğin; vitamin A, C, E ve flavenoidler) ve enzimatik ROT yakalayıcılarıdır (örneğin; süperoksit dismutaz (SOD), katalaz, glutatyon peroksidaz) (30). Ancak her zaman bu savunma mekanizmaları ROT üretimine karşı yeterli olmaz ve oksidatif stres durumu ortaya çıkar. Oksidatif stres ateroskleroz, diyabet, akciğer fibrozisi, nörodejeneratif hastalıklar, artrit gibi birçok hastalıkta artmıştır. Ayrıca yaşlanmanın temel belirleyicisi olarak bilinmektedir. ROT'a yanıt, hücresel düzeylerine bağlı olarak hücre çoğalmasından, büyüme durması ve hücre ölümüne kadar geniş bir dağılım gösterir. Bununla birlikte hücre içi stres sinyal yolları büyük ölçüde denge halindedir. Sonuçta bu sinyaller gen ekspresyonu ile sonuçlanır. Yollardan bazıları hücre ölümü oluştururken bazıları hücrenin yaşamasını sağlar (28,31).

ROT ve reaktif nitrojen türleri, iskemi sonrası hücresel hasardan sorumludur. Hipoksi veya reoksijenasyon tarafından üretilen ROT'un membran lipidlerini peroksitleyen, DNA'yı oksitleyen, enzim proteinlerini denatüre eden basit reaktanlardan çok, fizyolojik sinyal ileticisi olarak iş gördüğü bulunmuştur. Transkripsiyon faktörü nükleer faktör kappa B (NF-kB), p53 ve AP-1 oksijen bileşikleriyle düzenlenir. ROT, özellikle H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, çeşitli fizyolojik uyarılar için ikincil habercidir. Bu bilgiler ROT üretiminin sinyal ileti yolları ile ilişkili olduğunu gösterir. ROT transkripsiyonel düzenleyicilerin aktive olmasını sağlayan anahtar sinyal işlevini görmektedir. Bunlar hipoksi-uyarılabilen faktör-1(HIF-1), NF-kB, aktivatör protein-1 (AP-1), stresle aktive olan protein kinaz (SAPK) yolaklarıdır (28,31,32).

NL'ler, önemli birer ROT kaynaklarıdır. Bakterilere karşı immun sistem düzeneklerinde, süperoksit radikal üretimi önemli rol oynamaktadır (32). Ancak aktive olmuş NL reperfüzyon hasarı için mutlaka gerekli değildir. Ortamda NL olmasa da SEH, hepatosit ve diğer hücre kültürlerinde İR ardından hasarlanma meydana gelebilmektedir. İR'ye maruz kalan SEH'ler ekstrasellüler ortama süperoksit anyonları salabilirler (5). Mikrozomal sitokrom P<sub>450</sub>, özellikle de karaciğerde belli miktarda ROT üretebilirler. Karaciğerde yoğunlukları en yüksektir ve ekzojen substratları en çok burada etkileşirler. Bilinen diğer ROT kaynakları fagositik hücreler, NL ve

monositlerdir. Bu hücreler fagositoz için uyarıldıklarında yüksek miktarda ekstrasellüler ROT üretmektedirler. İnflamatuvar hücreler esas olarak plazma membranına bağlı, NADPH (Nikotin Adenin Dinükleotid Fosfat) bağlı oksidazdan süperoksit üretirler. Buna ek olarak, aktive olmuş Kupffer hücreleri ve NL'ler prooksidan etkileri olan Tümör Nekroz Faktör alfa (TNF $\alpha$ ), İnterlökin-1(IL-1), NO, HOCl ve lökotrienleri üretmektedirler (32).

### **3.2.2 pH Paradoksu**

İskemi sırasında, anaerobik glikoliz ve ATP hidrolizi nedeniyle pH düşer. Bu oluşan metabolik asidoz hepatositlerde nekrotik hücre ölümünün başlamasına karşı koruyucudur. Ancak iskemik hücrelerde reperfüzyonla birlikte pH'nın normale dönmesi pH bağımlı proteazları ve fosfolipazları aktive ederek hücre ölümüne neden olmaktadır. Bu fenomen "pH paradoksu" olarak adlandırılır. İskemik hücreler asidik pH'da reperfüze edildiklerinde hücre ölümü durmaktadır. Benzer biçimde reperfüzyondan sonra intrasellüler pH artımı durdurulduğunda İRH'na bağlı hepatoselüler nekroz engellenmektedir (33–36).

### **3.2.3 Nitrik Oksit ve Endotelin**

NO karaciğerde önemli sinyal molekül işlevi gören pluripotent gaz formunda bir serbest radikaldir. Karaciğerde Nitrik Oksit Sentazın (NOS) 3 izoformu bulunmaktadır. Bunların içinde uyarılabilen-inflamatuvar NOS (iNOS, NOS-2) ve endotelial yapısal NOS (eNOS, NOS-3) en önemli olanlarıdır (37,38).

iNOS, genellikle inflamatuvar mediatorlere yanıt olarak, hepatositler ve Kupffer hücreleri ve NL'ler gibi inflamatuvar hücrelerden eksprese edilir. iNOS geninin ekspresyonel düzenlenmesinde merkezi rol oynayan NF- $\kappa$ B, yüksek ökaryotik transkripsiyonal faktördür (37). eNOS SEH içinde eksprese edilir ve aktivitesi hücre içi kalsiyum seviyelerine bağımlıdır (25,39). SEH, kan damarlarının en iç yüzeyini döşeyen tek sıralı hücreler olup, vasküler homeostaz için temel unsurdur. Bu hücreler hem iskemiden hem de reperfüzyondan kolaylıkla hasar görür. Uzamış iskemi membran potansiyelini değiştirir. Bu da iyon dengesizliğine, hücre içi yoğunluk

artmasına, membran akışkanlığının azalmasına, hücresel iskeletin bozulmasına neden olur (40).

Birçok dokuda, kan akımının kesilmesi gibi fiziksel uyarılarda endotel, vazodilatörlere yanıt olarak NO üreterek ( eNOS) kan akışı düzenlenmesinde önemli rol oynamaktadır. Karaciğer İRH'nın stellat hücre kontraksiyonu ve sinuzoidler içinde kan akımı bozulması ile de ilişkili olduğu düşünüldüğünde bu durum oldukça önem kazanmaktadır (25). Reperfüzyonun erken safhalarında ET, hem plazma hem de karaciğer parankiminde artar. Bu karaciğere olan kan akımın azalması ile orantılıdır (41). ET, mikrodolaşımdaki bozukluğa oldukça güçlü bir vazokonstriktör olması nedeniyle de katkıda bulunur (42). Bunun yanı sıra reperfüzyondaki ilk birkaç saat NO miktarı düşüktür. Bunun nedeni iskemi ardından NO sentez kofaktörleri olan hücre içi NADPH ve O<sub>2</sub> düzeylerinin düşük olmasıdır. Bu sırada bol miktarda, L-arginini yıkan enzim olan, arginaz salgılanır. Ayrıca L-arginin, NO biyosentezinin aminoasit substratıdır. Hepatik reperfüzyondan hemen sonra, greftten yüksek miktarda arginaz salgılanır. Yeterli miktarda NO, reperfüzyondan sonraki 6 saate kadar oluşmaz. NOS uyarımı 4–6 saati bulur. Daha sonraki dönemlerde artmış endojen NO üretimi, koruyucu role sahip olmaktadır (25). İskemi reperfüzyon modeli uygulanan sıçanlara dışarıdan L-Arginin verilmesi İRH'yi azaltmış, L-NAME (NOS'un spesifik olmayan inhibitörü) verilmesi ise hücresel hasarı ve mikrodolaşımın bozulmasını şiddetlendirmiştir (43).

### **3.2.4 Sitokinler**

Hepatik İR inflamatuvar mediyatörlerin karmaşık yolağını tetikler. Sitokinler inflamatuvar yanıtı başlatır ve sürdürürler. Kupffer hücrelerinin aktivasyonu sonucunda proinflamatuvar sitokinler üretilir ve salgılanır. TNF $\alpha$  ve IL-1B artar. Bunlar sitokin ve kemokinlerin üretimini indükler.

TNF $\alpha$  çeşitli inflamatuvar ve immünmodülatör uyarana yanıt olarak çeşitli hücre tipleri tarafından üretilen bir sitokindir. Hepatik İR' de merkezi mediyatördür. Etkisini sadece karaciğerde değil uzak organlarda da (özellikle akciğerde) gösterir (24). Biyolojik etkileri hücre ölümünden hücre yenilenmesine kadar çeşitlilik göstermektedir. TNF $\alpha$ 'nın nasıl hepatosellüler hasarlanmaya yol açtığı tam



anlaşılammıştır. Doğrudan mitokondriye toksisitesi olabilir, apoptozu veya nekrozu indükleyebilir. TNF $\alpha$ 'nın sitotoksik etkisine mitokondri tarafından üretilen ROT'un da katkısı söz konusu olabilir (44).

TNF $\alpha$ , lokal bir kemokin olan epitelyal nötrofil aktive edici protein-78 (ENA-78)'in üretilmesini indükler. Bu protein NL'nin kemotaksisinde önemli rol oynar ve Kupffer hücrelerini superoksit radikalleri üretmesi için indükler (45).

Sıçan karaciğerinden izole edilmiş Kupffer hücrelerinde İR ardından TNF $\alpha$  üretimi kontrol grubuna göre 5 kat fazla artış göstermiştir (46). Ayrıca sıçanlarda hepatik İR'de anti-TNF $\alpha$  antikoru hepatik hasarlanmayı azaltmakta, akciğer ödemi engellemektedirler. Benzer biçimde pentoksifilin Kupffer hücrelerinin TNF $\alpha$  üretimini engeller, bunun sonucunda İRH azalır (47).

IL-1, TNF $\alpha$  'a yanıt olarak salgılanır. Sonuçta TNF $\alpha$  , Kupffer hücrelerini daha fazla TNF $\alpha$  üretimi için uyarır. IL-1 ayrıca NL'lerden serbest radikal üretimini uyarır (48). Reperfüzyondan yaklaşık 5 dakika sonra TNF $\alpha$  ve IL -1 plazma düzeyi artar (49). Reperfüzyon ardından izole edilmiş sıçan Kupffer hücreleri kendiliğinden IL-1 salınımında bulunurlar. Sıçanlarda IL-1'in ROT üretimini şiddetlendirdiği bilinmektedir. IL-1 antagonistleri ise TNF $\alpha$  düzeylerini düşürerek karaciğer İR hasarını azaltırlar (48).

IL-6, Kupffer hücreleri ve SEH'den salınır. Hepatositlerden akut faz reaktanlarının (C reaktif protein,  $\alpha$ -1 antitripsin, fibrinojen) salınımını indükler. Sıçan karaciğerinden izole edilen Kupffer hücrelerinde İR hasarı ardından 2 saat sonra, iskemik olmayan kontrollere göre IL-6 salınımı %175 oranında artış göstermiştir. IL-6, İR sırasında ayrıca in vivo olarak da salınmaktadır. Fakat bu salınımı TNF $\alpha$  ve IL-1 ile karşılaştırıldığında daha geç olmaktadır (46,48).

IL-12, iskemi ve erken reperfüzyonda hepatositler tarafından salgılanır. TNF $\alpha$  üretimi ve takip eden inflamatuvar yanıt için gerekli olduğu, IL-12 yoksun farelerde ya da IL-12'e karşı antikor kullanılarak gösterilmiştir (24). IL-12' ye karşı nötralizan antikorlarla tedavi edilen IL-12 p40 gen defektli farelerde, İR'e bağlı TNF $\alpha$  ve interferon gamma (INF $\gamma$ ) salınımı beklenen düzeyde olmamıştır, buna bağlı olarak da İR'ye bağlı karaciğer hasarı daha hafif düzeyde gerçekleşmiştir (50).

### **3.2.5 Kemokinler**

Kemokinler güçlü NL kemotaktan özellikleri olan düşük moleküler ağırlıklı proteinlerdir. Sitokinler, Kupffer hücrelerinde ve hepatositlerde kemokin oluşumunu indüklerler. Sıcak İR ardından karaciğerden TNF $\alpha$  salgılanmaktadır. Karaciğerden salgılanan TNF $\alpha$ , akciğerden ENA-78 kemokininin salgılanmasını uyarır, bu da akciğer hasarının ortaya çıkmasına neden olur. Sıcak hepatik İR hasarında, anti TNF $\alpha$  antikoru ENA-78 salgılanmasını azaltır. Bunun yanında anti-ENA-78 antikoru NL artışını ve serum aminotransferaz düzeylerini azaltır (51).

Diğer kemokin ailesi üyeleri IL-8, platelet faktör-4, sitokinle indüklenen nötrofil kemoçekicisi (CINC), makrofaj inflamatuvar protein (MIP-1 ve 2), monosit kemoçekicisidir (MCP-1, 2, 3) (52).

CINC, sıçanlarda önemli bir kemokindir. Sıcak karaciğer İR hasarından sonra, saatler içinde serum düzeyi yükselmektedir. CINC, NL'ler için güçlü bir kemotaktik ajandır. Sıçanlarda İR ardından Kupffer hücrelerine gadolinium klorür uygulanması serum CINC salgılanmasını önlemektedir (53). MIP-2 ve CINC NL'lerde integrin ekspresyonunu artırır, sonunda mikrovasküler alana NL göçü artar (54).

### **3.2.6 Lipid Mediyatörler**

Çeşitli lipid kökenli inflamatuvar mediyatörler reperfüzyon hasarı patofizyolojisinde rol almaktadır. Platelet Aktivatör Faktör (PAF), İR sırasında endotel hücrelerinden üretilmektedir. PAF, NL'leri süperoksit oluşumu için uyarabilir. Buna ek olarak, PAF,  $\beta_2$  integrin, Mac-1'in güçlü bir aktivatörüdür (55,56). PAF reseptör antagonistlerinin reperfüzyon hasarına karşı koruyucu etkisi olduğu gösterilmiştir (57,58).

Lökotrien B<sub>4</sub> (LTB<sub>4</sub>) insan NL'leri için güçlü bir kemotaktik ajandır. Karaciğer iskemisi ardından NL'ye bağlı hasarlanma sırasında NL'ler tarafından büyük miktarlarda üretilmektedir. Böylelikle de reperfüzyon sırasındaki NL yanıtının artmasına katkıda bulunur (59). Ancak Hughes ve ark. LTB<sub>4</sub> oluşumunun engellenmesinin NL birikimine ve hepatoselüler hasara bir etkisi olmadığını yaptıkları çalışmada göstermişlerdir (60). Takamatsu ve ark.'nın yaptığı çalışmada ise

karaciğer İR ardından karaciğer ve akciğer hasarı incelendiğinde her iki dokuda NL artışı bulunurken, LTB<sub>4</sub> düzeylerinin önemli oranda artmadığı saptanmıştır (61).

### **3.2.7 Hücresel Adezyon Molekülleri ve Nötrofil Lökositler**

Erken reperfüzyon hasarında, NL'ler karaciğer damar yatağında toplanır ve aktive olurlar. Sonuçta reperfüzyon hasarını şiddetlendirirler. Aktive NL'lerden salgılanan oksidanlar ve proteazlar, endotelial ve hepatosellüler hücrelere hasar verir. Ayrıca elastaz, katepsin G, heparanaz, kollajenaz ve diğer çeşitli hidrolitik enzimler, doğrudan hepatositlere sitotoksik etkilidirler. İlk NL oksidan üretim yolu NADPH oksidazdır. NADPH yetersiz farelerde yapılan çalışmada hepatic İR hasarına karşı korundukları gözlenmiştir (63).

Endotelial hücre yüzeyine NL'lerin yapışması hücre adezyon moleküllerinin (CAM) aktivasyonunun bir sonucudur (64). NL toplanması çok aşamalı bir safhadır. Endotelle ilk temas ve yapışma, transendotelial göç ve bunu takip eden parankimal hücre bağlanması ve hasarı şeklindedir. İR ardından intersellüler adezyon molekülleri (ICAM), SEH ve NL yüzeyinde aktive olup ve/veya miktarı artmaktadır. Bu aktivasyon ve/veya miktar artışı lipid mediatörler, sitokinler, kemokinler, nükleer transkripsiyon faktörleri gibi adezyon yolağının gelişmesini sağlayan çeşitli inflamatuvar moleküllerle sağlanır (59). Hücresel adezyon molekülleri, hücre-hücre ve hücre-matrix etkileşiminde bulunan hücre-yüzey glikoproteinleridir. Selektin, integrin ve immunglobulin süper ailesi olmak üzere ayrılırlar.

Selektinler, molekülün hücre dışı kısmında çeşitli kompleman bağlama tekrarları olan lektin-bağlı glikoproteinleridirler. Endotelial hücrelerde (E-selektin), plateletlerde (P-selektin) ve NL'lerde (L-selektin) eksprese edilirler. Selektinler, fizyolojik stres altında NL'lerin SEH'e tutunmasına aracılık ederler (64).

L- Selektin, karaciğer İR'nin erken evresinde NL'lerin ortama çekilmesinde önemli rol oynar. Anti L-selektin ile tedavi edilen farelerde karaciğer enzimleri, NL infiltrasyon düzeyleri, MIP-2 kemokin yanıtı iskemik kontrol gruplarına göre önemli derecede azalmış bulunmuştur (65).

İntegrinler, NL yüzeyinden salgılanır (örn. CD11b/CD18). Damar endotel hücrelerinden salınan immunglobulin benzeri adezyon moleküllerine (örn. ICAM-1)

bağlanır. Bu etkileşmeler İR'den sonra karaciğere NL göçü, yapışma ve birikimi için gereklidir (66,67).

İntersellüler adezyon molekülleri (ICAM)-1,2 ve 3, vasküler hücre adezyon molekülleri (VCAM)-1 ve platelet endotel hücre adezyon molekülleri (PECAM)-1 immunglobulin benzeri ailenin üyeleridir (68). Kemotaktik faktörlerle, NL'lerdeki  $\beta_2$  integrinlerin takip eden aktivasyonu ve endotel hücrelerinde ICAM-1 artışı ile NL'lerin bağlanması kuvvetlenir, endotel yüzeyinden damar dışına çıkarlar ve inflamasyon alanına giderler. ICAM-1'in endotel ve epitelde salınımının artışı TNF  $\alpha$  ve IL-1 gibi sitokinlerle artırılır (66).

### **3.2.8 Kupffer Hücreleri**

Kupffer hücreleri, endotelial hücrelerin lümene bakan yüzünde bulunur. Tipik makrofajlardır. Asıl görevleri yaşlı eritrositleri metabolize etmek ve sindirmektir (22,23). IL-1 $\beta$  gibi proinflamatuvar sitokinler ve TNF $\alpha$ , karaciğer hasarı gelişmesinde erken mediatör olarak Kupffer hücrelerinden üretilir. Ayrıca Kupffer hücre aktivasyonu sadece iskemik lobda değil iskemik olmayan lobda da artar. Bu da parsiyel hepatik cerrahiden sonraki karaciğer fonksiyon bozukluğunu açıklamada önemli olabilir (69–71). Gadolinyum klorid (GdCl<sub>3</sub>) sıçanlarda Kupffer hücrelerinin fagositoz özelliğini inaktive eden maddedir. İzole sıçan karaciğer modelinde GdCl<sub>3</sub> verildiğinde Kupffer hücre aktivasyonunu baskıladığı ve İR'nin neden olduğu hepatik hasarı azalttığı gösterilmiştir (72). Yine GdCl<sub>3</sub>'ün, endotoksemik sıçanlarda lipopolisakkaritin neden olduğu karaciğer hasarını, sistemik toksiteyi ve şiddetli inflamatuvar yanıtı azalttığı gösterilmiştir (73).

### **3.2.9 Mikrodolaşım**

NL'nin mikrovasküler birikmesinde artış, intrasellüler ödem ve intravasküler hemokonsantrasyon gibi birçok mekanizma iskemi sonrası sinuzoidal akım yetersizliğine neden olur (74). NL'lerden ve Kupffer hücrelerinden çeşitli proinflamatuvar mediatörlerin salgılanmasıyla trombosit- endotel hücresi arasındaki etkileşimler iskemi sonrası sinuzoidal akım azalmasına katkıda bulunur. İskemi

süresine bağılı olarak bu hücrelerin etkileşimleri de artar. Trombositlerin yapışmasının artması ile İR'deki sinuzoidal akım yetersizliği ilişkilidir (75). Ayrıca vazokonstrüktör ve vazodilatörlerin üretimindeki dengesizlik de olaya katkıda bulunur. eNOS aracılı NO sentezinin inhibe olması İRH'yi artırırken (76), ekzojen NO (L-NAME üzerinden ) eklenmesi hasarı engellemektedir (77). ET-1 iske mi sonrası reperfüzyonda salınan güçlü bir vazokonstrüktördür. Anti-ET-1 antikor u veya ET reseptör antagonisti ile yapılan ön tedavi reperfüzyon sırasında mikrovasküler kan akımını arttırarak doku hasarının azalmasına ve canlılığın uzamasına katkıda bulunur (78).

### **3.2.10 Kalsiyum**

ROT oluşumunun hücre sel  $Ca^{+2}$  dengesini bozarak da etkili olduğu bilinmektedir. Hücre içi  $Ca^{+2}$ 'un belli bir kısmı ER ve mitokondriumda bulunmaktadır. Hücre içi normal  $Ca^{+2}$  kontrol mekanizmaları, hücre membranında ATP'ye bağımlı  $Ca^{+2}$  translokaz,  $Ca^{+2}$  ATPaz ve Ca/Na de ğişim pompasıdır. Sitozol, ekstrasellüler boşluk ve ER arasındaki  $Ca^{+2}$  gradienti,  $Ca^{+2}$  pompalayan ATPaz' larca dengelenir. Bu sistem dolaylı olarak, de ğişik hormonların etkisiyle  $Ca^{+2}$  katalizörlüğünün gerekli olduğu adenilat siklaz, proteaz ve fosfolipazlar gibi enzimlerin aktivitelerini düzenler.  $Ca^{+2}$  hücre içine hem voltaja bağılı hem de reseptör kontrollü kanalların açılması ile girer ve sitozolde birikir.  $Ca^{+2}$  'un hücre içine girmesi proteazları aktive ederek hücre membranını parçalar. Aktive olan proteazlardan biri hücre yüzeyini balonlaştırarak hücre iskeletinin çökmesine neden olur.  $Ca^{+2}$  ile aktive edilen ve kalpein olarak adlandırılan ikinci sitozolik proteaz ise, ksantin dehidrogenazdan ksantin oksidaz oluşumunu indükler. Ayrıca Fosfolipaz  $A_2$  'nin aktive olması fosfolipidlerden araşidonik asit salınımı ile sonuçlanır. Araşidonik asit kaskatının tetiğinin çekilmesiyle  $LTB_4$ , tromboksan  $A_2, B_2$  gibi potent kemotaktan ve vazokonstriktör maddeler açığa çıkar. Bu maddeler, nötrofillerin endotele adezyonunu arttırarak IR hasarının oluşmasında önemli rol oynar. IR sonrasında artan hücre içi  $Ca^{+2}$  ayrıca, karaciğerde kupffer hücrelerini aktive ederek, bu hücrelerden  $TNF\alpha$ , IL 1, IL6 salınımını da arttırır. Bunun sonucu, adezyon moleküllerinin endoteldeki ekspresyonları, mikrovasküler yatakta nötrofil ve trombosit agregasyonu da artar (79).

