

T.C.
ORDU ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
TIBBİ BİYOKİMYA ANABİLİM DALI

**NON ALKOLİK YAĞLI KARACİĞER
OLUŞTURULMUŞ RATLARDA
TRİMETAZİDİN'İN SICAK İSKEMİ
REPERFÜZYON HASARINA KARŞI KORUYUCU
ETKİSİNİN ARAŞTIRILMASI**

YÜKSEK LİSANS TEZİ

Burhanettin Sertaç AYHAN

Anabilim Dalı

Tıbbi Biyokimya

TEZ DANIŞMANI

Prof. Dr. Tefvik NOYAN

**Bu araştırma Ordu Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi
Tarafından 2015/TT-1501 proje numarası ile desteklenmiştir.**

ORDU-2018

ONAY

Ordu Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü öğrencisi Burhanettin Sertaç AYHAN tarafından hazırlanan ve Prof. Dr. Tefvik NOYAN danışmanlığında yürütülen “*Non Alkolik Yağlı Karaciğer Oluşturulmuş Ratlarda Trimetazidin’in Sıcak İskemi Reperfüzyon Hasarına Karşı Koruyucu Etkisinin Araştırılması*” adlı bu tez, jürimiz tarafından 20/07/2018 tarihinde oybirliği ile Tıbbi Biyokimya Anabilim Dalı Tıbbi Biyokimya Tezli Yüksek Lisans Programında Yüksek Lisans tezi olarak kabul edilmiştir.

Tez Danışmanı : Prof. Dr. Tefvik NOYAN

Başkan : Prof. Dr. Tefvik NOYAN
Tıbbi Biyokimya Anabilim Dalı
Ordu Üniversitesi

İmza.....

Jüri Üyesi : Prof. Dr. Sembol YILDIRMAK
Tıbbi Biyokimya Anabilim Dalı
Giresun Üniversitesi

İmza.....

Jüri Üyesi : Doç. Dr. Ahmet BAYRAK
Tıbbi Biyokimya Anabilim Dalı
Ordu Üniversitesi

İmza.....

ONAY

... / ... / 20... tarihinde enstitüye teslim edilen bu tezin kabulü, Sağlık Bilimleri Enstitüsü Yönetim Kurulu'nun .../.../ 20... tarih ve sayılı kararı ile onaylanmıştır.

.../.../ 20...

Enstitü Müdürü

Doç. Dr. Alparslan İNCE

TEZ BİLDİRİMİ

Tez yazım kurallarına uygun olarak hazırlanan bu tezin yazılmasında bilimsel ahlak kurallarına uyulduğunu, başkalarının eserlerinden yararlanılması durumunda bilimsel normlara uygun olarak atıfta bulunulduğunu, tezin herhangi bir kısmının bu üniversite veya başka bir üniversitedeki başka bir tez çalışması olarak sunulmadığını beyan ederim.

Burhanettin Sertac AYHAN



TEŞEKKÜR

Yüksek lisans eğitim sürecim boyunca katkılarından dolayı, değerli tez danışman hocam Prof. Dr. Tefvik NOYAN'a, tez çalışmalarım esnasında bana her türlü desteği sağlayan Doç. Dr. Sevil IŞIK ve Doç. Dr. Sibel Köktürk'e, yüksek lisans eğitim süreci boyunca tecrübelerini benimle paylaşan hocalarım, Doç. Dr. Ahmet BAYRAK ve Doç. Dr. Tülin BAYRAK'a, sadece yüksek lisans eğitimim değil hayatımın her anında yanımda olan, desteğini esirgemeyen eşim Ayőe AYHAN'a ve Tıbbi Biyokimya Anabilim Dalı yüksek lisans arkadaşlarım, Ayhan SET, Cansu Can FİGEN, Kevser GÜNKUR ve Büőra YILDIZ'a değerli dostlukları için sonsuz teşekkür ederim.



ÖZET

Non Alkolik Yağlı Karaciğer Oluşturulmuş Ratlarda Trimetazidin'in Sıcak İskemi Reperfüzyon Hasarına Karşı Koruyucu Etkisinin Araştırılması

Amaç: Bu çalışmada; deneysel oluşturulan NAFL modelinde sıcak iskemi reperfüzyona bağlı oluşan hasara karşı Trimetazidin'in (TMZ) koruyucu etkisinin araştırılması amaçlanmıştır.

Gereç ve Yöntem: Çalışmada 32 adet rat kullanıldı. Ratlar; Grup 1 (kontrol grubu, n=6), yüksek yağlı diyetle beslenen Grup 2 (Sham grubu, n=6), yüksek yağlı diyetle beslenen ve sıcak iskemi/reperfüzyon oluşturulan Grup 3 (n=10) ve yağlı karaciğer iskemi/reperfüzyon oluşturulan ve 10 mg/kg oral TMZ uygulanan grup 4 (n=10) olmak üzere 4 gruba ayrıldı. Ratlardan histopatolojik analiz için karaciğer dokusu ve biyokimyasal analiz için kan örnekleri toplandı. Serum MDA, NADPH Oksidaz, Cyt-C ve 8-OHdG ölçümleri ELISA, MPO ve CAT ölçümleri ise kolorometrik yöntemle gerçekleştirildi.

Bulgular: Grup 1'e göre, NADPH Oksidaz ve Cyt-C düzeyleri grup 2 ve grup 3'de anlamlı olarak artma ($p<0,001$), grup 4'de ise grup 2 ve 3'e göre anlamlı derecede azalma gösterdi. ($p<0,001$). CAT aktivitesi grup 1'e göre, grup 2 ve 3'de anlamlı olarak azalma ($p<0,001$), grup 4'de ise grup 2 ve grup 3'e göre anlamlı artma gösterdi ($p<0,001$). MPO aktivitesinin grup 1'e göre, grup 2 ($p<0,05$) ve 3' ($p<0,001$) de anlamlı olarak arttığı, grup 4'de ise grup 3'e göre ise anlamlı olarak düştüğü tespit edilmiştir ($p<0,001$). MDA ve 8-OHdG düzeylerinde ise gruplar arasında anlamlı farklılık gözlemlenmedi ($p>0,05$). Histopatolojik olarak ise grup 3'de hücre grupları şeklinde hepatosit hasarı gözlemlenirken, grup 4'de sinüzoidlerin dilatasyonu, inflamasyon ve hepatik plakların yapısal bütünlüğünde grup 3'e göre düzelme gözlenmiştir.

Sonuç: Bu çalışmada, TMZ uygulamasının NAFLD'de sıcak iskemi reperfüzyona bağlı oluşan oksidatif hasara karşı antioksidan savunma mekanizmasına olumlu yönde artırıcı katkıda bulunduğu ve mitokondri bütünlüğünü koruyarak hücrelerin sağ kalımına destek sağladığı gösterilmiştir.

Anahtar Kelimeler: İskemi/ reperfüzyon hasarı, NAFL, Oksidatif hasar, Trimetazidine

ABSTRACT

The Invergation Of the Protective Effect of Trimetazidine Against Hot Ischemia Reperfusion Damage in Rats with Non Alcoholic Fatty Liver

Aim: In this study; it was aimed to investigate the protective effect of Trimetazidine (TMZ) against damage caused by hot ischemia reperfusion in NAFL model formed as experimental.

Material and Method: In this study, 32 rats were used. Rats were separated into 4 groups. These groups are group 1 (control group, n = 6), group 2 (sham group, n = 6) that was fed with a high fat diet, group 3 (n = 10) that was fed with a high fat diet and warm ischemia / reperfusion was created and group 4 (n = 10) that fatty liver ischemia / reperfusion was created and treated with 10 mg / kg oral TMZ. Blood samples for liver tissue and biochemical analysis were collected for histopathological analysis from rats. The measurement of Serum MDA, NADPH Oksidaz, Cyt-C and 8-OHdG was implemented by ELISA method, and the measurement of MPO and CAT was implemented by colorimetric method.

Finding: Compared to Group 1, NADPH Oxidase and Cyt-C levels of Group 2 and 3 showed significantly increase ($p < 0.001$), while in group 4, there was a significant decrease compared to groups 2 and 3 ($p < 0.001$). It was detected that CAT activity decreased significantly in group 2 and 3 compared to group 1, ($p < 0.001$) and it significantly increased in group 4 compared to group 2 and group 3 ($p < 0.001$). It was also detected that MPO activity significantly increased in group 2 ($p < 0,05$) and group 3' ($p < 0.001$) compared to group 1 and it significantly decreased in group 4 compared to group 3 ($p < 0.001$). There was no significant difference between MDA and 8-OHDG levels ($p > 0.05$). As histopathological, hepatocyte damage was observed in the form of cell groups in group 3, whereas in group 4, the improvement was observed in the dilatation of sinusoids, inflammation and the structural integrity of hepatic plaques compared to in group 3.

Conclusion: In this study it was demonstrated that TMZ application has positively been contributing to the antioxidant defense mechanism against oxidative damage developed by hot ischemia reperfusion in NAFLD, and has supported the survival of cells by protecting mitochondrial integrity.

Anahtar Kelimeler: Ischemia/Reperfusion Damage, NAFL, Oxidative Damage, Trimetazidine.

İÇİNDEKİLER

Sayfa No

İÇ KAPAK SAYFASI.....	
ONAY.....	
TEZ BİLDİRİMİ.....	I
TEŞEKKÜR.....	II
ÖZET.....	III
ABSTRACT.....	IV
İÇİNDEKİLER.....	V
ŞEKİLLER DİZİNİ.....	VII
TABLolar DİZİNİ.....	IX
SİMGELER ve KISALTMALAR DİZİNİ.....	X
1. GİRİŞ VE AMAÇ.....	1
2. GENEL BİLGİLER.....	4
2.1. İskemi-reperfüzyon (I/R).....	4
2.1.1. İskemi ve reperfüzyon hasarında yer alan mekanizmalar.....	5
2.1.1.1. pH paradoksu.....	6
2.1.1.2. Lökosit-endotel hücre etkileşimi.....	6
2.1.1.3. Nitrik oksit (NO).....	7
2.1.1.4. Kompleman sistem.....	8
2.1.1.5. Sitokinler.....	10
2.1.1.6. Serbest radikaller.....	11
2.1.1.6.1. Serbest radikal olan moleküller.....	11
2.1.1.6.2. Antioksidan enzimler.....	13
2.1.1.6.3. Serbest radikallerin biyomoleküller üzerine etkileri.....	15
2.1.1.7. Pürin metabolizması.....	21
2.1.1.8. Nikotinamid adenin dinükleotit fosfat oksidaz (NADPH oksidaz).....	22
2.1.1.9. Myeloperoksidaz (MPO).....	24
2.1.1.10. Apoptozis.....	25
2.2. Karaciğer yağlanması (Hepatosteatoz).....	28
2.2.1. Non-alkolik yağlı karaciğer hastalığı (NAFLD).....	29
2.2.2. Non-alkolik steatohepatit (NASH).....	30
2.2.2.1. NASH'in etiyojisi.....	30

2.2.2.2. NASH'ın patogenezi.....	31
2.2.2.2.1. Çift vuruş hipotezi.....	31
2.3. Nafld olgularında karaciğer I/R hasarı.....	38
2.4. Trimetazidin.....	40
3. GEREÇ VE YÖNTEM.....	42
3.1. Deney hayvanları ve çalışma grupları.....	42
3.1.1. Standart ve yüksek yağlı diyet.....	42
3.2. Ratlara iskemi ve reperfüzyon uygulanması.....	43
3.3. Ağırlık ölçümleri.....	45
3.4. Parametrelerin çalışılmasında kullanılan yöntemler.....	45
3.4.1. Serumda Katalaz (CAT) tayini.....	45
3.4.2. Serumda Miyeloperoksidaz aktivitesi tayini.....	46
3.4.3. Serumda Sitokrom-C (Cyt-C) tayini.....	47
3.4.4. Serumda NADPH Oksidaz tayini.....	49
3.4.5. Serumda Malondialdehit (MDA) tayini.....	52
3.4.6. Serumda 8-Hidroksi Guanozin (8-OHdG) tayini.....	54
3.4.7. Serum ALT ve AST tayini.....	57
3.5. Karaciğer dokusu histopatolojik değerlendirmesi.....	57
3.6. İstatistik değerlendirme.....	58
4.BULGULAR.....	59
4.1. Gruplar arası ağırlık karşılaştırılması.....	59
4.2. Serumda CAT ve MPO aktivitelerinin karşılaştırılması.....	60
4.3. Serumda NADPH oksidaz ve MDA düzeylerinin karşılaştırılması.....	61
4.4. Serumda Cyt-C ve 8-OHdG düzeylerinin karşılaştırılması.....	63
4.5. Serumda AST ve ALT düzeylerinin karşılaştırılması.....	65
4.6. Çalışmaya katılan ratların histopatolojik bulguları.....	66
5. TARTIŞMA.....	73
6. SONUÇ VE ÖNERİLER.....	86
KAYNAKLAR.....	88
EKLER.....	112
Ek-1. Etik Kurul İzni.....	112
ÖZGEÇMİŞ.....	114

ŞEKİLLER DİZİNİ

	Sayfa No
Şekil 2.1. Hepatik iskemi reperfüzyon hasarında yer alan mekanizmalar	5
Şekil 2.2. Kompleman sistemin meydana geliş yolakları	9
Şekil 2.3. Serbest radikallerin hücrel etkileri	15
Şekil 2.4. MDA oluşumu	17
Şekil 2.5. OH [•] radikalinin Guanin bazına saldırması	19
Şekil 2.6. Poliol yolu	20
Şekil 2.7. İskemi-reperfüzyonda pürin metabolizmasının rolü	22
Şekil 2.8. NADPH oksidazın'ın iskemi-reperfüzyonda aktivite kazanma mekanizması	23
Şekil 2.9. MPO tarafından oluşturulan reaktif ürünler	25
Şekil 2.10. Cyt-C salınımı sonucu apoptosiz oluşumu	27
Şekil 2.11. NAFLD evrelerinin şematik gösterimi	29
Şekil 2.12. Çift vuruş hipotezinin şematik gösterimi	31
Şekil 2.13. Fruktoz metabolizması	35
Şekil 2.14. Trimetazidin kimyasal formülü	40
Şekil 3.1. Normal ve yüksek yağlı diyetle beslenen ratların karşılaştırılması	43
Şekil 3.2. Ratlara karaciğer iskemi-reperfüzyon uygulanişı	44
Şekil 3.3. Sitokrom-C absorbans- konsantrasyon grafiği	49
Şekil 3.4. NADPH oksidaz absorbans- konsantrasyon grafiği	51
Şekil 3.5. Malondialdehit absorbans- konsantrasyon grafiği	54
Şekil 3.6. 8-Hidroksi Guanozin absorbans- konsantrasyon grafiği	56
Şekil 4.1. Çalışmaya katılan ratların ağırlıklarının şematik olarak gösterimi	59

Şekil 4.2. Çalışmaya katılan ratların CAT aktivitelerinin şematik olarak gösterimi	60
Şekil 4.3. Çalışmaya katılan ratların MPO aktivitelerinin şematik olarak gösterimi	61
Şekil 4.4. Çalışmaya katılan ratların NADPH oksidaz düzeylerinin şematik olarak gösterimi	62
Şekil 4.5. Çalışmaya katılan ratların MDA düzeylerinin şematik olarak gösterimi	63
Şekil 4.6. Çalışmaya katılan ratların Cyt-C düzeylerinin şematik olarak gösterimi	64
Şekil 4.7. Çalışmaya katılan ratların 8-OHdG düzeylerinin şematik olarak gösterimi	64
Şekil 4.8. Çalışmaya katılan ratların serum AST ve ALT düzeylerinin şematik olarak gösterimi	65
Şekil 4.9. Kontrol grubunun histolojik yapısı	67
Şekil 4.10. Kontrol grubunun histolojik yapısı	67
Şekil 4.11. Sham grubunda şiddetli dilatasyon	68
Şekil 4.12. Sham grubunda veziküler lipid dejenerasyonu	68
Şekil 4.13. Sham grubunda apoptozise giden hepatosit hücreleri	69
Şekil 4.14. Yağlı karaciğer İskemi/ reperfüzyon grubunda makroveziküler steatosis alanı	69
Şekil 4.15. Yağlı karaciğer İskemi/ reperfüzyon grubunda veziküler lipid dejenerasyonu	70
Şekil 4.16. Yağlı karaciğer İskemi/ reperfüzyon grubunda Portal alan çevresinde veziküler lipid dejenerasyonu	71
Şekil 4.17. Yağlı karaciğer İskemi/ reperfüzyon grubunda dilate olmuş sinüzoidler	71
Şekil 4.18. TMZ tedavi edilen ve iskemi/reperfüzyon grubunda makroveziküler steatosis	72
Şekil 4.19. TMZ tedavi edilen ve iskemi/reperfüzyon grubunda mikroveziküler steatosis	72

TABLULAR DİZİNİ

	Sayfa No
Tablo 2.1. Karaciğer yağlanma nedenleri.....	28
Tablo 2.2. Obezitenin dokularda meydana getirdiği değişimler.....	34
Tablo 4.1. Çalışmaya katılan ratların ilk ve son ağırlıkları.....	59
Tablo 4.2. Serum CAT ve MPO aktivitelerinin karşılaştırılması.....	60
Tablo 4.3. Serum NADPH oksidaz ve MDA düzeylerinin karşılaştırılması.....	61
Tablo 4.4. Serum Cyt-c ve 8-OHdG düzeylerinin karşılaştırılması.....	63
Tablo 4.5. Serum AST ve ALT düzeylerinin karşılaştırılması.....	65



SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ

3-KAT	:3-ketoaçıl-CoA tiyolaz
8-OHdG:	:8-hidroksi-2'-deoksiguanozin
AFLD:	:Alkolik yağlı karaciğer hastalığı
ALT	:Alanin amino transferaz
APAF-1	:Apoptotik proteaz aktivasyon faktörü
AST	:Aspartat amino transferaz
ATP	:Adenozin trifosfat
CAT	:Katalaz
Cyt-C	:Sitokrom-C
CPT-1	:Karnitin açıl transferaz-1
CPT-2	:Karnitin açıl transferaz-2
ELISA	:Enzim linked immunosorbent assay
ETS	:Elektron taşıma sistemi
ER	:Endoplazmik retikulum
GSH-Px	:Glutasyon peroksidaz
GSS-R	:Glutasyon reduktaz
HIF-1 α	:Hipoksi uyarılabilir faktör-1 α
I/R	:İskemi / Reperfüzyon
ICAM-1	:Hücre içi adhezyon molekülü-1
IL-1	:Interlokin-1
IL-6	:Interlokin-6
KS	:Kompleman sistem
LTB4	:Lökotrien B-4
MCD	:Metionin-kolinden yoksun diyet
MCP-1	:Monosit kemoatraktan protein 1
MDA	:Malondialdehit
MPO	:Myeloperoksidaz
NAD ⁺	:Nikotinamid adenindinükleotid
NAFLD	:Non-alkolik yağlı karaciğer hastalığı
NASH	:Non-alkolik steatohepatit

NO	:Nitrik oksit
NADPH oksidaz	: Nikotinamid adenin dinükleotit fosfat oksidaz
PAF	:Trombosit aktive edici faktör
PDH	:Piruvat dehidrogenaz
PECAM-1	:Platelet endotel hücre yapışma proteini-1
PHD2	:Prolil hidoksilaz 2
PPAR γ	:Peroksizom çoğlatıcı aktifleştirilmiş reseptör γ
PMNL	:Polimorf nüveli lökositler
PSGL-1	:P-selektin glikoprotein reseptörü 1
PUFA	:Çoklu doymamış yağ asitleri
ROT	:Reaktif oksijen türleri
SREBP1	:Sterol düzenleyici element bağlayan protein 1
SYA	:Serbest yağ asitleri
TAG	:Triaçilgliserol
TMZ	:Trimetazidin
TNF- α	:Tümör nekroz faktör α
XDH	:Ksantin dehidrogenaz
XOR	:Ksantin oksidoredüktaz
XO	:Ksantin oksidaz
VLA ₄	:Çok geç antijen 4

1. GİRİŞ

İskemi reperfüzyon (I/R) hasarı; şok, kalp yetmezliği, doku rezeksiyonu, hepatektomi ve organ nakilleri gibi çeşitli tıbbi ve cerrahi girişimler sırasında görülen potansiyel olarak ciddi bir durumdur. I/R hasarı, hücre ve doku hasarına neden olan karmaşık bir dizi olayı temsil eder. Kan akımı ve oksijenin geçici yoksunluğu sonucu, reaktif oksijen türlerinin (ROT), sitokinlerin ve kemokinlerin eşzamanlı salınması, yeniden kan akımının sağlanması (reperfüzyon) sırasında kan akışının geri dönüşümü ve bunun sonucunda oluşan hücresel ve organsal fonksiyon bozukluğu ile adhezyon moleküllerinin seviyelerinin artışı, süreçten sorumlu başlıca mekanizmalardır (Andrew ve ark., 2008).

I/R hasarı iki yönden etkili olmaktadır. Bunlardan birincisi iskemi sırasında, dokulara oksijen ve besin maddelerinin iletilmesindeki yetersizlik sonucu hücresel adenosin trifosfat (ATP) üretimi azalır ve bunun sonucunda hücreler anaerobik solunuma yönelir. Buna bağlı olarak hücre içine kalsiyum (Ca^{2+}) girişi artar ve nitrik oksit (NO) üretimi azalır, hücre içi pH seviyeleri düşer. Bu durumdan en çok etkilenen organel mitokondridir (Kalogeris ve ark., 2016).

Hücre için asıl hasar ikinci durumda gerçekleşir. Reperfüzyon sonucunda ortamdaki ani oksijen miktarındaki artışlar, iskemik ortama uyum sağlamış hücrelerin ROT saldırısına karşı savunmasız kalmasına ve reperfüzyona bağlı hücre içi pH artışı sonucu, pH bağımlı fosfolipazların ve proteazların aktifleştirilmesine bağlı hücre ölümleri meydana gelir (Lien ve ark., 2003).

I/R hasarına ilişkin yapılan çalışmalarda, kısa süreli I/R uygulanmasının, uzun süreli iskemi durumlarının olumsuz etkilerini hafiflettiği gösterilmiş ve buna iskemik ön koşullanma adı verilmiştir. Bu iskemik ön koşullanmayı taklit eden birçok farmakolojik ajan kullanılarak çeşitli araştırmalar yapılmasına karşın, I/R hasarının önlenmesine yönelik çalışmalarda, ortak bir görüş birliğine varılamamıştır.

Non Alkolik Yağlı Karaciğer Hastalığı (NAFLD); insülin direnci, obezite, hiperlipidemi ve oksidatif stres ile ilişkili bir hastalıktır. Bu tanım aşırı miktarda alkol tüketimine bağlı olarak gelişen alkolik karaciğer yağlanması (AFLD) ayırmak için kullanılmıştır. NAFLD’de alkol alımı olmaması ya da az düzeyde alkol alınmasına karşı, AFLD’deki komplikasyonların görülmesi bu tanıyı zorunlu kılmıştır (Li ve ark., 2015).

NAFLD basit steatozdan, non-alkolik steatohepatit (NASH), fibrozise hatta siroza kadar ilerleyen geniş bir klinik durumunun genel adıdır. NAFLD’nin her evresinde steatotik karaciğer mevcuttur. Hastalığın mekanizması tam aydınlatılmamış olmasına rağmen, metabolik sendrom olarak adlandırılan diyabet, obezite, hipertansiyon ve hiperlipideminin eşlik ettiği olgularda sık rastlanması NAFLD tedavisi için ip uçları sağlamıştır (Evelyn ve ark., 2017).

NAFLD’nin artan insidansı karaciğer vericilerinin kullanılabilirliğini azaltmaktadır. Her ne kadar steatotik karaciğer, nakil için bir karaciğer kaynağı olarak kabul edilse de NAFLD mevcudiyeti karaciğer ameliyatından sonra karaciğer hasarını şiddetlendirir (Yang ve ark., 2015). Yapılan çalışmalar, steatotik karaciğerlerin nakilden sonra normal karaciğerlere göre daha şiddetli akut I/R hasarıyla karşı karşıya kaldığını göstermektedir (Luo ve ark., 2011). Bu nedenle NAFLD’nin varlığı karaciğer cerrahi girişimleri sonrası morbidite ve mortalite riskini arttıran önemli bir unsurdur (Tashiro ve ark., 2014).

Trimetazidin (TMZ) anti iskemik bir piperazin türevidir (Nadkarni ve ark., 2015). Bu etkisini yağ asidi oksidasyonunun son basamağını kataliz eden 3-ketoasil-CoA tiyolazı (3-KAT) inhibe ederek ve sitrik asit siklusu enzimlerinden piruvat dehidrojenazı (PDH) doğrudan uyararak yapar (Liu ve ark., 2016). Yapılan birçok çalışma TMZ’nin iskemi sırasında ATP miktarını artırdığını, hücre içi pH düzeyinin düşmesini engellediği ve hücre içi Ca^{2+} girişini azaltarak mitokondriyal hasar üzerine koruyucu bir etkinlik gösterdiğini rapor etmiştir (Beşikçi ve Özkan, 2008).

Buna rağmen, NAFLD olgularında karaciğer cerrahi girişimleri sonucu oluşan I/R hasarına karşı TMZ'nin koruyucu etkinliğini üzerine yapılan araştırmalar yetersiz görölmektedir.

Bu çalışmada yüksek yağlı diyet ile NAFL modeli oluşturulmuş ratlarda, karaciğer I/R hasarına karşı TMZ'nin koruyucu etkinliğinin araştırılması amaçlanmıştır.



2. GENEL BİLGİLER

2.1. İskemi –reperfüzyon (I/R)

İskemi; Dokulara kan yoluyla ulaşan oksijen ve besinsel moleküllerin belirli bir nedenden ötürü ulaşımının engellenmesi olarak tanımlanmaktadır. Dokulara yeterli oksijenin iletilmemesi sonucunda, hücreler anaerobik yolu tercih eder ve hücre içi laktat birikimi sonucunda pH düzeyleri düşer (Siemionow ve Arslan, 2004). pH'nın düşmesi hücrelerdeki enzim kinetikleri üzerine olumsuz etkiler meydana getirir. Bu durumdan en çok etkilenen organellerden birisi de mitokondridir. Hücre içi asidoza bağlı olarak mitokondri membran geçirgenliği artar ve sitokrom-c (Cyt-C) salınımı oluşur. Bu da apoptozisin başlamasına katkıda bulunur (Wang ve ark., 2017). Ayrıca iskemi esnasında hücre içi enerji depolarının azalması sonucunda Na^+, K^+ -ATPaz pompasının inhibe olması sonucu, hücre içi Na^+ ve Ca^{+2} derişimlerinde artışlar meydana gelir (Green ve ark., 1989). İkincil haberci olarak görev yapan nitrik oksit düzeylerindeki değişimler de hücre bütünlüğünü olumsuz etkiler (Özkaya ve Koçdor, 2008).

Reperfüzyon; İskemiye uğramış olan dokunun kan akımı sağlanarak yeniden oksijenlendirilmesi olarak tanımlanır (Ortadeveci ve Öz 2017). İskemiye maruz kalan dokunun yeniden oksijenlendirilmesi, biriken toksik maddelerin uzaklaştırılması ve hücrel enerji düzeylerinin yükselmesi hücreler için hayati önem arz etmektedir (Bavarsad ve ark., 2018). Ancak, anaerobik şartlara uyum sağlamış iskemik hücreler, reperfüzyona bağlı yeniden oksijenlenmesi esnasında pH'nın asitlikten alkaliye doğru ani değişimi sonucu pH'a bağlımlı fosfolipazları ve proteazları aktifleştirek hücre ölümlerine neden olmaktadır. Ayrıca iskemik dokuda biriken toksik maddeler reperfüzyon esnasında diğer dokulara da ulaşarak oradaki hücreler için toksik etkiler meydana getirebilir (Baykara ve Tekmen, 2005).

2.1.1.1 pH paradoksu

Normal oksijenli ortamda, bağ doku oluşumunda önemli görevi olan prolil hidroksilaz 2 (PHD2), hipoksi uyarılabilir faktör-1 α (HIF-1 α)'yı hidroksilleyerek yıkımına sebep olur. İskemi sırasında hücrelerin oksijensiz kalması sonucu, prolil hidroksilaz 2 (PHD 2) inaktif olur ve HIF-1 α 'yı hidroksilleyemez. Bunun sonucu HIF-1 α hücrelerin oksijensiz ortamda yaşamalarına olanak sağlamak için glikolitik yol enzimlerinin düzeylerini artırır ve oksijensiz ortamda hücrel faaliyetlerin devam etmesini sağlar (Ruthenborg ark., 2014; Fukazawa ve ark., 2016).