### 3.2.11 Hücre Ölümü

Apopitoz (Ap) organizmanın ihtiyaç duymadığı, biyolojik görevini tamamlamış veya hasarlanmış hücrelerin, zararsız bir biçimde ortadan kaldırılmasını sağlayan ve genetik olarak kontrol edilen programlı hücre ölümüdür. Hücre içinden veya dışından gelen ölüm sinyalleri ile başlar (80). Ap, nekrozdan tamamen farklıdır. Nekrozda hücre membran bütünlüğü belirgin biçimde bozulur. Hücre şişmesi ve lizis olur. Sıklıkla nekroz bir grup hücre veya dokuda bir bölgeyi tutarken, Ap tek hücre düzeyinde gerçekleşir. Ap sırasında hücre aktif olarak hücre ölüm sürecine girer. Bu genetik bir programdır ve DNA parçalanması ile sağlanır (81). Oksidatif stres, hücre içi redoks dengesi bozulduğunda ortaya çıkar. Oksidatif stres altında mitokondriyal işlev bozulması, enerji kaynağının çökmesi nedeniyle Ap'a neden olabilir. Hasarlanma, biyolojik savunma düzenekleri yetersiz kaldığında gerçekleşir (28). Apopitoz üç dönemde incelenir.

1. Başlangıç evresi: Çeşitli proteazları içeren, moleküler mekanizmaların düzenlendiği dönem.
2. Etki Evresi: Çekirdekte apopitotik değişimlerin olduğu dönem.

Sonlanma Evresi: Apopitotik cisimlerin oluştuğu, DNA parçalanmasının olduğu, morfolojik değişikliklerin arttığı dönem.

Karaciğer İRH'de her iki hücre ölüm formu bir arada bulunur. Ancak hasarlanmada Ap merkezi rol oynar (82). İR'de yüksek yoğunlukta oksijen radikalleri, lipid peroksidasyonunu tetikler bu da membran fonksiyon bozukluğuna ve hücre ölümüne yol açar (83). Yüksek reaktif radikallerin TNF $\alpha$  ile birleşimi iskemi sonrası apopitotik hücre ölümünün başlaması için kritik rol oynar (84). Evre 1 ve 2 erken fazda Ap mekanizmalarının erken engellenmesi, hayvan modellerinde reperfüzyon sonrası parankimal hasarı azaltır (82). Yapılan çalışmalarda karaciğer İR'de apopitotik hücre ölümünün kanıtları bulunmuştur. Bu çalışmaların sonuçlarına göre, reperfüzyon sırasında SEH'lerin %50-70'i, hepatositlerin de %40-60'ı apopitoza uğrar. İnsan karaciğer allograftlarında da yüksek oranda apopitotik hepatositlere rastlanmıştır (85–87). Ancak tüm bu çalışmalarda apopitozu belirlemek için kullanılmış olan terminal deoksinükleotidil transferaz aracılı dUTP labeling (TUNEL) güvenilirliği kısıtlıdır. TUNEL incelemesi, DNA dizisinde kırığı olan tüm hücreleri,

hücre hasarı tipinin nekroz (DNA çözülmesi daha rastgeledir) veya apopitoz (DNA dizi kırılması çok bol miktardadır) olmasını ayırt etmeden boyamaktadır (88). Gujral ve ark'ın karaciğer İR hasarında eğer Ap birincil hücre ölüm mekanizması ise, kaspazların inhibisyonu hasarı önlemede oldukça efektif olacağı düşüncesi ile yaptıkları çalışmada, bu girişimin ancak %50 etkili olduğunu bulmuşlardır (89).

### **3.2.12 Histolojik ve Biyokimyasal Değişiklikler**

Kan akımının azaldığı durumlarda ilk olarak, hepatik lobullerin perisentral bölgesinde hipoksik hasar meydana gelmektedir. Yeterli şiddete ulaştığında perisentral karaciğer hipoksisi, iskemik hepatite neden olmaktadır. Serum ALT(Alanin aminotransferaz), AST (Aspartat aminotransferaz) yüksekliği bu duruma eşlik eder (3).

Işık mikroskopik inceleme yapıldığında santral NL infiltrasyonu, bölgesel hemoraji ve nekroz, konjesyon, sinuzoid ve lenfatik genişleme, bölgesel hepatoselüler vakuolizasyon, hepatosit şişmesi (90,91) , ultrastrüktürel inceleme yapıldığında ise mitokondriyal yapıda bozulma, şişme, boyanma farklılıkları, NL birikimi gözlenir (92,93). Karaciğer dokusu homojenatında yapılan biyokimyasal çalışmalarda ise; myeloperoksidaz (MPO) aktivitesi (NL infiltrasyonunun dolaylı göstergesi), TBARS (thiobarbituric acid reactive substances, lipid peroksidasyon ürünleri), protein karbonil (PO) düzeyi (proteinlerin oksidatif hasarının spesifik göstergesi) artmış, glutatyon (GSH) düzeyi (anahtar antioksidan) azalmış olarak bulunur (94,95).

### **3.3 Melatonin**

1958'de Aaron B Lerner tarafından tanımlanan MEL, pineal bezden salgılanan, uyku, üreme, sirkadiyen ritim ve immünite gibi pek çok biyolojik fonksiyonun düzenlenmesinde rol oynayan bir hormondur. Ayrıca, in vivo ve in vitro çalışmalarla antiproliferatif ve antioksidan etkilere de sahip olduğu gösterilen MEL'in, kanser ve yaşlanmanın önlenmesinde de etkili olabileceği öne sürülmektedir. Sentezini takiben, pineal bezden doğrudan dolaşıma verilen MEL, lipofilik özelliğine rağmen, membran

reseptörleri aracılığıyla hedef hücrelerine ulaşır. Lipofilik özelliği nedeniyle, hücrenin tüm bölümlerine kolaylıkla girebilen MEL için sitozolik ve nükleer bağlanma yerleri de tanımlanmıştır (96). MEL hem suda ve hem de lipid fazda çözünebildiğinden, organizmada çok geniş alanda antioksidan etki gösterebilmektedir. Kolaylıkla kan-beyin bariyerini ve plasentayı geçebilen MEL için, bilinen hiçbir bariyerin olmaması, MEL'in tüm intrasellüler komponentlere rahatlıkla ulaşabilmesini sağlamaktadır. Böylece MEL, hücre zarını, organelleri ve çekirdeği etkin bir şekilde serbest radikal hasarından koruyabilmektedir. Hücre membranı ile temas ettiğinde, fosfolipid tabakanın dış yüzeyine tutunan MEL, radikallerle membrandan önce temasa geçerek onları detoksifiye eder ve membranı korur. MEL varlığında, mitokondriyal solunum zincirinden kaynaklanan radikallerin üretimi de azalmaktadır. Çekirdeğe kadar ulaşabilme özelliği, DNA'nın oksidatif hasara karşı korunmasında, MEL'e bir üstünlük sağlamaktadır (14,15). MEL'in bir antioksidan olduğu, literatürde ilk kez 1991 yılında öne sürülmüş ve daha sonra yapılan in vitro (16,97) ve in vivo (98,99) çalışmalarla desteklenmiştir.

MEL'in antioksidan özelliği, yapısında bulunan pirol halkasından kaynaklanmaktadır. Fizyolojik şartlarda pek çok indol MEL'e benzer şekilde yıkılsa da,  $O_2^-$  varlığında, MEL'in pirol halkasının indolamin 2,3-dioksijenaz (IDO) ile enzimatik ya da hemin ile nonenzimatik olarak yıkımı, yüksek reaktiviteye sahip, N1-asetil-N2-formil-5-metoksikinüramin (AFMK) oluşumuyla sonuçlanmaktadır. MEL'in  $H_2O_2$  varlığında da AFMK oluşturduğu ve bu metabolitin radikal tutucu aktivite gösterdiği belirlenmiştir. Ayrıca  $OH^{\cdot}$  radikalini bağlayan MEL'in, indolil katyon radikalini oluşturması ve bu radikalini  $O_2^{\cdot-}$ 'i yakalayarak AFMK'e dönüştürür. Diğer taraftan indolil radikal,  $HO^{\cdot}$  varlığında siklik 3-hidroksimelatonin oluşturmakta ve bu metabolitin idrar düzeyleri, radikal üretiminin bir göstergesi olarak kullanılmaktadır (100). 5-OH-triptofan, 5-OH-triptamin ve serotonin ile kıyaslandığında, MEL'in, NO. oluşumunu azaltan en güçlü indol olduğu saptanmıştır(15).

Farmakolojik ve muhtemelen fizyolojik düzeylerdeki MEL'in, SOD, GSH-Px, GSSG-Rd, glukoz-6-fosfat dehidrogenaz (G6PD) ve g-glutamilsistein sentetaz gibi bazı antioksidan enzimlerin gen ekspresyonlarını ya da aktivitelerini artırdığı ve bu yolla oksidatif stresi baskıladığı bildirilmektedir (15,101).



MEL'in bazı prooksidan enzimleri inhibe ederek, serbest radikal oluşumunu azalttığı ve bu yolla da antioksidan sistemi desteklediği öne sürülmektedir (15,101). MEL'in antioksidan etkileri genel olarak incelendiğinde, adezyon moleküllerinin ve proinflamatuvar sitokinlerin sentezini azaltmasını da içeren oldukça geniş spektruma sahip bir antioksidan olduğu görülebilir (102).

### **3.4 Karnozin**

KAR,  $\beta$ -alanin ve L-Histidinin birleşmesi ile meydana gelen, 1900'lerde keşfedilmiş ilk nöropeptiddir. Kas ve sinir dokuda geniş dağılım gösterir (7). KAR'ın antioksidan etkisi 1984'de ilk kez gösterilmiştir. KAR, suda erime özelliğine bağlı olarak, suda çözünen oksidasyon mediatörlerinin (metaller ve oksijen radikalleri) yüksek olduğu sitozolde fonksiyon görür. Aktif oksijen radikallerini temizleyen biyolojik fonksiyonuna bağlı olarak antioksidan özelliğe sahiptir. Hidroksil ve süperoksit radikallerinin ve çok kuvvetli olarak da singlet oksijen molekülünün temizleyicisidir. Bu özelliği nedeniyle beyin, böbrek ve iskelet kası iskemi reperfüzyon hasarında KAR'ın koruyucu etkisi bulunmuştur (6–11).

Dokulardaki KAR metabolik kontrol altındadır. Karnozinaz enzimi ile peptid bağı hidrolize edilir. Karnozinaz esas olarak böbrek, karaciğer ve kanda bulunur. Serbest  $\beta$ -amino grubundan asetillenir veya dekarboksillenerek karsinin üretir. KAR ayrıca 1-N-imidazol halkasından metillenerek anserin oluşturur veya 3N pozisyonunda metillenerek ophidini oluşturur.

Fizyolojik pH'da, KAR'ın belirgin tamponlama aktivitesi vardır. Kaslarda KAR tüm pH tampon kapasitesinin %60'ı kadarını yapabilir. Zayıf alkali pH'da KAR lipid peroksidasyonunu kolayca baskılayabilir. KAR değişken değerlikli metal iyonlarını bağlayabilir. Bakır, çinko, demir iyonlarına bağlı reaksiyonları durdurur. Ayrıca KAR birçok enzimi ağır metal hasarından korur. KAR demir iyonları ile şelasyon yaparak lipid peroksidasyonunu inhibe eder.

Kimyasal çalışmalara göre KAR'ın oksijen bağlama sabiti değerlendirildiğinde, oksijeni bağlamada (etkisizleştirmede) sorumlu yapı imidazol halkasıdır. KARin belki de en önemli görevi anti-glikasyon etkisidir. Serbest radikal hasarından bağımsız olarak yaşlanmanın ana süreçlerinden birisi glikasyondur. İleri glikasyon ürünleri olan

AGE'ler (Advanced Glycosylation Endproducts-İleri Glikasyon Son ürünleri) organizmaya geniş çapta zarar verirler. KAR bu etkiyi bloke eder. Sonuç olarak KAR, aldehit ve ketonları inaktive eder ve protein glikasyonu ve AGE oluşumunu azaltır. Ayrıca var olan AGE'lere bağlanıp onları inaktive eder. Ayrıca KAR, interlökin-1 $\beta$  yapımını artırır, apoptozisi baskılar, B ve T lenfositleri aktive eder. Kan hücrelerinin membranları üzerine koruyucu etkiye sahiptir. İnflamasyonu azaltır, yara tedavi edici özelliği vardır. KAR'ın myeloperoksidaz aktiviteleri spektrofotometrik olarak ölçüldüğünde belirgin inhibitör etkinlikleri olduğu bulunmuştur.

KAR'ın beyin ve kalpte belirgin antiiskemik etkileri, antioksidan ve membran koruyucu etkileri, proton tamponlayıcı kapasitesi, ağır metaller ile kompleksler oluşturma ve makrofaj fonksiyon düzenlenmesi etkilerinin kombinasyonudur. Deneysel beyin iskemisinde KAR mortaliteyi azaltır ve hayvanların nörolojik fonksiyonlarına yararlı etki gösterir. KAR sadece radikal temizleyici değil aynı zamanda ROS üreten enzim sistemlerinin aktivitelerinin düzenleyicisidir (6,7)

#### **4. GEREÇ VE YÖNTEM**

Çalışmamızda Dokuz Eylül Üniversitesi Tıp Fakültesi Deney Hayvanları Laboratuvarından elde edilen 200–250 g Wistar Albino dişi sıçanlar kullanıldı. Deneklerin çalışma süresince barındırılması ve bakımları bu birim tarafından yapıldı. Denekler çalışma öncesinde 12 saat aydınlık, 12 saat karanlık, 20–22 °C oda sıcaklığında barındırıldı. Hayvanlar dinlendirilmiş musluk suyu ve standart pellet yem ile beslendi.

Sham grubunda 4, diğer gruplarda 8 sıçan olacak şekilde 5 çalışma grubu oluşturuldu.

1. Sham: Hepatik pedikül serbestleştirildikten sonra herhangi bir işlem yapılmayan grup.
2. İskemi/reperfüzyon (İR) : Hepatik pedikül serbestleştirildikten sonra klemp, total hepatik iskemi amacıyla hepatik arter, portal ven ve safra duktusuna konularak 1 saat uygulandı. İskeminin ardından klemp açılarak 4 saat reperfüzyon yapıldı.
3. İR + MEL: İR uygulanıp MEL verilen grup.
4. İR + KAR: İR uygulanıp KAR verilen grup.
5. İR + MEL+KAR: İR uygulanıp MEL ve KAR'ın birlikte verildiği grup.

Deneysel İR modelinde kullanılacak deney hayvanları deneyin bir gece öncesinden aç bırakıldı. Anestezileri intraperitoneal (i.p.) 40mg/kg pentobarbital ile yapıldı (4,8,11,13). Deneklere, sırt üstü pozisyon verildikten sonra steril şartlar altında median laparotomi uygulandı. Tüm gruplarda önce hepatik arter, portal ven ve safra duktusu görünür hale getirildi. Daha sonra başka bir işlem yapılmadan batını kapatılan denekler “sham” olarak kabul edildi (2). Hepatik pedikül serbestleştirildikten sonra total hepatik iskemi amacıyla hepatik arter, portal ven ve safra duktusuna atravmatik vasküler klemp konularak (2,4,27) 1 saat uygulandı. (Resim 1) Bir saatlik iskemiye takiben klemp açılarak 4 saat süreyle reperfüze edildi. Klemp uygulanmasından 30 dakika önce ve reperfüzyondan hemen önce MEL (Sigma-Aldrich /USA) 10mg/kg, KAR (Fluka-BioChemika/USA)250 mg/kg i.p. olarak verildi. Açık olan periton yüzeyinden sıvı kayıplarının önlenmesi için batın 4.0 ipek ile sütüre edildi. Sütüre edilmeden önce ılık %0,9 NaCl 1 ml batın içine verildi. Reperfüzyon sonlandırılmadan önce anestezisi devam ederken, vena cava caudalisten

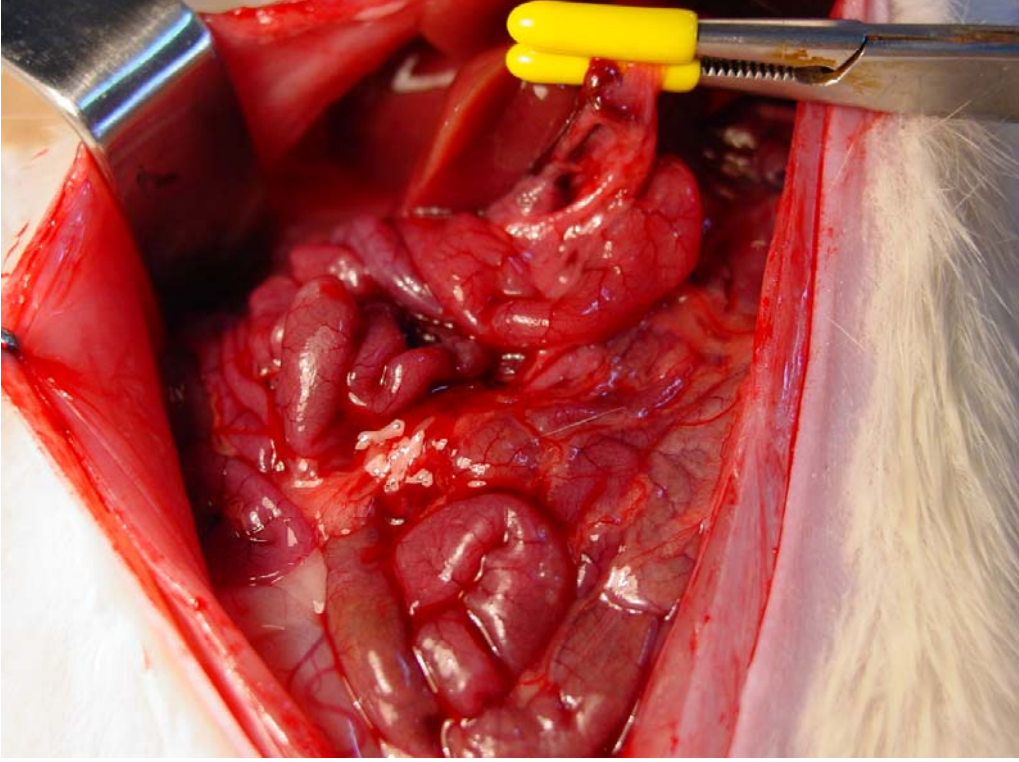
2 ml kan örneği karaciğer enzimlerini ölçmek üzere düz biyokimya tüplerine alındı. Karaciğer dokusundan 1cm<sup>3</sup> kadar alınan biyopsi örnekleri biyokimyasal doku enzimleri (TBARS, Glutasyon redüktaz, Myeloperoksidaz ) incelenmesi için soğuk serum fizyolojik ile yıkandıktan sonra kurutulup alüminyum folyo ile paketlenip buz içerisine konuldu. 1cm<sup>3</sup> kadar alınan biyopsi örnekleri küçültülerek elektron mikroskopik inceleme için glutraldehit içine alındı. Daha sonra deneklere % 10 tamponlu formalin perfüzyonu yapıldı. Perfüzyon sonrasında karaciğer doku örneği %10'luk tamponlu formaldehid içinde fikse edildi. Perfüzyon nedeniyle deneklerin yaşamı sonlandı. Çalışma sonunda ortaya çıkan atıklar Dokuz Eylül Üniversitesi Tıp Fakültesi Deney Hayvanları biriminin kurallarına göre yok edildi.

Tüm kan örnekleri santrifüj edildikten sonra plazmadan ayrıştırıldı. Elde edilen serum örneklerinde ALT ve AST düzeyleri, Dokuz Eylül Üniversitesi Tıp Fakültesi Merkez Laboratuvarı Biyokimya rutin laboratuvarında otoanalizörde ölçüldü. Histolojik inceleme için deneklerden elde edilen karaciğer dokuları, parafine gömüldü. Daha sonra hazırlanan parafin bloklardan 5µ kalınlığında kesitler normal lamlara ve immunohistokimyasal boyama için lizinli lamlara alındı. Bu kesitler, Hemotoksilen-Eozin (HE) , Toluidin blue ve apostain ile boyandı. Hazırlanan preparatlar ışık mikroskopunda (Olympus BH-2) incelenerek gruplar karşılaştırıldı. İstatistiksel yöntem olarak veriler SPSS 11.0 analiz programı kullanılarak Mann Whitney U ve Kruskall Wallis Varyans analizi ile değerlendirildi.

#### **4.1 Elektron Mikroskopik Doku Takip Protokolü**

Dokular % 2,5'lik glutraldehide alındı. Sorenson tampon fosfat buffer ile 3-4 kez değiştirilerek 15-20 dakika yıkandı. Bir birim PBS, bir birim osmium tetraoksit solüsyonu karışımında 1 saat bekletildi. Tüpler alimunyum folyo ile kapatıldı. PBS ile 15-20 dakika yıkandı. Bu aşamada bir gece bekletildi. Ardından dehidratasyon işlemi yapıldı. %70 alkol 10 dakika, %100 alkol 10 dakika, %100 alkol 10 dakika, propilen oksit 15 dakika, propilen oksit 15 dakika. Dokular 1:1 oranında propilen oksit + araldit karışımına alındı. Oda sıcaklığında 1 saat bekletildi. Arada hafif hareketlerle karıştırıldı. Daha sonra dokular saf araldit içine alındı. 6-12 saat oda ısısında bekletildi. Yeni araldit içine alınan dokular 2 saat bekletildi. Dokular araldit ile kapsüllere gömüldü. Polimerizasyon için 60°C'lik etüvde 24 saat bekletildi.

Örneklerden yarı ince kesitler ultratom (Leica Ultracut R) ile 1 µ kalınlığında alındı, kesitler Toluidin blue ile boyandı.



Resim 1: Deney sırasında iskemi oluşturmak için uygulanan Pringle Manevrası

#### **4.2 Işık Mikroskopik Doku Takip Protokolü**

%10'luk formaldehit ile tespit edilen karaciğer dokuları, fiksatiflerin uzaklaştırılmaları amacıyla 1 gece akarsu altında yıkandıktan sonra, dehidratasyon amacıyla 15'er dakika %60'dan %95'e artan etil alkol serilerinden geçirildi. Ardından 15 dakika 1:1 oranında ksilen-alkol karışımına ve şeffaflaştırma amacıyla 15'er dakika iki değişim ksilende tutuldu. 60°C'lik etüv içerisinde 15 dakika 1:1 oranında ksilen-parafin uygulanıp 30'ar dakika parafin ile immersiyonu sağlandıktan sonra dokular parafin bloklar içerisine gömüldü.

### **4.3 Hematoksilen-Eozin Boyama Protokolü**

Mikrotom (Reichert-Jung) aracılığı ile alınan 5µ'luk parafin kesitler deparafinizasyon işlemi için 1 gece 60°C'lik etüvde bırakıldıktan sonra, 30'ar dakika iki değişim ksilene tabi tutuldu. Ardından rehidratasyon işlemi için %95'den %60'a azalan alkol serilerinden geçirilen kesitler 5 dakika akarsu altında yıkandı. 2 dakika hematoksilen (33230, Riedel-de Haen, Almanya) ile boyamanın ardından, boyanın fazlasının dokudan uzaklaştırılması için 5 dakika akarsuda yıkanan kesitler, 30 saniye eozin (1345, Merck, Darmstadt, Almanya) boyası ile boyandı. Aynı şekilde 5 dakika akarsu altında yıkama yapıldıktan sonra sırasıyla %80 ve %95'lik alkol serilerinden geçirilip havada kurutulan kesitler şeffaflaştırma amacıyla 30'ar dakika iki değişim ksilende tutulduktan sonra entellan (UN 1866, Merck, Darmstadt, Almanya) ile kapatıldı.

### **4.4 Apostain Boyama Protokolü**

Lizinli lama 5 µ kalınlığında alınan karaciğer doku kesitleri deparafinizasyon için ksilen, %100,%95,%70 etanolden geçirildikten sonra PBS'e alındı. 20 dakika saponin (0,2 mg/ml PBS içinde) içerisinde oda ısısında bekletilerek permeabilizasyonu sağlandı. Proteinaz K ( 20 µL/ml PBS içerisinde) oda ısısında 20 dakika uygulandı. Kesitler distile su ile 3 kez yıkandı. 1:1 oranında distile su ile hazırlanan formamid 56–60°C'de ısıtıldıktan sonra içerisine kesitler kondu. 20 dakika su banyosunda ardından 5 dakika soğuk PBS'de bekletildi. %3'lük hidrojen peroksit 5 dakika uygulandı. %3 Non-fat dry milkte ( Carnation) 20 dakika bekletildi. PBS ile yıkandıktan sonra 100 µL monoklonal antikor F7–26= Apostain (Chemicon- ABD& Kanada) konularak oda ısısında 1 saat bekletildi. 1/100 dilüsyonunda peroksidaz-conjugated anti-mouse IgM 30 dakika uygulandı. PBS ile yıkama yapıldı. DAB kromojen ile boyandı. Distile su ile yıkama yapıldıktan sonra hematoksilen ile artalan boyaması yapıldı ve entellan ile lamlar kapatıldı.

#### **4.5 Karaciğer Dokusunda Glutasyon Redüktaz Düzeyi Ölçme Protokolü**

Karaciğer doku örnekleri soğuk izotonik ile yıkandıktan sonra kurulandı. 100 mg karaciğer dokusu %1'lik pikrik asit ile homojenize edildi. Doku homojenatlarına glutasyon redüktaz (GR) ölçümü için şu basamaklar uygulandı.

Gerekli reaktifler

- 1- Fosfat-EDTA solusyonu (fosfat 0,125 mol/L; EDTA, 6,3 mmol/L)
- 2- NADPH tampon solusyonu (fosfat, 0,125mol/L; EDTA, 6,3 mmol/L; NADPH, 0,3 mmol/L)
- 3- DTNB solusyonu: (fosfat, 0,125mol/L; EDTA, 6,3 mmol/L; DTNB, 6 mmol/L)
- 4- Glutasyon redüktaz solusyonu (GR, 200kU/L)
- 5- Glutasyon standart solusyonu (GSH, 20 mmol/L GSH; 1 mmol/L; GSH, 0,1mmol/L)

Ölçüm prosedürü

R2	0,7mL
R3	0,1 mL
Örnek (standart ya da kalibratör) + distile su	0,2 mL
İyice karıştırılır ve 30°C'de 4 bekleddikten sonra	
R4	5 µL

412nm'de  $\Delta$  absorbans hesaplandı, kalibrasyon eğrisine göre nmol/mL cinsinden glutasyon değeri bulundu. Daha sonra

$n_c$  = dilüsyon öncesi konulan glutasyonun mol cinsinden konsantrasyonu

$v$  = dilüsyon öncesi konulan örnek miktarı

$n_c/m_s = n_c \times 5,8 / V$  formülünden glutasyonun gram dokudaki  $\mu$ mol cinsinden konsantrasyonu hesaplandı (103).

#### **4.6 Karaciğer Dokusunda MPO Doku Düzeyi Ölçme Protokolü**

200-400mg'lık doku örnekleri %0,5 hexadecyltrimethylammoniumbromide (HETAB) içeren 0,05M potasyum fosfat (pH6,0) ile homojenize edildi. Homojenatlar 10 saniye buz üzerinde sonikate edildi. Sonikasyonu takiben homojenatlar

donduruldu. +4°C'de 12500 g'de 30 dakika santrifüj edildi. MPO ölçümü için süpernatantlar kullanıldı. MPO aktivitesi o-dianisidinin H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> bağımlı oksidasyonu ölçülerek (Cary 50 UV/ visible spektrofotometre/ Tokyo, Japonya) tayin edildi. Sonuçlar U/g olarak ifade edildi (104).

#### ***4.7 Karaciğer Dokusunda TBARS Doku Ölçme Protokolü***

Dokuların homojenizasyonu için KCl'nin %1,15(w/v)'lik solüsyonları kullanıldı. Homojenat daha sonra %20(w/v) asetik asit, %8,1 sodyum dodesil sülfat (SDS), %0,8 (w/v) tiobarbitürik asit ile karıştırıldı. 95°C'de 60 dakika inkübe edildi. Soğumasından sonra, süpernatant n-butanol ile ekstrakte edildi. Spektrofotometre (Cary 50 UV/ visible spektrofotometre/ Tokyo, Japonya) kullanılarak 532 nm'de absorban ölçüldü. Sonuçlar nmol/g doku ağırlığı cinsinden ifade edildi (105).



## **5. BULGULAR**

### ***5.1 Işık Mikroskopik Bulgular***

Karaciğer dokusunun histopatolojik olarak incelenmesiyle deney grupları arasında farklı mikroskopik görünümeler ortaya çıktı.

Sham grubunda, hepatositler ve portal alanların yapıları normal görünümde izlendi. Hepatositler, vena sentralis çevresinde ışınsal tarzda yerleşmiş hücre kordonları şeklinde bulunuyordu. Aralarında bulunan sinuzoidler normal genişlikte ve yapıda gözlemlendi. Herhangi bir hücre infiltrasyonu gözlemlenmedi.(Resim 2-4)

İR grubunda, hepatosit hücre kordonlarının bütünlüğü bozulmuş, karaciğer parankimi içinde rastgele dağılmış, multipl ve yaygın hepatosit nekroz alanları izlendi.(Resim 5-6) Parankimal alanlarda nötrofil infiltrasyonu, sinuzoidlerde genişleme ve konjesyon izlendi. (Resim 7–10) İskemik nekroza özgü soluk boyanan, mumyalaşmış hepatositler gözlemlendi.(Resim 8)

İR+KAR grubunda karaciğer parankiminde izole nekrotik hepatositler dışında hepatosit hasarına rastlanmadı. Sinuzoid genişlemesi İR grubuna göre oldukça azalmış olarak gözlemlendi. (Resim 13-15)

İR+MEL grubunda parankim bütünlüğünün korunduğu, İR grubundan daha az olmak üzere bu grupta da sinuzoid genişlemesi ve hücre infiltrasyonu, ender olarak da nekrotik hepatositler gözlemlendi. (Resim 18-20)

İR+MEL+KAR grubu karaciğer dokusu, pek çok alanda sham grubuyla benzerlik göstermekteydi. Hepatosit kordonları oldukça düzgün seyirli, sinuzoidler normal çapta, konjesyon ve nötrofil infiltrasyonu izlenmedi.(Resim 22–24)

Elektron mikroskopik takip yapılmış dokulardan alınmış yarı ince kesitlerdeki bulgular aşağıdaki gibidir.

Sham grubunda hepatositler ve sinuzoidler normal yapı ve görünümde izlendi. (Resim 5)

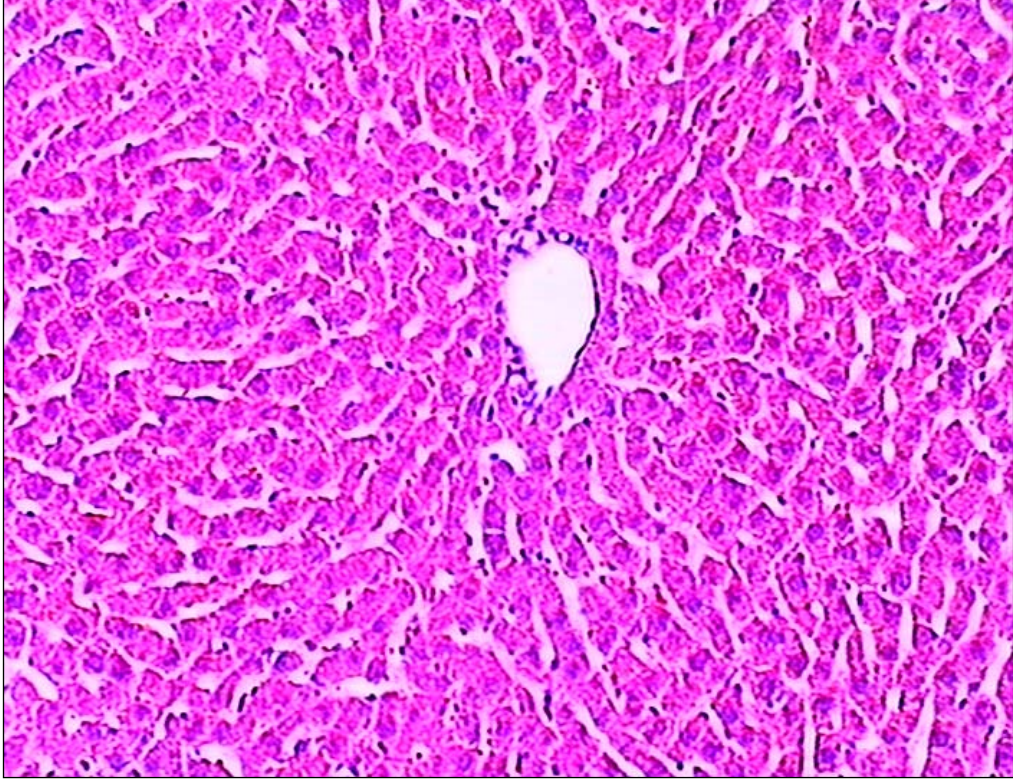
İR grubunda her bölgede açık koyulu hepatositler gözlemlendi. Hepatositler belirgin olarak şişmiş, sinuzoidler oldukça dilate görünümdeydi. Vena sentralisin periferinde infiltrasyon izlendi. (Resim 11,12)

İR+ KAR grubunda hepatositlerde boyanma farklılığı gözlemlenmedi. Ancak yer yer lipid artışı izlendi. Sinuzoidler normal yapıda görüldü. (Resim 16,17)

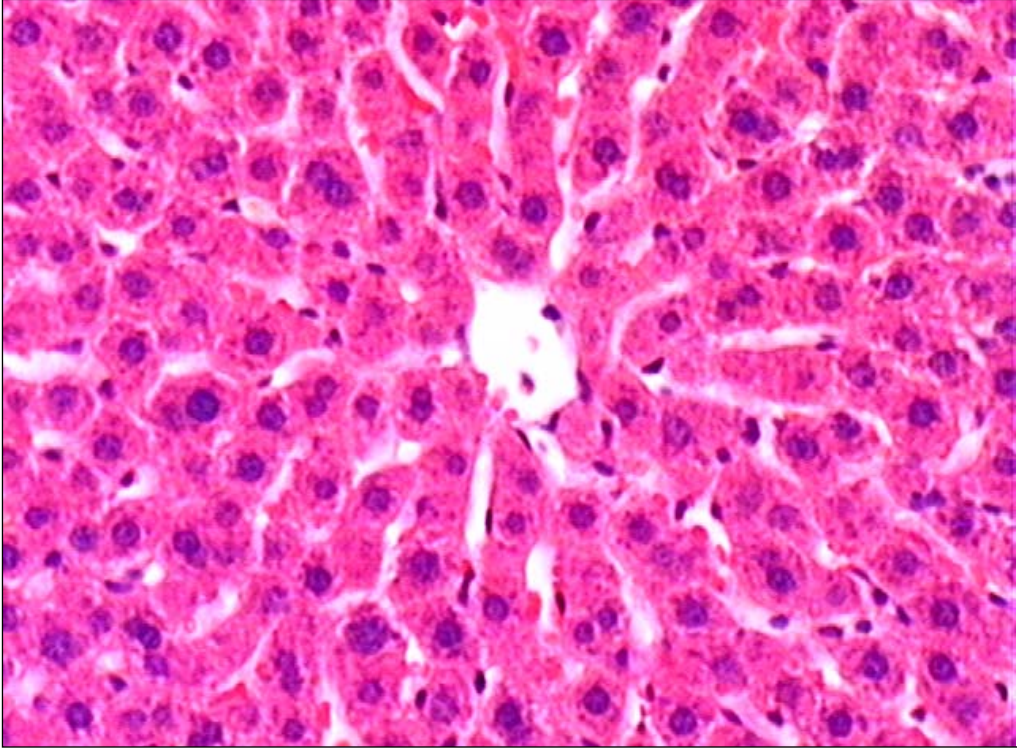
İR+MEL grubunda açıklı koyulu hepatositler az sayıda gözlendi. Ancak hücrelerde şişmeye rastlanmadı. Yer yer lipid artışı bu grupta da gözlendi. (Resim 21)

İR+MEL+KAR grubunda az sayıda açıklı koyulu hücreler vena sentralisin periferinde görüldü. Sinuzoidler normal yapıda ve infiltrasyon gözlenmedi. Lipid normal miktarda gözlendi. (Resim 25)

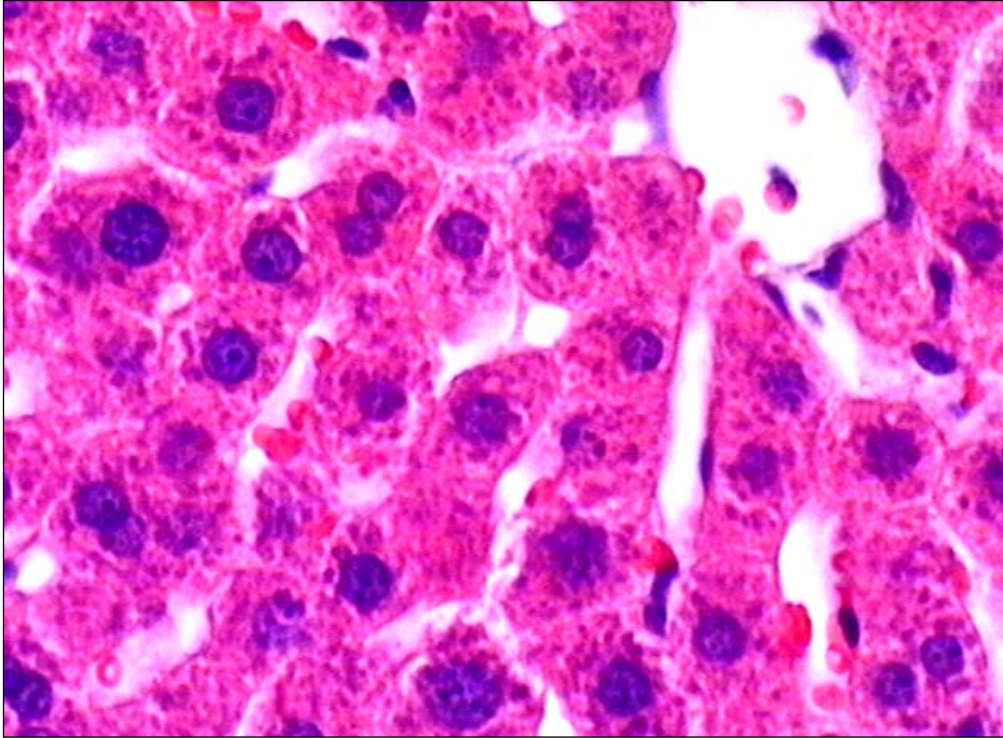
Histopatolojik bulgular bakımından gruplar arası farklar, biyokimyasal parametreler ile uyumlu bulundu.



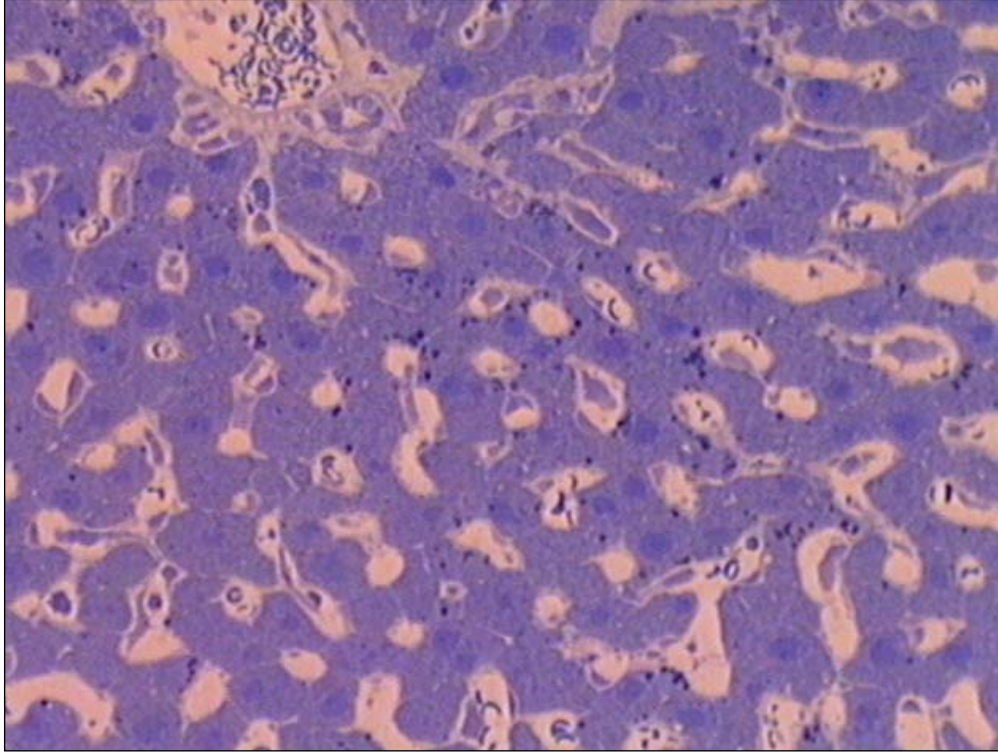
Resim2: Sham grubu karaciğer genel görünüm HEx330



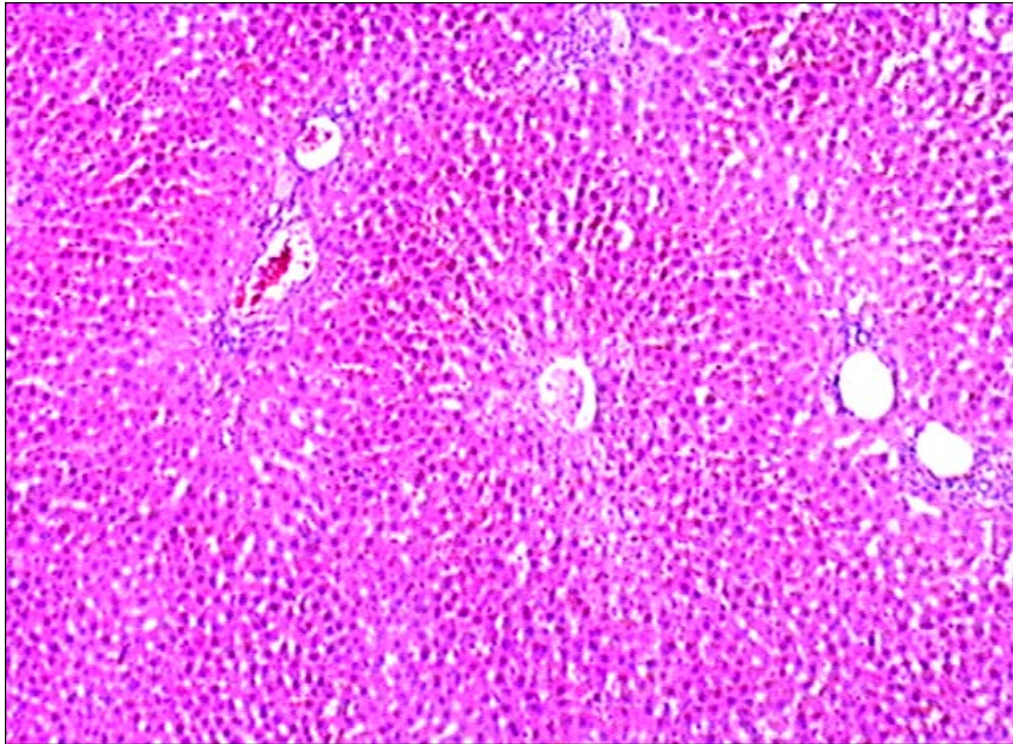
Resim 3: Sham grubu karaciğer genel görünüm HEx660