Dokulara oksijen sağlanamaması sonucu anaerobik glikoliz hızı çok artar ve glikoliz yolağının son ürünü olan pirüvat, asetil-Co-A yerine laktat'a dönüşür. Laktat'ın birikmesi pH'nın sürekli düşmesine ve hücre içi asidoza neden olur. İskemiden sonra reperfüzyona geçiş, iskemik ortama alışmış hücreler için büyük bir sorundur. Çünkü reperfüzyon sonucu hücre içi pH'nın ani artışları iskemik hücrelerde pH'ya bağımlı bazı proteazları aktive ederek hücre ölümlerine bu da doku hasarlarına neden olur. Bu durum pH paradoksu olarak bilinir. Yapılan bazı çalışmalarda iskemik hücrelerin reperfüzyonu esnasında ortam pH'sının asidik tutulması hücre ölümünü azalttığını göstermiştir (Kalogeris ark., 2016).

2.1.1.2 Lökosit-endotel hücre etkileşimi

Dolaşımda lökositler ile endotel hücreleri arasında devamlı bir etkileşim vardır. I/R hasarı sonucu lökositlerin, inflamasyon bölgelerine tutunmaları için çeşitli faktörler işlev görür. Lökosit endotel etkileşiminde ilk görev alan mekanizma selektin ve seleketin ligandları arasında gerçekleşen düşük afiniteli bağlanmadır. Bu faktörlerden en önemlisi lektin benzeri adhezyon molekülünün bir üyesi olan P-selektindir. Endotel hücrelerinde P-selektin sentezi; ROT, sitokin, histamin ve trombin gibi uyarıların artışı sonucu derhal başlar. Polimorf nüveli lökositlerde (PMNL) bulunan P-selektin, P-selektin Glikoprotein (PSGL-1) reseptörü ile etkileşerek lökositlerin hücrelere yapışmasına neden olur (Uylaş, 2015).

Selektinlerin bu düşük afiniteli bağlantısı, lökositlerin endotel boyunca hızlı bir şekilde değil, adeta yuvarlanarak yavaş hareket etmesini sağlar. PMNL aktivasyonu sonucunda Lökosit beta₂ integrinleri olan CD11/CD18 sentezi artar. Bu integrinler CD11a/CD18, CD11b/CD18 ve CD11c/CD18 olmak üzere üç heterodimer şeklinde bulunurlar. Beta₂ integrinlerin her üç çeşidi, endotel hücrelerinde yer alan hücre içi adhezyon molekülüne (ICAM-1) sıkıca bağlanırlar. Ayrıca endotel hücrede yer alan vasküler hücre adhezyon molekülü (VCAM-1) de, lökositlerdeki çok geç antijen 4 (VLA₄) aracılığıyla ile bağlanır (Kılınç ve Kılınç, 2003).

Son aşamada bir başka protein olan trombosit endotel hücre yapışma proteini-1 (PECAM-1) nötrofillerin endoteller arasında geçişi olayında görev alır. Bu mekanizmalar sonucu lökosit adhezyonu ve agregasyonu gelişir. Aktive olmuş lökositler daha iç bölgelere doğru göç etmeye başlarlar ve burada lökosit aktivitesi sonucu serbest radikal miktarlarında artış, fosfolipaz A₂ aktivasyonu sonucu araşidonik asit metabolitlerindeki artışlar ve lizozomal enzimlerin serbestleşmesi sonucu endotel hasarı ve hücre ölümleri meydana gelmektedir (Gibbins, 2004).

2.1.1.3 Nitrik oksit (NO)

NO, renksiz bir gaz olup, serbest radikal özelliğine sahip basit bir moleküldür. 1970'li yıllarda sitoplazmik guanilat siklaz enzimini aktive ederek damar düz kaslarında gevşemeye neden olduğu bulunmuştur (Evora ve ark., 2012). NO, nitrik oksit sentaz (NOS) ailesinin indüklenebilir (iNOS), nöronal (nNOS) ve endotelial (eNOS) izoformları tarafından sentezlenir (Pradhan ve ark., 2018).

NO, normal fizyolojik şartlarda lökosit adhezyonunu engelleyici, vazodilatasyon ve hücre sinyal iletişimi gibi çeşitli rollerde görev alır. NOS inhibitörleri tarafından P-selektin düzeylerinin arttırıldığı çeşitli çalışmalarda gösterilmesi, NO'nun P-selektin sentezini inhibe ettiği düşüncesine yol açmış ve histokimyasal yöntemlerle desteklenmiştir (Parakaw ve ark., 2017). Bunun yanında başka bir adhezyon molekülü olan VCAM-1'in de NO tarafından baskılandığı bildirilmektedir (Khan ve ark., 1996).

I/R hasarı sonucu artmış serbest radikaller, NO ile tepkimeye girerek toksik bir molekül olan peroksinitrit üretimine neden olurlar. Oluşan peroksinitrit birçok amino asidi ve tiyol gruplarını nitrozasyonlayarak, tiyol bağımlı enzimlerin inaktifleşmesine neden olur. Örneğin; MnSOD bunlardan biridir. MnSOD'un peroksinitrit tarafından nitrozasyonu bu enzimin aktivitesini düşürerek anti oksidan savunma mekanizmasına hasar vermektedir. Üç aminoasitten oluşan bir protein olan glutasyon, peroksinitritin bu etkilerine karşı koruyucu rol üstlenebilir. Ancak hücreler peroksinitrite karşı glutasyonu kullanması sonucunda, hücrelerde indirgenmiş glutasyon düzeyinin düşmesine bu da hücrelerin artmış oksidatif strese karşı mücadelesinde direnç kaybetmesine neden olur (Megan ve ark., 2014).

2.1.1.4. Kompleman sistem

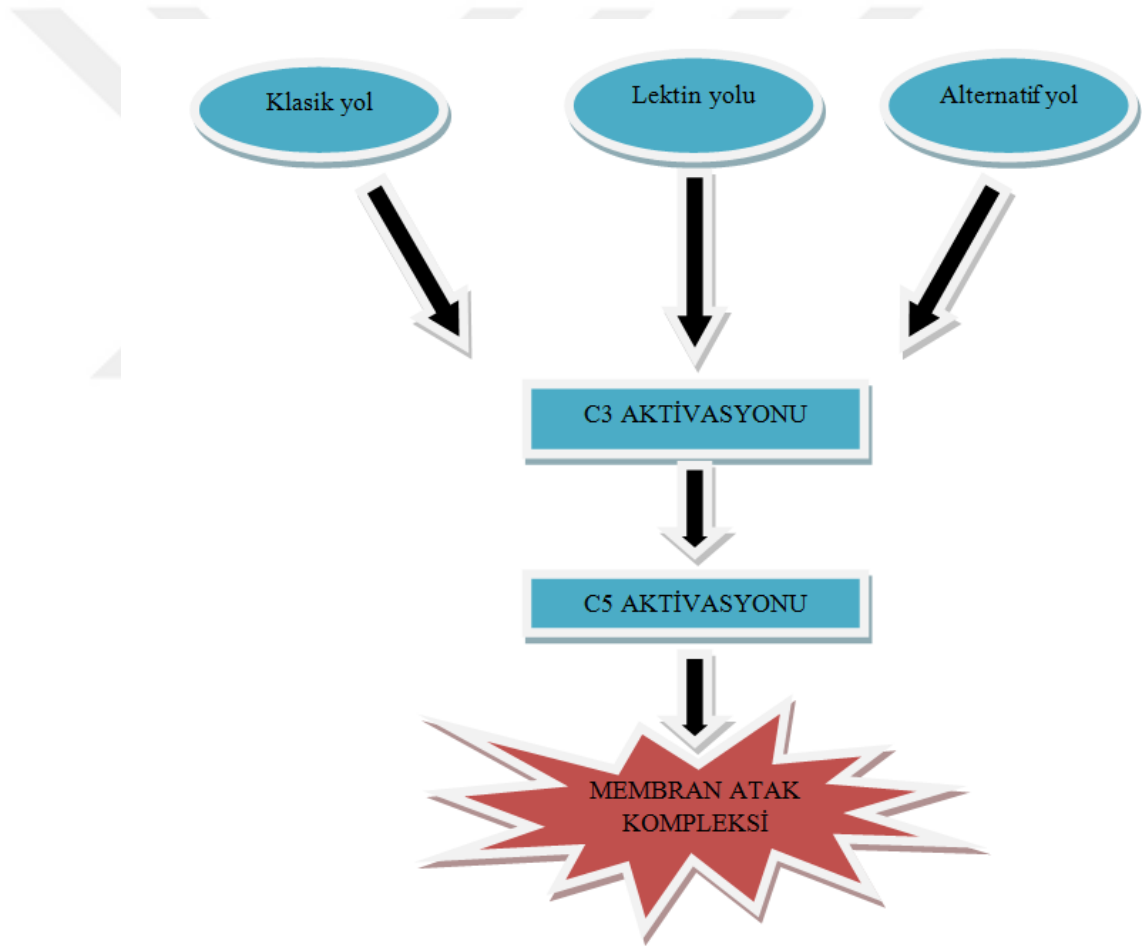
Kompleman sistem (KS); konağın savunmasında ve inflamatuvar olayların düzenlenmesinde görev alan bağışıklık sisteminin bir parçasıdır. Bu sistem normal koşullarda veya herhangi bir uyarın olmadığı sürece inaktiftir ve zimojen olan 30'dan fazla proteini barındırır. Herhangi bir uyarın durumunda ise ilk zimojen komponent aktive olur ve kendinden sonraki diğer inaktif komponentleri aktive ederek sanki bir şelale kaskadı oluşturur (Hammad ve ark., 2018).

KS üç yolla meydana gelir;

- 1- Klasik yol
- 2- Alternatif yol
- 3- Lektin yolu

Her üç yolda da amaç Şekil 2.2.'de görüleceği üzere komponent 5 (C5) aktivasyonunu sağlamaktır. Bu her üç yol sonucunda; opsonizasyon, kemotaksis ve membran atak kompleksi ile mikrobiyal ölüm gerçekleşmektedir. KS aktivasyonu sonucu üretilen proteinler C3a, C3b, C5a, C5b, C6, C7, C8 ve C9'dur (Ricklin ve ark., 2010).

KS'nin I/R hasarındaki moleküler mekanizması tam olarak çözülememiştir. Ancak bu komponentlerden bazıları inflamasyon şiddetini artırarak I/R hasarına katkıda bulunabileceği öngörülmüştür. Bunlardan özellikle C3a ve C5a gibi proteinler, opsonizasyon ve membran atak kompleksi gibi etkiler dışında, lökosit aktivasyonu, monosit kemoatraktan protein (MCP)- 1, TNF- α , IL-1 ve IL-6 gibi moleküllerin üretimini artırarak, inflamatuvar yanıtın gücünü arttırmaktadır. C5a monosit ve nötrofillerde araziidonik asit lipooksijenaz yolağını aktive etmektedir. Ayrıca KS aktivasyonu sonucu VCAM-1, ICAM-1, E-selektin ve P-selektin gibi birçok lökosit adhezyon molekülünün de sentezi artmaktadır. KS'nin bu etkiler sonucu I/R hasarına katkıda bulunduğu düşünölmektedir (Zhudema ve Zhang, 2010).



Şekil 2.2. Kompleman sistemin meydana geliş yolları

Nitekim Jaeschke ve ark. (1993), hepatik iskemi öncesi kompleman inhibitörü kullanılması durumunda, oksidatif stresin ve nötrofil birikmesinin azaldığı, bunun sonucu I/R hasarın düştüğünü bildirmişlerdir. Arumugam ve ark. (2009), yaptığı çalışmada ise C5a reseptör inhibitör kullanımı ile hepatik I/R hasarında anlamlı azalmalar olduğunu bildirmiştir.

2.1.1.5. Sitokinler

Sitokinler birçok hücre tarafından sentezlenip salınan çok yönlü biyolojik fonksiyonları olan polipeptidlerdir. I/R hasarında sitokinlerin aktif rol oynadığını gösteren birçok çalışma mevcuttur. Sitokinler proinflamatuvar ve antiinflamatuvar etki gösterebilirler. Proinflamatuvar sitokinler arasında en meşhurları TNF- α , IL-1 ve IL-6'dır. TNF- α çeşitli uyarımlarla karşı birçok hücre tarafından sentezlenip salınan bir moleküldür (Akhofy ve ark., 2000). Karaciğer I/R durumunda TNF- α 'nın hasara katkı mekanizması tam olarak aydınlatılamamış olmasına karşın, TNF- α 'nın I/R hasarında hücreleri apoptosize yönlendirebileceği veya direkt olarak mitokondri üzerinde olumsuz etkiler yaratabileceği düşünülmektedir. Bunun yanında karaciğer I/R sonrası TNF- α düzeylerinin arttığı gösterilmiştir (Akdoğan ve ark., 2016).

IL-1 birçok fonksiyonu olan bir sitokindir. Bunlar arasında makrofaj aktivasyonu, prostaglandin sentezi, akut faz proteinlerin ekspresyonu, ICAM-1 ve VCAM-1 gibi adhezyon moleküllerinin ekspresyonunun arttırması sayılabilir (Altaş ve ark., 2011).

Yukarıda değinildiği gibi karaciğer I/R hasarında, TNF- α miktarında aşırı artışlar olur. TNF- α da IL-1'in sentezini artırır. Artan IL-1 düzeyleri I/R hasarın şiddetini güçlendirebilir. Ayrıca IL-1 makrofajları aktive ederek daha fazla miktarda TNF- α salınına neden olur. IL-6 ise I/R sırasında kupffer hücre aktivasyonuna sebep olarak, PMNL'nin endotel hasarı oluşumuna katkı sağlar. Bunun yanı sıra hepatositlerden akut faz protein salınışını da arttırır (Xufeng ve ark., 2016; Jaeschke, 2006).

2.1.1.6. Serbest radikaller

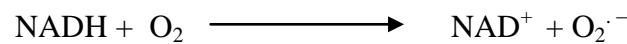
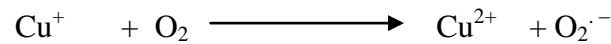
Serbest radikaller, dış yörüngelerinde ortaklanmamış elektron bulunduran atom veya moleküllerdir (Staroverov ve Davidson, 2000). Bu moleküller dış yörüngelerindeki elektron açlığını gidermek için vücudumuzda birçok moleküle saldırarak, dış yörüngelerinden bir elektron alırlar. Böylece diğer molekülü radikal hale getirerek bir dizi zincirleme radikal tepkime meydana gelmesine yol açarlar. Bu yüzden serbest radikaller çok reaktiftirler. Bu moleküller anyonik, nötral ve katyonik formlarda bulunabilirler (Halliwell, 1994).

Bu reaktif moleküller biyomoleküllerle etkileşime girmekte vücudumuzda protein, lipid, karbonhidrat ve DNA gibi yapılara saldırması sonucunda hücre membran hasarı, nekroz, apoptoz, yaşlanma ve kansere yol açmaktadır (Kopáni ve ark. 2006; Kehler ve Klotz 2015).

2.1.1.6.1. Serbest radikal olan moleküller

Süperoksit anyonu ($O_2^{\cdot-}$)

Süperoksit anyonu ($O_2^{\cdot-}$) moleküller oksijenin indirgenmesi sonucu oluşur. Moleküller oksijenin indirgenmiş geçiş metallere tek bir elektron alması sonucu süperoksit anyonu oluşur. Ayrıca, mitokondri elektron taşıma sisteminde moleküller oksijene elektron veren molekül, redükte nikotinamid adenin dinükleotid (NADH). NADH moleküller oksijene elektron verirken kendisi okside forma döner (NAD^+). Süperoksit, her ne kadar bir serbest radikal kabul edilse de çok reaktif olmadığından vücuda direkt olarak fazla bir zararı yoktur. Asıl etkisi hidrojen peroksit (H_2O_2) oluşturması ve geçiş metallere oksidasyonudur (Cherubini ve ark. 2005).



Hidrojen peroksit (H₂O₂)

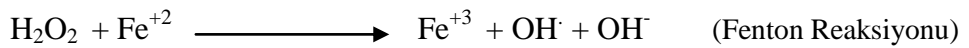
Moleküler oksijenin iki adet hidrojen ile birleşmesi sonucu oluşur. Biyolojik sistemlerde H₂O₂, iki süperoksit molekülünün iki proton alarak ters çevirim reaksiyonu sonucu H₂O₂ ve moleküler oksijen oluşturması sonucu meydana gelmektedir (Forman 2016). H₂O₂ bir serbest radikal değildir. Ancak oluştuğu bölgeden daha uzaklara gidebilen ve biyolojik membranlara nüfuz edebilen uzun ömürlü bir moleküldür. H₂O₂ nötrofillerde myeloperoksidaz (MPO) tarafından hipokloröz asite (HOCl) dönüştürülür ve geçiş metallerinin oksidasyonu esnasında en tehlikeli radikal olan hidroksil (OH[·]) radikali üretimine katkısı olur. (Karabulut ve Gülay, 2016).



Hidroksil radikali (OH[·])

Bu radikal biyomoleküller için en zararlı olanıdır. Kısa ömürlü ve çok reaktiftir (Zou ve ark., 2017). Atomik yapıdaki oksijen ile hidrojen atomunun birleşmesi sonucu oluşur. Oluşumu birçok olayı tetikleyebilir. Bunlardan biri ekzojen kaynaklı olan yüksek enerjili gamma radyasyonudur. Bu elektromanyetik dalga su molekülündeki O-H bağını kırarak hidrojen atomu ve hidroksil radikali oluşturur. Bir diğer yol fenton reaksiyonu olarak anılan ve H₂O₂'in geçiş metalleriyle etkileşimi sonucu hidroksil radikali meydana getirmesidir (Southoin ve Powis, 1998).

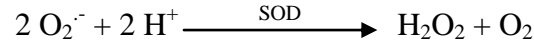
Diğer bir oluşum mekanizması ise H₂O₂'in tekrar süperoksit anyonu ile tepkimeye girmesi sonucu oluşumudur. Bu oluşum da Haber-Weiss reaksiyonu olarak tanımlanır (Cheeseman ve Slater, 1993).



2.1.1.6.2. Antioksidan enzimler

Süperoksit dismutaz (SOD)

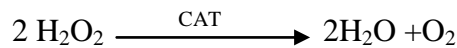
Bu enzim, süperoksit anyonunu H_2O_2 ve moleküler oksijene dönüştüren reaksiyonu katalizler. Böylece O_2^- anyonunu etkisiz hale getirirken aynı zamanda H_2O_2 de meydana gelir. SOD'un iki izoenzimi vardır. Bunlar Cu,Zn-SOD izoformu sitozolde, Mn-SOD izoformu ise mitokondride bulunur (Kinnula ve ark., 2004).



Katalaz enzimi (CAT)

Katalaz H_2O_2 'in su ve moleküler oksijene dönüşümünü sağlayan reaksiyonu katalizler. H_2O_2 normal sıcaklık ve nötr pH'da kararlı bir moleküldür, ancak reaktifitesi yüksek OH^\cdot radikalleri oluşturarak hücre harabiyetlerine neden olmaktadır. Serbest oksijen radikallerinin toksik etkileri üzerine yapılan birçok çalışmada, CAT'ın temel antioksidan savunma sisteminin vazgeçilmez bir unsuru olduğu göstermiştir (Yüzügüllü ve Ögel, 2012; Venarucci ve ark., 1999).

CAT, esas olarak peroksizomlarda, az miktarda da hücre sitozolünde bulunur. CAT üç sınıfa ayrılır, ilk iki sınıf HEM içeren gerçek katalazlar olarak adlandırılırken, 3. Grup HEM içermeyen mangan katalazları olarak adlandırılır. (Chelikani ve ark., 2004).



I/R hasarı hücrelerde birçok fonksiyonu olumsuz etkileyerek, hücrelerin bütünlüğünü ve biyokimyasal düzenini bozarak hücreleri ölüme sürükler. Özellikle de bu etkilerini dokuların oksidan-antioksidan dengesini bozarak gösterir. I/R hasarı sonucu artmış ROT düzeyleri hücrelerin antioksidan havuzunu tüketir (Liu ve ark., 2015).

Peroksizomlar, lipit metabolizması için gerekli bir organel olup, çok uzun zincirli yağ asitlerini ve mitokondride okside edilemeyen dallı zincirli yağ asitlerini β -oksidasyonla parçalamaktadır. Peroksizomlar aynı zamanda hücre içi redoks homeostazının idame ettirilmesinden de sorumludur. CAT'ın peroksizomlarda yoğun

bulunması, yağlı karaciğer için bir sorun teşkil eder. Çünkü peroksizomlarda sürekli yağ oksidasyonu sonucu, H₂O₂ üretiminde artış meydana gelir, bir süre sonra CAT düzeyleri bu artışla baş edemez hale gelebilir (Lingjuan ve ark., 2017).

Glutasyon redüktaz (GSS-R)

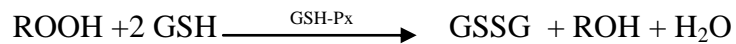
Glutasyon; glutamat, sistein ve glisinden oluşan bir tripeptiddir. Enzim, eritrosit, karaciğer ve böbrekte bol bulunur. Prostetik grup olarak 2 adet flavin adenin dinükleotit (FAD) içerir. Glutasyonun redükte formu, serbest radikallere proton vererek molekülleri etkisizleştirirken, kendisi okside formuna döner (Young ve Woodside, 2001). Bu okside glutasyonu yeniden redükte formuna getirmek için GSS-R enzimi reaksiyonu katalizler ve bu reaksiyon için NADPH'a ihtiyaç duyulur, bu reaksiyon için gereken NADPH'ın büyük kısmı pentoz fosfat yolundan elde edilmektedir (Reilly ve ark., 1991).



Glutasyon peroksidaz (GSH-Px)

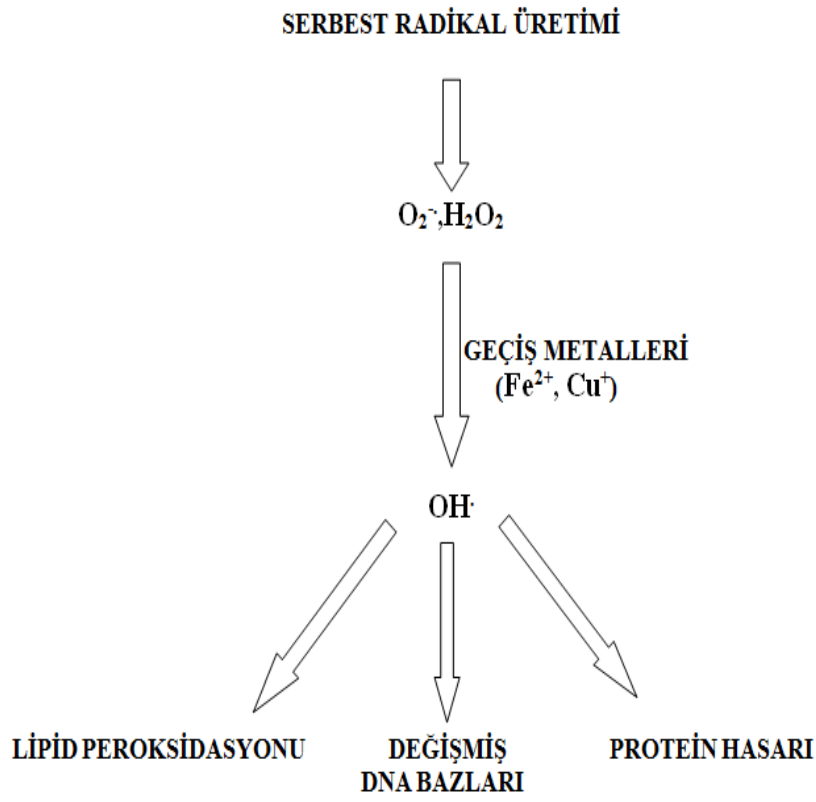
Tetramerik yapıda olan bu enzim selenyum içermektedir. Bu enzim, redükte glutasyonun radikalleri etkisiz hale getirmesi sırasındaki reaksiyonu katalizler ve reaksiyon sonunda glutasyon okside formuna dönüşür (Cnubben ve ark., 2001).

GSH-Px'in, fagositik hücrelerde önemli fonksiyonları vardır. Diğer antioksidan enzimler birlikte GSH-Px solunum patlaması sırasında serbest radikal hasarına karşı fagositik hücrelerin zarar görmelerini engeller. Eritrositlerde de GSH-Px oksidan strese karşı en etkili antioksidandır. GSH-Px aktivitesindeki azalma hidrojen peroksidin artmasına ve şiddetli hücre hasarına yol açar (Akkuş, 1995).



2.1.1.6.3. Serbest radikallerin biyomoleküller üzerine etkileri

Serbest radikaller çok kararsızdırlar ve kendilerini kararlı hale getirebilmek için, yakınındaki elektronca zengin moleküllere ataklar yaparlar ve onlardan elektron kopararak bu molekülleri de birer radikale dönüştürüp stabilitesini bozarlar. Şekil 2.3. de görüldüğü üzere vücudumuzda böyle moleküllerin yapılarının bozulması hücre bütünlüğünü kaybedilmesine sebep olur.



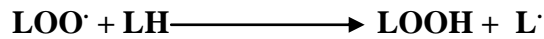
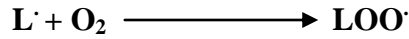
Şekil 2.3. Serbest radikallerin hücresel etkileri

Lipit peroksidasyonu

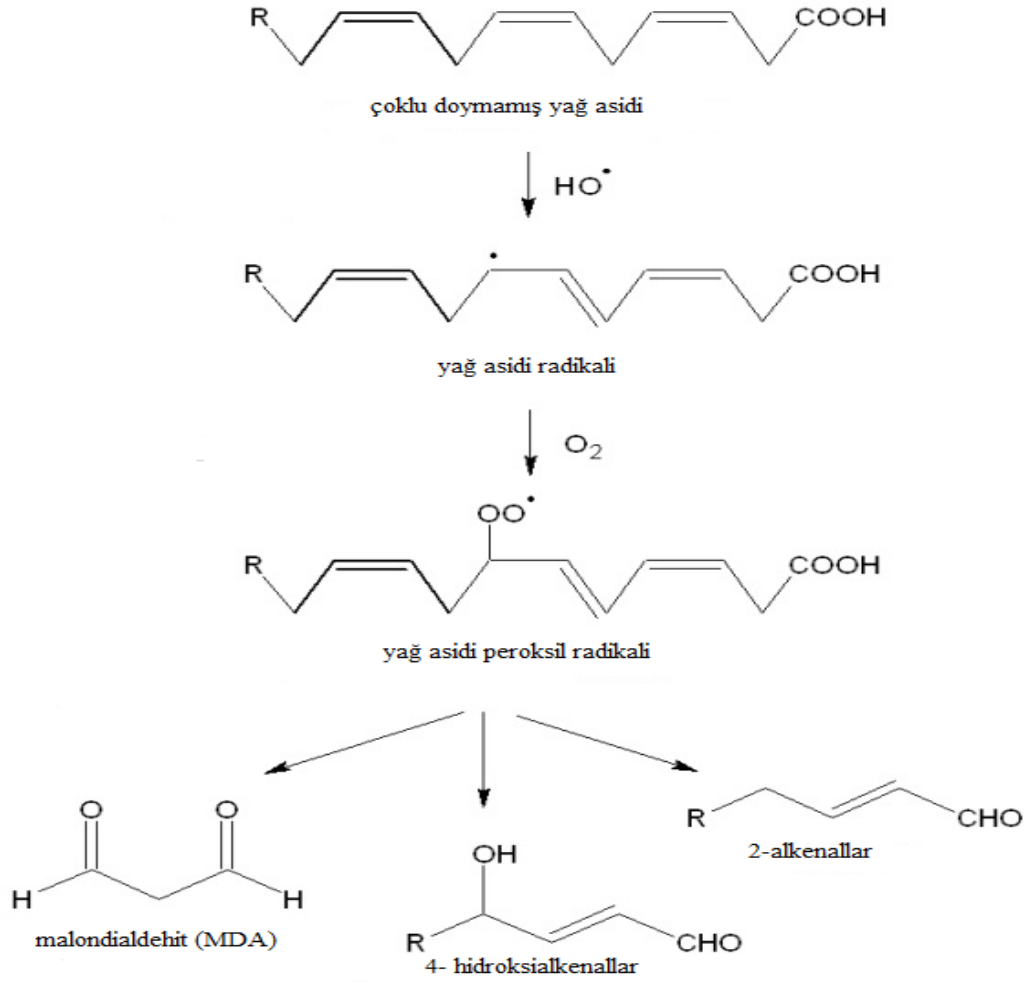
Çoklu doymamış yağ asitleri (PUFA), elektronca zengin yapılardır ve OH[·] radikali için açık bir hedef teşkil ederler. OH[·] radikali yağ asitlerine saldırarak yağ asidinin bir metilen grubundan hidrojen atomunu çıkararak H₂O şeklinde kendini kararlı hale getirir ve artık yağ asidinin kendisi karbon merkezli bir lipit radikaline (L[·]) dönüşür. Çift bağ içeren doymamış yağ asitleri ROT /RNS ve oksijen varlığında peroksidasyona uğrar. Araşidonik asit (dört çift bağ), linolenik asit (üç çift bağ) ve linoleik asit (iki çift bağ) oksidasyona daha yatkındır. Bu zincir oksidasyon reaksiyonu sırasında birkaç lipit molekülü (LH) oksitlenir (Esterbauer ve ark., 1992).