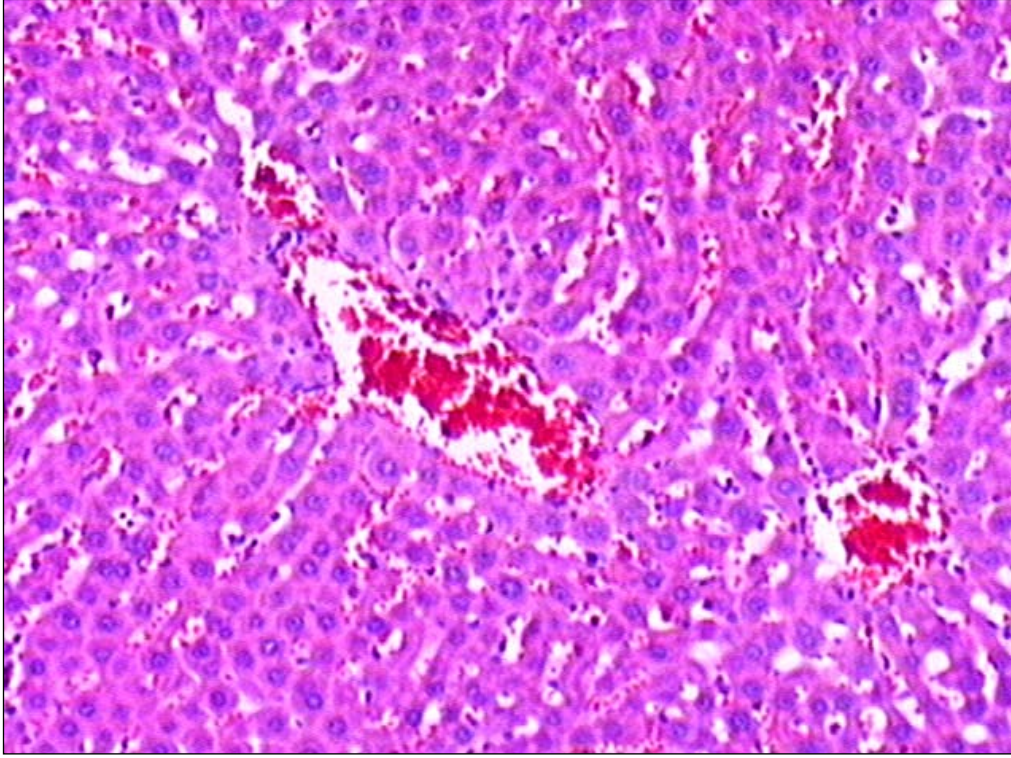
Resim 4: Sham grubu karaciğer genel görünüm HEX1320



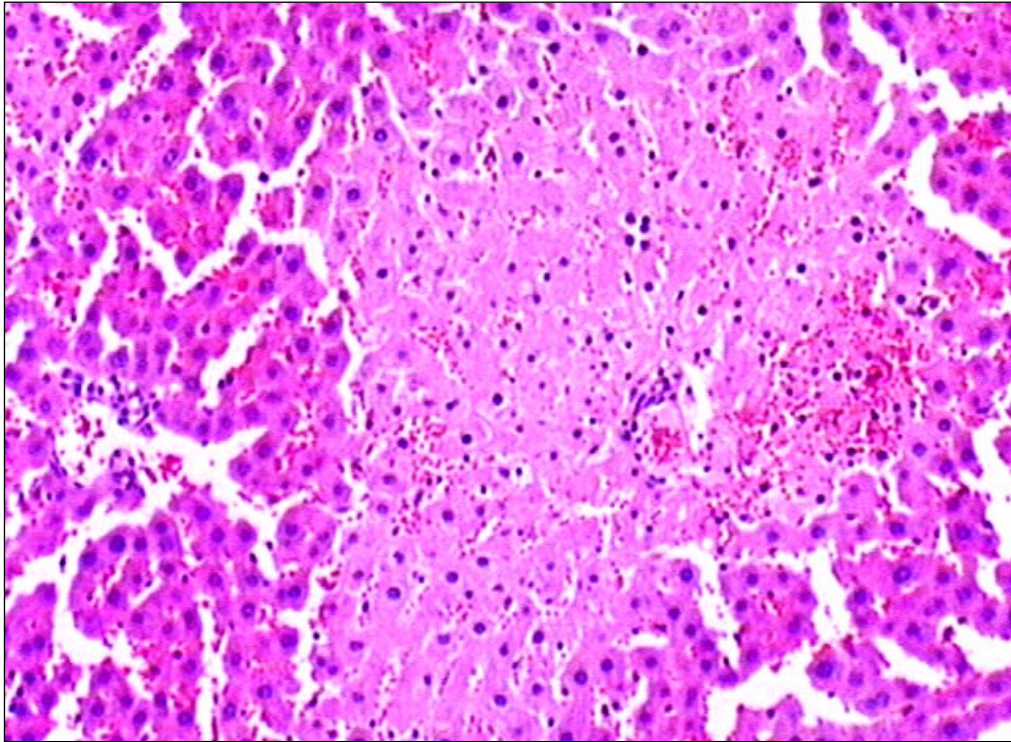
Resim 5: Sham grubu karaciğer genel görünüm Toluidin BlueX 660



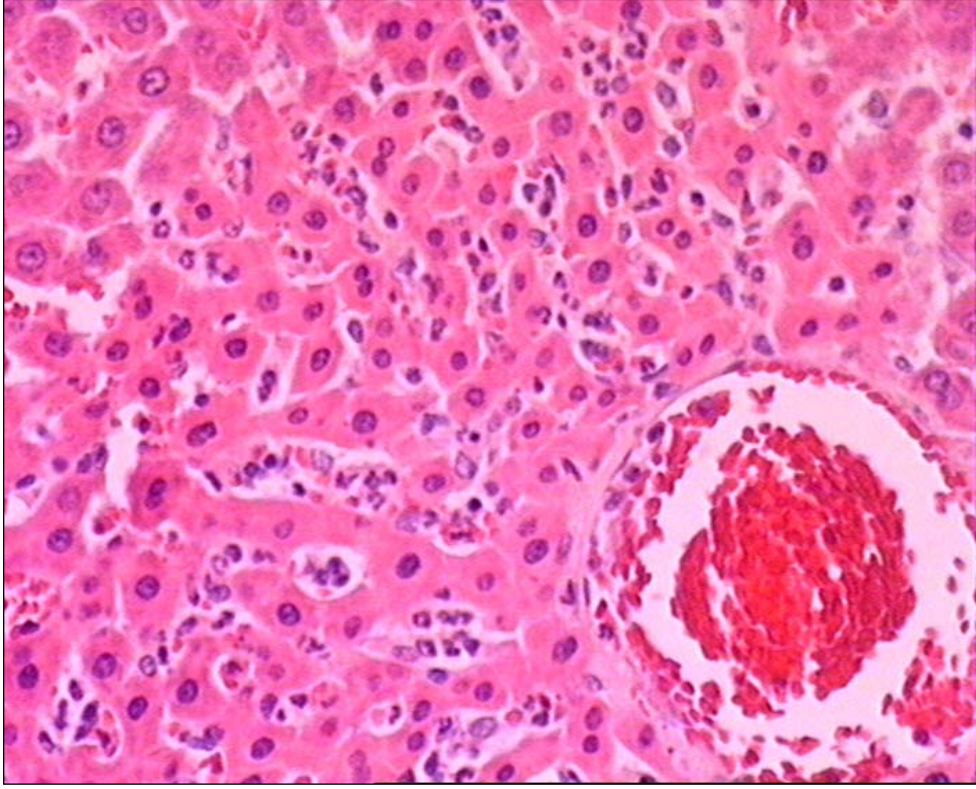
Resim 6: İR grubu karaciğer genel görünümü HE X 132



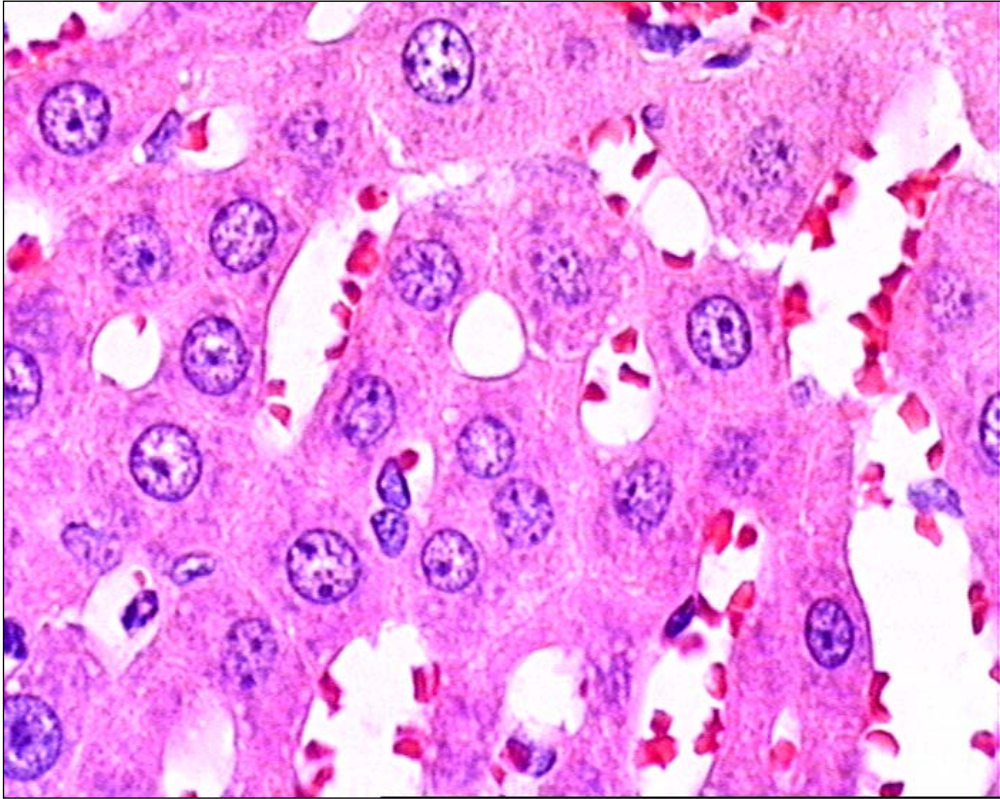
Resim 7: İR grubu nötrofil infiltrasyonu ve konjesyon HEX 330



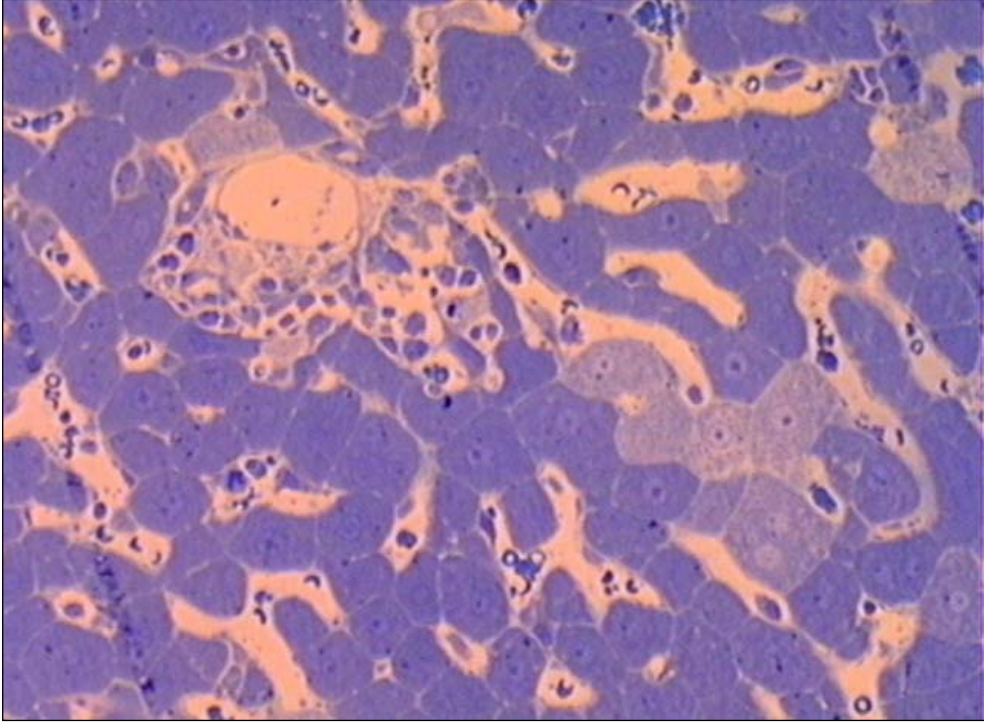
Resim 8: İR grubu nekrotik alan, sinuzoidal genişleme ve konjesyon HEX330



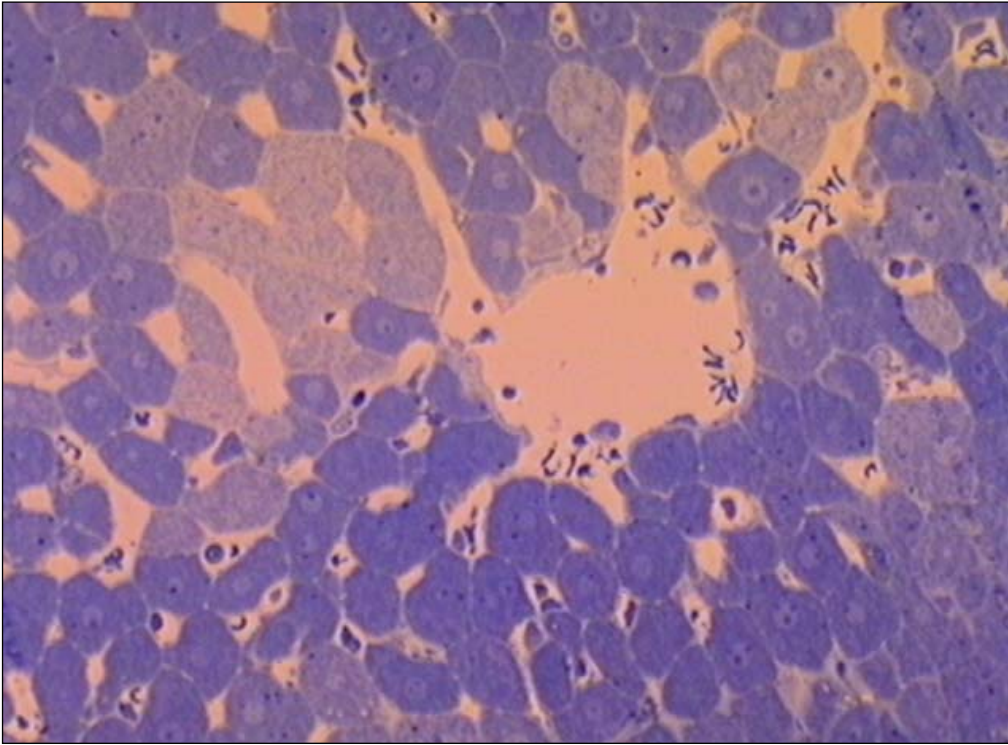
Resim 9: İR grubu infiltrasyon ve konjesyon HE X 660



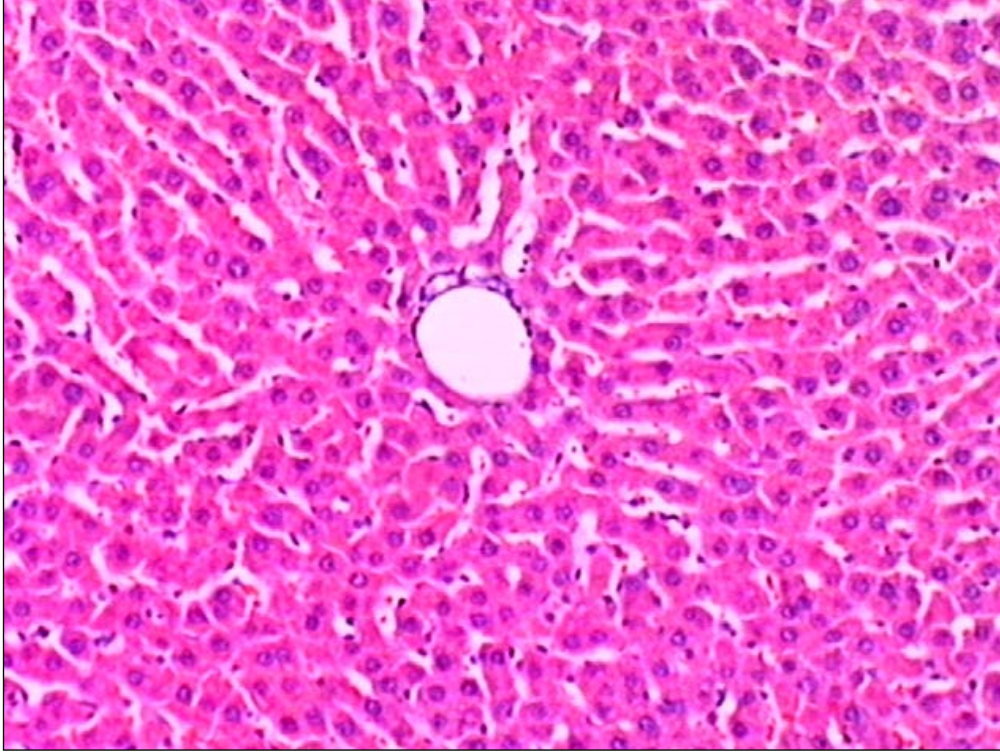
Resim 10: İR grubu konjesyon HEX1320



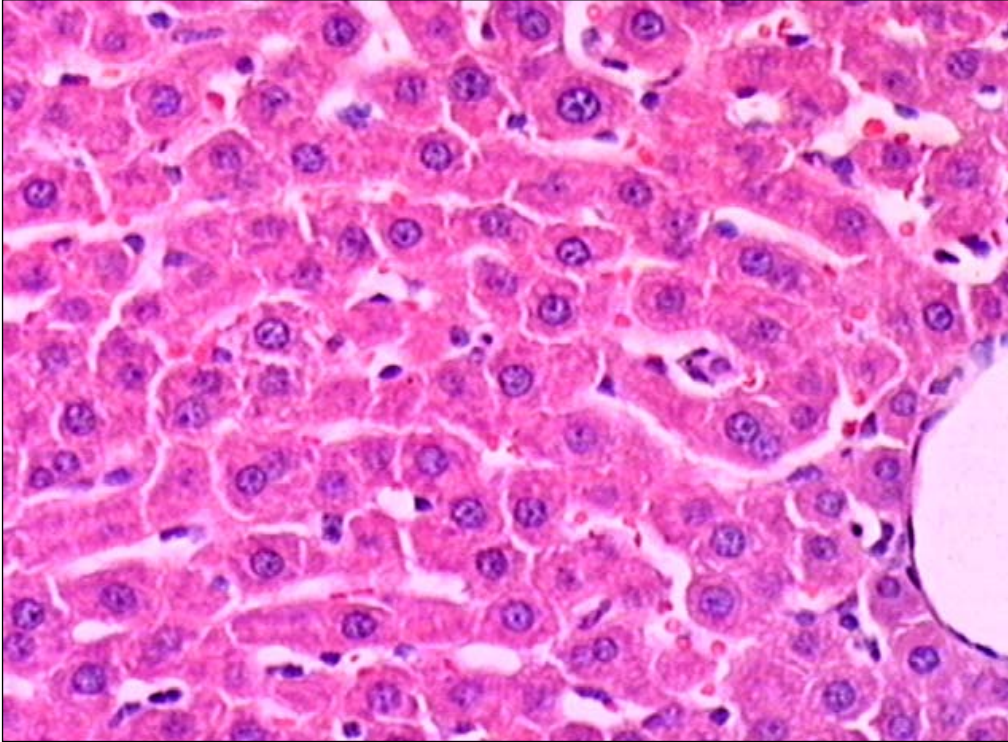
Resim 11: İR grubu hücre infiltrasyonu, sinuzoid dilatasyonu, hepatosit şişmesi Toluidin BlueX 660



Resim 12: İR grubu hepatositlerde şişme, açıkli koyulu hepatositler Toluidin BlueX 660

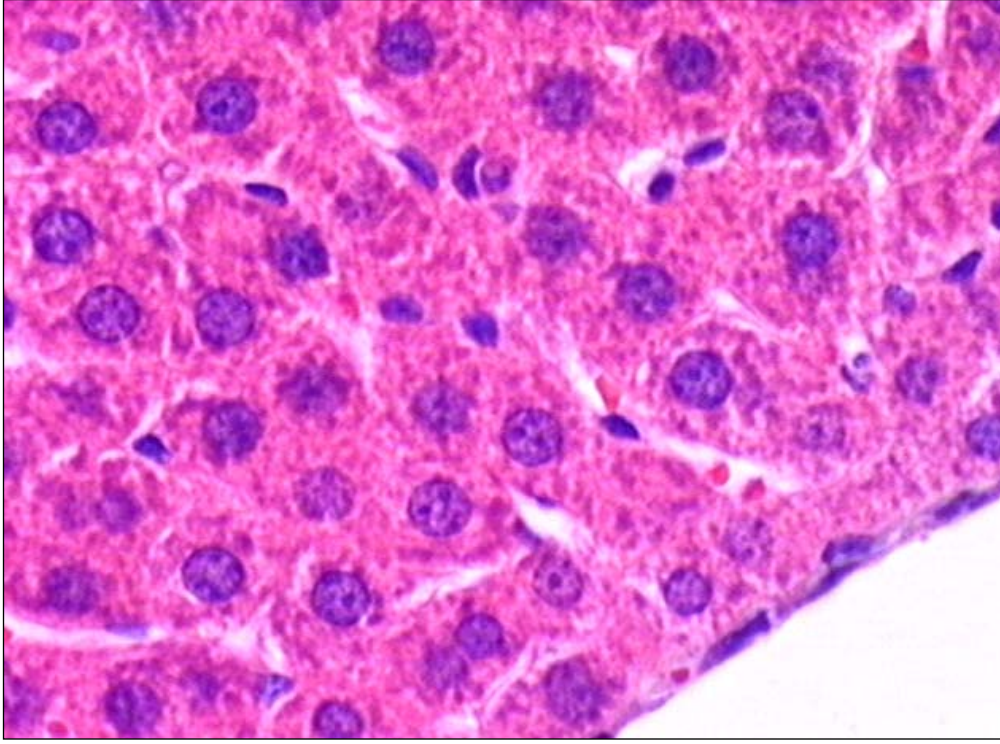


Resim 13: IR+KAR grubu karaciğer genel görünüm HE X 330

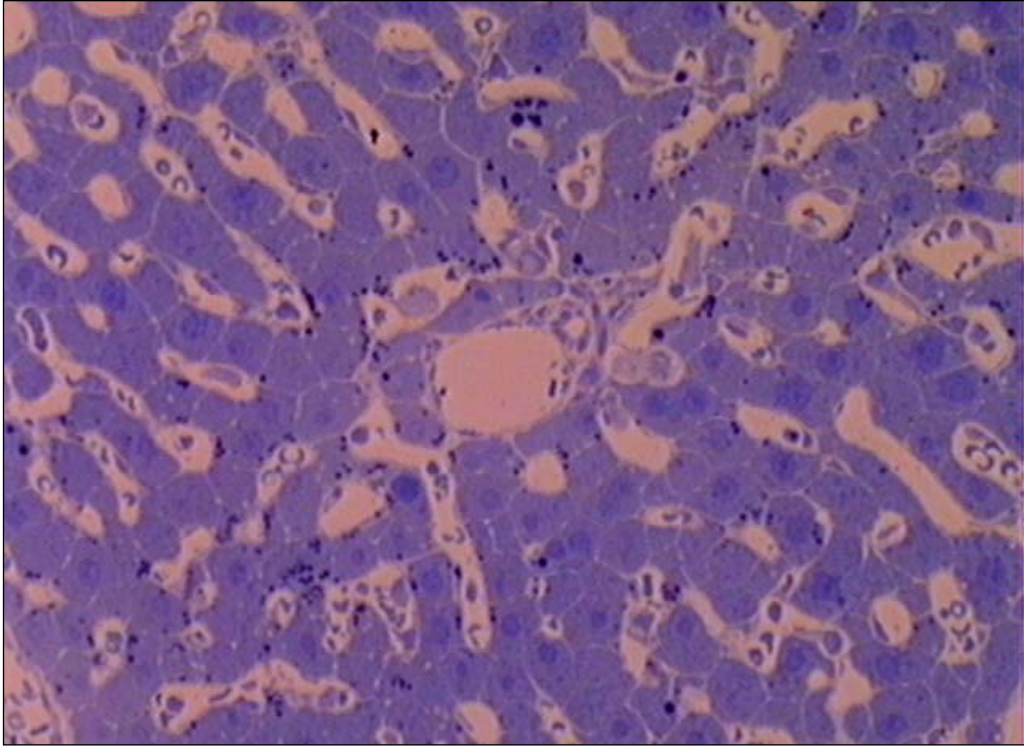


Resim 14: IR+KAR grubu minimal sinuzoid dilatasyonu HEX 660

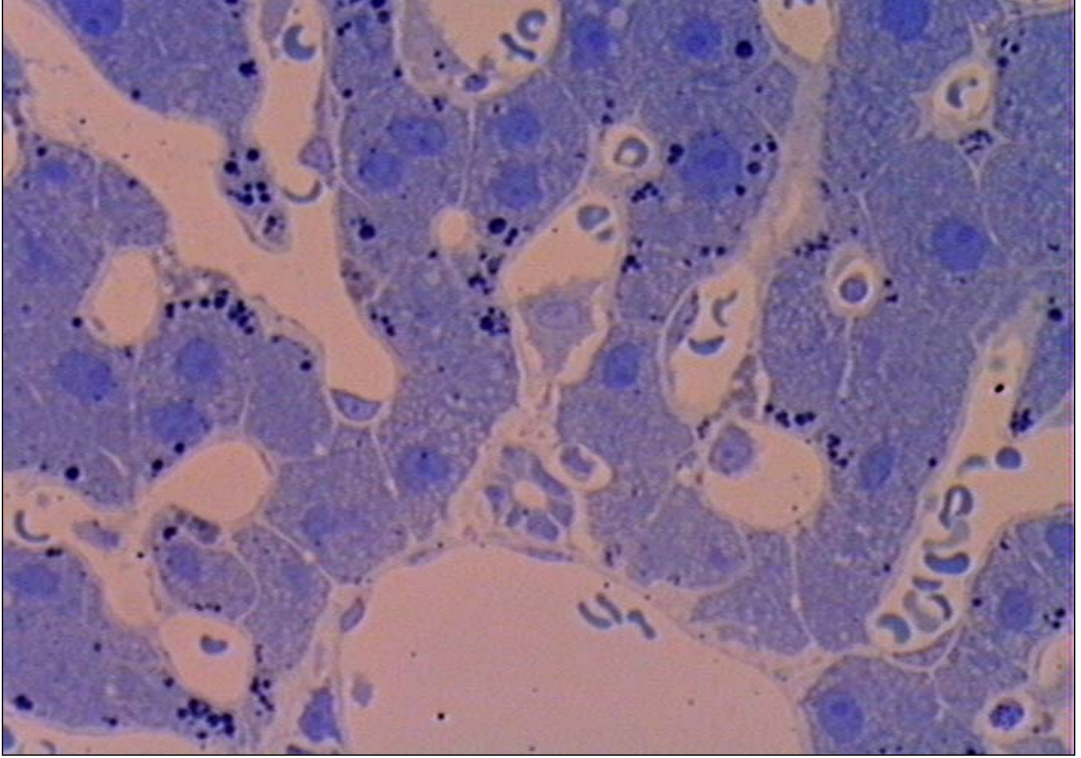




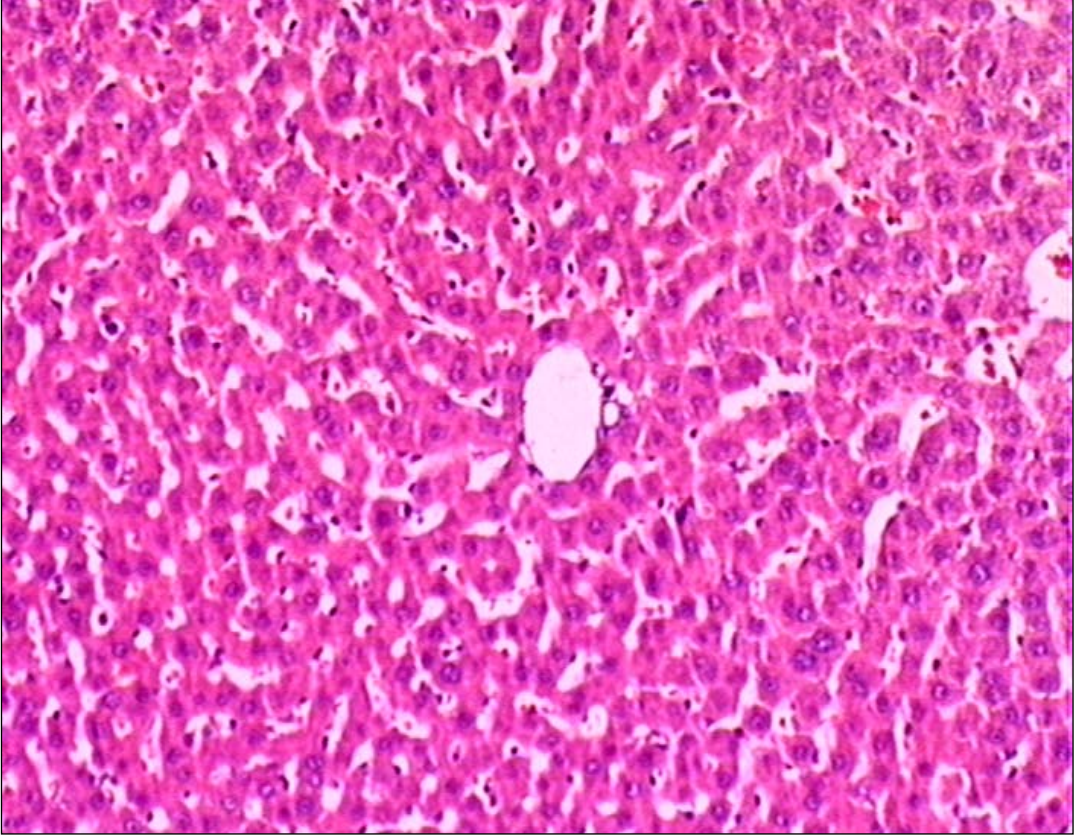
Resim 15: IR+KAR grubu karaciğer genel görünüm HE X 1320



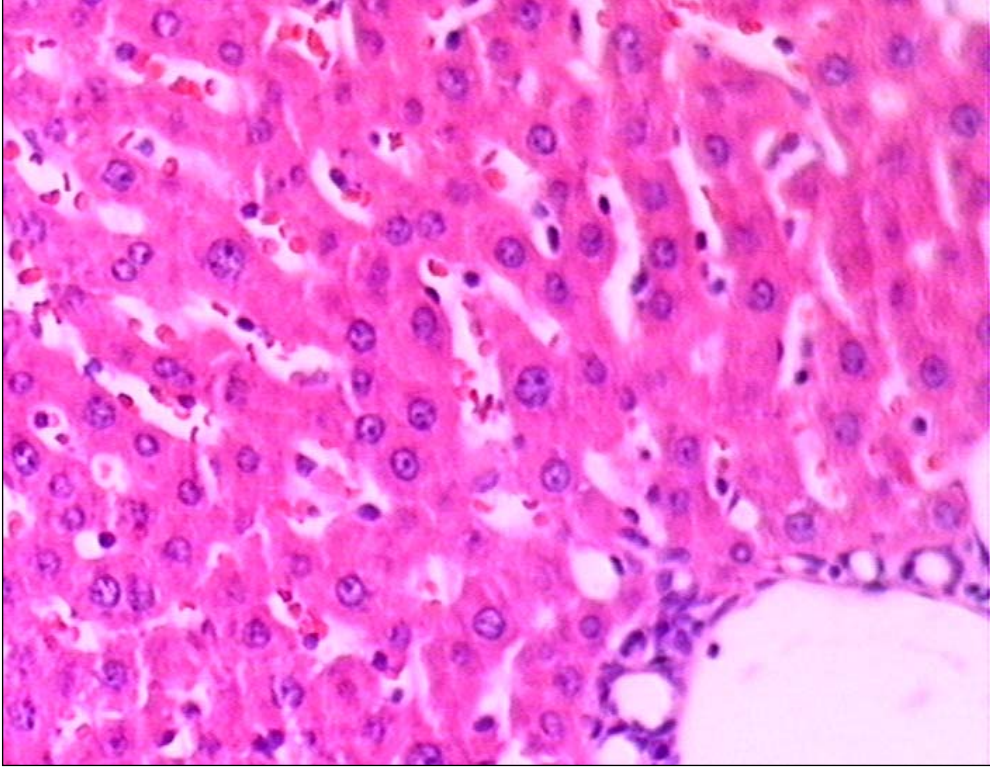
Resim 16: IR+KAR grubu karaciğer genel görünüm Toluidin BlueX 660



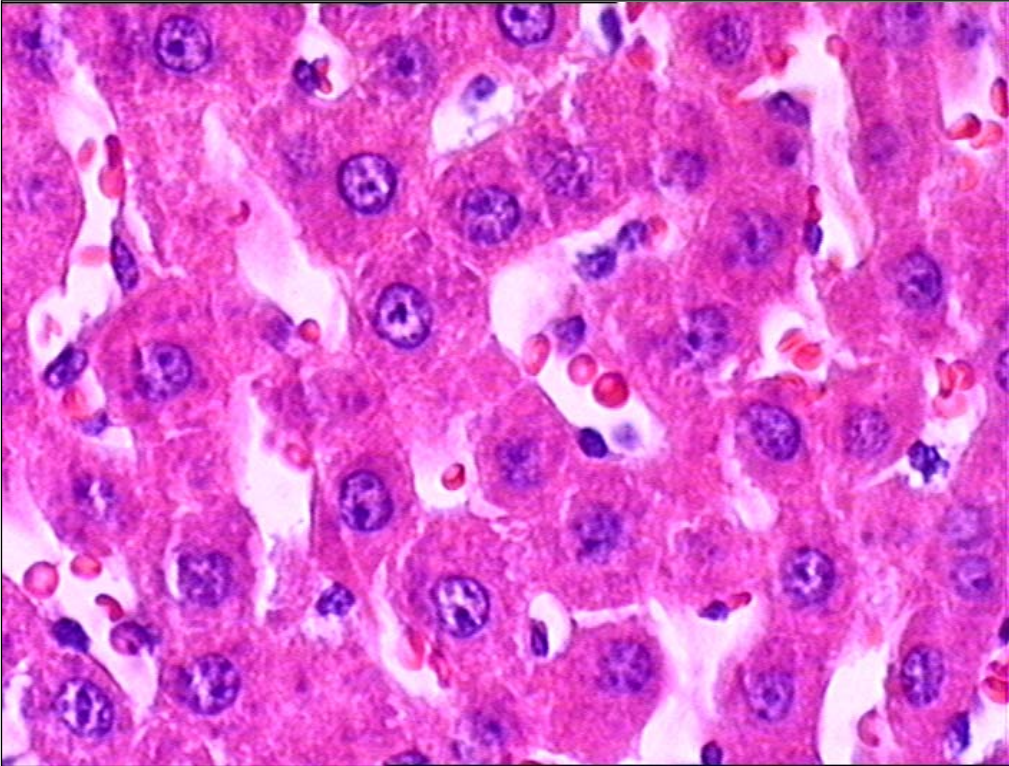
Resim 17 : IR+KAR grubu lipid artışı Toluidin BlueX 1320



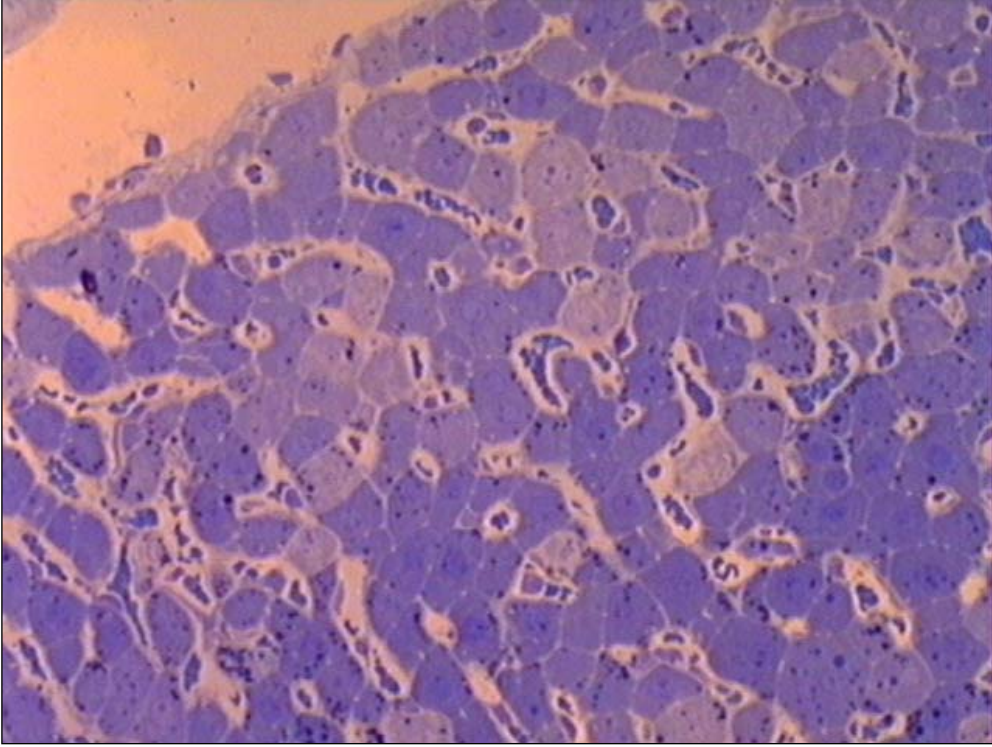
Resim18: İR+MEL grubu karaciğer genel görünüm HEX 330



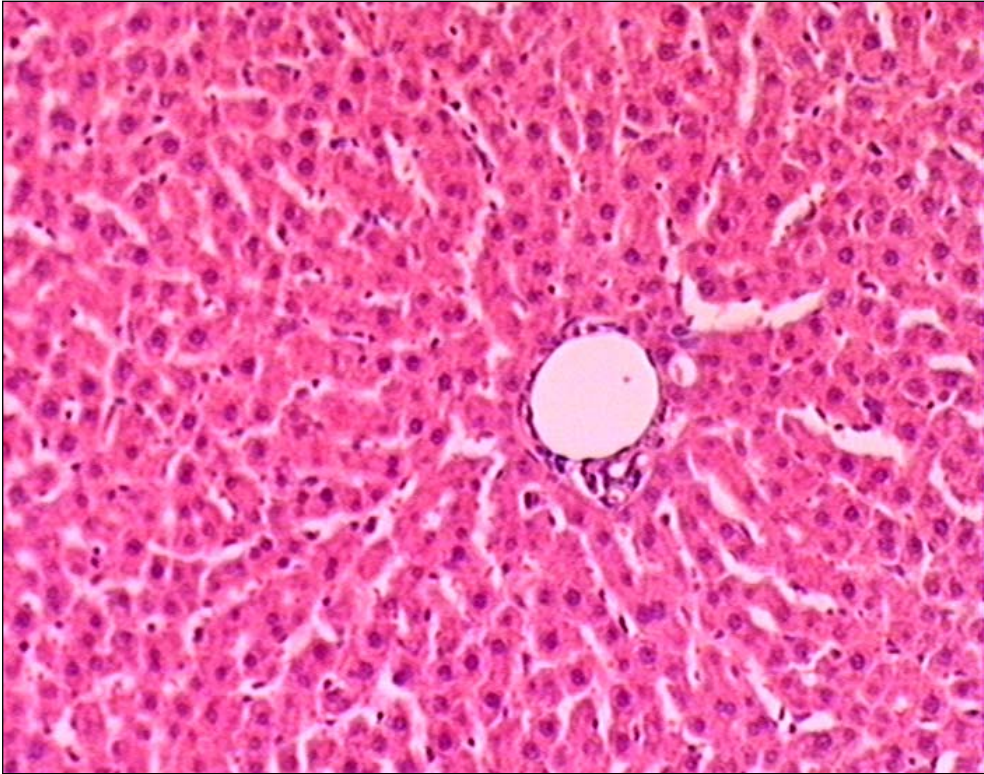
Resim 19: İR+MEL grubu minimal hücre infiltrasyonu HE X 660



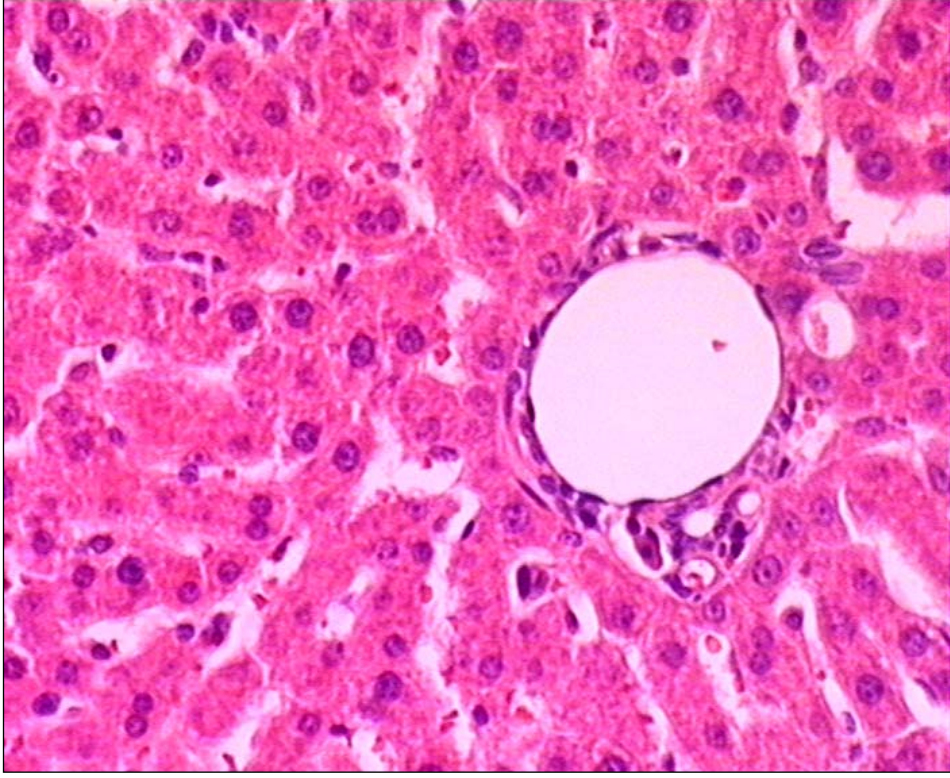
Resim 20 : İR+MEL grubu minimal sinuzodal genişleme HE X 1320



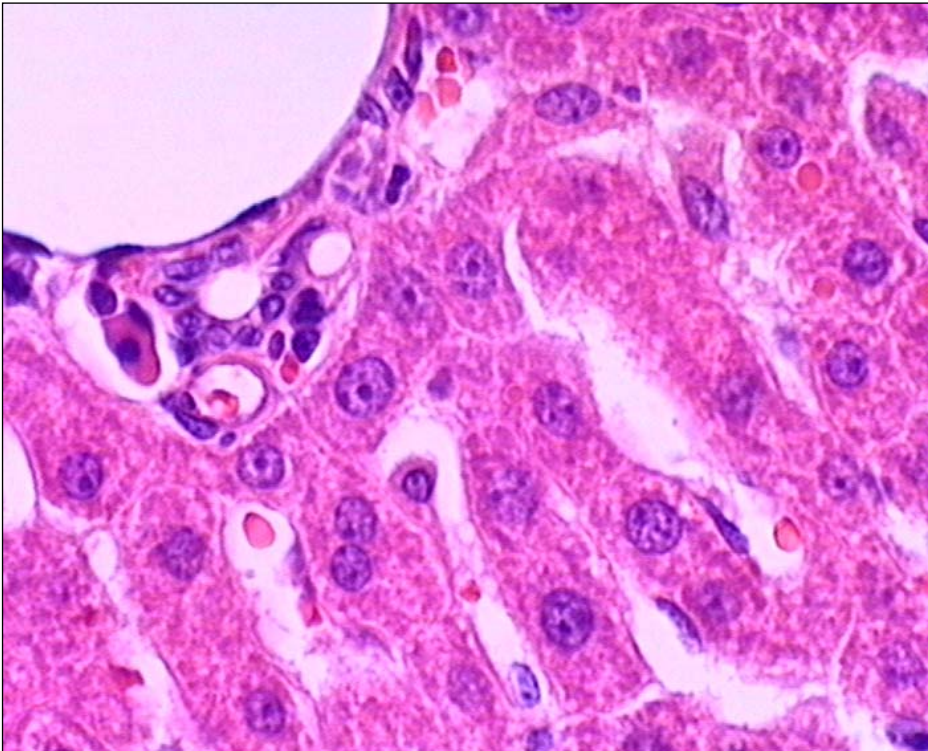
Resim 21 : İR+MEL grubu lipid artışı, az sayıda açık boyanmış hepatositler Toluidin BlueX 660