Daha sonra karbon merkezli bu lipit radikali moleküler oksijen ile reaksiyona girer ve lipit peroksil radikali (LOO[·]) oluşur. Peroksil de kendisi bir radikal olduğundan yakınındaki yağ asitlerinin metilen gruplarına saldırır ve açığa çıkan hidrojen atomunu kendi yapısına katarak lipit hidroperoksitlerine dönüşür (LOOH[·]) ve böylece zincirleme bir reaksiyon başlamaktadır (Bottje ve ark. 1995).



LOOH çok dengesiz bir moleküldür bu yüzden hızlıca yıkıma uğrar. Lipit peroksidlerin yıkımı sonucunda malondialdehit (MDA) ve 4-hidroksi nonenal gibi moleküller meydana gelir ve yine bu moleküllerin de DNA ve proteinlerin yapılarını bozucu etkileri vardır (Niki ve ark., 2005). Yağ asitlerinin radikalleşmesi sonucu özellikle hücre membran stabilitesini bozular geçirgenliği artar, hücre içine su ve Ca⁺² girişine bağlı olarak hücre şişer (Spiteller, 2005).



Şekil 2.4. MDA oluşumu

Karaciğerde I/R hasarı sonucu, azalan ATP miktarını yerine koymak için mitokondride elektron transport zinciri aktivitesinde artış meydana gelir. Buna bağlı olarak üretilen oksijen kaynaklı radikal miktarındaki artışlar, hücre membranında lipid peroksidasyon artışlarına neden olarak hücre harabiyetine yol açmaktadır. I/R sırasında karaciğerde büyük oranda serbest oksijen radikalleri oluşması ve iskemi nedeniyle intrahepatik savunma mekanizmaları düzensizliği, radikallerin etkili bir şekilde temizlenmesini sağlayamaz, böylece karakteristik hücre hasarına yol açar ve membran lipid peroksidasyonunun metabolik ürünü olan MDA düzeyleri artar. MDA, proteinler ve bunların ilgili primer amino grupları arasında bir çapraz bağlanma reaksiyonu başlatarak, hücre fonksiyonunun yok edilmesine yol açabilir. (Wen-S ve ark., 2016).

Oksidatif hasarın proteinler üzerine etkileri

Üç boyutlu yapıda tiyol (-SH) grubu ve doymamış bağ içeren amino asitlere sahip proteinler serbest radikallerden daha belirgin etkilenmektedir . Çünkü -SH grupları ve doymamış bağlar radikal saldırılara müsaittir. Bu saldırılar sonucunda proteinlerde çapraz bağlanma, peptid bağların kırılması, üç boyutlu yapının bozulması ve agregasyon görülebilir (Dean ve ark., 1997). Vücudumuzda yer alan enzimler de protein yapısında olduğundan yapısal değişim enzimlerde de aktivite kayıpları meydana getirmektedir. Ayrıca hücre sinyal iletimindeki aksaklıklar da gen ifadesinin değişmesine neden olmaktadır (Hawkins ve Davies, 2001; Lobo ve ark., 2010).

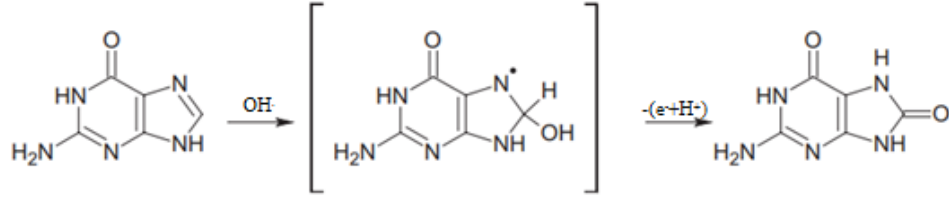
Oksidatif hasarın DNA üzerine etkileri

Serbest radikaller birçok mekanizma ile DNA üzerinde zincir kırıklarına, DNA baz ve şeker modifikasyonlarına neden olur (Cooke ve ark. 2003). OH[•] radikali hem pürin hem de pirimidin bazları ile reaksiyona 8-oksoguanin, 2-oksoadenin ve 5-hidroksi-metilurasil gibi değişmiş bazlar oluşturabilmektedir (Halliwell ve Gutteridge, 2001).

DNA bazlarının oksidatif hasarının önemli bir sonucu, AT↔GC ve GC↔AT değişiminin neden olduğu mutasyondur (Kalyanaraman, 2013). Bu mutasyonlar protein gen ifadelerinde değişikliğe neden olabilirler (McDorman ve ark., 2005).

Mitokondri DNA'sı genomik DNA'ya oranla serbest radikallerden daha çok etkilendiği ve bunun nedenleri arasında mitokondri DNA'sının serbest radikallerin daha fazla olduğu bölgelere yakın yerleşimli olması ve histonlar tarafından korunmadığı, kendini onarma mekanizmasının da sınırlı olması ileri sürülmüştür (Lim ve ark., 2005 ; Lagouge ve Larsson 2013).

Guanin bazı Şekil 2.5.'de görüleceği üzere, özellikle OH[•] radikali ataklarına en yatkın olan bazdır. Guaninin 8. pozisyonundaki karbon atomuna OH[•] radikalinin saldırısı sonucunda 8-hidroksi-2'-deoksiguanozin (8-OHdG) ve 8-hidroksi guanin (8-OHGua) oluşur.



Şekil 2.5. OH[·] radikalinin Guanin bazına saldırması

8-OHdG, oksidize guanin içeren diğer türlerin aksine hücre zarı içinden geçebilir, bu nedenle oksidatif stres ile ilişkili hastalıklara sahip hastaların idrarı veya serumunda genellikle saptanır (Hsieh ark., 2014) . Birçok çalışmada oksidatif stresle ilişkili hastalıklarda artmış 8-OHdG seviyeleri gösterilmiş olsa da, 8-OHdG'nin kesin biyolojik rolü belirlenememiştir. Okside edilmiş deoksiguanozin, mutajenez indüklemek için oldukça duyarlıdır. Bu nedenle çoğu araştırmacı 8-OHdG'nin hücrelerde mutajenik veya zararlı etkilere sahip olabileceğini düşünmektedir (Ock ve ark., 2012).

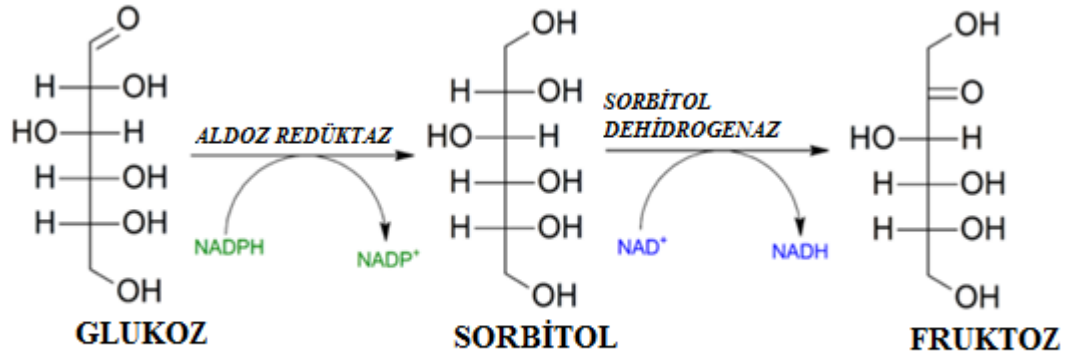
8-OHdG'nin bir başka biyolojik önemi, insan kanserlerinde en sık rastlanan somatik mutasyonlar arasında yer alan G > T geçişlerini indükleme kabiliyetinden kaynaklanmaktadır (Pilger ve Rüdiger, 2006).

Karaciğer I/R hasarı sonucu, artmış oksidatif stres ve bununla artık baş edemeyen tükenmiş antioksidan enzim düzeyleri DNA'nın ROT saldırısına uğraması için uygun ortamı sağlayabilir. I/R'nin iskemi ve reperfüzyon safhalarında 8-OHdG düzeylerinin yükseldiğine dair bulgulara rastlanmaktadır (Hong ve ark., 2017). Oksidatif hasar mekanizması I/R olgusunda merkezi bir rol olarak DNA gibi önemli moleküllerin harabiyetine katkı sağlayabilir. Her ne kadar 8-OHdG oksidatif strese bağlı gelişen DNA hasarının bir belirteci olarak önemini korusa da, deneysel olarak düşük dozlarda 8-OHdG uygulanmasının paradoksal bir şekilde oksidatif strese bağlı iltihaplı hastalıklarda hücre savunmasına katkısı olduğunu gösterilmesini bildiren çalışma da mevcuttur (Yamagami ve ark., 2000).

Oksidatif hasarın karbonhidratlar üzerine etkileri

Diyetle alınan glukoz molekülün hücre içine girmesiyle birlikte, glikoliz yoluna girerek metabolize olur. Bu metabolik yol esnasında NADH üretim miktarı artar. NADH molekülleri elektron taşıma sisteminde ATP üretmek üzere bir dizi reaksiyona girer, elektron transport zincirinde (ETS) serbest radikal kaçakları meydana gelir. Glukoz miktarındaki artışların, ETS yolundaki artışla paralel olarak serbest radikal kaçaklarının artması oksidatif hasarı şiddetlendirebilir (Green ve ark., 2004).

Ayrıca yüksek glukoz konsantrasyonları, enzimatik olmayan yollarla proteinlerin glikasyonuna neden olur (Gillery ve ark., 1988). Vücudumuzda glukoz konsantrasyonlarının artmasına bağlı olarak glukoz, sorbitol ve fruktoz üretmek için polioliol yolu olarak adlandırılan yola girer. Aldoz redüktaz enzimi kataliziyle glukozdan sorbitol oluşurken NADPH koenzim olarak kullanılır. Ayrıca NADPH'ın polioliol yolunda aşırı tüketimi antioksidan savunma sistemini zayıflatmaktadır (Maritim ve ark., 2003).



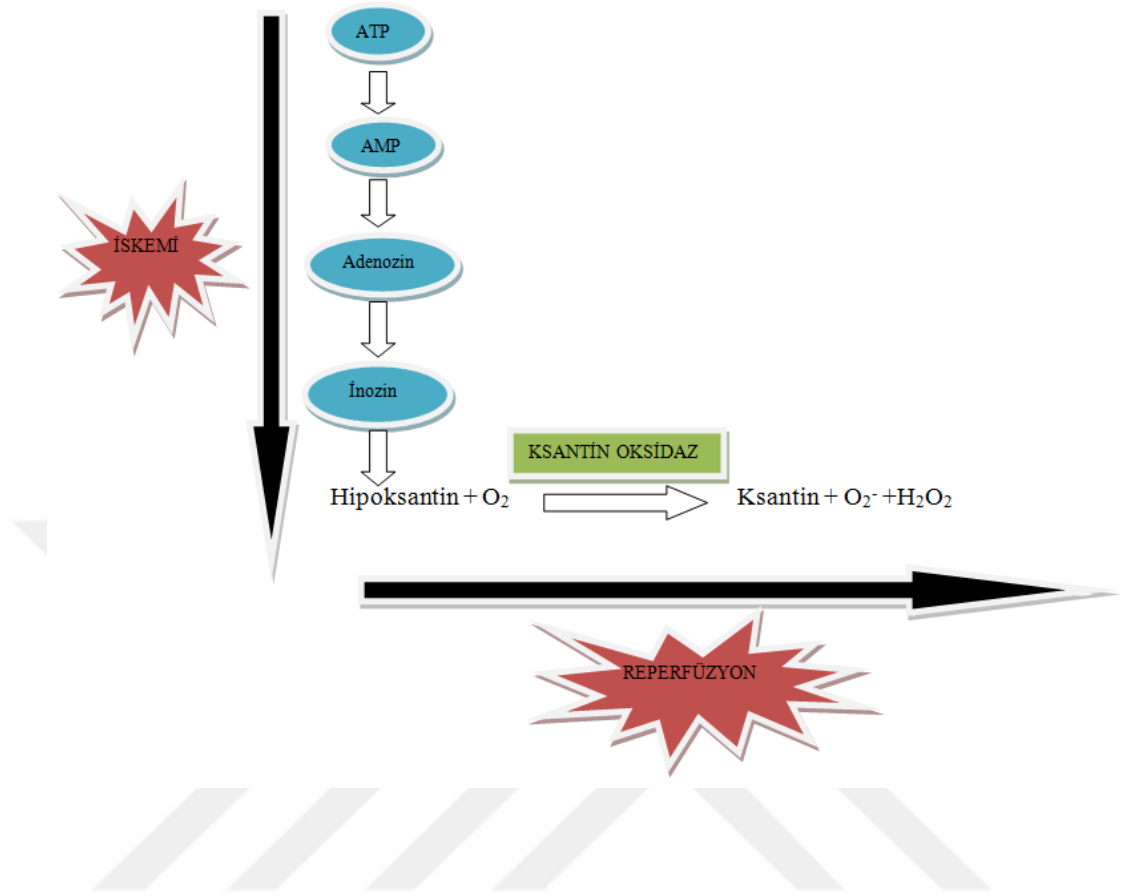
Şekil 2.6. Polioliol yolu

2.1.1.7. Pürin metabolizması

Ksantin Oksidoredüktaz (XOR pürin katabolizmasında hipoksantin, ksantine ve daha sonra ksantinin ürik aside hidroksilasyonunu katalizleyen molibdo flavoenzimdir. Memeli dokularında XOR enziminin birbirine dönüşebilen iki formu mevcuttur. Baskın olan form Ksantin dehidrogenaz (XDH) olup, katalizi için elektron alıcısı olarak nikotin adenin dinükleotit (NAD⁺)'a gereksinim duyar iken, diğer form olan Ksantin Oksidaz (XO) ise NAD⁺ yerine moleküler oksijeni kullanır (Kuwabara ve ark., 2003).

İskemi sırasında hücre içi hidrojen derişiminin artması hücre içine kalsiyum girişini tetikler, aynı zamanda endoplazmik retikulum (ER)'dan da sitozole Ca²⁺ salınımı artar. Ca²⁺ miktarının hücre içinde artışı, Ca²⁺'a bağımlı proteazları aktive eder. Bu proteazlar sonucu baskın olan XDH formu XO dönüşür (Wu ve ark., 2018). Ayrıca iskemi sırasında artan ATP yıkımına bağılı olarak adozin, inozin ve hipoksantin düzeyleri yükselir (Özcan ve ark., 2015).

İskemi sırasında baskın olan formun XO olması ve ATP yıkımına bağılı XO'nun substratı olan hipoksantin miktarının artması, reperfüzyon evresinde büyük bir sorun teşkil eder. Şekil 2.7.'de görüleceğı üzere reperfüzyon esnasında artmış oksijen seviyeleri nedeniyle XO sürekli bir şekilde moleküler oksijeni kullanarak kataliz aktivitesini arttırır (Ajemiah ve ark., 2002). Bunun sonucuna bağılı olarak aşırı miktarda O₂⁻ ve H₂O₂ üretilir. Oluşan O₂⁻ normal koşullarda SOD ve CAT enzimleriyle suya dönüştürülür. Ancak I/R hasarına bağılı oksidatif stresin, antioksidan havuzu tüketmesi sonucu bu radikaller ortamda birikecektir (Magierowski ve ark., 2014).



Şekil 2.7. İskemi-reperfüzyonda pürin metabolizmasının rolü

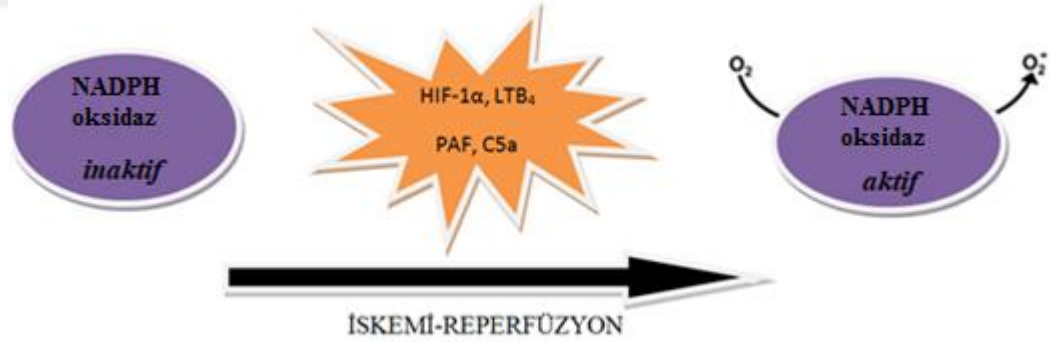
2.1.1.8. Nikotinamid adenin dinükleotit fosfat oksidaz (NADPH oksidaz)

Nikotinamid Adenin Dinükleotit Fosfat Oksidaz (NADPH Oksidaz), moleküler oksijenden süperoksit ve hidrojen peroksit üretimine katkı sağlayan multimerik transmembran bir enzim kompleksidir (Babior ve ark., 1975). NADPH Oksidaz enzimi 20'inci yüz yılın ortalarına kadar sadece solunum patlaması adı verilen, vücudun mikropları öldürmesinde moleküler oksijenden süperoksit oluşumunu sağlayan bir enzim olarak öngörülmesine rağmen, geniş bir doku dağılımı gösteren sadece vücudun savunması değil farklı fizyolojik rollerinin olabileceğine inanılan bir enzim kompleksidir (Bedard ve Krause, 2007).

NADPH Oksidaz enzim ailesi ROT üretimine aşırı katkı sağlar. ROT miktarının artması inflamasyonlara neden olmaktadır, bu da NADPH Oksidaz'ın inflamasyon gelişimine katkı sağlayan bir proinflamatuvar enzim olduğunu

düşündürmektedir (Irani, 2000). Ancak bu enzimin genetik eksikliği sonucunda özellikle bakteriyel inflamasyonlarda güçlü bir vücut defans sistemini teşkil eden, solunum patlamasının azalmasına bağlı olarak gelişen, kronik granülamatoz hastalığının en yaygın belirtileri arasında olan hiperinflamasyonun görülmesi bu enzimin aslında bir anti-inflamatuar enzim olduğunu da düşündürmektedir (Cale ve ark., 2000).

NADPH Oksidaz'ın özellikle reperfüzyon safhasında aşırı artmış aktivitesi oksidatif stresi artırarak I/R hasarına katkı sağladığını bildiren birçok çalışma mevcuttur (Cadenas, 2018; Kleikers ve ark., 2012 ; Simone ve ark., 2014). Şekil 2.8.'da gösterildiği üzere NADPH Oksidaz'ın I/R sırasında aktivite kazanmasını sağlayan unsurlar arasında KS sisteminde yer alan C5a, fosfolipaz A2 aktivasyonu sonucu hücre ile etkileşime giren trombosit aktive edici faktör (PAF) ve araşidonik asit metabolizması ürünlerinden lökotrien B4 (LTB₄) sayılabilir. Ayrıca iskemi sırasında aktif rol oynayan HIF-1 α 'nın da NADPH Oksidaz'ın aktivitesi için gerekli konformasyonel değişikliğine katkı sağlayabileceği düşünülmektedir (Granger ve Kvietys, 2015).



HIF-1 α : Hipoksi uyarılabilir faktör, LTB₄: Lökotrien B4, PAF: trombosit aktive edici faktör, C5a: Kompotent 5a

Şekil 2.8. NADPH Oksidaz'ın iskemi-reperfüzyonda aktivite kazanma mekanizması

2.1.1.9 Myeloperoksidaz (MPO)

MPO, aktive edilmiş nötrofiller, makrofajlar ve monositler gibi insan iltihap hücrelerinin granüllerinde bol bulunan bir enzimdir. MPO, benzersiz bir özellik göstererek H_2O_2 'den hipoklorik (HOCl) asit oluşumunu katalizleyen ve böylece antimikrobiyal ajan olarak vücudun doğal bağışıklık sistemi içerisinde önemli bir görev alan enzimdir. Ancak MPO'nun bu yararlı etkileri yanında aktivitesindeki aşırı artışlar, serbest radikal miktarlarını da arttırarak doku hasarı, akut ve kronik inflamasyon, arteroskleroz gibi birçok hastalığın oluşumundan da sorumlu tutulmasına neden olmuş, hatta geliştirilen çeşitli MPO inhibitörlerinin bu hastalıkların tedavisi için kullanımı üzerine birçok çalışma yapılmıştır (Malle ve ark., 2007; Pasti ve ark., 2015)

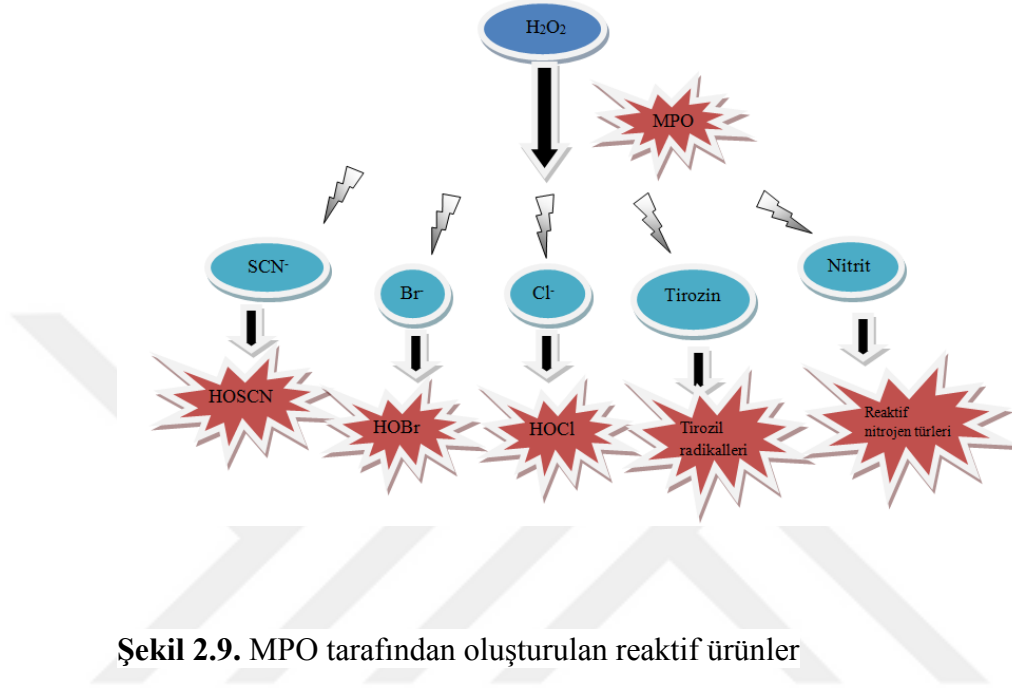
MPO aktivitesi çeşitli fizyolojik durumlarda artar. Bunlardan biride iskemi ve reperfüzyondur. Karaciğer I/R'sinde özellikle reperfüzyon aşamasında XO ve NADPH Oksidaz enzimlerinin O_2^- ve H_2O_2 'in aşırı üretimini teşvik etmesi sonucu endotelial adezyon proteinlerinin üretimi artmaktadır. Bu durum karaciğer dokusunda nötrofil aktivasyonunu ve proinflamatuvar sitokinlerin üretilmesini tetiklemektedir (Al-Khafaji ve ark., 2016).

MPO'un karaciğer I/R sonucu substratındaki aşırı artışlar ve diğer etkenler artmış MPO aktivasyonu ile sonuçlanır. Bu durum patojenlere karşı bir savunma mekanizmasından öte hücre ve dokular için zararlı bir saldırı haline dönüşebilir.

Özellikle, kupffer hücreleri reperfüzyon hasarının erken fazında (reperfüzyondan 2 saat sonraya kadar) ROS üretiminden sorumlu olduğu düşünülmektedir. Kupffer hücreleri ROS ile birlikte TNF- α , IL -1 ve IL-6 gibi proinflamatuvar sitokin üretir. Bu sitokinler, reperfüzyon hasarının geç evresi (reperfüzyondan 6 saat sonra) sırasında nötrofilleri bu bölgelere çekerek etkinleştirmekte ve iskemik bölgede doku hasarını arttıran ajanların miktarında artışa neden olmaktadır. (Bae ve ark., 2014).

Bu ajanlara bağlı MPO aktivitesindeki artış, serbest radikal üretiminin artmasına yol açarak proteinler, nükleik asitler, lipidler ve karbonhidratlar gibi

biyomoleküllerin yapısında bozulmaya neden olur. Bu şekilde I/R hasarı, ateroskleroz, endotelial fonksiyon bozukluğu, kardiyovasküler hastalıklar ve diğer komplikasyonların gelişmesine neden olabilir (Bojana ve ark., 2016). MPO tarafından oluşturulan reaktif ürünler şekil 2.9.'da gösterilmiştir.



Şekil 2.9. MPO tarafından oluşturulan reaktif ürünler

2.1.1.10. Apoptozis

Apoptozis, bir organizmada görevini tamamlamış veya herhangi bir nedenden dolayı telafisi olmayacak derecede hasar görmüş hücrelerin kontrollü bir şekilde ortadan kaldırılmasını sağlayan programlı hücre ölüm sisteminin genel adıdır. Her ne kadar nekroz da bir hücre ölümü olsa da, apoptozisten tamamen farklıdır. Nekrozda hücre şişer, membran yapısı bozulur, hücre içine sıvı girişi artar ve DNA rastgele bir şekilde parçalanır ve inflamasyona neden olur. Gelişen bu olaylar tamamen kontrolsüz bir şekilde ilerler. Apoptozis de ise hücre tam tersine küçülür, membran bütünlüğü bozulmaz ve etrafındaki makrofajlar tarafından yutulduğu için herhangi bir inflamasyona neden olmaz. Apoptozisin belkide en önemli özelliği, DNA'nın rastgele bir şekilde parçalanması yerine belli bölgelerden 180-200 baz çifti ve katları şeklinde parçalanmasıdır (Çoşkun ve Özgür, 2011).

Apoptozis sırasında kaspaz adı verilen birçok protein grubu işlev görmektedir. (Shalini ve ark., 2014). Kaspazlar hücre içinde prokaspaz olarak inaktif şekillerde yer alır. Apoptozis sinyalinin verilmesine dayalı olarak aktive olurlar ve birbirlerini aktive ederek bir zincir tepkimesi oluştururlar. Apoptozis yolağı birkaç yolla aktive edilebilir, bunlar iç ve dış yolaklar olmak üzere iki sınıfa ayrılır. Dış yolakta ölüm almaçları sinyalleri alır. Bu yolakta TNF α CD95 ligandına (Fas) bağlanarak süreç başlatılır ve kaspazlardan, kaspaz-8 ve kaspaz-10 aktive edilerek zincir tepkime reaksiyonları ilerler. İç yolakta ise mitokondri görevi üstlenmektedir. Bu yolak ROT, radyasyon ve DNA hasarı sonucu gözlenir. İç yolakta üç faktör görev alır. Bunlar mitokondri dış membranı üzerinde yer alan sitokrom-C (Cyt-C), apoptotik proteaz aktivasyon faktörü (Apaf-1) ve kaspaz-9'dur (Yazıcı ve ark., 2009).

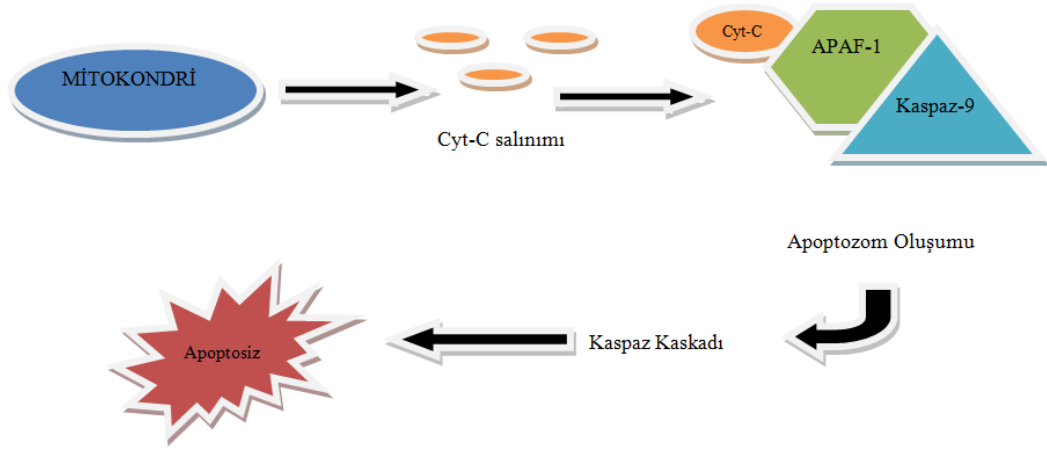
İç sinyal yolağı sonucu mitokondriden Cyt-C salınır ve Apaf -1 ile birleşir. Daha sonra kaspaz-9 bu faktörlere bağlanarak kendi kendini aktivite etmekte ve böylece apoptozom denen yapı oluşmaktadır. Cyt-C, mitokondri iç membranında bulunan elektron transport zincirinin bir proteimidir. Mitokondriden Cyt-C'nin sitoplazmaya salınımı hücrenin geri dönüşümsüz olarak apoptozis mekanizmasına yöneltildiğinin bir kanıtıdır (Kagan ve ark., 2009).