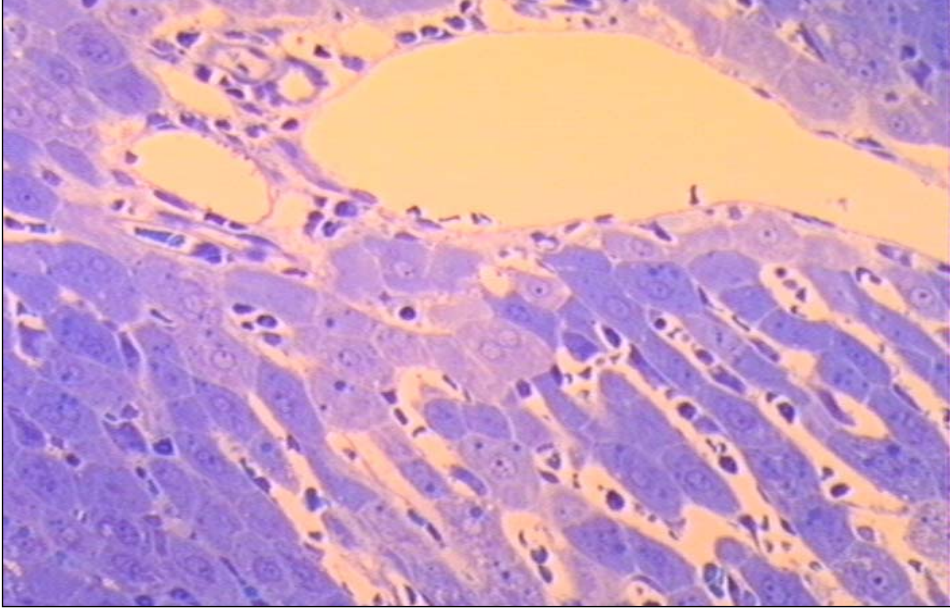
Resim 22 : İR+KAR+MEL grubu karaciğer genel görünüm HEX 330



Resim 23 : İR+KAR+MEL grubu normal sinuzoidal yapı HE X 660



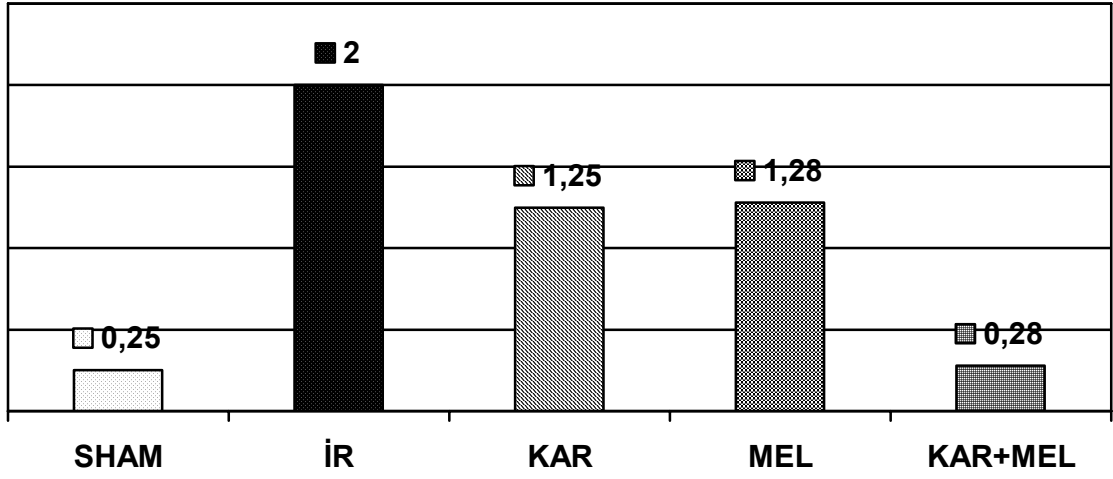
Resim 24 : İR+KAR+MEL grubu karaciğer genel görünüm HE X 1320



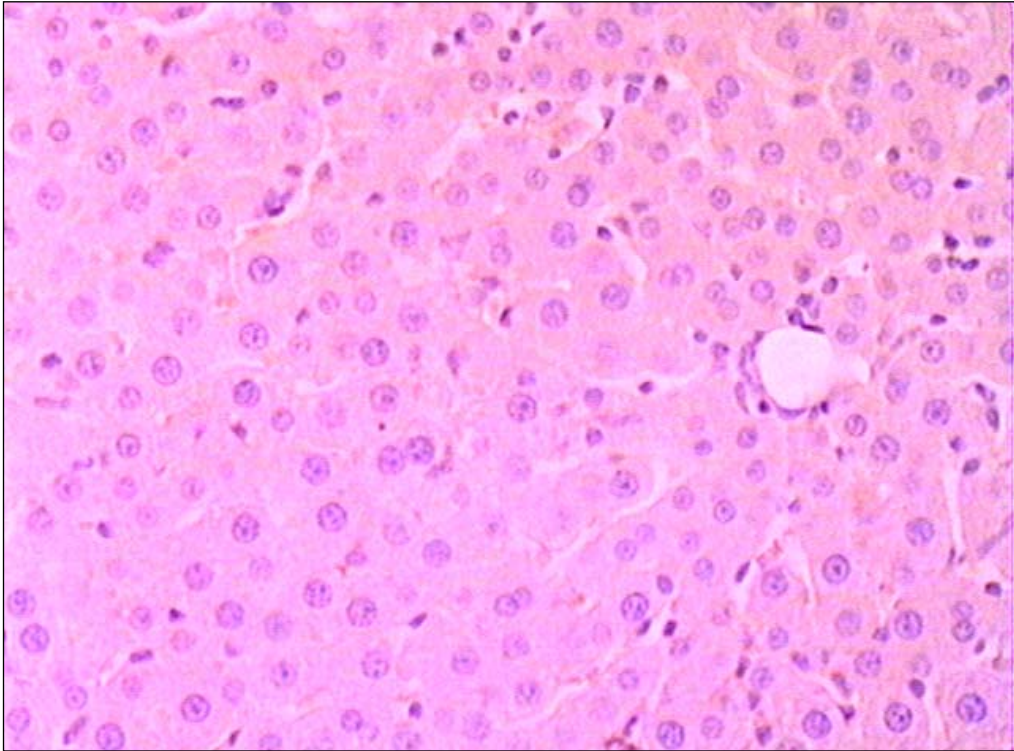
Resim 25 : İR+KAR+MEL grubu az sayıda açık boyanmış hepatositler  
Toluidin BlueX 660

## **5.2 İmmunohistokimyasal Bulgular**

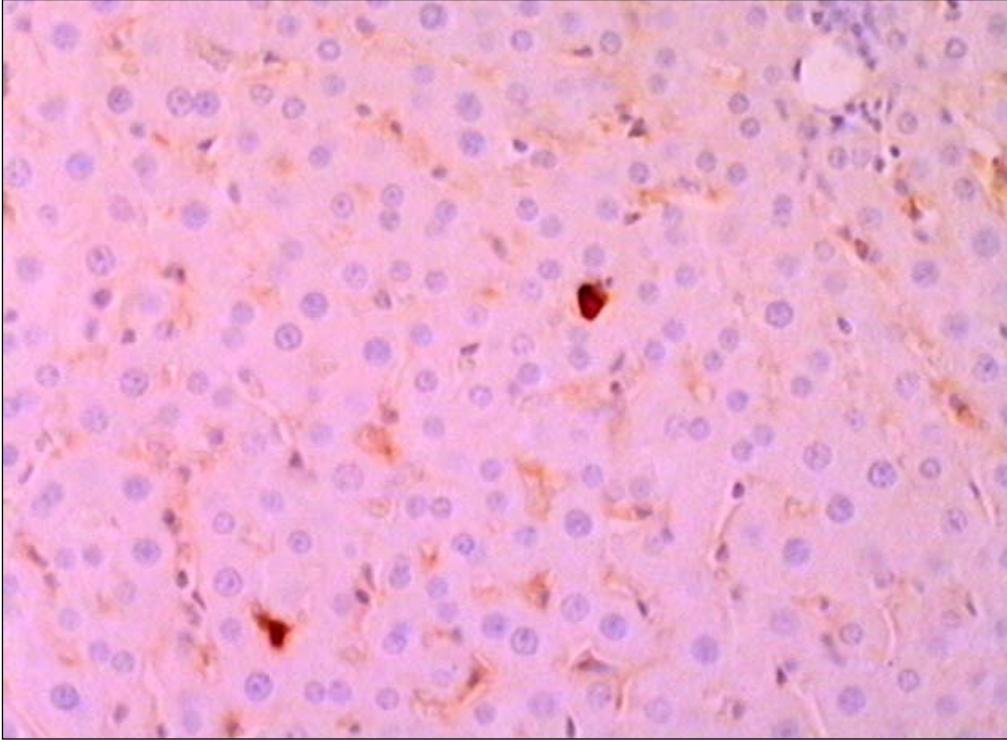
Apostain boyası ile boyanan apoptotik hücre sayısı X40'lık büyütmede ortalama 1000 hücre sayılarak elde edildi. İR grubunda sham grubuna göre apostain ile boyanmış kesitlerde artmış apoptotik hücreler gözlemlendi. (Resim 26–30) Apoptotik hücre sayı ortalamaları istatistiksel olarak değerlendirildiğinde İR grubu ile sham grubu arasında istatistiksel olarak anlamlı fark olduğu saptandı. ( $p=0.016$ ) MEL ve KAR verilen grupta apoptotik hücre sayısında azalma görülürken, bu azalma istatistiksel olarak anlamlı değildi. ( $p>0.05$ ) MEL+KAR grubunda ise apoptotik hücre sayısında azalma İR grubu ile karşılaştırıldığında istatistiksel olarak anlamlı bulundu. ( $p=0.005$ )(Tablo1)



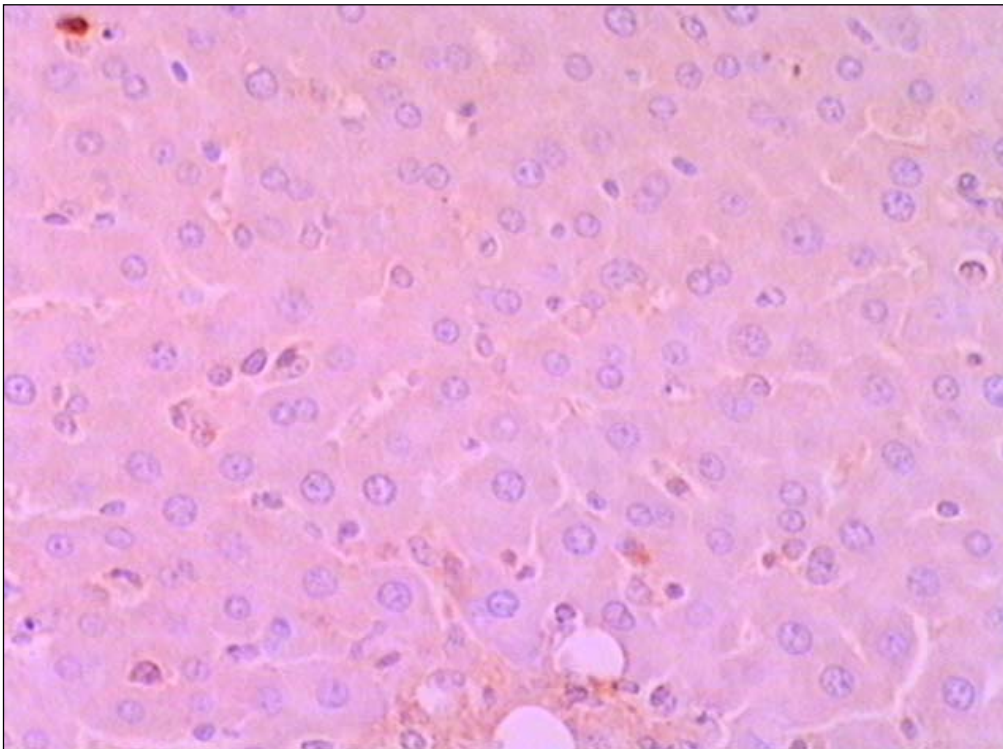
Tablo 1: Apoptotik Hücre Ortalamaları



Resim 26: Sham grubu Apoptain Boyası X 660

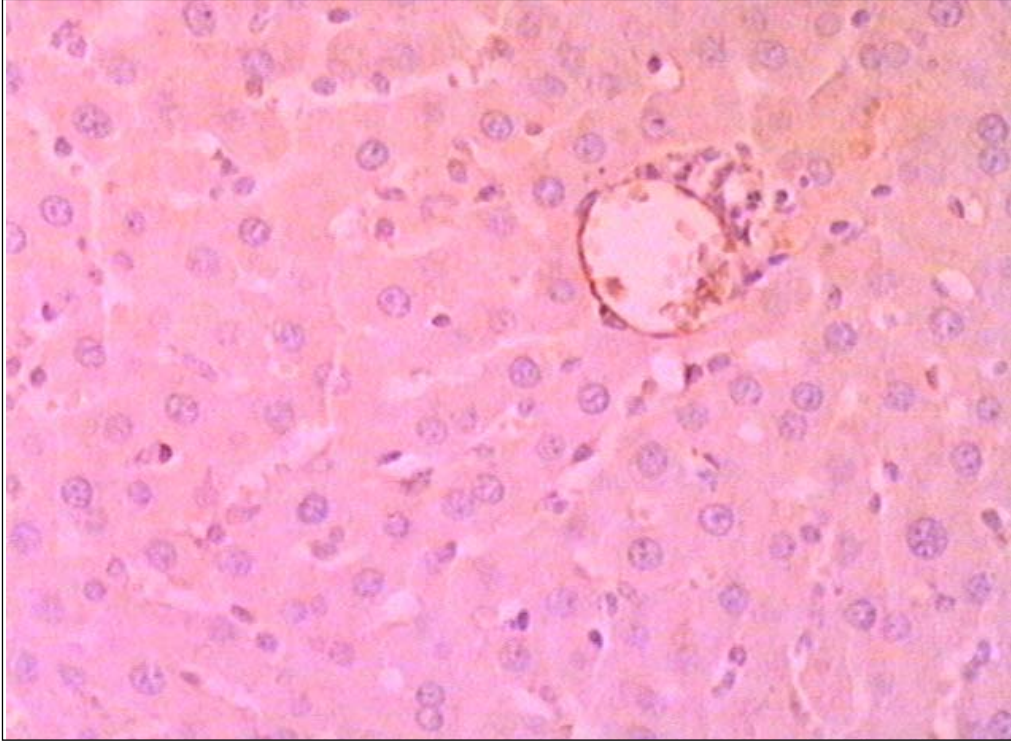


Resim 27: İR grubu Apostain Boyası X 660

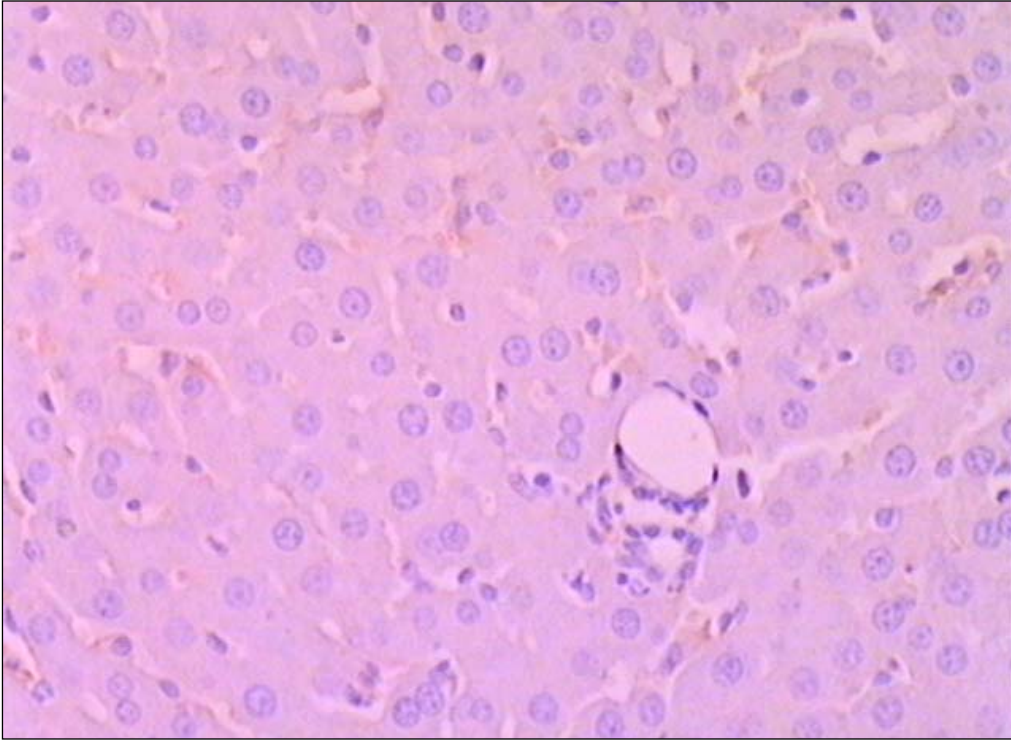


Resim 28: İR+KAR grubu Apostain Boyası X 660





Resim 29: İR+MEL grubu Apostain Boyası X 660

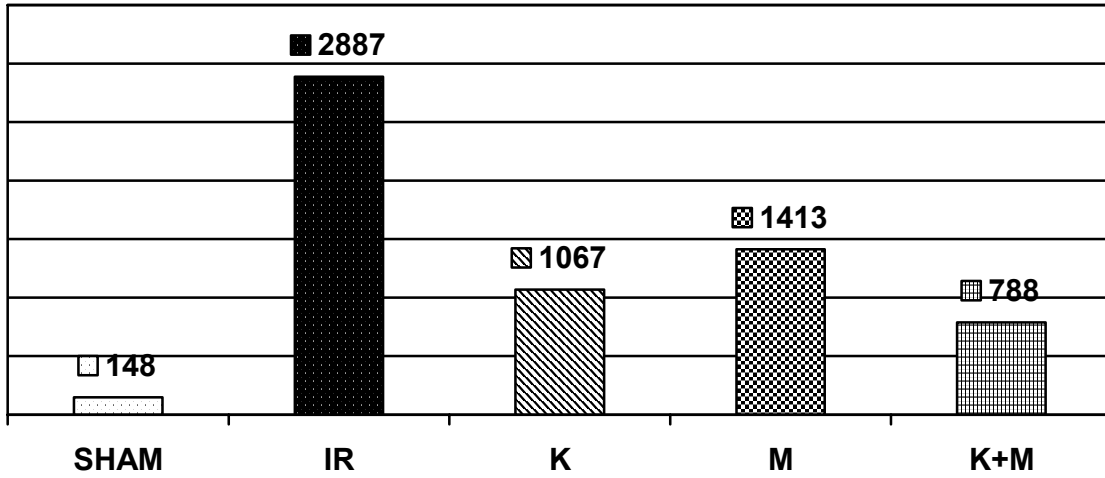


Resim 30: İR+MEL+KAR grubu Apostain Boyası X 660

### 5.3 Biyokimyasal Sonuçlar

#### 5.3.1 ALT Düzeyi

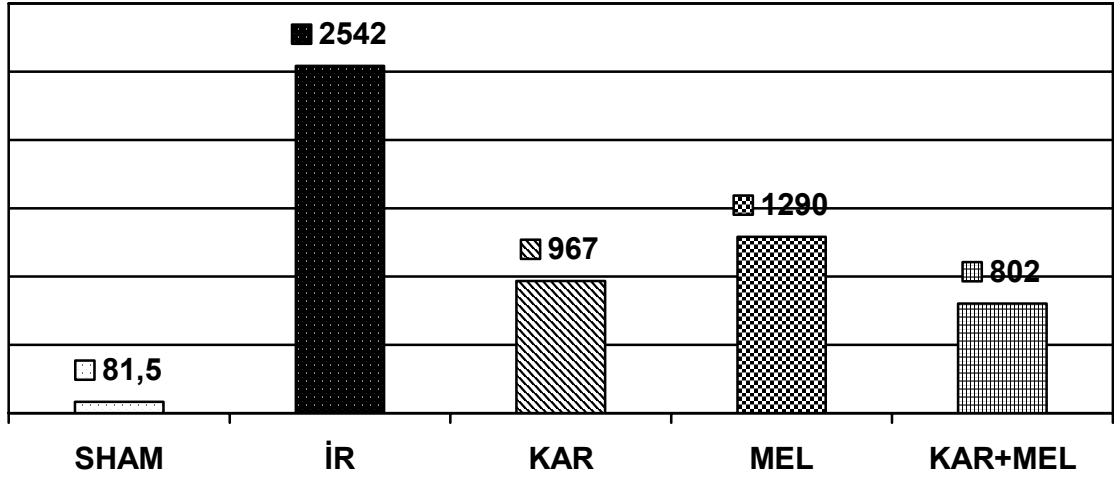
Sham grubu ile İR grubu karşılaştırıldığında ALT düzeyi İR grubunda istatistiksel olarak anlamlı olarak yüksek bulundu.( $p=0.011$ ) Tedavi gruplarının hepsinin ALT düzeyini anlamlı olarak düşürdüğü bulundu. KAR'ın, MEL'e göre daha etkili olduğu bulundu.( $p=0.008$ ) Kendi aralarında karşılaştırıldığında ise en etkili yöntemin MEL+KAR verilmesinin olduğu istatistiksel olarak gözlemlendi. ( $p=0.002$ ) (Tablo 2)



Tablo 2: ALT Ortalamaları

#### 5.3.2 AST Düzeyi

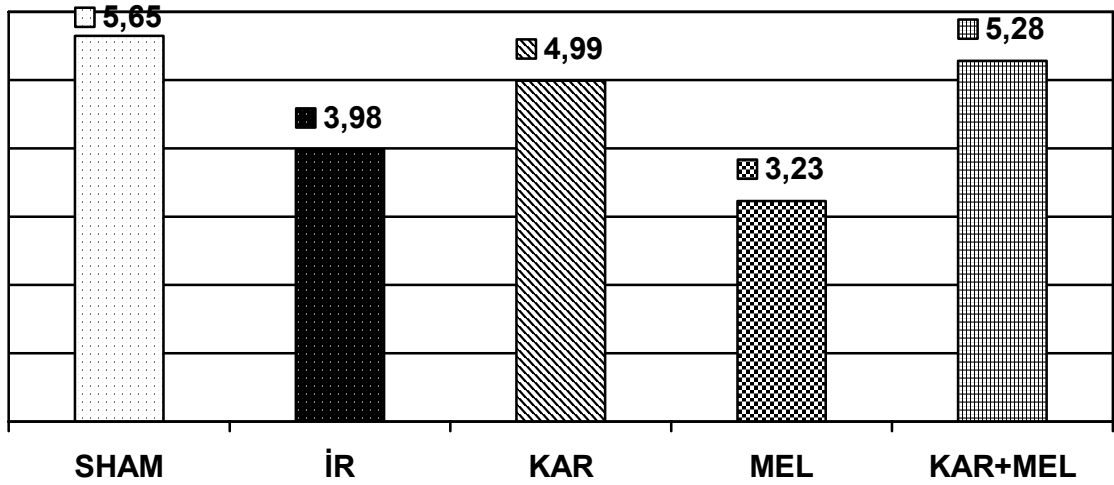
Sham grubu ile İR grubu karşılaştırıldığında AST düzeyi İR grubunda istatistiksel olarak anlamlı olarak yüksek bulundu. ( $p=0.011$ ) Tedavi gruplarının hepsinin AST düzeyini istatistiksel olarak anlamlı düzeyde düşürdüğü bulundu. Ancak hiçbirinin birbirine istatistiksel olarak anlamlı farkı bulunmadı.( $p>0.05$ ) (Tablo 3)



Tablo 3: AST Ortalamaları

### 5.3.3 Glutasyon Redüktaz Düzeyi

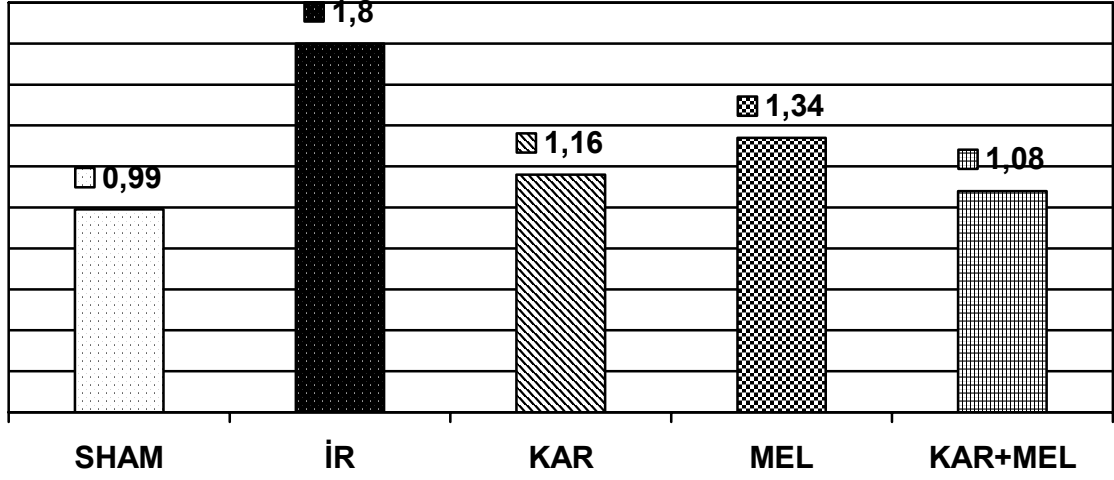
GR düzeyi , İR grubunda sham grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı olarak düşük bulundu.( $p=0.006$ ) KAR grubu GR düzeylerini istatistiksel olarak anlamlı düzeyde yükseltti. ( $p=0.002$ ) KAR+MEL grubu da GR düzeylerini istatistiksel olarak anlamlı düzeyde yükseltti.( $p=0.002$ ) MEL grubunda ise istatistiksel olarak anlamlı bir değişikliğe neden olmadı. ( $p> 0.05$ ) (Tablo 4)



Tablo 4: Glutasyon Redüktaz Ortalamaları

### 5.3.4 MPO Düzeyi

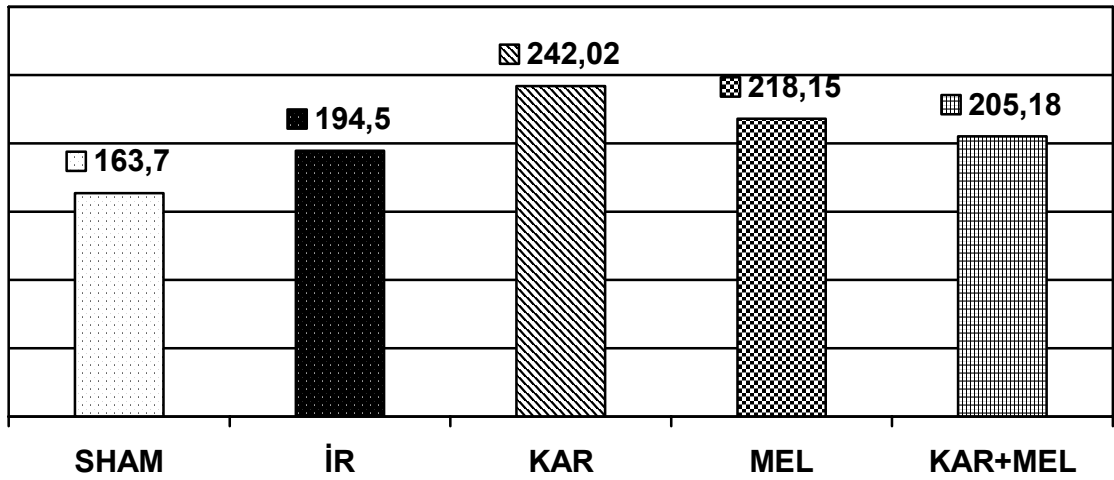
İR grubu, sham grubuna göre MPO düzeylerini yükseltirken ( $p=0.008$ ), KAR grubu İstatistiksel olarak anlamlı düzeyde MPO düzeylerini düşürdüğü gözlemlendi. ( $p=0.024$ ) KAR+MEL grubu da istatistiksel olarak anlamlı düzeyde MPO düzeylerini düşürdüğü gözlemlendi. ( $p=0.015$ ) MEL grubu ise anlamlı bir düşüşe neden olmadı. ( $p>0.05$ ) (Tablo 5)



Tablo 5: MPO Ortalamaları

### 5.3.5 TBARS Düzeyi

Deney grupları arasında herhangi bir istatistiksel anlam bulunmadı. ( $p>0.05$ ) (Tablo 6)



Tablo 6: TBARS Ortalamaları

## **6.TARTIŞMA**

İRH, hipoksik organın tekrar oksijenlenmesinden sonra ortaya çıkan hasarlanmadır. Karaciğer iskemisi nakil cerrahisinden başka, travma, kanser, safra yolu tıkanmaları ve darlıkları nedeniyle ameliyat edilen hastalarda, ayrıca cerrahi girişim olmaksızın bir hemodinamik veya kardiyojenik şok periyodunu takiben oluşabilmektedir. Karaciğer İRH patofizyolojisi, karaciğer hasarına etki eden çeşitli düzeydeki birçok mekanizmanın katılımından meydana gelir. Kupffer hücre aktivasyonu, ROT oluşumu, sitokin ve kemokin salınımı, vazokonstrüksiyon, nitrik oksit ve endotelin dengesindeki bozulma, nötrofil lökositlerin toplanması, mitokondriyal geçirgenliğin değişikliğe uğraması, kalsiyumun hücre içine dengelenmemiş geçişi ve pH paradoksu gibi çeşitli hücrel ve moleküler etkileşimler söz konusudur. Bu kompleks mekanizmalar hücre ölümüne, organ fonksiyon bozukluğuna ve en sonunda da organ kaybına neden olmaktadır (3). İRH'nin sorumlu olduğu düşünülen patofizyolojik mekanizmaları bloke edeceği düşünülen birçok hepatosit koruyucu ajan; allopurinol, roskovitin, α-tokoferol, mannitol, dopamin, prostoglandin, aktive karbon hemoperfüzyonu, glukagon, melatonin, karnitin, klorpromazin, aprotonin, metil prednizolon, deferoksamin, siklosporin, katalaz, aspartik asit, ubiquinon, trombosit aktive edici faktör antagonistleri, ATP, verapamil, nifedipin, süperoksit dismutaz tanımlanmış ve bunların İRH üzerine iyileştirici etkileri deneysel İR modellerinde araştırılmıştır (4,5,106,107).

Karaciğer İR hasarında ışık mikroskopik inceleme yapıldığında, NL infiltrasyonu, bölgesel hemoraji ve nekroz, konjesyon, sinuzoidlerde genişleme, bölgesel hepatoselüler vakuolizasyon, hepatosit şişmesi, ultrastrüktürel inceleme yapıldığında ise mitokondriyal yapıda bozulma, şişme, boyanma farklılıkları, NL birikimi gözlenir. Serumda yapılan incelemede ALT ve AST düzeyleri artmış, karaciğer dokusu homojenatında yapılan biyokimyasal çalışmalarda ise; MPO, MDA, TBARS, protein karbonil (PO) düzeyi (proteinlerin oksidatif hasarının spesifik göstergesi) artmış, GSH düzeyi azalmış olarak bulunur (108). Crockett ve ark.ları yaptığı çalışmada, karaciğer İR uygulanmış grupta sinuzoidal konjesyon, sitoplazmik vakuolizasyon, hepatoselüler nekroz ve nötrofil infiltrasyonu gözlemiş, ALT düzeylerini yüksek olarak bulmuşlardır (109). Ingloft ve ark.ları İR uygulanmış karaciğer dokusunda

polimorfonükleer hücre infiltrasyonu, hepatosit nekrozu, sinuzoidal genişleme , ALT ve AST düzeylerinde artış saptamışlardır (110). Peralta ve ark.ları İR uygulanmış karaciğer dokusunda yaygın hepatosit nekrozu , hemoraji, nötrofil infiltrasyonu , TUNEL boyaması ile apoptotik hücre sayısında artış , ALT ve AST düzeyi yükselmesi bulmuşlardır (111). Bizim çalışmamızda benzer şekilde İR grubunda inflamasyon, sinuzoid genişlemesi ve konjesyon, yaygın hepatosit nekroz alanları izlendi. Apoptotik hücre sayısı artmış bulundu. Serum AST ve ALT, karaciğer dokusu MPO düzeyi artmış, GR düzeyi azalmış olarak bulundu. Tata ve ark. ları total hepatik iskemiyi yaptıkları karaciğer dokularında TBARS düzeylerini kontrol grubuna göre anlamlı düzeyde artmış bulmuşlardır (112). Okatani ve ark. larının yaptığı çalışmada İR uygulanan grupta TBARS düzeyi kontrol grubuna göre anlamlı olarak artmış şekilde gözlenmiştir (113). Bizim çalışmamızda da karaciğer doku homojenatlarında TBARS ölçümü yapılmış ancak hiçbir yönde anlamlı bir değişiklik gözlenmemiştir. Ayrıca diğer bulgular ile ters olarak İR grubunun tedavi verilen gruplara göre değerinin düşük olması ölçüm prosedürünün uygun olmadığı, bu parametrenin başka yöntemlerle gösterilmesinin daha sağlıklı sonuç vereceğini düşünmekteyiz.

KAR, suda erime özelliğine bağlı olarak, suda çözünen oksidasyon mediatörlerinin (metaller ve oksijen radikalleri) yüksek olduğu sitozolde fonksiyon görür. Aktif oksijen radikallerini temizleyen biyolojik fonksiyonuna bağlı olarak antioksidan özelliğe sahiptir. Hidroksil ve süperoksit radikallerinin ve çok kuvvetli olarak da singlet oksijen molekülünün temizleyicisidir (6,7). Antioksidan özelliğinden yola çıkılarak birçok deneysel modelde etkisi denenmiştir. Fujii ve ark.ları yaptığı böbrek İR modelinde KAR verilmesinin, sempatik sinir aktivitesini ve böbrekte oluşan İRH'yi azalttığını bulmuşlardır (7). Stvolinsky ve ark.ları beyin iskemisi oluşturulan deneklerde KAR'ın nöroprotektör etkisi olduğunu (6), başka bir çalışmalarında da global beyin iskemisi uygulanan deneklere KAR verilmesinin yaşam süresinin arttırdığını göstermişlerdir (9). Boldyrev ve ark.ları KAR'ın nöranal hücreleri ROT' lara karşı koruduğunu bildirmişlerdir (114). Yine aynı çalışmacılar KAR'ın serebellar granüler hücreleri serbest radikal hasarından koruduğunu göstermişlerdir (10). Hipkiss KAR'ın MDA toksisitesine karşı sıçan beyin endotel hücrelerini koruduğunu bildirmiştir (115). Lee ve ark.ları izole sıçan kalp reperfüzyon hasarına karşı KAR'ın koruyucu etkisi olduğunu göstermiştir (116). Kang ve ark.ları kültür ortamında karaciğer

epitelyal hücrelerinde 12-O- tetradecanoylphorbol-13-acetate ve hidrojen peroksite neden olduğu DNA fragmentasyonunu KAR'ın engellediğini bulmuştur. Buna neden olarak KAR'ın lipid peroksidasyonunu inhibe ettiğini, süperoksit dismutaz ve/veya serbest radikal temizleyici özelliğine sahip olmasına bağlı olduğunu bildirmişlerdir (117).

Şimdiye kadar yapılmış çalışmalarda karaciğer İRH'ye karşı KAR'ın etkisini ışık mikroskopik, immunohistokimyasal ve biyokimyasal olarak inceleyen bir araştırma bulunmamaktadır. Biz bu çalışmamızda KAR'ın karaciğer İRH uygulanmasında koruyucu etki gösterdiğini ve bu özelliğinin MEL'e göre daha kuvvetli olduğunu bulduk. Bir diğer dikkat çekici yönü ise MEL ile birlikte verilmesi sonuçları çok daha iyi etkilemiştir.

MEL, pineal bezden salgılanan, uyku, üreme, sirkadiyen ritim ve immünite gibi pek çok biyolojik fonksiyonun düzenlenmesinde rol oynayan bir hormondur. Sentezini takiben, pineal bezden doğrudan dolaşıma verilen MEL, lipofilik özelliğine rağmen, membran reseptörleri aracılığıyla hedef hücrelerine ulaşır (96). MEL için, bilinen hiçbir bariyerin olmaması, MEL'in tüm intrasellüler komponentlere rahatlıkla ulaşabilmesini sağlamaktadır. Böylece MEL, hücre zarını, organelleri ve çekirdeği etkin bir şekilde serbest radikal hasarından koruyabilmektedir. Çekirdeğe kadar ulaşabilme özelliği, DNA'nın oksidatif hasara karşı korunmasında, MEL'e bir üstünlük sağlamaktadır (14,15). Reiter ve ark.larının yaptığı çalışmada MEL'in organizmada immunomodülatör ve antioksidan etkisi olduğu bulmuştur (19). Sewerynek ve ark.ları karaciğer İR'de oluşan oksidatif hasara karşı MEL'in polimorfonükleer lökositleri ve lipid peroksidasyon ürünlerini azalttığı, glutatyon düzeylerinde artışa neden olduğu bildirmiştir (98). Kaçmaz ve ark.larının yaptığı çalışmada karaciğer İR sonucu azalan glutatyon düzeyini melatoninin arttırdığı, MPO düzeyini azaltıp, ALT, AST ve MDA düzeyini anlamlı derecede düşürdüğünü bildirmişlerdir (118). Ancak Okatani ve ark.larının yaptığı çalışmada, karaciğer glutatyon peroksidaz aktivitesi iskemi sırasında değişmeden kalmış, reperfüzyon sırasında anlamlı derecede azalmıştır. MEL verilmesinin bu düşüşe etkili olmadığını göstermişlerdir. Karaciğer İR'de oluşan mitokondri hasarını ultrastrüktürel olarak incelediklerinde kristalarda disintegrasyon ve şişme gözlemiş, buna karşın MEL uygulanmış hayvanlarda bu bulguların azaldığını göstermişlerdir (13). Bizim çalışmamızda da benzer şekilde MEL

verilmesi glutatyon redüktaz seviyesini yükseltmedi. Ancak KAR ile birlikte verilmesi bu düzeyi istatistiksel olarak anlamlı şekilde yükseltti. MPO düzeyi İR' ye göre azalmış bulundu ancak istatistiksel olarak anlamlı değildi. ALT ve AST düzeyleri ise MEL verdiğimiz grupta anlamlı derecede düşüşe neden oldu. Şener ve ark.ları total hepatik iskemi uygulanan deneklerde yaptıkları incelemede İR grubunda, hepatositlerin belirgin olarak şiş ve vakoulizasyon gösterdiğini, genişlemiş sinuzoidlerde konjesyon olduğunu, MEL grubunda ise iyi korunmuş karaciğer parankimi ve hepatositlerin görüldüğünü sinuzoidal yapılarda konjesyon bulunmadığını bildirmişlerdir (91). Bizim çalışmamızda da MEL verilen grupta benzer histolojik bulgular bulunmuştur. KAR+MEL verilen grupta ise histolojik bulgular kontrol grubuna yakın özellik göstermiştir.

Karaciğer İRH oluşturulmuş deney modellerinde şimdiye kadar apostain immun boyası ile apoptoz belirlemesi yapılmamıştır. Yapılan çalışmalarda daha çok TUNEL ile apoptotik hücreler gösterilmiştir. Saxton ve ark.ları İR grubunda TUNEL ile boyanan hücrelerin kontrole göre arttığını (119), Sun ve ark.ları yine TUNEL ile boyanan apoptotik hücrelerin İR grubunda arttığını göstermişlerdir (120). Ancak TUNEL ile yapılan çalışmaların güvenilirliği kısıtlıdır. TUNEL DNA dizisinde kırığı olan tüm hücreleri, hücre hasarı tipinin nekroz veya apoptoz olmasını ayırt etmeden boyamaktadır (5,58). Bu nedenle biz çalışmamızda apoptotik indeksi TUNEL'a göre daha iyi gösteren, apoptoza daha spesifik olan apostain boyasını tercih ettik (121). Çalışmamızda İR grubu, kontrol grubuna göre anlamlı olarak apoptotik hücre sayısında artış gösterdi. KAR ve MEL verilmesi apoptotik hücre sayısını azalttı ancak fark anlamlı olarak bulunmadı. KAR+MEL verilmesi ise anlamlı olarak apoptozu azalttı.



## **7. SONUÇ ve ÖNERİLER**

Tüm bulgular göz önüne alındığında genel olarak karnozinin verilmesi, melatoninin verilmesinden daha iyi sonuç vermiştir. Ayrıca karnozin ve melatoninin birlikte verilmesi karnozinin ve/veya melatoninin tek başına verilmesinden çok daha anlamlı sonuçlara neden olmuştur. Bu da karnozinin ve/veya melatoninin diğer antioksidanlar ile sinerjik etki gösterebileceğini düşündürmektedir. Karaciğer iskemi reperfüzyon hasarında karnozinin ilk defa kullanılması ve ortaya çıkan bulguların ışık mikroskopik, immunohistokimyasal ve biyokimyasal parametrelerle desteklenmesi nedeniyle çalışmamızın bundan sonraki araştırmalara yol göstereceği inancındayız. Ancak kullanılan ajanların klinikte uygulanabilirliği açısından daha çok çalışmaya ihtiyaç bulunduğu da bir gerçektir.

## **KAYNAKLAR**

1. Carden DL, Granger DN. Pathophysiology of ischemia-reperfusion injury. *Journal of Pathology*. 2000; 190: 255–266
2. Toledo-Pereyra LH, Simmons RL, Najarian JS. Protection of the ischemic liver by donor pretreatment before transplantation. *American Journal of Surgery*. 1975;129:513–517
3. Kaplowitz N. Mechanisms of liver injury. *Journal of Hepatology*. 2000; 32: 39–47
4. Tredger JM. Ischemia-reperfusion injury of the liver: Treatment in theory and practice. *Biofactors* 1998;8 (1-2) :161-164
5. Teoh NC, Farrell GC. Hepatic ischemia reperfusion injury: Pathogenic mechanisms and basis for hepatoprotection *Journal of Gastroenterology and Hepatology* 2003; 18:891–902
6. Stvolinsky SL, Kukley ML, Dobrota D, Vachova MM, Tkac I, Boldyrev A. Carnosine: an endogenous neuroprotector in the ischemic brain. *Cellular and Molecular Neurobiology* 1999;19-1:45-56
7. Fujii T, Takaoka M, Muraoka T, Kurata H, Tsuruoka N, Ono H, Kiso Y, Tanaka T, Matsumura Y. Preventive effect of L-carnosine on ischemia/reperfusion-induced acute renal failure in rats. *European Journal of Pharmacology* 2003; 474:261-267
8. Fujii T, Takaoka M, Muraoka T, Kurata H, Tsuruoka N, Ono H, Kiso Y, Tanaka T, Matsumura. Dietary supplementation of L- Carnosine prevents ischemia/reperfusion-induced renal injury in rats. *Biol.Pharm.Bull.* 2005;28(2):361-363
9. Stvolinsky SL, Kukley ML, Dobrota D, Mezesova V, Boldyrev A. Carnosine protects rats under global ischemia. *Brain Research Bulletin* 2000;53-4:445-448
10. Boldyrev A, Johnson P, Wei Y, Tan Y, Carpenter DO. Carnosine and taurine protect rat cerebellar granular cells from free radical damage. *Neuroscience Letters* 1999; 263:169-172
11. Zalesova ZS, Kuleva NV. The influence of carnosine on oxidation of skeletal muscle actin in vivo and in vitro. *Pathophysiology* 1998;3-1:119
12. Russel J Reiter, Dun-Xian Tan. Melatonin: Reducing intracellular hostilities. *The Endocrinologist* 2004;14:222-228

13. Okatani Y, Wakatsuki A, Reiter JR, Enzan H, Miyahara Y. Protective effect of melatonin against mitochondrial injury induced by ischemia and reperfusion of rat liver. *European Journal of Pharmacology* 2003; 469:145-152
14. Reiter RJ, Tan DX, Manchester LC, Qi W. Biochemical reactivity of melatonin with reactive oxygen and nitrogen species. A review of the evidence. *Cell Biochemistry and Biophysics* 2001; 34:237-256
15. Reiter RJ, Tan DX, Osuna C, Gitto E. Actions of melatonin in the reduction of oxidative stress. *Journal of Biomedical Science* 2000; 7:444-458
16. Tan DX, Chen LD, Poeggeler B, Manchester LC, Reiter RJ. Melatonin: a potent endogenous hydroxyl radical scavenger. *Endocrine Journal* 1993; 1:57-60
17. Cuzzocrea S, Costantino G, Mazzon E, Micali A, De Sarro A, Caputi AP. Beneficial effects of melatonin in a rat model of splanchnic artery occlusion and reperfusion. *Journal of Pineal Research* 2000; 28:52-63
18. Reiter RJ, Acuna-Castroviejo D, Tan DX, Burkhardt S. Free radical-mediated molecular damage. *Annals of the New York Academy of Sciences* 2001; 939:200-215
19. Reiter RJ, Maestroni GJM. Melatonin in relation to the antioxidative defense and immune systems: possible implications for cell and organ transplantation. *Journal of Molecular Medicine* 1999; 77:36-39
20. Cabeza J, Motilva V, Martin MJ, Lastra CA. Mechanisms involved in gastric protection of melatonin against oxidant stress by ischemia-reperfusion in rats. *Life Science*. 2001; 68:1405-1415
21. Pei Z, Ho HTS, Cheung RTF. Pretreatment with melatonin reduces volume of cerebral infarction in a permanent middle cerebral artery occlusion stroke model in the rat. *Neuroscience Letters* 2002; 318:141-144
22. Junqueira LC, Carneiro J. *Basic Histology Text & Atlas*. Tenth Edition. USA: McGraw-Hill Companies, 2003; 332-344
23. Ross MH, Kaye GI, Pawlina W. *Histology A Text and Atlas*. Fourth Edition. USA: Lippincott Williams & Wilkins, 2003; 532-548
24. Lentsch AB, Atsushi K, Yoshidome H et al. Inflammatory mechanisms and therapeutic strategies for warm hepatic ischemia/reperfusion injury. *Hepatology*. 2000; 32:169-173