Mitokondriden Cyt-C salınımı, mitokondri dış membranında yer alan proapoptotik ve antiapoptotik özellikler barındıran Bcl-2 ailesi tarafından belirli mekanizmalar ile kontrol edilmektedir. Bu aileden Bcl-2 ve Bcl-XL antiapoptotik özellik göstererek hücrenin yaşamasına katkı sağlarken, yine bu ailenin üyesi olan Bad ve Bax proapoptotik etki göstererek hücreyi ölüme teşvik etmektedir. Bu iki grup arasındaki oran apoptozis belirlenmektedir. Apoptoz sinyali alındığında Bax aktivite kazanır ve mitokondri dış membranı geçirgenliği artar, sonuçta Cyt-C salınımı olur ve apoptozom oluşumu ile süreç başlar, Bcl-2 ise antiapoptotik etki göstererek Apaf-1'e bağlanır ve apoptozis yolağını inhibe eder (Ulukaya, 2011).

I/R hasarı sonucu nekroz mu yoksa apoptoz mekanizmasının mı aktive olduğunu araştıran birçok çalışma mevcuttur. Yapılan çoğu çalışma I/R hasarı sonucu apoptozis daha ağır bastığını göstermektedir (Rüdiger ve ark., 2003; Broughton ve ark., 2009; Kroemer ve ark., 2007). Bunun yanında Gujral ve ark.

(2001)'nin yaptığı çalışmada karaciğer I/R hasarı sonrası hücrelerde apoptoz ve nekrozun eşit dağılım oluşturduğu bilgisi verilmektedir.

Karaciğer I/R hasarı esnasında hangi nedenlere bağlı olarak apoptozin başladığına dair nihai bir sonuç elde edilmemiş olsa da birkaç neden öne sürülmektedir. İlk olarak I/R hasarı esnasında hücrelerden aşırı miktarda TNF- α salınmakta bu da apoptozis sinyali oluşturmaktadır. Rüdiger ve Clavien (2002), tarafından yapılan bir çalışmada, TNF- α 'ın apoptozisi teşvik ettiği gösterilmiştir. Bu çalışmada TNF- α 'ın salınımının engellenmesi sonucu Cyt-C salınımında ve kaspaz-3 aktivitesinde azalma olduğu bildirilmiştir. Diğer bir çalışmada ise reaktif oksijen türlerinde aşırı artış mitokondri geçirgenliğini artırarak, Cyt-C salınımına, bu da apoptozom oluşumuna katkı sağladığı bildirilmiştir. Diğer olası neden I/R hasarı esnasında proapoptotik Bad ve Bax 'ın gen ekspresyonundaki artışları olduğu ve bunun sonucu mitokondriden Cyt-C salınımının meydana geldiği yönündedir (Wu ve Bratton, 2012).



Şekil 2.10. Cyt-C salınımı sonucu apoptozis oluşumu

2.2. Karaciğer Yağlanması (Hepatosteatoz)

Karaciğer yağlanması; herhangi bir nedenden ötürü lipit miktarının karaciğer ağırlığının % 5'inden fazla olması ya da hepatositlerin % 5'inden fazlasında yağ vakuollerinin görülmesi şeklinde tanımlanmaktadır (Satman ve Kocabay, 2006). Bu tanım genel bir tanım olmakla birlikte nedenleri açısından çeşitlilik göstermektedir. Karaciğer yağlanması, klinik tablo durumuna göre akut karaciğer yağlanması ve kronik karaciğer yağlanması olarak sınıflandırılabilir (Sonsuz, 2007).

Hepatositler az miktarda yağ içerebilir, ancak bu miktarın aşırı artması ilerleyen evrelerde inflamasyona yol açar hatta karaciğer işlev kaybına ve siroza kadar ilerleyebilir (Choen ve ark., 2011). Karaciğer yağlanması, alkole bağlı karaciğer yağlanması (AFLD) ve alkole bağlı olmayan karaciğer yağlanması (NAFLD) olarak ikiye ayrılır. AFLD alkolizme bağlı olarak gelişen inflamasyonun eşlik ettiği karaciğer toksik hasarına neden olan bir hastalıktır (Karuna ve ark., 2016). NAFLD'de ise alkol tüketimi olmaksızın ya da çok düşük alkol tüketimi durumlarında bile, alkol dışındaki etkenlerden kaynaklanan ve karaciğerin yağlanması sonucu toksik hasarın meydana gelmesidir (Lakshman ve ark., 2015).

NAFLD kendi içinde ikiye ayrılır, sadece yağlanmanın eşlik ettiği ama inflamasyonun gelişmediği non-alkolik steatoz (NAS), bir diğeri ise yağlanmaya inflamasyonun eşlik ettiği non-alkolik steatohepatittir (NASH).

Tablo 2.1. Karaciğer yağlanma nedenleri

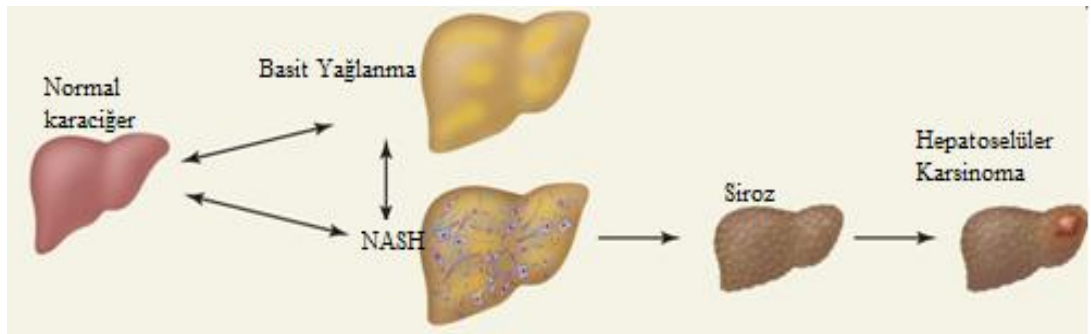
AKUT KARACİĞER YAĞLANMASI	KRONİK KARACİĞER YAĞLANMASI
Reye Sendromu	Diyabet
Toksik Hasar	Obezite
Gebelikte Karaciğer Yağlanması	Kronik Alkolizm
	Hiperlipidemi
	Metabolik hastalıklar

2.2.1. Non-alkolik yağlı karaciğer hastalığı (NAFLD)

NAFLD metabolik sendrom olarak adlandırılan diyabet, obezite, hipertansiyon ve hiperlipideminin eşlik ettiği olgularda sık rastlanan bir durumdur (Li ve ark., 2015). Günümüzde bu hastalık alkolik yağlı karaciğer hastalığından daha fazla gözlemlenmekle beraber, kronik karaciğer hastalığının ana nedeni haline gelmiştir (Fuchs, 2015).

Bu tanım Ludwig ve arkadaşlarının alkol kullanmayan ya da az miktarda alkol alan bireylerde, alkolik karaciğer yağlanmasından ayırt edilemeyen benzer biyopsi sonuçlarını görülmesi sonucunda ortaya atılan bir terimdir. NAFLD alkole bağlı olmayan basit steatozdan non-alkolik steatohepatit (NASH), fibroze hatta siroza kadar geniş bir yelpazeyi kapsayan karaciğer hastalığının temel adlandırılmasıdır ve bu kendi içinde alt birimlere ayrılmıştır (Gören ve Fen, 2005). Şekil 2.11. NAFLD evrelerini göstermektedir.

NAFLD hastalarının büyük bir çoğunluğunda, metabolik sendrom kriterlerinden en az birisi eşlik etmektedir. Bu kriterlerin miktarı arttıkça NAFLD hastalığının şiddeti ve evrelerinin ilerlemesi de artmaktadır (Adams ve Angulo, 2005). NAFLD erişkin bireylerde % 17-33 sıklığında görülürken, obezite varlığında bu oran % 75'lere çıkmaktadır (Çolak ve Tuncer, 2010).



Şekil 2.11. NAFLD evrelerinin şematik gösterimi (Cohen ve ark., 2011)

NAFLD'de biyokimyasal olarak serum Alanin amino transferaz (ALT) ve Aspartat amino transferaz (AST) düzeyleri yüksek olmasına karşın, bilirubin, albümin ve globülin düzeyleri normaldir. NAFLD'nin ilerleyen evrelerinde ise hastalığa insülin direnci de eşlik etmektedir (Sonsuz ve Baysal, 2011).

Günümüzde trans-yağ asitleri ve fruktoz tüketiminin artmasıyla birlikte NAFLD'li olgularda anlamlı bir artış olduğu bildirilmiştir (Tilg ve Moschen, 2010). Şu an gelinen noktada NAFLD olgularını iyileştirme çabası için birçok farmakolojik terapinin (Metformin, pioglitazone, pentoksifilin, anjiyotensin blokörleri, E vitamini, Statin grubu lipid düşürücüler ve Ursodeoksikolik asit) kullanılmasına karşın henüz yeterli bir tedavi yöntemi bulunamamıştır. Önerilen tedavi, düzenli egzersiz ve diyet ile insülin direncinin azaltılması olarak sınırlandırılmaktadır (Takahashi ve ark., 2015).

2.2.2. Non-alkolik steatohepatit (NASH)

NASH; karaciğerde yağlanmaya inflamasyonun da eşlik ettiği bir durumdur. Karaciğerde yağlanma dışında alkole bağlı karaciğer yağlanmasında (AFLD) olduğu gibi hepatositlerde, inflamasyon, balonlaşma ve fibrosiz gibi olgular da gözlenmektedir (Bettermann ve ark., 2014). NASH'da yağ asiti miktarında aşırı artış ile beraber mitokondrinin işlev kaybı, ATP düzeylerinin azalması sonucunda, reaktif oksijen türlerinin düzeylerinde ve lipit peroksidasyonunda artışlara sebep olmakta, bu da karaciğerde inflamasyon oluşumunu tetiklemektedir (Kara ve Erdal, 2014).

2.2.2.1. NASH'ın Etiyolojisi

Obezite ile NASH arasında çok yakın bir ilişki söz konusudur. Yapılan çalışmalarda bu ilişkinin normal kilolulara göre 6 kat fazla olduğu gösterilmiştir. Ayrıca obez bireylerin %75'inde karaciğer yağlanması ve bunların %24'ünde NASH ve %3-11 arasında da siroz gelişimi gözlenmiştir (Adik, 2016).

Diabetes mellitus; karaciğer fibrosizi için bağımsız bir risk faktörüdür. Normal bireylere göre diyabetik hastalarda NASH oranı yaklaşık %10 ile %75 arındadır ve bunun nedenleri arasında insülin direnci ve hiperinsülineminin olabileceği düşünülmektedir (Gören ve Fen, 2005).

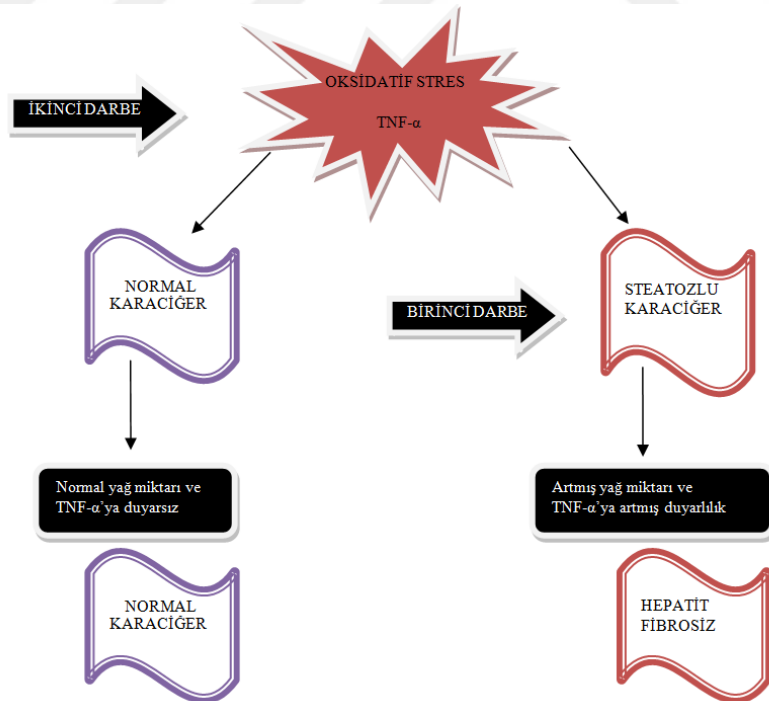
Hipertrigliseridemi; NASH ile güçlü bir ilişki söz konusudur. NASH'lı hastaların çoğunda lipit metabolizmasında bozukluk görülmektedir (Browning, 2006). Trigliserid düzeylerini düşürücü tedavi alan bireylerde karaciğer fonksiyon testlerinin düzeldiği bildirilmiştir (Yalçın ve ark., 2014).

2.2.2.2. NASH'ın Patogenezi

2.2.2.2.1. Çift Vuruş Hipotezi

Bu teoriye göre, ilk vuruşta önce karaciğerde hafif yağlanma olur. Bu durum karaciğerin hasar yapıcı etkenlere karşı daha hassas olmasını sağlar. İkinci darbeye ise Şekil 2.12.'de görüleceği üzere oksidatif stres, çeşitli sitokin ve kemokinlerin etkileri karşısında hepatositlerde hasar, inflamasyon ve karaciğerde fibrosiz gelişimi görülür (Sonsuz ve Baysal, 2011).

İlk vuruşta karaciğerin yağlanmasından kasıt, karaciğerdeki total trigliserit düzeyleri normalin 3-4 kat üstüne çıkmasıdır. Kolesterol, fosfolipid ve kolesterol esterlerindeki artış dikkate alınmamaktadır (Wnag ve ark., 1995).



Şekil 2.12. Çift vuruş hipotezinin şematik gösterimi

İlk vuruşta karaciğer lipid birikimi birçok etkenden kaynaklanır. Bu etkenler arasında insülin direnci, obezite, fruktoz tüketimi ve yağ asidi oksidasyonunun azalması gösterilmektedir. İlk vuruş sonrası birçok etkenden dolayı karaciğerde yağ asidi birikimi artması, karaciğer için toksik bir durum oluşturur (Engin, 2017). İkinci vuruş mekanizması henüz tam olarak aydınlatılamamış olsa da, oksidatif stresin ve çeşitli stokinlerin bu mekanizmada rol oynadığı düşünülmektedir (Lonardo ve ark., 2017; Tacke ve ark., 2009).

İnsülin Direnci

İnsülin; pankreasın langerhans adacıklarındaki β hücreleri tarafından üretilen, yağ ve karbonhidrat metabolizmalarında anahtar rol oynayan polipeptid yapıda bir hormondur. İnsülin direnci; insülinin dolaşımdaki normal düzeylerine rağmen özellikle glukozun insüline bağımlı olarak hücreye alındığı kas ve yağ dokularında yeterli yanıtı oluşturamamasına bağlı gelişen bir durumdur. İnsülin direnci sonucu kas ve yağ dokularında glukoz alımının azalması kan şekeri düzeyinde yükselmelere neden olur. Ayrıca glikoneogenezis ve lipolizisi inhibe etme etkisinin düşmesi gibi durumlar oluşur. Bu durumu düzeltmek için daha çok insülin salınımı medya gelir. Sonuçta kan şekeri düzeyi normal tutulmaya çalışılırken, insülin düzeyleri normalin 2-3 kat üstüne çıkar. Bu süreçte β hücre fonksiyon bozukluğu gelişir ve insülin salınımında azalma ile beraber hiperglisemi geçilir (Varman ve Gerald, 2013).

İnsülin direncinin karaciğer yağlanması üzerine etkileri şöyle sıralanabilir;

Artmış lipoliz: Normal sağlıklı bireylerde insülin hormonuyla, glukagon ve epinefrin hormonları düzenli şekilde çalışarak vücut metabolizmasını dengede tutmaktadır. Sağlıklı bireylerde kan glukoz düzeylerinin azaldığı durumlarda yağ dokusunda glukoz oranı azaldığından, glukagon ve epinefrin düzeyleri artarak yağ dokuda hormona duyarlı lipaz'ı aktive edilir ve buna bağlı olarak yağ dokudaki triaçilgliseroller (TAG) hidroliz edilerek, gliserol ve serbest yağ asitlerini (SYA) açığa çıkarır. Oluşan SYA'leri kandaki albumine nonkovalent bağlanarak karaciğere taşınır. SYA hepatositlerdeki mitokondriye aktararak β -oksidasyona uğrarlar ve ATP üretimi meydana gelir (Champe ve ark., 2007).

İnsülin direncine sahip bireylerde, kanda yüksek glikoz konsantrasyonlarına karşı yağ dokuya glikoz girişi olmadığından, sürekli olarak yağ dokudan TAG hidrolizi yapılır ve karaciğer hepatositlerinde aşırı SYA birikimi olur. Ayrıca artmış SYA'leri bir kısır döngü oluşturarak insülin etkisiyle kas ve yağ dokuya glikoz girişini de azaltır. Glikozun karaciğer hücrelerine girişi artar, karaciğerde glikoz belli bir düzeye kadar glikojen sentez yolağına girer, glikojen sentezlenmesi durduğunda artmış aşırı glikoz yağ asitlerinin öncülü olan asetil-KoA oluşumuna ve bunun sonucu yağ asiti sentez miktarı artarak hepatositlerde yağ asidi miktarı artar (Vatner ve ark., 2015; Sun ve Lazar, 2013).

Azalmış Lipoprotein lipaz aktivitesi: Lipoprotein lipaz yağ, kalp ve kas dokuda kapiller endotelinde bulunan bir enzimdir. Bu enzim dolaşımında bulunan lipoprotein partiküllerinde yer alan apo C-II tarafından aktive edilerek, lipoproteinlerdeki TAG'leri hidrolize eder. Lipoprotein lipazın sentezi ve hücre dışına yönelmesi insülin hormonu tarafından düzenlenir. İnsülin direnci olan bireylerde özellikle yağ dokuda lipoprotein lipaz sentezinin azalmasına bağlı olarak plazma şilomikron ve çok düşük dansiteli lipoprotein (VLDL) düzeylerinin yükselmesine neden olur. Karaciğer TAG sentezi ile VLDL arasındaki dengenin bozulması da karaciğer yağ birikiminin bir başka sebebi olarak görülmektedir (Czyzewska ve ark., 2010).

Santral Obezite

Santral obezite, özellikle vücudun karın ve göğüs bölgelerinde aşırı miktarda yağ birikmesiyle sonuçlanan bir hastalıktır. Santral obezitenin, karaciğerde lipid birikimine etkisi şu şekilde özetlenebilir; peroksizom çoğaltıcı aktive edilmiş reseptör γ (PPAR γ) ve sterol düzenleyici element bağlayan protein 1 (SREBP1), normal metabolizma şartlarında yağ doku hücrelerini TAG sentezi ve depolanmasına hazırlamaktadır. Ancak obezitede yağ doku hücrelerini TAG ile aşırı dolmuş olması, SREBP1 ve PPAR γ 'nın talebine yanıt oluşmamasına yol açar (Sanal, 2008). Obez kişilerin yağ doku hücrelerinde zamanla SREBP1 ve PPAR γ miktarlarında azalmalar olurken, karaciğer ve kas hücrelerindeki aktivitelerinde artışlar meydana gelir (Herman ve ark., 2012).

Bunun sonucunda, önemli miktarda TAG'ın karaciğer ve kas gibi ektopik bölgelerde birikimi olur. Aynı zamanda obeziteye bağlı olarak adipositlerde aşırı

TAG birikimi yağ doku inflamasyonuna yol açar. Obez kişilerde, adipositlerin makrofajlar tarafından işgal edildiği görülür (Shimobayashi ve ark., 2018).

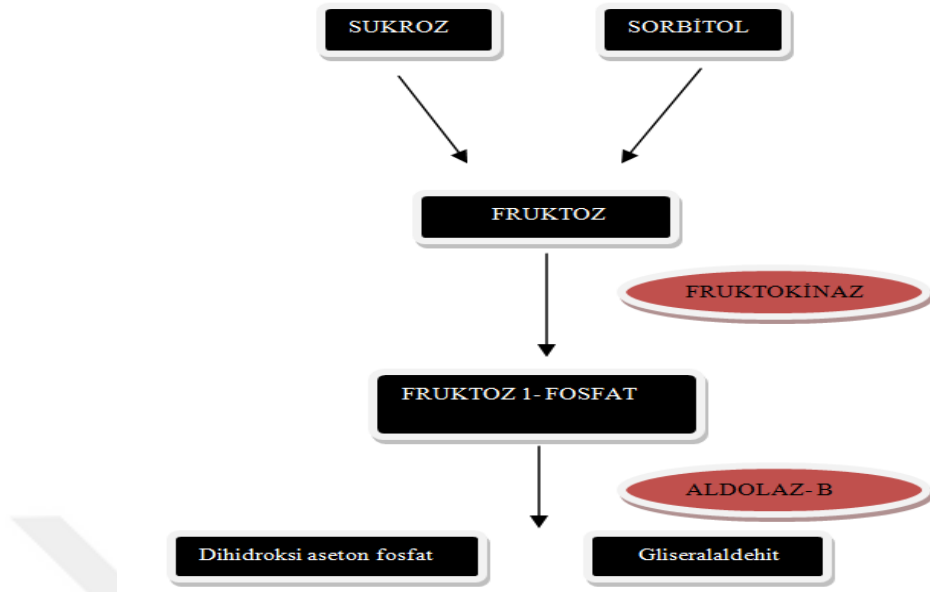
Tablo 2.2. Obezitenin dokularda meydana getirdiği değişimler

	NORMAL			OBEZ		
	YAĞ DOKU	KARACİĞER	KAS DOKU	YAĞ DOKU	KARACİĞER	KAS DOKU
PPAR γ ifadesi	+++	+	+	+	+++	+++
SREBP1 ifadesi	+++	+	+	+	+++	+++
Yağ sentezleme ve depolama kapasitesi	+++	+	+	+	+++	+++
İnsülin duyarlılığı	+++	+++	+++	+	+	+

Fruktoz Tüketimi

Meyve şekeri adıyla bilinen fruktoz, şekerli katkı maddesi olarak çeşitli hamur işlerinde, alkolsüz içeceklerde ve birçok gıda ürününde tatlandırıcı amaçlı kullanılmaktadır. Diyet ile yüksek miktarlarda alınan fruktozun, hepatik insülin duyarlılığını azaltmakta, de nova lipogenezi artırarak karaciğerde lipit birikimine neden olduğu düşünülmektedir (Sun ve Empie, 2012).

Karaciğer dışı dokularda fruktoz da glukoz gibi heksokinazın substratıdır. Ancak heksokinazın fruktoza ilgisi düşüktür. Fruktoz başlıca karaciğerde metabolize olur ve ana enzimi fruktokinazdır. Fruktokinaz, fruktozu 6. karbon yerine, 1. karbondan fosforilleyerek fruktoz-1 fosfat oluşumunu katalizler. Fruktoz-1 fosfat, fruktoz-6 fosfat gibi fruktoz 1.6 bifosfata çevrilmez. Aldolaz B enziminin katalizörlüğünde dihidroksiaseton fosfat ve gliserlaldehite yıkılır. Bu tepkimeler glikolizdeki fosfofruktokinaz basamağının bypass edilmesine ve fruktoz metabolizmasının glukoz metabolizmasından daha hızlı olmasını sağlar (Tran, 2017).



Şekil 2.13. Fruktoz metabolizması

Hepatositlerde, fruktozun bu hızlı metabolizması sonucu gliserol-3-fosfat ve açıl koenzim A üretimi artar. Aşırı yüklenmiş fruktoz, hepatic metabolik yükü artırarak, mitokondriyumda asetil CoA'nın fazla üretimini teşvik eder. Bu silsile sonucunda yağ asidi sentezinde öncül molekül olan hücre içi malonil-KoA birikimde artış olur. Karaciğerde lipid metabolizmasının lipogeneze kayması β oksidasyonu inhibe eder (Chen ve ark., 2017).

Bunun yanında aşırı fruktoz tüketimine bağlı olarak, oksidatif stresin arttığı ve karaciğer kupffer hücre aktivasyonuna neden olduğu bildirilmiştir (Spruss ve Bergheim, 2009). Hayvan ve insanlar üzerine yapılan birçok çalışmada; yüksek fruktoz diyetinin ince bağırsakta bakteri üremesini teşvik ederek, portal vendeki endotoksin düzeylerini arttırdığı ve NAFLD gelişimine katkısı olduğu bildirilmiştir (Nomura ve Yamanouchi, 2012; Ouelaa ve ark., 2017). Yüksek fruktoz diyetiyle beslenen farelere antibiyotik tedavisinin uygulanması sonucunda, hepatic lipid birikiminin belirgin bir şekilde engellediği gösterilmiştir (Bergheim ve ark., 2008).

Yağ Asidi Oksidasyonunun Azalması

A) Karnitin Mekiği Bozuklukları

Memeli hücrelerinde, yağ asidi oksidasyon enzimleri mitokondri matriksinde yer almaktadır. Kısa ve orta zincirli yağ asitleri herhangi bir özel taşıyıcıya ihtiyaç duymadan mitokondriye geçerken, uzun zincirli yağ asitleri mitokondriye geçişleri için **karnitin mekiği** denilen sisteme ihtiyaç duyarlar. Karnitin mekeğinde **Açil-KoA sentetaz, karnitin açil transferaz-1 (CPT-1) ve karnitin açil transferaz-2 (CPT-2)** olmak üzere 3 enzim görev alır. Bu enzimlerin katalitik aktivitesi sonucu yağ asitleri yıkılmak üzere mitokondri matriksine taşınır (Longo ve ark., 2017).

Bu üç enzimin genetik eksiklikleri veya yeterli düzeyde karnitin olmaması çeşitli komplikasyonlara neden olur. Bu enzim eksiklikleri ilgili yapılan çalışmalarda uzun zincirli yağ asidi oksidasyonunun azalmasına bağlı olarak, plazmada yağ asiti düzeylerindeki yükselmeler karaciğerde yağ birikimi oluşumuna katkısı olabileceğini bildirmektedir (Ibdah ve ark., 2005; Zhang ve ark., 2007).

Mitokondriyal β Oksidasyon Bozuklukları

Yağ asitlerinin içerdiği asetil gruplarının sitrik asit döngüsünde CO₂'e kadar yükseltgenmesi için, öncelikle yağ asitlerinin mitokondride β oksidasyon denilen bir dizi tepkime ile asetil-KoA'ya parçalanması gerekir. Yağ asitlerinin β oksidasyonu tepkimeleri 4 basamaktan oluşur. İlk basamakta, yağ asidi açil-KoA'nın α ve β karbon atomları arasında bir çift bağ oluşturmak için dehidrojenlenmesi sağlanır. Bu tepkimeyi **açil-KoA Dehidrogenaz** katalizler. Oluşan molekül trans- Δ^2 -enoil-KoA'dır. Bu enzimin yağ asiti açil zinciri uzunluklarına göre 3 izoenzimi bulunur (Nelson ve Cox, 2013).

- | | |
|---|----------------|
| 1- Uzun zincirli açil-KoA dehidrogenaz(VLCAD) | 12-22 karbonlu |
| 2- Orta zincirli açil-KoA dehidrogenaz (MCAD) | 6-12 karbonlu |
| 3- Kısa zincirli açil-KoA dehidrogenaz (SCAD) | 2- 6 karbonlu |

MCAD eksikliği en fazla görülen mitokondriyal yağ asidi oksidasyon bozukluğudur. Hastalarda en sık görülen belirtiler hipoglisemi, uyku hali ve kusmadır. Bu hastaların idrarında; 6-10 karbon içeren dikarboksilik asitler ve hafif düzeyde keton cisimlerine rastlanır (Flath ve ark., 1997). Karaciğer yağlanması ve kanda oktanoik seviyesinde artış meydana gelir. Bunun yanında VLCAD eksikliği sonucu uzun zincirli yağ asit oksidasyon bozuklukları da sık görülmektedir. Bu hastalarda nonketotik hipoglisemi görülmesi yanında hepatik steatoz da eşlik eder (Bennett ve ark., 2000).

B) Peroksizomal β Oksidasyon Bozuklukları

Her ne kadar yağ asitlerinin oksidasyonunun gerçekleştiği başlıca yer mitokondri matriksleri olsa da, peroksizomlarda da yağ asitleri β oksidasyona uğratılmaktadır. Oksidasyon tepkimeleri mitokondriyal β oksidasyona benzer olup, en önemli fark yağ asiti açıl-KoA'ların özgülüğüdür. Peroksizomlarda çok uzun zincirli yağ asitleri ile fitanik asit gibi dallanmış zincirli yağ asitleri oksidasyona uğratılır.