25. Inglott FS, Habib NA, Mathie RT. Hepatic ischemia-reperfusion injury. *The American Journal of Surgery* 2001; 181:160–161
26. Vollmar B, Richter S, Menger MD. Leukocyte stasis in hepatic sinusoids. *American Journal of Physiology*. 1996; 270:798–803
27. Chan K.L. Role of nitric oxide in ischemia and reperfusion injury. *Current Medicinal Chemistry-Anti-Inflammatory & Anti-Allergy Agents*. 2002; 1(1):1–13
28. Martindale JL, Holbrook NJ. Cellular response to oxidative stress: signaling for suicide and survival. *Journal of Cellular Physiology*. 2002;192:1–15
29. Halliwell B. *Free Radicals in Biology and Medicine*. Oxford University Press. Third Edition. 1999
30. Klaus Apel; Heribert Hirt. Reactive oxygen species: metabolism, oxidative stress, and signaling transduction. *Annual Review of Plant Biology*. Health & Medical Complete. 2004; 55:373–399
31. Toyokuni Shinya. Reactive oxygen species- induced molecular damage and its application in pathology. *Pathology International*. 1999; 49(2): 91
32. Krishnaswamy K, Sushil K. Oxidative stress and Apoptosis. *Journal of Pathophysiology* 2000;7(27): 153–163
33. Grace P.A. Ischemia-reperfusion injury. *British Journal of Surgery*. 1994;81:637–647
34. Currin RT, Gores GJ, Thurman RG. Protection by acidotic pH against anoxic cell killing in perfused rat liver: evidence for a pH paradox. *FASEB Journal*. 1991; 5:207–210
35. Bond JM, Chacon E, Herman B. Intracellular pH and calcium homeostasis during the paradox of reperfusion injury to cultured neonatal rat cardiac myocytes. *American Journal of Physiology*. 1993;265:129–137
36. Kim JS, Ohshima S, Pediaditakis P et al. Nitric oxide: a signaling molecule against mitochondrial permeability transition-and pH- dependent cell death after reperfusion. *Free Radical Biology & Medicine*. 2004; 37(12):1943–1950
37. Clemens MG. Nitric oxide in liver injury. *Hepatology*. 1999; 30:1–5

38. Raghavan S.A.V, Dikshit M. Vascular regulation by the L-arginine metabolites, nitric oxide and agmatine. *Pharmacological Research* 2004; 49:397–414
39. Shah V, Haddad FG, Garcia- Cardena G. Liver sinusoidal endothelial cells are responsible for nitric oxide modulation of resistance in the hepatic sinusoids. *Journal of Clinical Investigation*. 1997; 100:2923–2930
40. Fisher MA, Eversole RR, Beuving LJ et al. Sinusoidal endothelial cell and parenchymal cell injury endotoxemia and hepatic ischemia-reperfusion: protection by the 21-aminosteroid tirilazad mesylate. *International Hepatology Communications*. 1997;6:121–129
41. Pannen BHJ, Bauer M, Noldge-Schömburg GFE et al. Response of hepatic blood flow during resuscitation from hemorrhagic shock: role of NO and endotelins. *American Journal of Physiology*. 1997; 69:429–434
42. Peralta C, Rull R, Rimola A et al. Endogenous nitric oxide and exogenous nitric oxide supplementation in hepatic ischemia-reperfusion injury in the rat. *Transplantation*. 2001; 71(4): 529–536
43. Koti RS, Yang W, Dashwood MR et al. Effect of ischemic preconditioning on hepatic microcirculation and function in a rat model of ischemia reperfusion injury. *Liver Transplantation*. 2002;8(12): 1182–1191
44. Baker SJ, Reddy EP. Modulation of life and death by the tumor necrosis receptor superfamily. *Oncogene*. 1998; 17:3261–3270
45. Shibuya H, Ohkohchi N, Tsukamoto S et al. Tumor necrosis factor-induced, superoxide-mediated neutrophil accumulation in cold ischemia/reperfusion in rat liver. *Hepatology* 1997;26:113–120
46. Wanner GA, Ertel W, Muller P. Liver ischemia and reperfusion induces a systemic inflammatory response through Kupffer cell activation. *Shock*. 1996; 5: 34–40.
47. Rudiger HA, Clavien P. Tumor necrosis factor  $\alpha$ , but not Fas, mediates hepatocellular apoptosis in the murine ischemic liver. *Gastroenterology* 2002; 122: 202–210.
48. Shirasugi N, Wakabayashi G, Shimazu M. Up-regulation of oxygen-derived free radicals by interleukin-1 in hepatic ischemia/reperfusion injury. *Transplantation*. 1997; 64: 1398–1403.

49. Suzuki S, Toledo- Pereyra LH. Interkeukin 1 and tumor necrosis factor production as the initial stimulants of liver ischemia and reperfusion injury. *Journal of Surgery Research*. 1994;58:253–258
50. Lentsch AB, Yoshidome H, Kato A et al. Requirement for interleukin-12 in the pathogenesis of warm hepatic ischemia/reperfusion injury in mice. *Hepatology* 1999; 30:1448–1453.
51. Colletti LM, Kunkel SL, Walz A. The role of cytokine networks in the local liver injury following hepatic ischemia/reperfusion in the rat. *Hepatology* 1996; 23: 506–514.
52. Lichtman SN, Lemasters JJ. Role of cytokines and cytokine-producing cells in reperfusion injury to the liver. *Seminars Liver Disease*. 1999; 19: 171–87.
53. Hisama N, Yamaguchi Y, Ishiko T. Kupffer cell production of cytokine-induced neutrophil chemoattractant following ischemia/reperfusion injury in rats. *Hepatology*.1996; 24: 1193–1198.
54. Lentsch AB, Yoshidome H, Cheadle WG. Chemokine involvement in hepatic ischemia/reperfusion injury in mice: roles for macrophage inflammatory protein–2 and Kupffer cells. *Hepatology* 1998; 27: 507–512
55. Zhou W, McCollum MO, Levine BA et al. Inflammation and platelet-activating factor production during hepatic ischemia/reperfusion. *Hepatology*.1992; 16:1236–1240
56. Bautista AP, Spitzer JJ. Platelet activating factor stimulates and primes the liver, Kupffer cells and neutrophils to release superoxide anion. *Free Radical Research Communications* 1992; 17:195–209
57. Takada Y, Boudjema K, Jaeck D et al. Effects of platelet-activating factor antagonist on preservation/ reperfusion injury of the graft in porcine orthotopic liver transplantation. *Transplantation*. 1995; 59:10–16
58. Jaeschke H. Molecular mechanisms of hepatic ischemia-reperfusion injury and preconditioning. *American Journal of Physiology - Gastrointestinal Liver Physiology*. 2003;284:G15-G26
59. Figueroa D.J. , Breyer R.M., Defoe S.K et al. Expression of the cysteinyl leukotriene 1 receptor in normal human lung and peripheral blood leukocytes. *American Journal Of Respiratory And Critical Care Medicine* 2001; 163: 226–233

60. Hughes H., Farhood A., Jaeschke H., Role of leukotriene B<sub>4</sub> in the pathogenesis of hepatic ischemia-reperfusion injury in the rat. *Prostaglandins, Leukotrienes and Essential Fatty Acids* 1992; 45(2):113–119
61. Takamatsu Y, Shimada K, Chijiwa K et al. Role of leukotrienes on hepatic ischemia/reperfusion injury in rats. *Journal of Surgical Research*. 2004; 119(1): 14–20
62. Ozaki M, Deshpande SS, Angkeow P et al. Inhibition of the Rac1 GTPase protects against non-lethal ischemic/ reperfusion-induced necrosis and apoptosis in vivo. *FASEB J.* 2000; 14: 418–429.
63. El-Wahsh M, Seifalian AM, Fuller BJ et al. Induction of adhesion molecule expression in liver ischemia-reperfusion injury is associated with impaired hepatic parenchymal microcirculation. *British Journal of Surgery*. 2004;91(8):1034–1039
64. Smith CW, Jaeschke H. Intercellular adhesion molecule-1 (ICAM-1) expression and its role in neutrophil-induced ischemia-reperfusion injury in rat liver. *Journal of Leukocyte Biology* .1995; 57:368–374
65. Gustavo MM, Toledo-Pereyra LH, McDuffie E et al. L-Selectin and chemokine response after liver ischemia and reperfusion. *Journal of Surgical Research* 2000; 93:156–162
66. Pober JS. Cytokine-mediated activation of vascular endothelium: physiology and pathology. *American Journal of Pathology*. 1998;133:426–433
67. Marubayashi S, Oshiro Y, Fukuma A et al. Protective effect of monoclonal antibodies to adhesion molecules on rat liver ischemia-reperfusion injury. *Transplantation Proceedings*. 1999; 31: 1054–1058
68. Okaya T, Lentsch A. Cytokine cascades and the hepatic inflammatory response to ischemia and reperfusion. *Journal of Investigative Surgery*, 2003; 16:141–147
69. Jaeschke H, Farhood A. Kupffer cell activation after no-flow ischemia versus hemorrhagic shock. *Free Radical Biology & Medicine*. 2002; 33(2):210–219
70. Nakamitsu A, Hiyama E, Imamura Y et al. Kupffer cell function in ischemic and nonischemic livers after hepatic partial ischemia/reperfusion. *Surgery Today*. 2001; 31:140–148
71. Lee Y.G, Lee S.H, Lee S.M. Role of Kupffer cells in cold/warm ischemia-reperfusion injury of rat liver *Archives of Pharmacal Research*.2000;23(6):620–625

72. Vollmar B, Rüttinger D, Wanner G.A et al. Modulation of Kupffer cell activity by gadolinium chloride in endotoxemic rats. *Shock*.1996;6(6): 434–441
73. Vollmar B, Glasz J, Leiderer R et al. Hepatic microcirculatory perfusion failure is a determinant of liver dysfunction in warm ischemia–reperfusion. *American Journal of Pathology*. 1994; 145: 1421–1431.
74. Cutrin J.C, Perrelli MG, Cavalieri B et al. Microvascular dysfunction induced by reperfusion injury and protective effect of ischemic preconditioning. *Free Radical Biology & Medicine*, 2002; 33(9): 1200–1208
75. Khandoga A, Biberthaler P, Messmer K, Krombach F. Platelet– endothelial cell interactions during hepatic ischemia–reperfusion in vivo: a systematic analysis. *Microvascular Research*. 2003; 65: 71–77
76. Koepfel TA, Thies JC, Schemmer P. Inhibition of nitric oxide synthesis in ischemia/reperfusion of the rat liver is followed by impairment of hepatic microvascular blood flow. *Journal of Hepatology*. 1997; 27: 163–169.
77. Jones SM, Thurman RG. L-arginine minimizes reperfusion injury in a low-flow, reflow model of liver perfusion. *Hepatology* 1996; 24: 163–168.
78. Dhar DK, Yamanoi A, Ohmori H. Modulation of endothelin and nitric oxide: a rational approach to improve canine hepatic microcirculation. *Hepatology* 1998; 28: 782–788.
79. Nauta RJ, Tsimoyiannis E et al. The role of calcium channel entry blockers in experimental ischemia-reperfusion induced liver injury. *Ann surg*. 1991; 213(2) : 137-142)
80. Öztürk Feral. Apoptoz. İnönü Üniversitesi Tıp Fakültesi Dergisi. 2002; 9(2): 143–148
81. Krishnaswamy K, Sushil K. Oxidative stress and apoptosis. *Pathophysiology* 2000; 7(27): 153–163
82. Rudiger HA, Graf R, Clavien PA. Liver ischemia: Apoptosis as a central mechanism of injury. *Journal of Investigative Surgery*. 2003; 16:149–159
83. Tsuchiya T, Abe T, Saito T, et al. Induction of immediate early genes and apoptosis after ischemia/reperfusion in fatty liver rats. *Transplantation Proceedings*. 1998;30(7):2919–2922



84. Rudiger H, Clavien P-A. Tumor necrosis factor-alpha, but not Fas, mediates hepatocellular apoptosis in the murine ischemic liver. *Gastroenterology*. 2002;122:202–210.
85. Gao W, Bentley RC, Madden JF, Clavien PA. Apoptosis of sinusoidal endothelial cells is a critical mechanism of prevention of injury in rat liver transplantation. *Hepatology* 1998; 27: 1652–1660.
86. Cursio R, Gugenheim J, Ricci JE, Crenesse D, Rostagno P, Maulon L. A caspase inhibitor fully protects rats against lethal normothermic liver ischemia by inhibition of liver apoptosis. *FASEB J*. 1999; 13: 253–61.
87. Kohli V, Selzner M, Madden JF, Bentley RC, Clavien PA. Endothelial cell and hepatocyte deaths occur by apoptosis after ischemia-reperfusion injury in the rat liver. *Transplantation* 1999; 67: 1099–105.
88. Kelly KJ, Sandoval RM, Dunn KW et al. A novel method to determine specificity and sensitivity of the TUNEL reaction in the quantitation of apoptosis. *American Journal of Physiology - Cell Physiology*. 2003;284(5):1309–1318
89. Gujral JS, Bucci TJ, Farhood A, Jaeschke H. Mechanism of cell death during warm hepatic ischemia-reperfusion in rats: apoptosis or necrosis? *Hepatology* 2001; 33:397-405
90. Topaloğlu S, Abbasoğlu O, Ayhan A, Sökmensuer C, Kılınç K. Antiapoptotic and protective effects of roscovitine on ischemia- reperfusion injury of the rat liver. *Liver International* 2003; 23:300-307
91. Şener G, Tosun O, Şehirli Ö et al. Melatonin and N-acetylcysteine have beneficial effects during hepatic ischemia and reperfusion. *Life Sciences* 2003; 72: 2707-2718
92. Shinoda M, Shimazu M, Wakabayashi G, Tanabe M, Hoshino K, Kitajima M. Microcirculation, tumor necrosis factor, and ischemic/reperfusion injury of the liver. *Journal of Gastroenterology and Hepatology*.2002; 17:1211–1219
93. Nadig N.S, Periyasamy B, Shafizadeh S.F et al. Hepatocellular ultrastructure after ischemia/reperfusion injury in human orthotopic liver transplantation. *Journal of Gastrointestinal Surgery*. 2004;8(6): 695–700
94. Tan S, Yokayama Y, Wang Z, et al. Hypoxia-reoxygenation is as damaging as ischemia-reperfusion in the rat liver. *Critical Care Medicine* 1998; 26(6):1089-1095

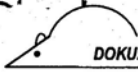
95. Jaeschke H. Reactive oxygen and mechanisms of inflammatory liver injury. *Journal of Gastroenterology and Hepatology*. 2000; 15:718-724
96. Reiter RJ. Interactions of the pineal hormone melatonin with oxygen-centered free radicals: a brief review. *Brazilian Journal Medicine Biology Research*. 1993, 26: 1141-1155
97. Pahkla R, Zilmer M, Kullisaar T, Rago L. Comparison of the antioxidant activity of melatonin and pinoline in vitro. *J Pineal Res* 1998, 24: 96-101.)
98. Sewerynek E, Reiter RJ, Melchiorri D, Ortiz GG, Lewinski A. Oxidative damage in the liver induced by ischemia reperfusion: Protection by melatonin. *Hepatogastroenterology* 1996, 43: 898-905.
99. Pierrefiche G, Topall G, Courboin G, Henriet I, Laborit H. Antioxidant activity of melatonin in mice. *Res Commun Chem Pathol Pharmacol* 1993, 80: 211-223.)
100. Hardeland R, Reiter RJ, Poeggeler B, Tan D-X. The significance of the metabolism of the neurohormone melatonin: Antioxidative protection and formation of bioactive substances. *Neuroscience Biobehavioral Rev* 1993, 17: 347–357
101. Beyer CE, Steketee JD, Saphier D. Antioxidant properties of melatonin-an emerging mystery. *Biochem Pharmacol* 1998, 56: 1265-1272
102. Reiter RJ. Melatonin: clinical relevance. *Best Pract Research Clinic Endocrinology Metabolism*. 2003, 17:273-285
103. Bergmeyer J. *Methods of Enzymatic Analysis*. Third Edition. Germany, VCH Publishers, 1990; 521-529
104. Krawisz JE, Sharon P, Stenson WF. Quantitative assay of acute intestinal inflammation based on myeloperoxidase activity. Assessment of inflammation in rat and hamster models. *Gastroenterology*, 1984, 87: 1344—1350.
105. Ohkawa H, Ohihi N, Yagi K. Assay for lipid peroxides in animal tissues by thiobarbituric acid reaction. *Anal Biochem* .1979, 95: 351–358
106. Nina E. Saxton, Johanna L. Barclay, Andrew D. Clouston, Jonathan Fawcett. Cyclosporin A pretreatment in a rat model of warm ischaemia/reperfusion injury. *Journal of Hepatology* 2002, 36: 241–247
107. Topaloğlu S, Abbasoglu O, Ayhan A, Sokmensuer C, Kılınç K. Antiapoptotic and protective effects of roscovitine on ischemia-reperfusion injury of the rat liver. *Liver International* 2003, 23:300–307

108. Baykara B, Tekmen I. Karaciğer İskemi Reperfüzyon Hasarı. Dokuz Eylül Üniversitesi Tıp Fakültesi Dergisi. 2005, 3:185–194
109. Crockett Elahé T , Galligan James J , Uhal Bruce D, Harkema Jack et al. Protection of early phase hepatic ischemia-reperfusion injury by cholinergic agonists. BMC Clinical Pathology 2006, 6:3:1-13
110. Ingloft S.Ferdinand , Virlos T Ioannis , Habib A Nagy, Williamson CN Robin et al. Adenosine preconditioning attenuates hepatic reperfusion injury in the rat by preventing the down-regulation of endothelial nitric oxide synthase BMC Gastroenterology 2002, 2; 22:1-6
111. Peralta Carmen, Bartrons Ram´On, Serafin Anna, Bl´Azquez Cristina, et al. Adenosine Monophosphate–Activated Protein Kinase Mediates the Protective Effects of Ischemic Preconditioning on Hepatic Ischemia-Reperfusion Injury in the Rat. Hepatology. 2001, 34 (6):1164-1173
112. Tata Vincenzo de, Brizi Stefania, Saviozzi Michela, Lazzarotti Alessandra et al. Protective Role Of Dehydroascorbate In Rat Liver Ischemia-Reperfusion Injury Journal of Surgical Research. 2005, 123 (2 ): 215-221
113. Okatani Yuji, Wakatsuki Akihiko, Enzan Hideaki, Miyahara Yasuyo. Edaravone protects against ischemia/reperfusion-induced oxidative damage to mitochondria in rat liver. European Journal of Pharmacology 2003, 465:163-170
114. Boldyrev A, Bulygina E, Leinsoo T, Petrushanko I, Tsubone Shiori, Abe H. Protective of neuronal cells against reactive oxygen species by carnosine and related compounds. Comparative Biochemistry and Physiology Part B. 2004; 137:81-88
115. Hipkiss AR. Carnosine, a protective, anti-ageing peptide? The International Journal of Biochemistry & Cell Biology 1998, 30: 863-868
116. Lee JW, Miyawaki H, Bobst EV, Hester JD et al. Improved functional Recovery of Ischemic Rat Hearts due to singlet Oxygen Scavengers Histidine and Carnosine. J Mol Cell Cardiol 1999, 31:113-121
117. Kang KS, Yun JW, Lee YS Protective effect of L-carnosine against 12-O-tetradecanoylphorbol-13-acetate –or hydrogen peroxide-induced apoptosis on v-myc transformed rat liver epithelial cells. Canser Letters 2002, 178: 53-62

118. Kaçmaz A, User EY, Şehirli AÖ, Tilki M et al. Protective effect of melatonin against Ischemia/reperfusion-induced oxidative remote organ injury in the rat. *Surgery Today* 2005, 35:744-750
119. Saxton Nina E., Barclay Johanna L., Clouston Andrew D., Fawcett Jonathan Cyclosporin A pretreatment in a rat model of warm ischaemia/reperfusion injury. *Journal of Hepatology* 2002, 36:241–247
120. Sun Kai, Liu Zhi-Su, Sun Quan. Role of mitochondria in cell apoptosis during hepatic ischemia-reperfusion injury and protective effect of ischemic postconditioning .*World Journal of gastroenterology* 2004;10(13):1934-1938
121. Prochazkova J, Kylarova D, Vranka P, Lichnovsky V. Comparative study of apoptosis-detecting techniques: TUNEL, apostain, and lamin B. *Biotechniques*. 2003 , 35(3): 528-534.

## EKLER

1



**DOKUZ EYLÜL ÜNİVERSİTESİ TIP FAKÜLTESİ DENEY HAYVANI ARAŞTIRMALARI ETİK KURULU**

35340, Inciraltı, İzmir-232 2777777-2254  
<http://tip.deu.edu.tr/etik/deneyetik/>

**Sayı** :01  
**Tarih** :06.02.2004  
**Toplantı No** :04/01/01  
**Toplantı Tarihi** :27.01.2004

### **DOKUZ EYLÜL ÜNİVERSİTESİ TIP FAKÜLTESİ DEKANLIĞINA**

Histoloji-Embriyoloji Anabilim Dalı Araştırma Görevlilerinden Dr. Başak BAYKARA'nın sorumlusu olduğu 109 Protokol Nolu "Karaciğer İskemi-Reperfüzyon Hasarında Melatonin ve Carnosine'in Koruyucu Etkisi" isimli projeye ait istenen bilgiler kurulumuza ulaşmış ve uygun görülmüştür.

**Prof. Dr. Atay ATABEY**  
**Deney Hayvanı Araştırmaları**  
**Etik Kurul Başkanı**