Peroksizomal β oksidasyon kusurları arasında en önemlisi belki de genetik geçişli ve çok nadir görülen bir hastalık olan, Zellweger sendromudur (Wanders ve Waterham, 2004).

Bu hastalıkta peroksizom oluşumu hiç yoktur. Hasta bireylerde peroksizom olmayışına bağlı olarak uzun ve dallanmış yağ asitlerini oksidasyona uğrayamaması sonucu bu yağ asitlerinin kanda düzeyleri artar ve hepatomegali gelişir (Tokatlı, 2001).

2.3. NAFLD Olgularında Karaciğer I/R Hasarı

Günümüzde; karaciğer nakillerinde yaşanan en büyük sıkıntılardan birisi, yeterli donör bulunamamasıdır. Bulunan potansiyel donörlerin ise yaklaşık % 30'unda belli evrelerde hepatik steatoza rastlanılmaktadır. Bu nedenlerden dolayı karaciğer nakillerinde yağlı karaciğerlerin kullanılmasının yaygınlaşması, beraberinde farklı sorunları da getirmiştir (Kato ve ark., 2014).

Çünkü NAFLD olgularında karaciğer I/R hasarı daha da çok artmaktadır (Ajamieh ve ark., 2015). Yağlı karaciğer, I/R hasarına karşı daha da savunmasızdır ve karaciğer nakilleri gibi karaciğer cerrahi girişimlerinden sonra postoperatif morbidite ve mortalite riski daha da artar (Tashiro ve ark., 2014).

Yağlı karaciğerde I/R hasar mekanizmasındaki karmaşıklığı iskemi sırasında kaynaklanan hipoksi ve reperfüzyonun yol açtığı oksidatif hasarın yanında bir de steatozdan kaynaklanan diğer hasarların birleşmesi sonucu ortaya çıkan ve her biri farklı yaralanmalara sebep olan karmaşık bir durumu içerir (Gupta ve ark., 2014).

Yağlı karaciğerde, normal karaciğer I/R hasarından daha çok hücre ölümü gerçekleşir. Bunun başlıca nedeni olarak NAFLD'de, yağ yüklü hepatositlerin I/R sırasında akut olarak şiddetlenen ve geniş parankimal hasara neden olan oksidatif stres gösterilmektedir (Reiniers ve ark., 2014).

İltihap uyaranlarına yanıt olarak, karaciğerden çok miktarda TNF- α salınımı gerçekleşmektedir. TNF- α , hem NAFLD'de hem de I/R hasarında merkezi bir rol oynar. TNF- α karaciğerde ikili bir etkiye sahiptir. Birçok yolakla ölüm sinyali kaskadını aktive edebilirken, diğer yandan hücre hayatta kalımını da teşvik edebilir. (Zhang ve ark., 2010). NAFLD ve karaciğer I/R hasarı sonucu ATP tüketiminin azalmasına bağlı olarak TNF- α 'nın hücreleri ölüme teşvik ettiği bildirilmiştir (Kloek ve ark., 2012).

Bunun yanında, yağlı karaciğer I/R hasarında mitokondriyel bozukluğunun rol aldığı da bildirilmektedir (Liu ve ark., 2012). Yağlı karaciğer, I/R hasarı esnasında düşük antioksidan düzeyine yanıt olarak daha yüksek düzeylerde mitokondriyal ROT üretir ve reperfüzyon sonrasında normal ATP düzeyleri iyileştirme kapasitesinde azalmalara ve hücre ölümünde artışa neden olur. Yakın zamanda

yapılan bir çalışmada, yağlı karaciğerde hem başlangıçtaki hem de I/R'ye yanıt olarak elektron transport zinciri (ETS) kompleksi I (KI)'in aktivitesinin azaldığını ve daha da önemlisi, uzun reperfüzyon sürelerinin ardından bile KI aktivitesinin düzelmediği gösterilmiştir (Prieto ve Monsal, 2017).

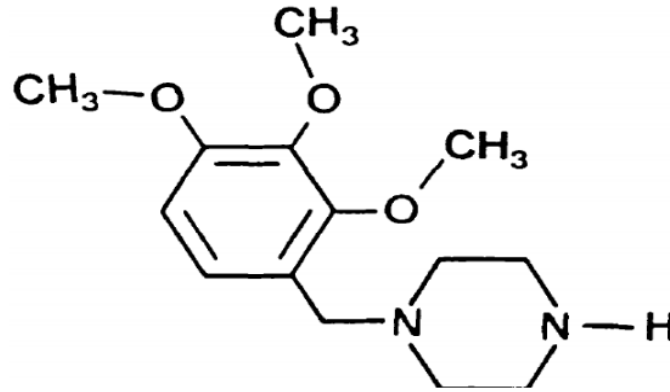
Tamamen ele alındığında, NAFLD'deki metabolik dalgalanmalar, mitokondriyal yolaklar yoluyla I/R hasarı sırasında hepatosit canlılığını olumsuz yönde etkilemektedir. Cyt-C salınımının artması, ATP üretiminin engellenmesi ve artmış inflamasyon, sağlıklı karaciğere karşı yağlı karaciğerde parankim hasarını büyük oranda artırır (Selzner ve ark., 2003).



2.4. Trimetazidin (TMZ)

TMZ, piperazin türevi (1-[2,3,4-trimetoksibenzil-piperazine) anti-iskemik bir ajandır (Nadkarni ve ark., 2015). Yağ asidi β -oksidasyonunda görevli son enzim olan 3-ketoaçil-CoA tiyolazın (3-KAT) selektif inhibitörüdür (Yang ve ark., 2017). Yağ asidi oksidasyonunun kısmen inhibisyonu, ATP üretiminin daha etkili bir aracı olan glikoliz hızının artmasına sebep olur. Potansiyel olarak faydalı diğer bir etki mekanizması, TMZ kollajen birikimi ve azalmış bağ dokusu büyüme faktörü (CTGF) ekspresyonu yoluyla kardiyak fibrozu doğrudan inhibe etmesidir. Böyle mekanizmaların, konjestif kalp yetmezliği ortamında bu ajanın yararlı etkilerini açıkladığı düşünülmektedir. (Steggall ve ark., 2017).

Ayrıca TMZ, piruvat dehidrogenazı (PDH) doğrudan uyararak iskemi sırasında piruvatın asetil-Co-A ya dönüşümünü kolaylaştırarak, glikoliz ile sitrik asit döngüsü yolağını sağlar. Böylece iskemi esnasında bozulan glukoz ve yağ asidi metabolizmasını düzenler (Fantini ve ark., 1994). Böylece hücre içi pH düşüşü, ATP miktarında azalmalar ve hücre içi Ca^{2+} girişi gibi olumsuz etkiler bertaraf edilebilir (Fath ve ark., 1997).



Şekil 2. 14. Trimetazidin Kimyasal Formülü

Koroner arter hastalarında; hastalığın semptomlarını azaltmak için beta blokerler, kalsiyum kanal blokerleri ve nitrat gibi anti iskemik ajanlar kullanılmakta olup, bu hastalarda kalp atış hızı ve kan basıncı değişiklikleri gibi hemodinamik parametreleri de değiştirmektedir. TMZ ise bu hastalarda anti iskemik etki gösterirken hemodinamik parametreleri değiştirmedeği için, son zamanlarda koroner arter hastalarında TMZ ya tek olarak ya da kombine tedaviler içinde aranan bir ajan haline gelmiştir. Monoterapi ve kombinasyon tedavisi denemelerinin sonuçlarına göre TMZ'nin haftalık angina atak sayısını, haftalık nitroglicerine tablet tüketimini ve egzersiz süresini, plaseboya kıyasla azalttığı meta-analizlerle desteklenmektedir (McCarthy ve ark., 2016).

TMZ'nin antioksidan etkisi üzerine birçok çalışma yapılmıştır. İskemi esnasında oksidatif stresi engelleyerek TMZ'in miyokard hücrelerini koruyucu etkiye sahip olduğu (Wu ve ark., 2013), TMZ'in sigara kullanımını sonucu oluşan oksidatif stres, apoptozis ve inflamasyonu anlamlı derecede azalttığı bildirilmiştir (Zhou ve ark.,2012). Ayrıca alzheimer hastalığı ve hastalık ilerlemesinin önlenmesinde de TMZ'in oksidatif stresi azaltarak nöroprotektif etkisi olduğu gösterilmiştir (Hassanzadeh ve ark., 2015).

3. GEREÇ VE YÖNTEMLER

Çalışma başlamadan önce T.C. Ordu Üniversitesi Hayvan Deneyleeri Yerel Etik Kurul Başkanlığından 11/02/2015 tarih ve 82678388/16 sayılı izin alındı.

3.1. Deney Hayvanları Ve Çalışma Grupları

Vücut ağırlıkları 185-200 gram arasında 32 adet Sprague Dawley cinsi sıçan çalışmaya dahil edildi. Sıçanlar, standart kafeslerde barındırılıp, yem ve su alımı serbest bırakıldı. Hayvanların bulunduğu oda 22 ± 2 C° de, 12 saat karanlık-12 saat ışık ortamında tutuldu. Sprague Dawley cinsi ratlar rastgele 4 gruba ayrıldı.

1.Grup (Kontrol grubu): Deneyin başından sonuna kadar (8 hafta) standart bazal diyetle beslendi ve herhangi bir cerrahi uygulanmadı (n=6).

2.Grup (Sham operasyon yağlı karaciğer grubu): Deneyin başından sonuna kadar (8 hafta) yüksek yağlı diyet ile beslendi ve laparotomi yapıp, hilusu diseke edilip İ/R oluşturulmadı (n=6).

3.Grup (Yağlı karaciğer iskemi/ reperfüzyon grubu): Deneyin başından sonuna kadar (8 hafta) yüksek yağlı diyet ile beslendi ve İ/R oluşturuldu (n=10).

4. Grup (Yağlı karaciğer TMZ tedavi edilen ve iskemi/reperfüzyon grubu): Deneyin başından sonuna kadar (8 hafta) yüksek yağlı diyet ile beslendi ve İ/R oluşturulmadan 30 dakika önce 10 mg/kg dozunda TMZ oral olarak gavajla verildi (n=10).

3.1.1. Standart Ve Yüksek Yağlı Diyet

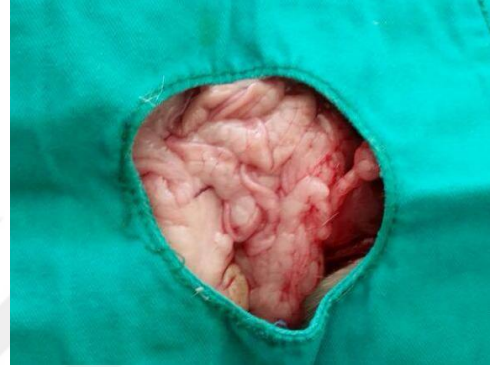
Sıçanların standart yemleri T.C. Ondokuzmayıs Üniversitesi Deney Hayvanları Merkezinden temin edildi. Diyet içeriğinde,% 15 protein, % 2,5 yağ, % 15 selüloz, % 14 kil, % 13 su bulunuyordu. Yüksek yağlı diyet, 100 gram standart diyete 25 gram hayvansal bir yağ türü olan taze kuyruk eklenerek oluşturuldu. Böylece toplam enerjinin % 65'i yağ kaynaklı bir diyet sağlandı (Zhou ve ark., 1998). Yüksek yağlı diyet hazırlanırken kuyruk yağları mikserden geçirilerek yumuşak jölemsi bir yapı oluşturuldu, toz haline getirilen standart yemler ile belirlenen oranlarda el ile köfte

boyutlarında karıştırılıp kurutuldu, böylece yağ içeriğinin tamamen standart yem tarafından emilmesi sağlandı.

Küflenme çok çabuk olduğu için yüksek yağlı diyet yemleri taze olarak sıçanlara verildi. Sıçanların deneyin başlamasından sonuna kadar yüksek yağlı diyet yemlerine uyum gösterdiği görüldü.



Normal diyetle ile beslenen grup



Yüksek yağlı diyetle beslenen NAFLD grubu

Şekil 3.1. Normal ve yüksek yağlı diyetle beslenen ratların karşılaştırılması

3.2. Ratlara İskemi ve Reperfüzyon Uygulanması

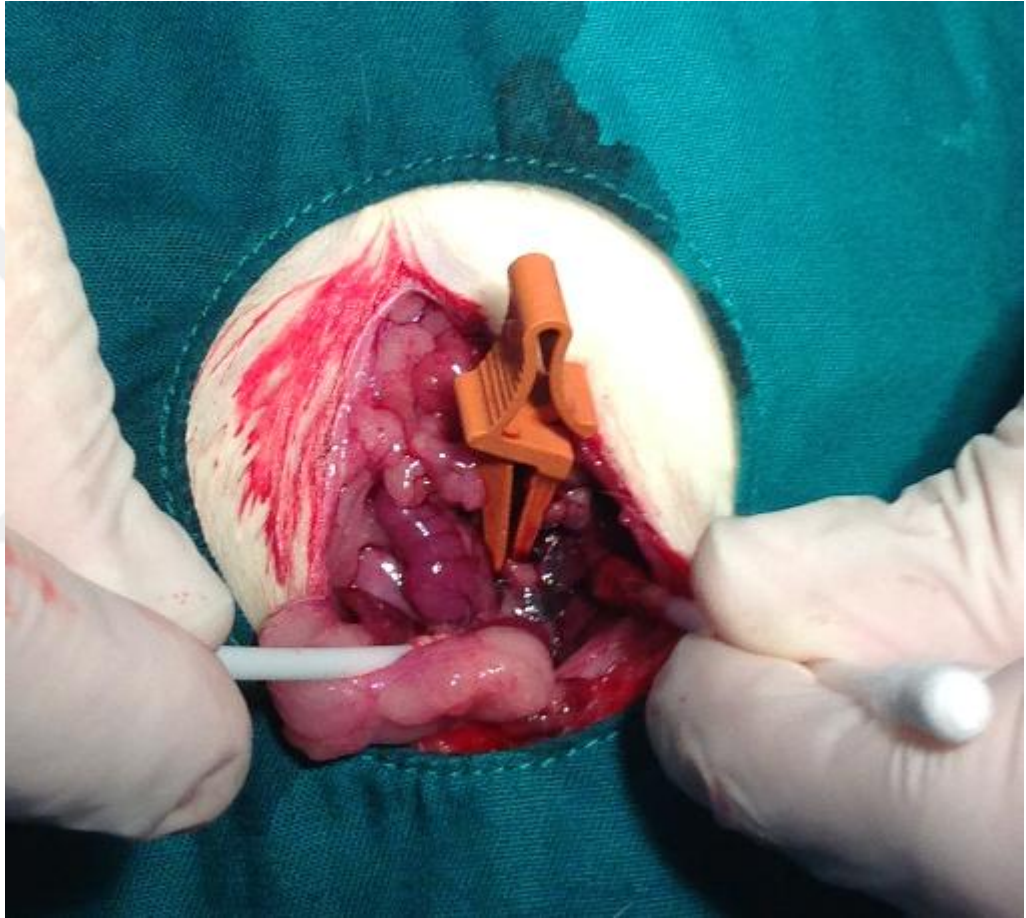
TMZ ile tedavi grubuna operasyondan 30 dakika önce 10 mg/kg dozunda TMZ (Vastarel tb® , Servier) oral olarak gavajla verildi, diğer tüm gruplara ise TMZ ile aynı volümde serum fizyolojik (SF) aynı yolla verildi.

Anestezi uygulanması: Ratlar tartılarak 15 mg/kg xylazine ile 75 mg/kg dozunda ketamin intraperitoneal uygulama ile genel anestezi yapıldı.

Ratlar 4 ekstremitelerinden operasyon masasına tesbit edilip, baticonla cilt temizlendikten sonra midline laparotomi ile hepatik pediküle mini vasküler bulldog klemp konarak karaciğere total iskemi uygulandı.

Operasyon sırasında ratlar batın ısısı kaybı olmasın diye kapalı tutuldu. İskeminin 60. dakikasında bulldog klemp açılıp, batına 2 cc SF bırakılarak batın 2/0 ipekle tek planda kapatıldı ve kafeslerine geri alındı. Çalışma sırasında oda ısısı 25 °C tutuldu.

Reperfüzyonun 6. saatinde ekstanguinasyon yoluyla ratlardan intrakardiak ponksiyonla çalışma için kan örnekleri alınıp sakrifiye edildi. Alınan kan numuneleri içinde antikoagülan içermeyen biyokimya tüpleri içine alındı 30 dakika süreyle kanın pıhtılaşması beklenip, 1800*g'de 10 dakika süreyle santrifüj edildikten sonra elde edilen serum numuneleri çalışmaya kadar -80 °C'de derin dondurucuda saklandı. Alınan karaciğer dokuları ışık mikroskobunda histopatolojik olarak değerlendirilmek üzere yüksek yağlı diyet grubunda karaciğer yağlanması tespiti için saklandı.



Şekil 3.2. Ratlara karaciğer iskemi-reperfüzyon uygulaması

3.3. Ağırlık Ölçümleri

Bütün deney grubundaki ratlar deneyin başlangıcında ve deney sonunda vücut ağırlıkları ölçülüp not edildi.

3.4. Parametrelerin Çalışılmasında Kullanılan Yöntemler

3.4.1. Serum Katalaz (CAT) Tayini

Katalaz aktivitesi Goth (1992)'un kolorometrik metoduna göre ölçüldü. Yöntemin temel prensibi, numune H₂O₂ substratıyla inkübe edilip, amonyum molibdat eklenerek reaksiyon durdurularak, oluşan sarı renkli kompleksin absorbansı 405 nm'de spektrofotometrede ölçülmesi esasına dayanır.

Çalışmanın yapılışı şu şekildedir;

Sodyum potasyum fosfat tamponu 60 mM, H₂O₂ (fosfat tamponunda) 65 µmol/mL, Amonyum molibdat 32,4 mM reaktifleri hazırlandıktan sonra 0,2 mL numune üzerine 1 mL substrat eklendi ve bir dakika 37°C'de inkübe edildi. İnkübasyon sonunda 1 mL amonyum molibdat eklenerek reaksiyon durdurularak 405 nm'de kör 3'e karşı absorbansı ölçüldü.

Kör 1: 1 mL substrat + 1 mL amonyum molibdat + 0,2 mL numune

Kör 2 : 1 mL substrat + 1 mL amonyum molibdat + 0,2 mL tampon

Kör 3 : 1 mL tampon + 1 mL amonyum molibdat + 0,2 mL tampon

Hesaplama:

$$\text{Katalaz aktivitesi (kU/L)} = \frac{A_{\text{kör1}} - A_{\text{numune}}}{A_{\text{kör2}} - A_{\text{kör3}}} \times 271$$

Bu formül ile her numunede ki CAT aktivitesi kU/L olarak hesaplandı.

3.4.2. Serum Miyeloperoksidaz Aktivitesi Tayini

Serum MPO aktivitesi tayininde, Bradley ve ark. (1982), tarafından geliştirilen metod kullanıldı.

Metodun prensibi, peroksidaz substratı olarak bilinen O-dianisidinin, H₂O₂ varlığında, MPO tarafından oksitlenerek sarı-turuncu renkli bir ürün oluşturması ve bu oksidasyon reaksiyonunun, zamana bağlı optik dansite (OD) artışı şeklinde, 460 nm’de izlenmesi esasına dayanmaktadır.

Çözeltiler

50 mM Potasyum fosfat tamponu, pH 6.0, %16.7 mg O-dianisidin dihidroklorid (tampon içinde taze hazırlanır), %0.0005 H₂O₂ substratı (O- dianisidin içeren tampon içinde taze hazırlanır) reaktifleri hazırlandıktan sonra, numune grubunda 2.9 mL H₂O₂ substratı üzerine 0.1 mL serum ve kontrol grubunda ise 2.9 mL H₂O₂ substratı üzerine 0.1 mL distile su ilave edilip, pipetleme işlemlerinden hemen sonra, 25°C’de ve 460 nm dalga boyunda, distile suya karşı numune ve kontrol tüplerindeki OD artışı, 5 dk süreyle kaydedildi.

Hesaplama

Numune ve kör tüpleri için, $\Delta OD/dk$ değerleri hesaplandı ve numune $\Delta OD/dk$ değerlerinden kontrol değeri çıkarılarak, net $\Delta OD/dk$ değerleri bulundu.

Bir ünite MPO, standart deney şartlarında, dakikada 1 mikromol O-dianisidinin oksidasyonunu katalizleyen enzim miktarı (U/L: $\mu\text{mol O-dianisidin/dk/L}$) olarak tanımlandı.

Okside O-dianisidinin molar ekstinksiyon katsayısı ($\epsilon=1.13 \times 10^4 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$) kullanılarak, plazma örneklerinin net $\Delta OD/dk$ değerlerinden, U/L cinsinden hesaplamalar yapıldı.

$$U/L = \frac{\text{net } \Delta OD/dk \quad X \quad \text{total hacim (ml)}}{\epsilon \quad X \quad \text{serum hacmi (ml)}} \quad X \quad 10^6 \mu\text{mol / mol}$$

3.4.3. Serum Sitokrom-C (Cyt-C) Tayini

Serum Sitokrom-C tayini “Enzyme-Linked İmmunosorbent Assay (ELISA) yöntemiyle çalışan hazır ticari kitler kullanılarak çalışıldı.

Deneyin Prensibi

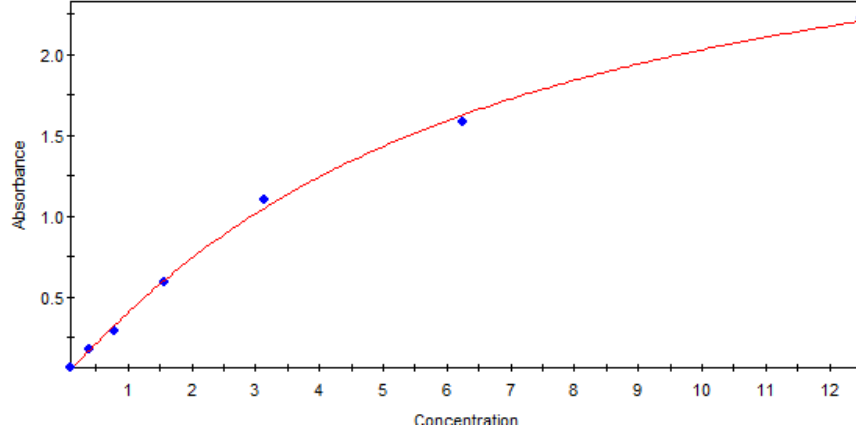
Deney prensibi; ilk olarak antijene özgü antikor ile kaplanmış kuyucuklara uygun miktarlarda standartların ve numunelerin eklenmesi ile başlamaktadır. Sitokrom-C ölçümünde yarışmalı ELISA protokolü uygulanmıştır. Bu yöntem genellikle antijen varlığını göstermek amaçlı kullanılmaktadır. Serumda aranan antijene özgü antikor katı faza bağlanır. Enzimle işaretli olan antijen ve serumdaki antijen katı fazdaki antikora eş zamanda eklenir ve her iki antijenin antikora bağlanması için belirli bir süre inkübe edilir. İnkübasyon süresi dolduktan sonra yöntemde belirtilen sayıca yıkanarak katı faza bağlanmayan antijenler uzaklaştırılır. Bağlanmış enzim üzerine substrat reaktifi eklenerek belirli bir süre inkübe edilir. Süre dolduktan sonra son olarak durdurucu solüsyon eklenir ve reaksiyon durdurulur. Sonuç spektrofotometrede 450 nm’de okutulur.

Gerekli Reaktiflerin Hazırlanması

Deneylelerimizdeki rat Cyt-C kitinde (Elabscience Biotechnology Co., Ltd., Beijing,. PRC) sandwich ELISA metodu kullanılmıştır. Rat Cyt-C’ne spesifik antikor 96 kuyucuklu plaklara kaplanmıştır. Tüm ELISA kitinde bulunan standart dilüsyon tamponu, standart, 96 kuyucuklu ELISA plağı ve rat serum örnekleri, çalışmaya başlamadan en az 1 saat önce dolaptan çıkartılarak oda sıcaklığına gelmeleri beklenmiştir. Kite bulunan 25 ng/mL konsantrasyonundaki standart, standart dilüsyon tamponuyla dilue edilmiştir. Dilüsyon sonrası standartlar seri dilüsyonlar yardımıyla 12.5 ng/mL, 6.25 g/mL, 3.13 ng/mL, 1.56 ng/mL, 0.78 ng/mL, 0.39 ng/mL ve 0 ng/mL konsantrasyona ayarlanmıştır. -80⁰C’de saklanan serum örnekleri oda ısısında çözündürüldükten sonra, ELISA çalışma aşamalarına hazır hale getirilmiştir.

Sitokrom-C Ölçüm Yöntemi

- 1) Tüm reaktifler, örnekler ve standartlar hazırlandı.
- 2) Standart ve örnekler 96 kuyucuklu rat Cyt-C antikoruyla kaplı kuyucuklara konulmuştur. Bu amaçla her bir kuyuya 100 µL serum örneği ve 100 µL standartlar pipetlenmiştir. Daha sonra plağın yüzeyi şeffaf örtü ile kaplandıktan sonra 37°C'de su banyosunda 90 dakika inkübasyona bırakılmıştır. İnkübe işleminden sonra yine her bir kuyucuğa 100 µL biyotinlenmiş anti-Cyt-C (biyotin ile konjuge) pipetlenmiş ve plağın yüzeyi şeffaf örtü ile kapatıldıktan sonra plak 37°C'de su banyosunda 1 saat inkübe edilmiştir.
- 3) 1 saatlik inkübasyon aşamasını takiben plağın yıkama aşamasına geçilmiştir. Yıkama işlemi otomatize ELISA yıkayıcısı (ELX50, BIO-TEK Instruments) kullanılarak yapılmıştır. Bu işlem plaktaki sıvılar aspire edildikten sonra otomatize olarak her bir kuyucuğa verilen 350 µL yıkama solüsyonu ile 3 kez yıkandı.
- 4) Yıkama aşamasını takiben her bir kuyucuğa 1/100 oranında dilüe edilmiş 100 µL HRP solüsyonu konulmuştur. Plağın yüzeyi şeffaf örtüyle kapatılıp 37°C'de su banyosunda 30 dakika oda ısısında inkübe edilmiştir.
- 5) 30 dakikalık inkübasyon aşamasını takiben plağın tekrar yıkama aşamasına geçilmiştir. Yıkama işlemi otomatize ELISA yıkayıcısı (ELX50, BIO-TEK Instruments) kullanılarak yapılmıştır. Bu işlem plaktaki sıvılar aspire edildikten sonra otomatize olarak her bir kuyucuğa verilen 350 µL yıkama solüsyonu ile 5 kez yıkandı.
- 6) Yıkama aşamasını takiben plağa 90 µL stabilize edilmiş kromojen ilave edilmiştir. 15 dakika 37°C'de su banyosunda karanlıkta plağın inkübasyonu yapılmıştır.
- 7) Plaklara 50 µL stop solüsyonu ilave edilip reaksiyon durdurulmuştur.
- 8) Plaklardaki optik dansite (OD) 450 nm dalga boyunda ELISA okuyucusunda (ELX800, BIO-TEK Instruments) değerlendirilmiştir. Standart solüsyonların konsantrasyonuna bağlı olarak hazırlanan kalibrasyon eğrisinden numune konsantrasyonları hesaplandı.



Şekil 3.3. Sitokrom-C absorbans- konsantrasyon grafiği

3.4.4. Serum NADPH Oksidaz Tayini

Deneyin Prensibi

Deney prensibi ilk olarak antijene özgü antikor ile kaplanmış kuyucuklara uygun miktarlarda standartların ve numunelerin eklenmesi ile başlamaktadır. NADPH Oksidaz ölçümünde yarışmalı ELISA protokolü uygulanmıştır. Bu yöntem genellikle antijen varlığını göstermek amaçlı kullanılmaktadır. Serumda aranan antijene özgü antikor katı faza bağlanır. Enzimle işaretli olan antijen ve serumdaki antijen katı fazdaki antikora eş zamanda eklenir ve her iki antijenin antikora bağlanması için belirli bir süre inkübe edilir. İnkübasyon süresi dolduktan sonra yöntemde belirtilen sayıca yıkanarak katı faza bağlanmayan antijenler uzaklaştırılır. Bağlanmış enzim üzerine substrat reaktifi eklenerek belirli bir inkübe edilir. Süre dolduktan sonra son olarak durdurucu solüsyon eklenir ve reaksiyon durdurulur. Sonuç spektrofotometrede 450 nm’de okutulur.

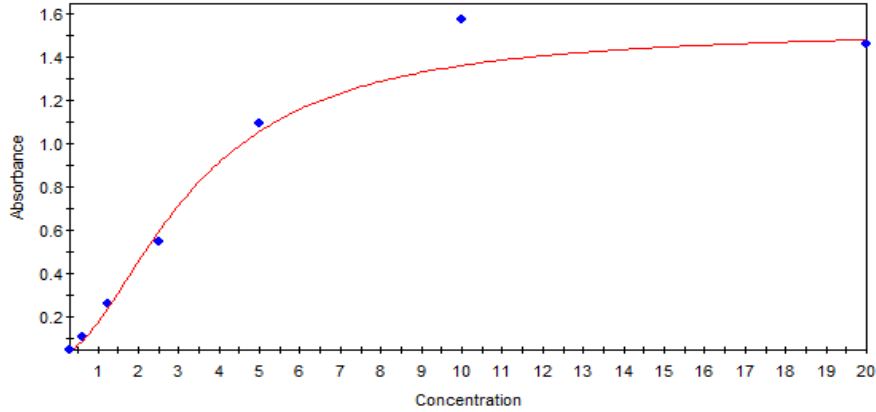
Gerekli Reaktiflerin Hazırlanması

Denelerimizdeki rat NADPH Oksidaz kitinde (Elabscience Biotechnology Co., Ltd., Beijing,. PRC)) sandwich ELISA metodu kullanılmıştır. Rat NADPH Oksidaz'a spesifik antikor 96 kuyucuklu plaklara kaplanmıştır. Tüm ELISA kitinde bulunan standart dilüsyon tamponu, standart, 96 kuyucuklu ELISA plağı ve rat serum örnekleri, çalışmaya başlamadan en az 1 saat önce dolaptan çıkartılarak oda sıcaklığına gelmeleri beklenmiştir. Kitte bulunan 20 ng/mL konsantrasyonundaki standart, standart dilüsyon tamponuyla dilüe edilmiştir. Dilüsyon sonrası standartlar seri dilüsyonlar yardımıyla 10 ng/mL, 5 ng/mL, 2.5 ng/mL, 1.25 ng/mL, 0.625 ng/mL, 0.313 ng/mL ve 0 ng/mL konsantrasyona ayarlanmıştır. -80°C'de saklanan serum örnekleri oda ısısında çözündürüldükten sonra, ELISA çalışma aşamalarına hazır hale getirilmiştir.

NADPH Oksidaz Ölçüm Yöntemi

- 1) Tüm reaktifler, örnekler ve standartlar hazırlandı.
- 2) Standart ve örnekler 96 kuyucuklu rat NADPH Oksidaz antikoruyla kaplı kuyucuklara konulmuştur. Bu amaçla her bir kuyuya 100 µL serum örneği ve 100 µL standartlar pipetlenmiştir. Daha sonra plağın yüzeyi şeffaf örtü ile kaplandıktan sonra 37°C'de su banyosunda 90 dakika inkübasyona bırakılmıştır. İnkübe işleminden sonra yine her bir kuyucuğa 100 µL biyotinlenmiş anti NADPH Oksidaz (biyotin ile konjuge) pipetlenmiş ve plağın yüzeyi şeffaf örtü ile kapatıldıktan sonra plak 37°C'de su banyosunda 1 saat inkübe edilmiştir.
- 3) 1 saatlik inkübasyon aşamasını takiben plağın yıkama aşamasına geçilmiştir. Yıkama işlemi otomatize ELISA yıkayıcısı (ELX50, BIO-TEK Instruments) kullanılarak yapılmıştır. Bu işlem plaktaki sıvılar aspire edildikten sonra otomatize olarak her bir kuyucuğa verilen 350 µL yıkama solüsyonu ile 3 kez yıkandı.
- 4) Yıkama aşamasını takiben her bir kuyucuğa 1/100 oranında dilüe edilmiş 100 µL HRP solüsyonu konulmuştur. Plağın yüzeyi şeffaf örtüyle kapatılıp 37°C'de su banyosunda 30 dakika oda ısısında inkübe edilmiştir.

- 5) 30 dakikalık inkübasyon aşamasını takiben plağın tekrar yıkama aşamasına geçilmiştir. Yıkama işlemi otomatize ELISA yıkayıcısı (ELX50, BIO-TEK Instruments) kullanılarak yapılmıştır. Bu işlem plaktaki sıvılar aspire edildikten sonra otomatize olarak her bir kuyucuğa verilen 350 μ L yıkama solüsyonu ile 5 kez yıkandı.
- 6) Yıkama aşamasını takiben plağa 90 μ L stabilize edilmiş kromojen ilave edilmiştir. 15 dakika 37⁰C'de su banyosunda karanlıkta plağın inkübasyonu yapılmıştır.
- 7) Plaklara 50 μ L stop solusyonu ilave edilip reaksiyon durdurulmuştur.
- 8) Plaklardaki OD 450 nm dalga boyunda ELISA okuyucusunda (ELX800, BIO-TEK Instruments) değerlendirilmiştir. Standart solüsyonların konsantrasyonuna bağlı olarak hazırlanan kalibrasyon eğrisinden numune konsantrasyonları hesaplandı.



Şekil 3.4. NADPH Oksidaz absorbans- konsantrasyon grafiği

3.4.5. Serum Malondialdehit (MDA) Tayini

Deneyin Prensibi

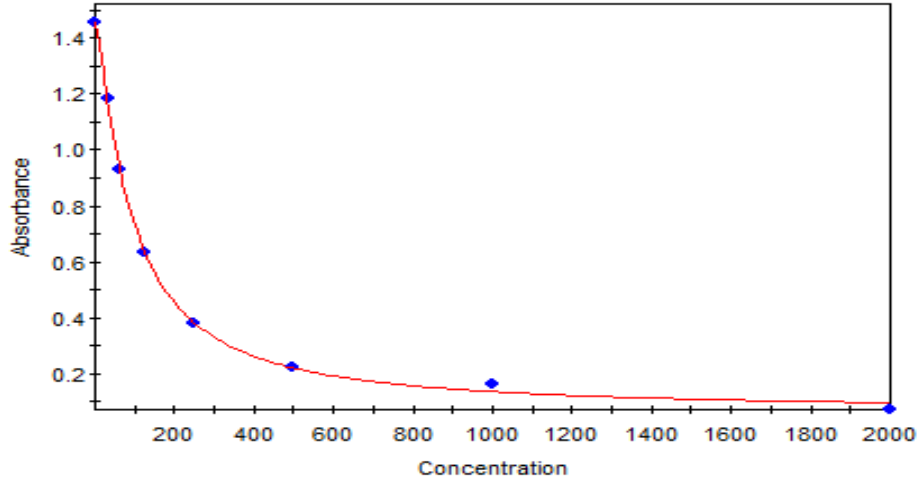
Deney prensibi ilk olarak antijene özgü antikor ile kaplanmış kuyucuklara uygun miktarlarda standartların ve numunelerin eklenmesi ile başlamaktadır. MDA ölçümünde yarışmalı ELISA protokolü uygulanmıştır. Bu yöntemi genellikle antijen varlığını göstermek amaçlı kullanılmaktadır. Serumda aranan antijene özgü antikor katı faza bağlanır. Enzimle işaretli olan antijen ve serumdaki antijen katı fazdaki antikora eş zamanda eklenir ve her iki antijenin antikora bağlanması için belirli bir süre inkübe edilir. İnkübasyon süresi dolduktan sonra yöntemde belirtilen sayıca yıkanarak katı faza bağlanmayan antijenler uzaklaştırılır. Bağlanmış enzim üzerine substrat reaktifi eklenerek belirli bir inkübe edilir. Süre dolduktan sonra son olarak durdurucu solüsyon eklenir ve reaksiyon durdurulur. Sonuç spektrofotometrede 450 nm'de okutulur.

Gerekli Reaktiflerin Hazırlanması

Deneylemizdeki rat MDA kitinde (Elabscience Biotechnology Co., Ltd., Beijing, PRC)) sandwich ELISA metodu kullanılmıştır. Rat MDA'ne spesifik antikor 96 kuyucuklu plaklara kaplanmıştır. Tüm ELISA kitinde bulunan standart dilüsyon tamponu, standart, 96 kuyucuklu ELISA plağı ve rat serum örnekleri, çalışmaya başlamadan en az 1 saat önce dolaptan çıkartılarak oda sıcaklığına gelmeleri beklenmiştir. Kitte bulunan 2000 ng/mL konsantrasyonundaki standart, standart dilüsyon tamponuyla dilue edilmiştir. Dilüsyon sonrası standartlar seri dilüsyonlar yardımıyla 1000 ng/mL, 500 ng/mL, 250 ng/mL, 125 ng/mL, 62.5 ng/mL, 31.3 ng/mL ve 0 ng/mL konsantrasyona ayarlanmıştır. -80°C'de saklanan serum örnekleri oda ısısında çözündürüldükten sonra, ELISA çalışma aşamalarına hazır hale getirilmiştir.

Malondialdehit Ölçüm Yöntemi

- 1) Tüm reaktifler, örnekler ve standartlar hazırlandı.
- 2) Standart ve örnekler 96 kuyucuklu rat MDA antikoruyla kaplı kuyucuklara konulmuştur. Bu amaçla her bir kuyuya 50 µL serum örneği ve 50 µL standartlar pipetlenmiştir. Daha sonra yine her bir kuyucuğa 50 µL biyotinlenmiş anti-MDA (biyotin ile konjuge) pipetlenmiş ve plağın yüzeyi şeffaf örtü ile kapatıldıktan sonra plak 37⁰C'de su banyosunda 45 dakika inkübe edilmiştir.
- 3) 45 dakikalık inkübasyon aşamasını takiben plağın yıkama aşamasına geçilmiştir. Yıkama işlemi otomatize ELISA yıkayıcısı (ELX50, BIO-TEK Instruments) kullanılarak yapılmıştır. Bu işlem plaktaki sıvılar aspire edildikten sonra otomatize olarak her bir kuyucuğa verilen 350 µL yıkama solüsyonu ile 3 kez yıkandı.
- 4) Yıkama aşamasını takiben her bir kuyucuğa 1/100 oranında dilüe edilmiş 100 µL HRP solüsyonu konulmuştur. Plağın yüzeyi şeffaf örtüyle kapatılıp 37⁰C'de su banyosunda 30 dakika oda ısısında inkübe edilmiştir.
- 5) 30 dakikalık inkübasyon aşamasını takiben plağın tekrar yıkama aşamasına geçilmiştir. Yıkama işlemi otomatize ELISA yıkayıcısı (ELX50, BIO-TEK Instruments) kullanılarak yapılmıştır. Bu işlem plaktaki sıvılar aspire edildikten sonra otomatize olarak her bir kuyucuğa verilen 350 µL yıkama solüsyonu ile 5 kez yıkandı.
- 6) Yıkama aşamasını takiben plağa 90 µL stabilize edilmiş kromojen ilave edilmiştir. 15 dakika 37⁰C'de su banyosunda karanlıkta plağın inkübasyonu yapılmıştır.
- 7) Plaklara 50 µL stop solüsyonu ilave edilip reaksiyon durdurulmuştur.
- 8) Plaklardaki OD 450 nm dalga boyunda ELISA okuyucusunda (ELX800, BIO-TEK Instruments) değerlendirilmiştir. Standart solüsyonların konsantrasyonuna bağlı olarak hazırlanan kalibrasyon eğrisinden numune konsantrasyonları hesaplandı.



Şekil 3.5. Malondialdehit absorbans- konsantrasyon grafiği

3.4.6. Serum 8-Hidroksi Guanozin (8-OHdG) Tayini

Deneyin Prensibi

Deney prensibi ilk olarak antijene özđü antikor ile kaplanmış kuyucuklara uygun miktarlarda standartların ve numunelerin eklenmesi ile başlamaktadır. 8-OHdG ölçümünde yarışmalı ELISA protokolü uygulanmıştır. Bu yöntem genellikle antijen varlığını göstermek amaçlı kullanılmaktadır. Serumda aranan antijene özđü antikor katı faza bağlanır. Enzimle işaretli olan antijen ve serumdaki antijen katı fazdaki antikora eş zamanda eklenir ve her iki antijenin antikora bağlanması için belirli bir süre inkübe edilir. İnkübasyon süresi dolduktan sonra yöntemde belirtilen sayıca yıkanarak katı faza bağlanmayan antijenler uzaklaştırılır. Bağlanmış enzim üzerine substrat reaktif eklenerek belirli bir inkübe edilir. Süre dolduktan sonra son olarak durdurucu solüsyon eklenir ve reaksiyon durdurulur. Sonuç spektrofotometrede 450 nm’de okutulur.

Gerekli Reaktiflerin Hazırlanması

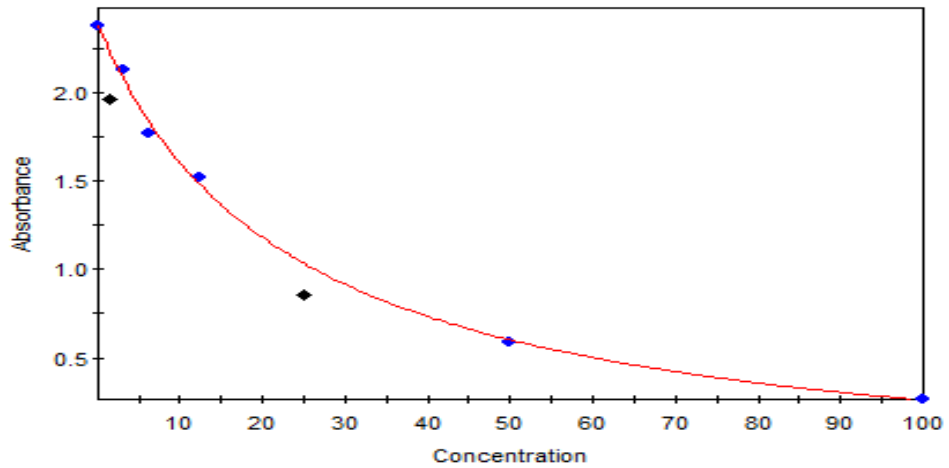
Deneylemizdeki rat 8-OHdG kitinde (Elabscience Biotechnology Co., Ltd., Beijing,. PRC) sandwich ELISA metodu kullanılmıştır. Rat 8-OHdG'ne spesifik antikor 96 kuyucuklu plaklara kaplanmıştır. Tüm ELISA kitinde bulunan standart dilüsyon tamponu, standart, 96 kuyucuklu ELISA plağı ve rat serum örnekleri, çalışmaya başlamadan en az 1 saat önce dolaptan çıkartılarak oda sıcaklığına gelmeleri beklenmiştir. Kitte bulunan 100 ng/mL konsantrasyonundaki standart, standart dilüsyon tamponuyla dilue edilmiştir. Dilüsyon sonrası standartlar seri dilüsyonlar yardımıyla 50 ng/mL, 25 ng/mL, 12.5 ng/mL, 6.25 ng/mL, 3.13 ng/mL, 1.56 ng/mL ve 0 ng/mL konsantrasyona ayarlanmıştır. -80⁰C'de saklanan serum örnekleri oda ısısında çözündürüldükten sonra, ELISA çalışma aşamalarına hazır hale getirilmiştir.

8-Hidroksi Guanozin Ölçüm Yöntemi

- 1) Tüm reaktifler, örnekler ve standartlar hazırlandı.
- 2) Standart ve örnekler 96 kuyucuklu rat MDA antikoruyla kaplı kuyucuklara konulmuştur. Bu amaçla her bir kuyuya 50 µL serum örneği ve 50 µL standartlar pipetlenmiştir. Daha sonra yine her bir kuyucuğa 50 µL biyotinlenmiş anti-MDA (biyotin ile konjuge) pipetlenmiş ve plağın yüzeyi şeffaf örtü ile kapatıldıktan sonra plak 37⁰C'de su banyosunda 45 dakika inkübe edilmiştir.
- 3) 45 dakikalık inkübasyon aşamasını takiben plağın yıkama aşamasına geçilmiştir. Yıkama işlemi otomatize ELISA yıkayıcısı (ELX50, BIO-TEK Instruments) kullanılarak yapılmıştır. Bu işlem plaktaki sıvılar aspire edildikten sonra otomatize olarak her bir kuyucuğa verilen 350 µL yıkama solüsyonu ile 3 kez yıkandı.
- 4) Yıkama aşamasını takiben her bir kuyucuğa 1/100 oranında dilüe edilmiş 100 µL HRP solüsyonu konulmuştur. Plağın yüzeyi şeffaf örtüyle kapatılıp 37⁰C'de su banyosunda 30 dakika oda ısısında inkübe edilmiştir.
- 5) 30 dakikalık inkübasyon aşamasını takiben plağın tekrar yıkama aşamasına geçilmiştir. Yıkama işlemi otomatize ELISA yıkayıcısı (ELX50, BIO-TEK

Instruments) kullanılarak yapılmıştır. Bu işlem plaktaki sıvılar aspire edildikten sonra otomatize olarak her bir kuyucuğa verilen 350 µL yıkama solüsyonu ile 5 kez yıkandı.

- 6) Yıkama aşamasını takiben plağa 90 µL stabilize edilmiş kromojen ilave edilmiştir. 15 dakika 37⁰C’de su banyosunda karanlıkta plağın inkübasyonu yapılmıştır.
- 7) Plaklara 50 µL stop solusyonu ilave edilip reaksiyon durdurulmuştur.
- 8) Plaklardaki OD 450 nm dalga boyunda ELISA okuyucusunda (ELX800, BIO-TEK Instruments) değerlendirilmiştir. Standart solüsyonların konsantrasyonuna bağlı olarak hazırlanan kalibrasyon eğrisinden numune konsantrasyonları hesaplandı.



Şekil 3.6. 8-Hidroksi Guanozin absorbans- konsantrasyon grafiği

3.4.7. Serum ALT ve AST Tayini

Bu çalışmada ölçülen AST, ALT tayinleri kolorimetrik yöntemle çalışan ARCHITECT marka ticari kitler kullanılarak, Hitachi PP Moduler marka otoanalizörle gerçekleştirildi.

3.5. Karaciğer Dokusu Histopatolojik Değerlendirmesi

Çalışmada gruplarının karaciğer dokuları Hematoksilen ve eozin (H&E) boyaması ile ışık mikroskopta karşılaştırmalı olarak incelendi.

Hepatosit dejenerasyonu, hepatik plakların yapısal bütünlüğü, steatozis, lenfosit infiltrasyonu ve sinüzoid dilatasyonu histolojik bulguları French ve ark. (French SW vd. 2000) tarafından tanımlanan skorlamaya göre değerlendirildi.

Skor 0 = hücre hasarı yok

Skor 1 = odaksal hepatosit hasarı dokunun % 25 'inden az ise

Skor 2 = odaksal hepatosit hasarı dokunun % 25-50 'inde ise

Skor 3 = şiddetli, fakat odaksal hepatosit hasarı

Skor 4 = yaygın hepatosit hasarı gözlenmesi şeklinde skorlandı

3.6. İstatistiksel Değerlendirme

Verilerin normal dağılım kontrolü Kolmogorov-Smirnov testi ile grup varyanslarının homojenlik kontrolü ise Levene testi ile yapılmıştır. Ağırlık değişkenine ait veriler iki faktörlü faktörlerden birinin seviyeleri tekrarlanan ölçümlü (Two-way ANOVA with repeated measures on one factor) varyans analizi ile geriye kalan değişkenler ise tek-yönlü varyans analizi (One-way ANOVA) ile değerlendirilmiştir. Farklı grupların belirlenmesi için %5 önem düzeyinde Tukey çoklu karşılaştırma testi yapılmıştır. Hesaplama ve yorumlamalarda %5 önem düzeyi (α) dikkate alınmıştır. Tüm hesaplamalar SPSS v24 (IBM Inc., Chicago, IL, USA) istatistik paket programı ile yapılmıştır. Sonuçlar ortalama \pm standart sapma (SD) olarak verilmiştir.

4. BULGULAR

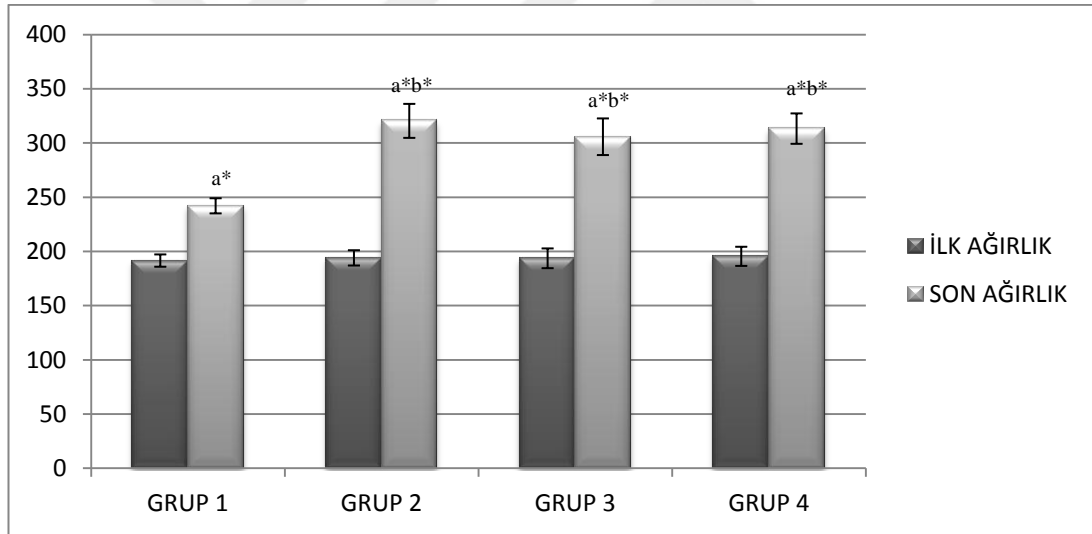
4.1. Gruplar Arası Ağırlık Karşılaştırılması

Çalışmaya katılan ratların ilk ve son ağırlıkları Tablo 4.1.'de gösterilmiştir.

Tablo 4.1. Çalışmaya katılan ratların ilk ve son ağırlıkları

	Grup 1 X ± SD	Grup 2 X ± SD	Grup 3 X ± SD	Grup 4 X ± SD
İlk ağırlık (gr)	191.50± 5.68	194.00± 7.04	193.60± 9.11	195.40 ± 8.83
Son ağırlık (gr)	242.00± 6.98 ^{a*}	320.33±15.68 ^{a*b*}	305.70±16.88 ^{a*b*}	313.20±14.01 ^{a*b*}

^a; başlangıç ağırlığı ile karşılaştırıldığında, ^b; çalışma sonrası kontrol grubu ile karşılaştırıldığında, *; p<0,001



Şekil 4.1. Çalışmaya katılan ratların ağırlıklarının şematik olarak gösterimi

Çalışma başında tüm gruplar arasında ağırlık değerleri arasında anlamlı olarak farklılık göstermemiştir ($p > 0,05$). Çalışma sonunda kontrol grubundaki ratların ağırlık ortalamalarının önemli derecede diğer gruplardan düşük olduğu belirlenmiştir ($p=0.000$).

4.2. Serumda CAT ve MPO aktivitelerinin karşılaştırılması

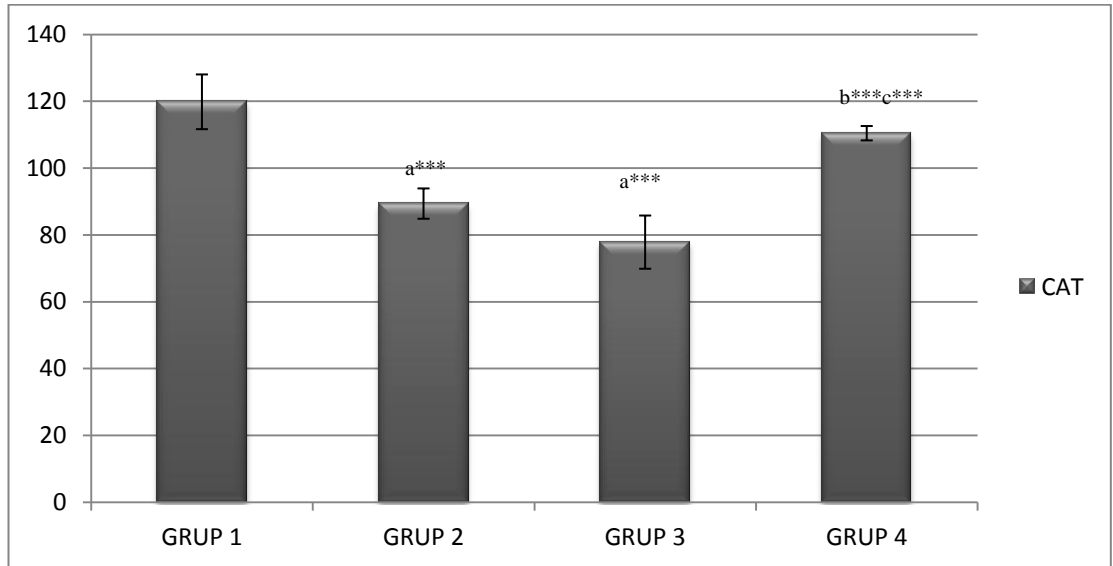
Çalışmaya katılan ratların serum CAT ve MPO aktiviteleri Tablo 4.2’de gösterilmiştir.

Tablo 4.2. Serum CAT ve MPO aktivitelerinin karşılaştırılması

	Grup 1 X ± SD	Grup 2 X ± SD	Grup 3 X ± SD	Grup 4 X ± SD
CAT (kU/L)	119.80± 8.18	89.33± 4.53 ^{a***}	77.80± 7.96 ^{a***}	110.40± 2.14 ^{b***c***}
MPO (U/L)	52.00± 3.46	148.43± 42.53 ^{a**}	189.21± 54.15 ^{a***}	84.44± 34.50 ^{c***}

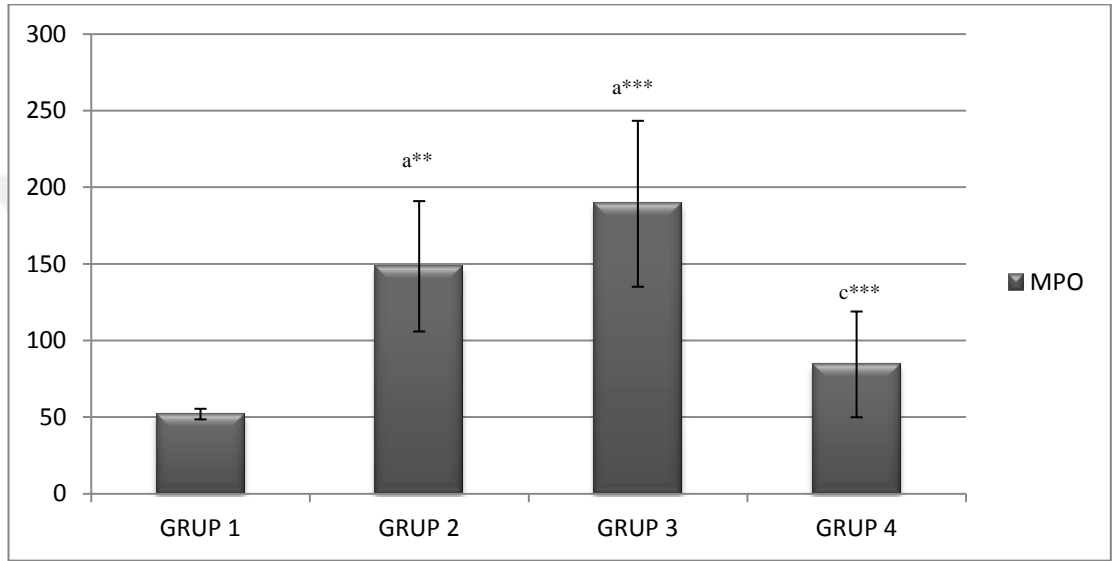
^a; grup 1 ile karşılaştırıldığında, ^b; grup 2 ile karşılaştırıldığında, ^c; grup 3 ile karşılaştırıldığında, *; p<0,05; ** p<0,01; *** p<0,001

CAT için yapılan varyans analizi sonucunda, gruplar arasındaki farklılık istatistiksel olarak önemli bulunmuştur. Yapılan Tukey testi sonuçlarında, kontrol grubuna göre CAT aktivitesinin grup 2 ve grup 3’de anlamlı olarak azaldığı (p=0,000), grup 4’de ise grup 2 ve grup 3’e göre anlamlı artış gösterdiği tespit edilmiştir (p=0,000). Grup 2 ve grup 3 arasında ise CAT aktivitesi anlamlı olarak değişiklik göstermemiştir (p > 0,05).



Şekil 4.2. Çalışmaya katılan ratların CAT aktivitelerinin şematik olarak gösterimi

MPO için yapılan varyans analizi sonucunda, gruplar arasında farklılık istatistiksel açıdan anlamlı bulunmuştur. Yapılan Tukey testi sonuçlarına göre; en düşük MPO aktivitesinin grup 1’de olduğu, grup 4’de ki MPO aktivitesinin grup 3’e göre anlamlı olarak düştüğü (p=0,000) tespit edilmiştir. Ayrıca grup 2 (p=0,002) ve grup 3’de ki (p=0,000) MPO aktivitelerinin grup 1’e göre anlamlı olarak yüksek bulunduğu ancak bu iki grup arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunmadığı tespit edilmiştir (p > 0,05).



Şekil 4.3. Çalışmaya katılan ratların MPO aktivitelerinin şematik olarak gösterimi.

4.3. Serum NADPH Oksidaz ve MDA düzeylerinin karşılaştırılması:

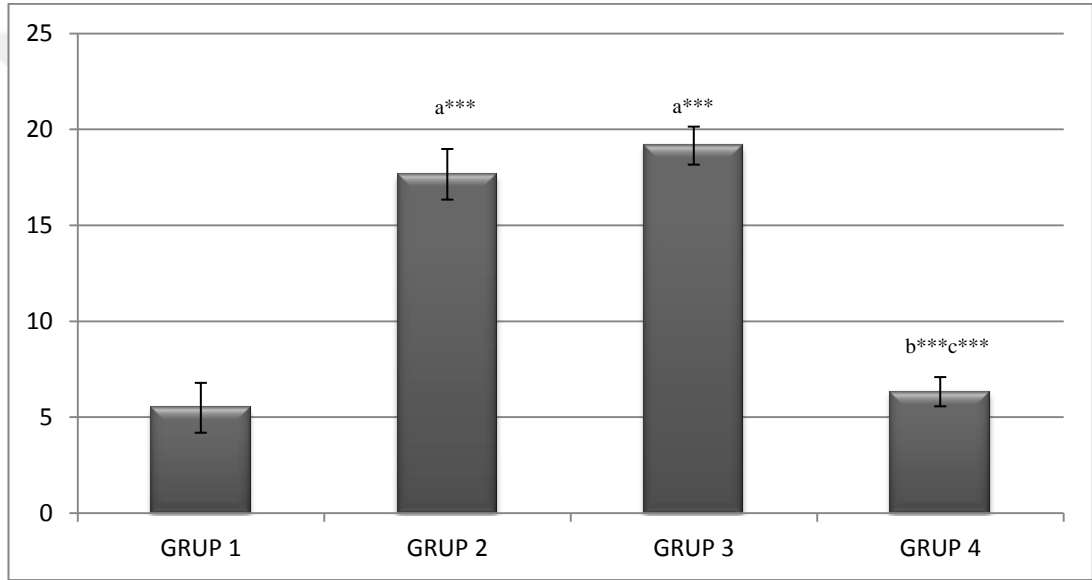
Çalışmaya katılan ratların serum NADPH Oksidaz ve MDA düzeyleri Tablo 4.3’de gösterilmiştir.

Tablo 4.3. Serum NADPH Oksidaz ve MDA düzeylerinin karşılaştırılması

	Grup 1 X ± SD	Grup 2 X ± SD	Grup 3 X ± SD	Grup 4 X ± SD
NADPH Oksidaz (ng/mL)	5.49± 1.30	17.66± 1.31 ^{a***}	19.15± 0.99 ^{a***}	6.33± 0.76 ^{b***c***}
MDA (ng/mL)	413.28± 112.89	583.08± 127.12	596.63± 163.53	555.53± 153.30

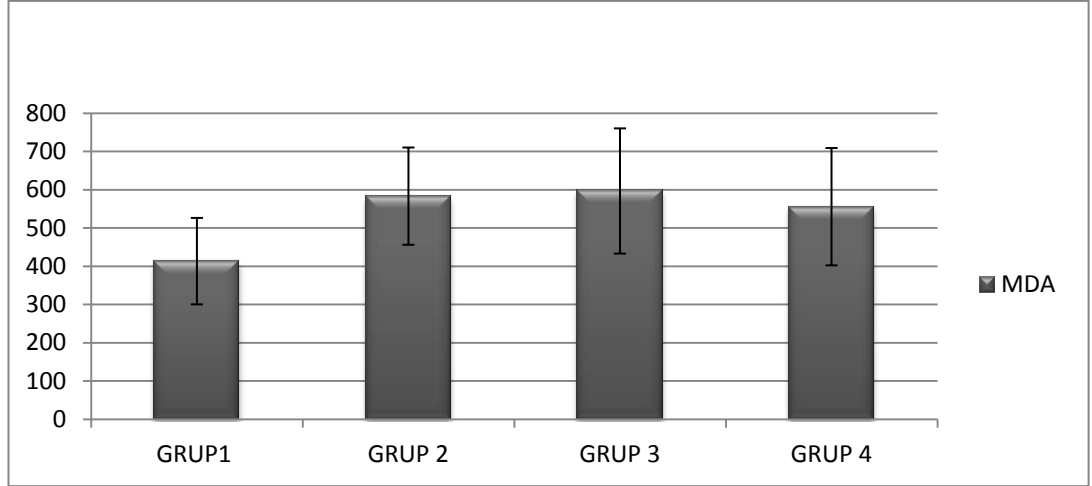
^a; grup 1 ile, ^b; grup 2 ile, ^c; grup 3 ile karşılaştırıldığında, *; p<0,05; ** p<0,01; *** p<0,001

NADPH Oksidaz için yapılan varyans analizi sonucunda, gruplar arasındaki farklılık anlamlı bulunmuştur. Farklı grupların belirlenmesi amacıyla yapılan Tukey testi sonuçlarına göre, kontrol grubuna göre NADPH Oksidaz düzeyinin grup 2 ve grup 3’de anlamlı olarak arttığı ($p=0,000$), grup 4’de ise grup 2 ve grup 3’e göre anlamlı derecede azalma olduğu tespit edilmiştir ($p=0,000$). En yüksek NADPH Oksidaz ortalamasının Grup 3’de olduğu görülmektedir. Ayrıca grup 1 ve grup 4 ile grup 2 ve grup 3 arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunmadığı tespit edilmiştir ($p > 0,05$).



Şekil 4.4. Çalışmaya katılan ratların NADPH Oksidaz düzeylerinin şematik olarak gösterimi

Serum MDA düzeylerinin bütün gruplar arasında anlamlı olarak farklılık göstermediği tespit edilmiştir ($p > 0,05$).



Şekil 4.5. Çalışmaya katılan ratların MDA düzeylerinin şematik olarak gösterimi

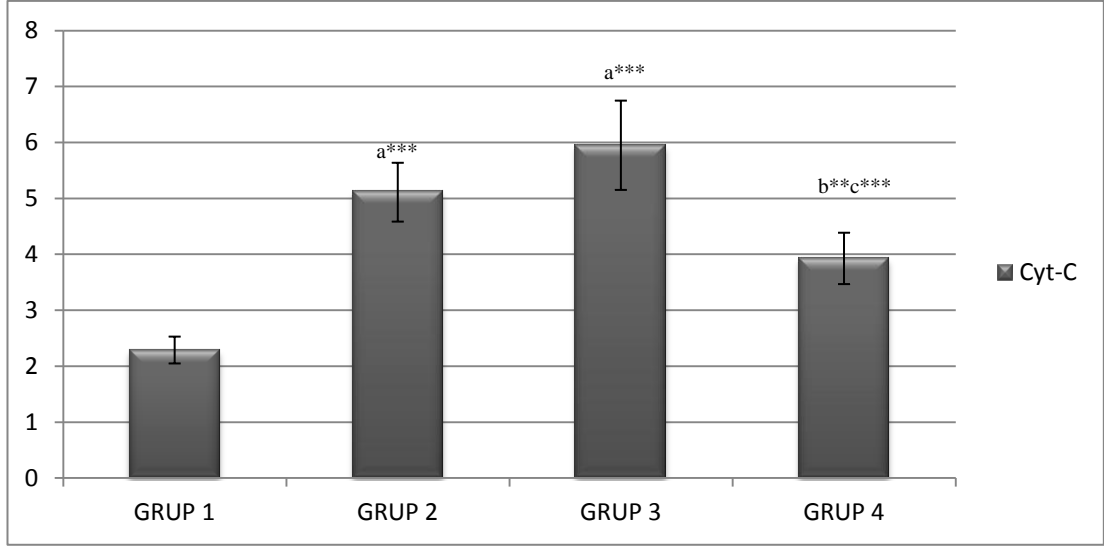
4.4. Serum Cyt-c ve 8-OHdG düzeylerinin karşılaştırılması

Tablo 4.4. Serum Cyt-c ve 8-OHdG düzeylerinin karşılaştırılması

	Grup 1 X ± SD	Grup 2 X ± SD	Grup 3 X ± SD	Grup 4 X ± SD
Cyt-C (ng/mL)	2.28 ± 0.24	5.10 ± 0.52 ^{a***}	5.94 ± 0.79 ^{a***}	3.92 ± 0.45 ^{b**c***}
8-OHdG (ng/mL)	37.625 ± 10.47	48.55 ± 23.56	52.075 ± 22.04	41.398 ± 17.896

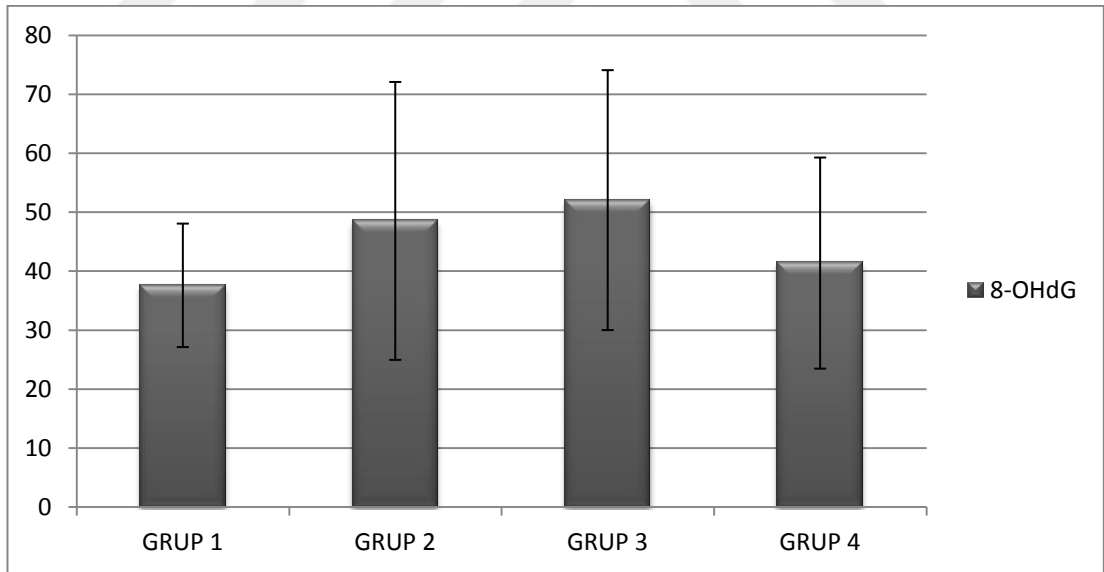
^a; grup 1 ile, ^b; grup 2 ile, ^c; grup 3 ile karşılaştırıldığında *; p<0,05; ** p<0,01; *** p<0,001

Serum Cyt-C için yapılan varyans analizi sonucunda gruplar arasındaki farklılık anlamlı bulunmuştur. Farklı grupların belirlenmesi amacıyla yapılan Tukey testi sonuçlarına göre en yüksek Cyt-C düzeyi grup 3’de tespit edilmiştir. grup 4’de ise, grup 3 (p=0.000) ve grup 2 (p=0.002)’ye göre anlamlı olarak düşük bulunduğu tespit edilmiştir. Kontrol grubuna göre, grup 2 ve grup 3’de Cyt-C düzeyi anlamlı artış göstermiştir (p=0.000). Grup 2 ve grup 3 arasında ise anlamlı farklılık tespit edilmemiştir (p > 0,05).



Şekil 4.6. Çalışmaya katılan ratların Cyt-C düzeylerinin şematik olarak gösterimi

Serum 8-OHdG düzeylerinin bütün gruplar arasında anlamlı farklılık göstermediği tespit edilmiştir ($p > 0,05$).



Şekil 4.7. Çalışmaya katılan ratların 8-OHdG düzeylerinin şematik olarak gösterimi

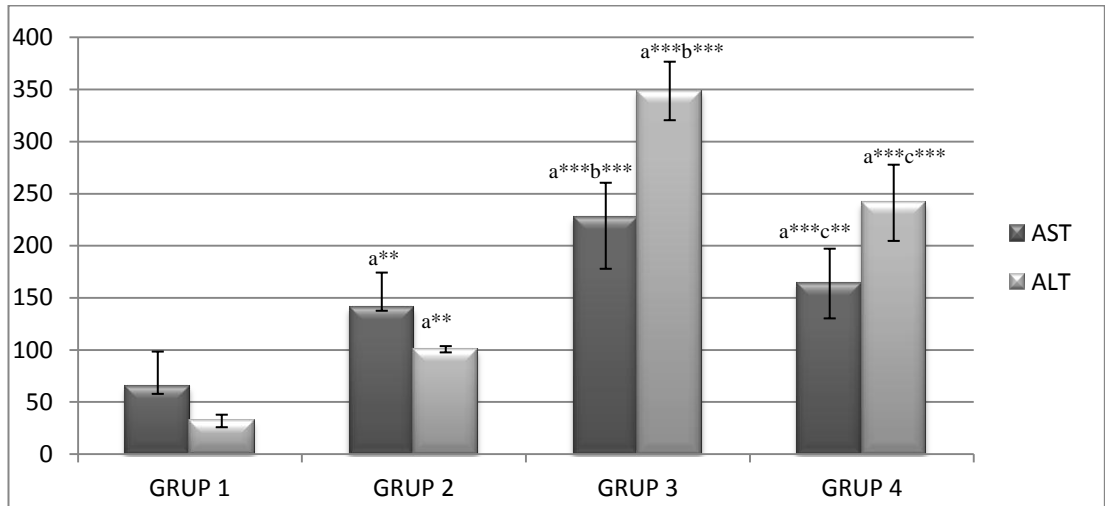
4.5. Serum AST ve ALT düzeylerinin karşılaştırılması

Tablo 4.5. Serum AST ve ALT düzeylerinin karşılaştırılması

	Grup 1 X ± SD	Grup 2 X ± SD	Grup 3 X ± SD	Grup 4 X ± SD
AST (U/L)	64.83±7.16	140.66±3.20 ^{a**}	226.90±49.14 ^{a***b***}	163.60±33.45 ^{a***c***}
ALT (U/L)	31.66±6.02	100.50±3.01 ^{a**}	348.50±28.08 ^{a***b***}	241.10±36.58 ^{a***c***}

^a; grup 1 ile, ^b; grup 2 ile, ^c; grup 3 ile, *; p<0,05; ** p<0,01; *** p<0,001

AST ve ALT için yapılan varyans analizi sonucunda gruplar arasındaki fark anlamlı bulunmuştur. En yüksek AST ve ALT aktivitesinin grup 3’de olduğu tespit edilmiştir. Kontrol grubuyla karşılaştırıldığında grup 2 (p=0.003), grup 3 (p=0.00) ve grup 4 (p=0.000) de AST ve ALT aktivitelerinin anlamlı olarak artış gösterdiği tespit edilmiştir. Grup 2’ye göre grup 3 (p=0.000) AST ve ALT aktivitesinin anlamlı olarak arttığı, grup 4’de ise grup 3’e göre AST (p=0.001) ve ALT (p=0.000) aktivitesinin anlamlı azaldığı tespit edilmiştir.



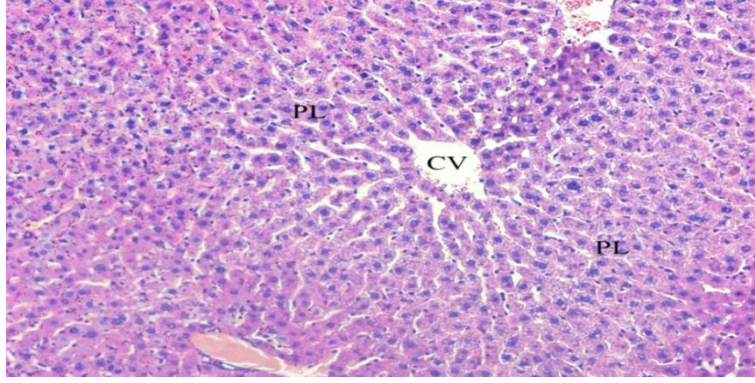
Şekil 4.8. Çalışmaya katılan ratların serum AST ve ALT düzeylerinin şematik olarak gösterimi

4.6. Çalışmaya Katılan Ratlatların Histopatolojik Bulguları

Grup 1’de hepatositlerin, merkezi venler, sinusoidlerin ve portal alanın genel histolojik yapısı normal görünümde ve skor 0 olarak gözlemlendi (Şekil 4.9 ve Şekil 4.10). Grup 2’de, sinüzoidlerin şiddetli dilatasyon gösterdiği gözlemlendi. Lipid depolanması nedeniyle sitoplazması bulanıklaşmış dejenerasyon başlangıcında olan ve nukleusu kondanse olmuş apoptozise doğru giden hepatosit hücrelerinin olduğu gözlemlendi. Steatozis başlangıcında olan ve az sayıda hepatositte veziküler lipid depolanmasının görüldüğü sham grubunda hepatosit hasarı skor 1 olarak saptandı.

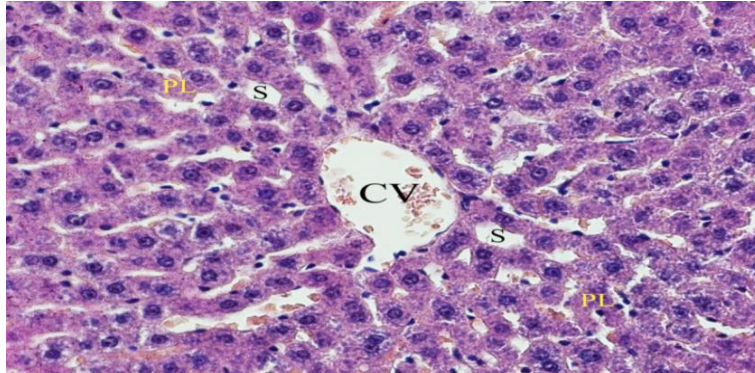
Grup 3’de makroveziküler ve mikroveziküler steatohepatitis gözlemlendi (Şekil 4.14). Makroveziküler steatozisde bir veya birkaç tane yuvarlak yağ damlacığının, hepatosit çekirdeğinin hücrenin periferine doğru yer değiştirmesine neden olduğu görüldü (Şekil 4.15). Mikroveziküler steatozisde, hepatosit çekirdeğini çevreleyen birçok küçük yağ damlacığının, hepatosite köpüksü ve veziküler bir görünüm verdiği gözlemlendi (Şekil 4.15). Yağlı karaciğer İskemi/ reperfüzyon grubunda (Grup 3) hücre ve hücre grupları şeklinde gözlenen hepatosit hasarı, yaygın skor 4 şiddetinde saptandı. Sinüzoid dilatasyonu, hepatosit dejenerasyonu ve hepatik plakların yapısal bütünlüğünde dejenerasyon dikkat çekti. Merkezi ven ve portal alan periferinde de lenfosit infiltrasyonu görüldü (Şekil 4.16 ve 4.17).

Grup 4’de mikroveziküler ve makroveziküler steatozis gösteren az sayıda hepatositlerin görüldüğü, hafif skor 2 şiddetinde bir steatozis gözlemlendi (Şekil 4.18). Sinüzoidlerin dilatasyonu ve inflamasyon grup 3’e göre göre azalmıştı (Şekil 4.19). Hepatik plakların yapısal bütünlüğünde grup 3’e göre düzelme gözlemlendi (Şekil 4.19).



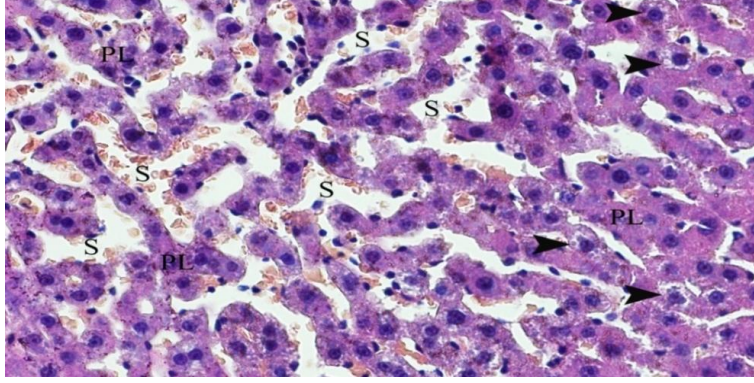
Şekil 4.9. Kontrol grubunun histolojik yapısı

Kontrol grubunda (grup 1) Hematoksilen ve eozin (H&E) boyamasıyla, merkezi ven (CV) ve çevresinde hepatositler normal histolojik yapıda görülmektedir. Hepatik plak (PL), x20 büyütme



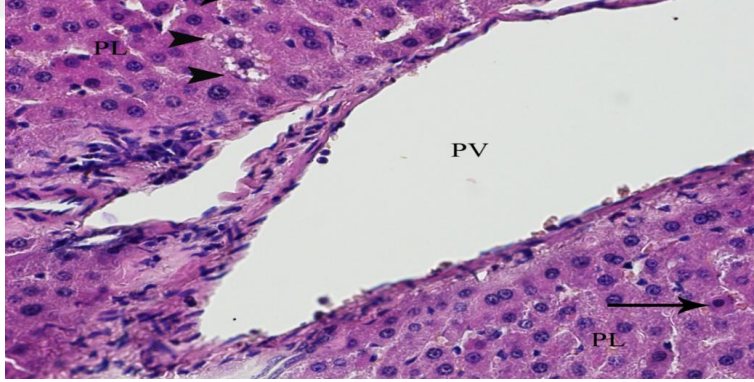
Şekil 4.10. Kontrol grubunun histolojik yapısı

Kontrol grubunda (grup 1) merkezi ven (CV) ve çevresinde hepatositler görülmektedir. Sinusoidlerin (S) ve hepatik plakların (PL) genel histolojik yapısı normal görünümde gözlenmektedir. H&E boyaması, x40 büyütme.



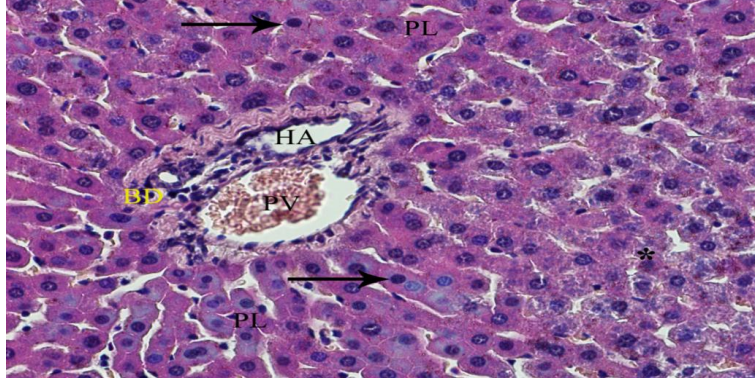
Şekil 4.11. Sham grubunda şiddetli dilatasyon

Sham grubunda (grup 2) şiddetli dilatasyon gösteren sinusoidler (S) ve veziküler lipid dejenerasyonu gösteren hepatosit hücreleri (okbaşları) görülmektedir. Hepatik plaklar (PL). H&E boyaması, x40 büyütme.



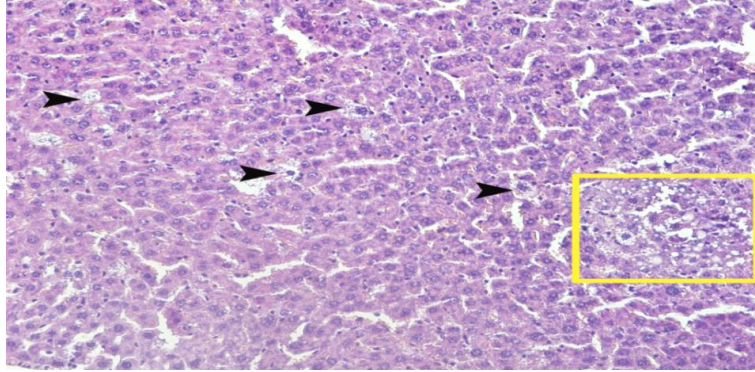
Şekil 4.12. Sham grubunda veziküler lipid dejenerasyonu

Sham grubunda (grup 2) veziküler lipid dejenerasyonu gösteren (okbaşları) ve nukleusu kondanse olmuş apoptozise giden hepatosit hücreleri (oklar) görülmektedir. Portal ven (PV), hepatik plaklar (PL). H&E boyaması, x40 büyütme.



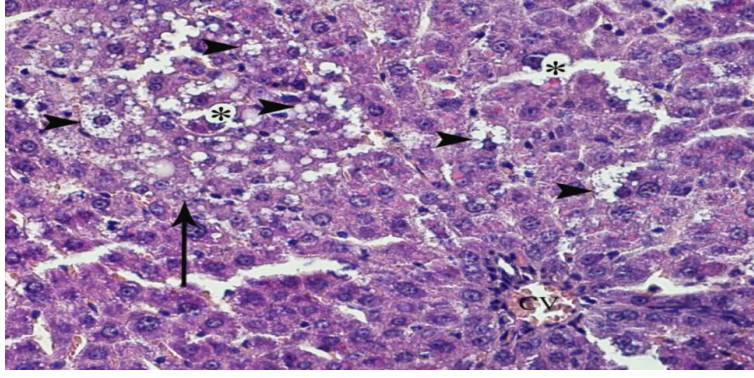
Şekil 4.13. Sham grubunda apoptozise giden hepatosit hücreleri

Sham grubunda (grup 2) nukleusu kondanse olmuş apoptozise giden hepatosit hücreleri (oklar) ve portal alana yakın sitoplazması bulanıklaşmış hepatositlerin bulunduğu alan (asterisk) görülmektedir. Portal venül (PV), hepatik plak (PL), safra kanalı (BD), hepatik arteriyol (HA). H&E boyaması, X40 büyütme.



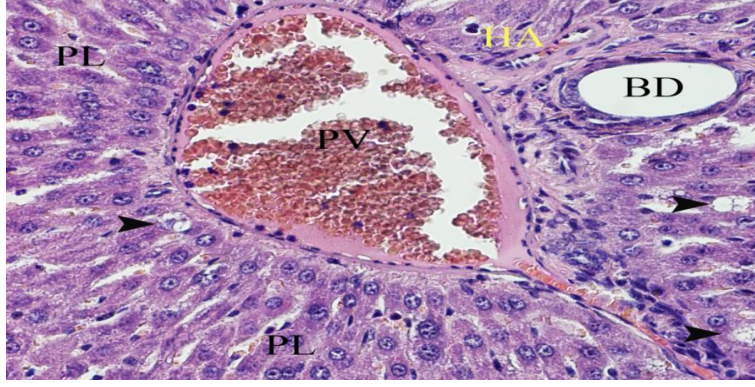
Şekil 4.14. Yağlı karaciğer İskemi/ reperfüzyon grubunda makroveziküler steatosis alanı

Yağlı karaciğer İskemi/ reperfüzyon grubuna (grup 3) ait ışık mikroskopik fotoğrafta mikroveziküler (okbaşları) ve makroveziküler steatosis alanı (sarı çerçeve) görülmektedir. H&E boyaması, X20 büyütme.



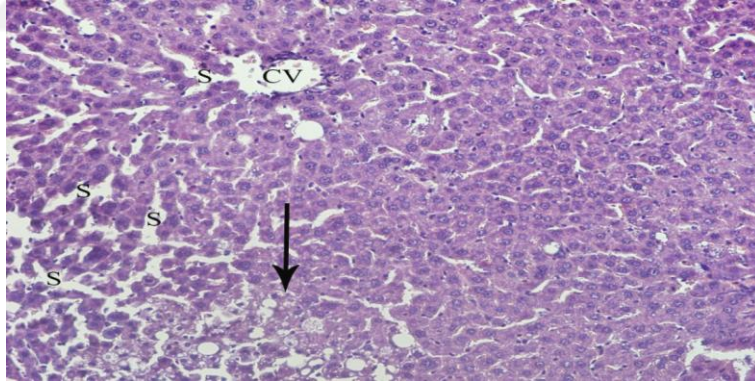
Şekil 4.15. Yağlı karaciğer İskemi/ reperfüzyon grubunda veziküler lipid dejenerasyonu

Yağlı karaciğer İskemi/ reperfüzyon grubuna (grup 3) ait karaciğer dokusunda hepatositlerin boyutunda artış ve veziküler lipid dejenerasyonunun sonucu olarak sitoplazmalarında köpüksü görünüm (okbaşları) ve makroveziküller (asterisk) gözlemlendi. İskemi grubunda sinuzoid ve hepatositlerin yapısal bütünlüğünde bozulma dikkat çekti. Merkezi ven (CV) çevresinde polimorfonükleer hücrelerin inflamasyonu görülmektedir. H&E boyaması, X40 büyütme



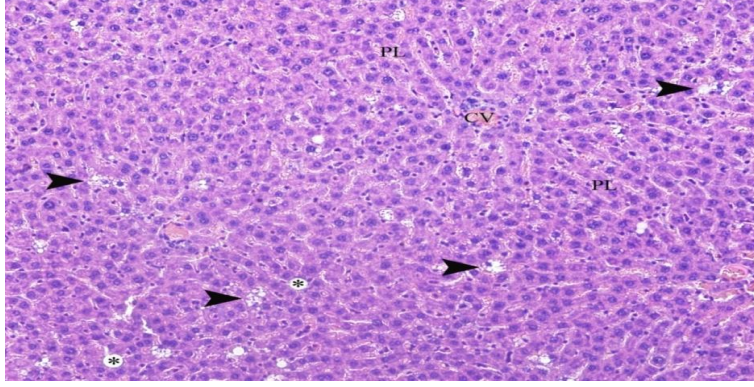
Şekil 4.16. Yağlı karaciğer İskemi/ reperfüzyon grubunda portal alan çevresinde veziküler lipid dejenerasyonu

Yağlı karaciğer İskemi/ reperfüzyon grubunda (grup 3) Portal alan çevresinde veziküler lipid dejenerasyonu (okbaşları) gösteren hepatositler görülmektedir. Portal venül (PV), hepatik plak (PL), safra kanalı (BD), hepatik arteriyol (HA). H&E boyaması, X40 büyütme.



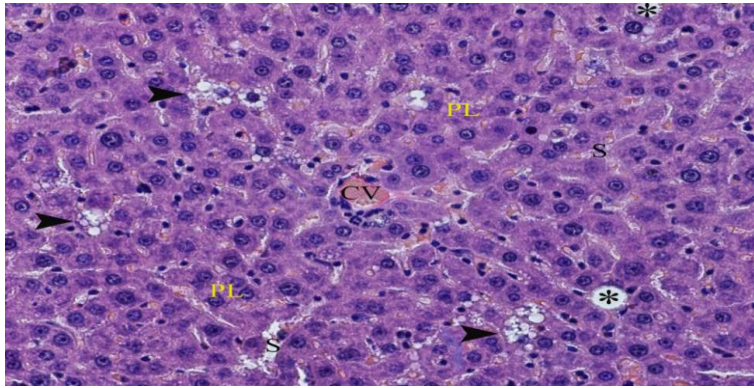
Şekil 4.17. Yağlı karaciğer İskemi/ reperfüzyon grubunda dilate olmuş sinüzoidler

Yağlı karaciğer İskemi/ reperfüzyon grubunda (grup 3) aşırı veziküler lipid dejenerasyonu gösteren hepatosit hücre grubu (ok) ve dilate olmuş sinüzoidler (S) görülmektedir. H&E boyaması, X20 büyütme.



Şekil 4.18. TMZ tedavi edilen ve iskemi/reperfüzyon grubunda makroveziküler steatosis

TMZ tedavi edilen ve iskemi/reperfüzyon grubunda (grup 4) mikroveziküler (okbaşları) ve makroveziküler steatosis (asterisk) gösteren hepatositler görülmektedir. Merkezi ven (CV) ve hepatik plaklar (PL). H&E boyaması, x40 büyütme.



Şekil 4.19. TMZ tedavi edilen ve iskemi/reperfüzyon grubunda mikroveziküler steatosis

TMZ tedavi edilen ve iskemi/reperfüzyon grubunda (grup 4) mikroveziküler (okbaşları) ve makroveziküler steatosis (asterisk) gösteren hepatositler görülmektedir. Merkezi ven (CV) ve hepatik plaklar (PL). H&E boyaması, x20 büyütme.

5. TARTIŞMA

Ratlarda deneysel NAFLD modeli oluşturmak için çeşitli yöntemler oluşturulmuştur. Lieber ve ark.'nın (2004) yaptığı modelde 3 hafta boyunca % 70 yağlı diyet sonrası NAFLD modeli olduğu bildirilmiştir. NAFLD'nin metabolik sendromla sıkı bir ilişki içerisinde bulunması rat modellerine yüksek yağlı diyetle ilaveten fruktoz diyetinin eklenmesinin karaciğer transaminaz düzeylerini anlamlı artırarak, NAFLD'ye neden olduğunu gösteren birçok çalışma mevcuttur (Govindaraj ve ark., 2016; Jegatheesan ve ark., 2016). Diğer bir yöntem metionin-kolinden yoksun (MCD) diyettir.

Çalışmamızda ratlara 8 hafta süre ile toplam enerjinin % 65'i yağ tarafından sağlanan diyet uygulanmasının, karaciğer transaminaz düzeylerini yükselttiği, rat ağırlıklarında aşırı artışlara neden olduğu ve histolojik olarak da NAFLD modeli oluştuğunu gözlemledik. Sonuçlarımız literatürdeki NAFLD modelleri ile uyum sağlamaktadır (Jahn ve ark., 2018).

Hepatik I/R esnasında ROT, sitokin, kemokin ve birçok faktör hasar mekanizmasında görev alır. Bu faktörlerin sürekli olarak birbirini tetiklemesi kısır bir döngüye sebep olmaktadır. NAFLD'li olgularda, steatozlu karaciğerin antioksidan savunma mekanizmalarını yeterli kullanamaması, proinflamatuvar sitokin salınımının artması ve artmış lipid yükünün karaciğer üzerindeki toksik etkileri ve bazı genlerin ekspresyonundaki değişikliklere sebep olması, NAFLD I/R hasarını daha da şiddetlendirmektedir (Li ve ark., 2017).

Nikotinamid Adenin Dinükleotit Fosfat Oksidaz (NADPH Oksidaz), moleküler oksijenden süperoksit ve hidrojen peroksit üretimine katkı sağlayan multimerik transmembran bir enzim kompleksidir (Bedard ve Krause 2007). Bu kompleks enzim sistemi normal şartlarda hücre savunması için görev alır, ancak I/R bağlı hasar durumlarında bir savunma mekanizmasından daha çok hücre için zararlı etkilere sebep olabilir. Nitekim reperfüzyon esnasında hücrelerin ani oksijenlenmesi, NADPH Oksidaz'ın aktivitesinde aşırı artışlara neden olur. Bunun sonucu süperoksit üretiminin gereğinden fazla oluşu dokularda harabiyete neden olmakla birlikte I/R hasarında yer alan mekanizmalara da katkı sağlar (Kapoor ve ark., 2018).

Çalışmamızda da NADPH Oksidaz düzeyleri kontrol grubuna göre, sham grubu (grup 2) ve yağlı karaciğer iskemi ve reperfüzyon grubunda (grup 3) anlamlı oranda yüksek bulunmuştur. TMZ ile tedavi edilen grupta (grup 4) ise kontrol grubu hariç diğer gruplara göre, anlamlı olarak düşük bulunmuştur. Çeşitli iskemik hasar durumunda NADPH Oksidaz değişimini araştıran birçok çalışma mevcuttur. Krinjer ve ark. (2003), yaptığı çalışmada miyokard infaktüslü hastalardan alınan kardiyomiyositlerde NADPH Oksidaz düzeylerinin arttığını bildirmiştir. Başka bir çalışmada köpekler üzerinde miyokard iskemi-reperfüzyon sonucu oluşan serbest radikal hasarının etil-gallimide (NADPH Oksidaz inhibitörü) ile azaldığı gösterilmiştir (Duilio ve ark., 2001). Walder ve ark. (1997), tarafından yapılan farklı bir çalışmada ise NADPH Oksidaz eksikliği oluşturulmuş farelerde beyin I/R hasarında NADPH Oksidaz'ın önemli bir rolü olduğu ve NADPH Oksidaz eksikliğine paralel olarak beyin hasarının azaldığı bildirilmiştir.

Apocynin, selektif bir NADPH Oksidaz inhibitörüdür. Kimura ve ark. (2016), yağlı karaciğer I/R hasarında Apocynin kullanılmasının, I/R hasarını önemli ölçüde azalttığı ve bunun NADPH Oksidaz aktivitesinin engellemesi sonucu oluştuğunu bildirmişlerdir. Harada ve ark. (2004), ise NADPH Oksidaz enzimi eksikliği oluşturulmuş farelerde yapmış olduğu hepatik iskemi ve reperfüzyon modelinde ROT düzeylerinin düşüşüne bağlı olarak I/R hasarında azalmalar bildirmiştir. HepG2 hücrelerinde kapsaisin kaynaklı apoptoz mekanizmasında ROT bağımlı NADPH Oksidaz'ın sorumlu olduğu bildirilmiştir (Lee ve ark.,2004). NADPH Oksidaz aracılı ROT üretimine bağlı olarak oluşan hasar kronik hepatitiden, alkolik yağlı karaciğere kadar birçok karaciğer hastalıklarının nedenleri arasında gösterilmiştir (Ha ve ark., 2016).

Çalışmamızda elde ettiğimiz sonuçlar, steatotik karaciğerin sürekli olarak oksidatif strese maruz kalmasının, NADPH Oksidaz enziminde artışa yol açabileceğini düşündürmektedir. Çalışmamıza benzer şekilde Haggai ve ark. (2005), yağlı karaciğer ile ilgili çalışmalarında; NAFLD'li olgularda artmış TNF α 'nın NADPH oksidaz ekspresyonunu arttırdığı, artan NADPH Oksidaz aktivitesine bağlı olarak ROT artışının da NAFLD'nin ilerlemesine sebep olduğu sonucuna varmışlardır. Ayrıca Chen ve ark. (2015), vahşi tip yaban farelerinin yüksek yağlı

diyet ile beslemesi sonucunda oluşan karaciğer yağlanma modelinde, karaciğer NADPH Oksidaz mRNA ekspresyonunun kontrol grubuna göre istatistiksel olarak yüksek bulunmuşlar ve NAFLD'de NADPH Oksidaz inhibitörlerinin kullanılmasının hastalığın düzelmesine katkıda bulunabileceği görüşünü ileri sürmüşlerdir.

Çalışmamızda TMZ tedavisi I/R hasarına bağlı artış gösteren NADPH Oksidaz düzeylerinde anlamlı azalmaya neden olmuştur. Çalışmamıza benzer şekilde Liu ve ark. (2010), farelerde yapmış olduğu çalışmada TMZ'nin NADPH Oksidaz aracılı ROT aktivitesini inhibe ederek, miyokard fibrosizini azalttığını göstermişlerdir. Bu çalışmanın sonuçları çalışmamızla elde ettiğimiz sonuçları destekleyici bir diğer bulgudur. Bununla beraber yağlı karaciğer iskemisi ve reperfüzyon grubunda (grup 3) NADPH Oksidaz düzeylerinin kontrol ve TMZ ile tedavi grubuna göre anlamlı olarak yüksek çıkması, NADPH Oksidaz'ın yağlı karaciğer I/R hasarına bağlı artış göstermesinin bir sonucu olduğunu düşündürmektedir.

Myeloperoksidaz, hidrojen peroksitten (H_2O_2)'den hipoklorik (HOCl) asit oluşumunu katalizleyen ve böylece antimikrobiyal ajan olarak vücudun doğal bağışıklık sistemi içerisinde yer alan bir enzimdir. MPO'nun asıl substratının H_2O_2 olması, I/R hasarında önemli bir rol teşkil edebilir. Yukarıda değinildiği üzere çalışmamızın sonuçlarından biri olan I/R hasarı esnasında NADPH oksidaz'ın aktivitesindeki artışlar özellikle de reperfüzyon esnasında moleküler oksijenin süperoksit anyonuna dönüşümünde artışa, süperoksit dismutaz enzim katalizi sonucu H_2O_2 miktarında aşırı artışlara neden olmaktadır. H_2O_2 artışına bağlı olarak MPO aktivitesi artışı sonucu, ROT oluşumunun tetiklenmesi hücre hasarlarına neden olmaktadır. Ayrıca antioksidan enzim savunma sistemlerinde de düşüş yaşanmasına neden olarak, I/R hasarının artışında önemli katkıları olabileceği düşünülmektedir.

Çalışmamızda; yağlı karaciğer iskemisi ve reperfüzyon grubunda (grup 3) MPO aktivitesi, sham grubu (Grup 2) dışında diğer tüm gruplara göre anlamlı yüksek bulunmuştur. Ayrıca TMZ ile tedavi edilen grupta (grup 4) MPO aktivitesi, yağlı karaciğer iskemisi ve reperfüzyon grubuna (grup 3) göre anlamlı derecede düşük bulunmuştur. I/R hasarında MPO'nun nasıl etkilendiğine ilişkin yapılan çeşitli çalışmalarda farklı sonuçlar bulunmuştur. Yapılan bir çalışmada hepatik I/R sonrası MPO düzeylerinin, sham grubuna göre yüksek bulunduğu bildirilmiştir (Tao ve ark.,

2016). Başka bir çalışmada ise 10 dakika iskemik ön koşullandırmanın hepatik I/R hasarı sonucu artmış MPO düzeylerini düşürdüğü bildirilmiştir (Guang-jing ve ark., 2005).

Liu ve ark. (2015), hepatik I/R hasarı üzerine yaptıkları çalışmada, MPO aktivitesinin reperfüzyonunun 3. saatinde artmaya başladığını ve 6. saatte pik yaptığını göstermişlerdir. Gastrointestinal bir hormon olan, kolesistokinin (CCK)'in ratlarda karaciğer I/R hasarına karşı koruyucu etkinliğinin araştırıldığı bir çalışmada 60 dakika kısmi karaciğer iskemisi ardından 6 saat reperfüzyon süreci sonunda CCK ile muamele edilen grubun, sham grubuna göre MPO düzeylerinin düştüğü bildirilmiştir (Zhang ve ark., 2017).

MPO'nun I/R hasar mekanizması dışında, NAFLD'nin ilerlemesine de katkısı olduğunu düşündüren çalışmalar mevcuttur. Nitekim yağlanmış karaciğerin basit steatozdan, steatohepatite ilerleyişinde artmış MPO aktivitesinin büyük katkısı olduğu bildirilmiştir (Marra ve ark., 2008). Alshammari ve ark. (2018), tarafından bir çalışmada yüksek yağlı diyetle beslenmiş, bunun yanında MPO eksikliği oluşturulmuş farelerde, NASH şiddetinin hepatik inflamasyon ve fibrozu azaltılarak düşürdüğü bildirilmiştir. Bunun yanında MPO aktivite artışına bağlı olarak miktarları artan serbest radikallerin fibrosiz gelişimi ve nötrofil birikimine sebep olduğuna dair bulgulara da rastlanılmaktadır (Lau ve ark., 2005).

TMZ antianjinal olarak kullanılan bir ajandır. Bunun yanında TMZ'nin oksidatif stres durumlarında adeta bir süpürücü gibi davranması bu ajanın oksidatif stres ile ilişkili hastalıklarda ilgi odağı olmasını sağlamıştır. Ratlarda inflamatuvar barsak hastalığı (İBD) modeli oluşturmak için yaygın olarak asetik asit kullanılır. Bir çalışmada asetik asit ile muamele edilmiş ratlarda MPO aktivitelerinin çok yükseldiği, asetik asit ile muamele edilip TMZ verilen grupta ise MPO aktivitesinin düştüğü bildirilmiştir (Kuralay ve ark., 2003).

Inci ve ark. (2001), tarafından yapılan rat akciğer transplantasyonu model çalışmasında, TMZ ile tedavi edilen grubun sham grubuna göre MPO aktivitesinin düşük olduğu bulunmuştur. Bu sonuç TMZ'nin I/R esnasında hücrelerin enerji

dengesi ve oksijenasyon hasarına karşı koruyucu etkisine bağı olarak oluşabileceğini düşündürmektedir.

Çalışmamızda; yağlı karaciğer I/R hasarına karşı MPO aktivitesinin TMZ ile tedavi edilen grupta düşük bulunması, I/R hasarının iskemi safhasında TMZ'nin hücrelerde muhtemelen ATP düzeylerine koruyucu etki göstererek ve reperfüzyon safhasında kontrolsüz oksijenlemeye karşı hücrelerde antioksidan aktivitede artış göstererek etki gösterebileceğini düşündürmektedir. Nitekim çalışmamızın bir başka sonucu olan TMZ uygulanan grupta antioksidan bir enzim olan CAT aktivitesinde anlamlı artışlara sebep olması TMZ'nin bu hasar mekanizmalarında antioksidan savunma mekanizmaya dolaylı ve hücresel düzeyde direkt katkısı olabileceği görüşünü kuvvetlendirmektedir.

MDA, lipit peroksidasyondaki artışı gösteren biyokimyasal bir belirteçtir. ROT moleküllerinin kısa ömürlü oluşu ölçümleri zorlaştırdığı için araştırmalarda uzun ömürlü olan bu tarz oksidatif stres belirteçleri kullanılır. Hücreler oksidatif stresle baş edemediği durumlarda, özellikle hücre membranında bulunan lipitler ROT saldırıları için açık hedef haline gelirler. I/R hasarı sonucu MDA düzeylerinin arttığına dair birçok çalışma mevcuttur (Abdelsameea ve ark., 2017; Shuna ve ark., 2013; Yuzhu ve ark., 2017). Bunun yanında yine steotik karaciğerde MDA düzeylerinin yükseldiği, yüksek yağlı diyet modeli oluşturulmuş rat modellerinde gösterilmiştir (Rao ve ark., 2017).

Çalışmamızda tüm gruplar arası MDA düzeylerinde istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunmamıştır. Mosbah ve ark. (2006), steatotik karaciğer transplantasyonu ile ilgili çalışmalarında TMZ'nin yıkama solusyonuna ilavesi ile steatotik karaciğerde I/R hasarı sonucu yükselmiş MDA seviyelerinin düştüğünü bildirmiştir. Yine akciğer transplantasyonu üzerine TMZ'nin koruyucu etkisinin araştırıldığı bir çalışmada, TMZ'nin lipit peroksidasyonunu azalttığı ve MDA seviyelerinin sham grubuna göre düştüğü bildirilmiştir (Inci ve ark., 2001).

Ancak, bazı çalışmalar bu görüşü tam desteklememektedir. Nitekim oksidatif böbrek hasarına karşı TMZ'nin koruyucu etkisinin araştırıldığı bir çalışmada, ratlara intraperitoneal olarak enjekte edilen 3 mg/kg TMZ'nin, MPO düzeylerini düşürdüğü,

ancak MDA düzeyleri üzerinde herhangi bir etki yaratmadığı bildirilmiştir (Yalçın ve ark., 2012).

Yine Omar ve ark. (2011), tarafından yapılan lipopolisakkarit kaynaklı oksidatif strese karşı TMZ'nin MDA üzerine etkisinin araştırıldığı çalışmada; farelere TMZ iki gün boyunca 1.8 mg/kg, 3.6 mg/kg ve 7.2 mg/kg olmak üzere 3 farklı dozda oral olarak uygulanması sonucu düşük doz TMZ uygulanmasının MDA düzeylerinde düşürücü bir etkisi olmadığı ancak yüksek dozlarda MDA düzeylerini düşürdüğü bildirilmiştir. Başka bir çalışmada ise ratlarda arka ekstremite I/R hasarına karşı I/R öncesi 7.5 mg/kg tek doz TMZ uygulanmış grupta, kontrol ve sham gruplarına göre MDA düzeylerinin istatistiksel olarak anlamlı değişmediği bulunmuştur (Da Silveira ve Yoshida, 2009).

TMZ'nin MDA üzerine etkisinin araştırıldığı çalışmalar arasındaki farklılığın oluşma nedeninin, ilacın dozaj ve verilme şekli ile ilgili olabileceğini düşündürmektedir. Bizim çalışmamızda da gruplar arası MDA düzeylerinin istatistiksel olarak farklı bulunmamasını bu görüşe bağlıyoruz. Çalışmamızda karaciğer I/R tedavi grubuna 30 dakika önce 10 mg/kg tek doz TMZ oral olarak verilmiş olup, herhangi bir yıkama solusyonu kullanılmamıştır. TMZ'nin tedavi grubuna bu dozda ve oral olarak verilmesi MPO ve NADPH Oksidaz gibi oksidan enzimler üzerine düşürücü etkisi olmasına karşın, MDA düzeylerinde anlamlı bir değişiklik göstermemiştir.

I/R hasarı hücrelerde birçok fonksiyonu olumsuz etkileyerek, hücrelerin bütünlüğünü ve biyokimyasal düzenini bozarak hücreleri ölüme sürükler. Özellikle de bu etkilerini dokuların oksidan-antioksidan dengesini bozarak gösterir. I/R hasarı sonucu artmış ROT düzeyleri hücrelerin antioksidan havuzunu tüketir (Liu ve ark., 2015).

Yapılan birçok çalışma, serbest oksijen radikallerinin toksik etkileri üzerine CAT'ın temel antioksidan savunma sisteminin vazgeçilmez bir unsuru olduğunu göstermiştir (He ve ark., 2017; Moris ve ark., 2017; Yu ve Huang, 2015). Ratlarda böbrek iskemi reperfüzyon sonucu böbrek dokularında CAT aktivitesinin, kontrol grubuna göre anlamlı olarak düştüğü ve bunun I/R hasarı sonucu artan oksidatif stresin antioksidan enzim havuzunu tüketmesine bağlı olabileceğini düşündürmektedir. (Takhtfooladi ve ark., 2016).

Caskurlu ve ark. (2016), böbrek I/R hasarına karşı bir çörek otu bitkisi olan *Nigella sativa*'nın koruyucu etkinliğini araştırdıkları çalışmada, I/R hasarı sonucu böbrek dokusunda CAT aktivitesinde istatistiksel olarak anlamlı azalma olduğunu tespit etmişlerdir. Karaciğer I/R hasarı oluşturulmuş başka bir çalışmada ise sham grubuna göre I/R grubunda CAT aktivitesi anlamlı olarak düşük bulunmuştur (Bae ve ark., 2014). Gedik ve ark. (2008), farelerde güçlü bir antioksidan flavanoid olan resvatorolün hepatik I/R hasarına karşı koruyucu etkilerini araştırdıkları çalışmada, I/R hasarı sonucunda CAT aktivitesinin kontrol grubuna göre anlamlı olarak azaldığını ve resvatorolün hepatik I/R hasarında CAT aktivitesini anlamlı olarak yükselttiğini bildirmişlerdir.

Çalışmamızda yağlı karaciğer iskemisi ve reperfüzyon grubunda (grup 3) CAT aktivitesi sham grubu (grup 2) hariç diğer tüm gruplara göre anlamlı azalma göstermiş, TMZ ile tedavi edilen grupta (grup 4) ise CAT aktivitesi kontrol grubu hariç diğer gruplara göre anlamlı artış göstermiştir. Yüksek yağlı diyet ile beslenme sonucu vücut antioksidan savunma sisteminin azalması ve ROT üretimindeki aşırı artışlar CAT üzerinde olumsuz etkiler meydana getirmektedir. Nitekim NAFLD'de artmış oksidatif stres sonucunda, antioksidan enzim düzeylerinde azalmaların olduğu ve bu düşüşle beraber NAFLD'nin NASH gibi daha ciddi komplikasyonlara ilerlemesine katkıda bulunduğu bildirilmiştir (Park ve ark., 2016). Deney hayvanlarında NAFLD modeli oluşturmanın bir başka yolu da, metionin-kolinden yoksun (MCD) diyettir. Jorgačević ve ark. (2014), farelerde MCD diyeti ile oluşturdukları NAFLD modelinde CAT aktivitesini kontrol grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı bir şekilde düşük bulmuşlardır.

Başka bir çalışmada yüksek yağlı diyet ile beslenen vahşi tip yabani farelerin CAT aktivitelerinin, kontrol grubuna göre anlamlı olarak düştüğü gösterilmiştir (Chen ve ark., 2015). Leghi ve ark. (2015), yaptıkları vaka-kontrol çalışmasında ise NASH tanısı konmuş bireylerle, NASH tanısı konmamış ama obez olan bireyler arasında CAT aktivitesi kıyaslandığında gruplar arası istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulamadıklarını bildirmişlerdir.

Çalışmamızda TMZ ile tedavi edilen grupta, yağlı karaciğer iskemi ve reperfüzyon grubuna (grup 3) oranla CAT aktivitesinin artması, TMZ'nin antioksidan sistem üzerine olumlu katkısının bir sonucu olabileceğini düşündürmektedir. Çalışmamıza benzer şekilde Zhang ve ark. (2013), H₂O₂'ile oksidatif hasar oluşturulmuş kardiyomiyositlerde TMZ'nin bu hasara karşı CAT aktivitesini anlamlı olarak arttırdığını göstermişlerdir. Bir başka çalışmada ise etanol ile oluşturulmuş deneysel ülser modelinde TMZ uygulanması, CAT aktivitesini diğer gruplara göre anlamlı olarak yükseltmiştir (Öztürk ve ark., 2009). Pathan ve ark. (2010), yaptığı bir başka çalışmada ise Doksorubisin ile kardiyomiyopati modeli oluşturulmuş ratlarda TMZ'nin CAT aktivitesi üzerine anlamlı olarak artırıcı katkısının olduğunu ve bunun sebebinin TMZ'nin radikal süpürücü etkisine bağlı olabileceğini bildirmişlerdir.

Yapılan çalışmalar göstermiştir ki karaciğer I/R sonrası ROT artışına bağlı olarak hücreler apoptoz ve nekroza uğrarlar (Jaeschke ve Lemasters, 2003). ROT bağımlı apoptozdan mitokondri sorumludur. Mitokondri işlev kaybı, enerji sisteminin altüst olması ve artmış ROT düzeyleri sonucunda mitokondri dış membranından Cyt-C salınımı olmakta, Cyt-C daha sonra Apaf -1 ile birleşip, kaspaz-9'u aktive ederek apoptozom denen yapıyı oluşturmaktadır (Shakeri ve ark., 2017; Yuan ve Akey 2013).

Hayvan modelleri üzerinde yapılan bir çalışmada apoptozun önceden engellenmesi ile reperfüzyon sonrasında hücre hasarında azalmalar olduğu bildirilmiştir (Gao ve ark., 1998). Kohli ve ark. (1999), tarafından yapılan karaciğer I/R hasarı çalışmasında, insan karaciğer hepatositlerinde yüksek miktarda apoptotik hücrelere rastlanmıştır. Cahova ve ark. (2015), ise yağlı karaciğer I/R hasarı üzerine antidiyabetik bir ilaç olan metformin'in koruyuculuğu üzerine yaptıkları çalışmada, yağlı karaciğer I/R hasarı sonucu Cyt-C salınımının arttığını ve mitokondri fonksiyon bozukluğuna sebep olduğunu göstermişlerdir. Başka bir çalışmada ise hepatik I/R hasarı sonrası karaciğerde Cyt-C ekspresyonunun kontrol grubuna göre anlamlı olarak arttığı, apoptotik hücre miktarında ise anlamlı artışlar olduğu gösterilmiştir (Kim ve ark., 2013).

Karaciğer yağlanmasıyla ilgili olarak hepatositlerin apoptoza yöneldiğini gösteren birçok çalışma mevcuttur (Wu ve ark., 2018; Kim, 2017; Cartland ve ark. 2017). NAFLD'de antioksidan sistemin azalması sonucunda oksidatif stres artışına bağlı olarak mitokondri fonksiyon bozukluğu oluşur, bu da hücreleri apoptoza teşvik eder. Alwahsh ve ark. (2014), yaptığı çalışmada yüksek yağlı diyet ve fruktoz ile ratlarda oluşturulmuş yağlı karaciğer modelinde Cyt-C seviyelerinin kontrol grubuna göre anlamlı olarak arttığını göstermiş ve bu durumun hücrel ROT miktarının artması sonucu, mitokondri geçirgenliğinin bozulmasından kaynaklandığını ileri sürmüşlerdir.

Çalışmamızda sham grubu (grup 2) ve yağlı karaciğer iskemi ve reperfüzyon grubu (grup 3) Cyt-C seviyeleri kontrol grubuna göre anlamlı olarak yüksek, TMZ ile tedavi edilen grup (grup 4) Cyt-C düzeyleri ise sham grubu (grup 2) ve yağlı karaciğer iskemi ve reperfüzyon grubuna (grup 3) göre anlamlı olarak düşük olduğu bulunmuştur. Bu sonucumuzun karaciğer I/R sonrası artmış ROT düzeylerine bağlı olarak, mitokondriyal dış membranı hasar görmesinin bir sonucu olduğunu düşünmekteyiz. Nitekim TMZ ile tedavi edilen gruptaki Cyt-C seviyelerinin, yağlı karaciğer iskemi ve reperfüzyon grubuna kıyasla anlamlı olarak düşük bulunması, TMZ'nin mitokondri stabilitesini koruduğunun bir göstergesidir. Çalışmamızı destekleyen başka bir çalışmada, Mahfoudh-Boussaid ve ark. (2012), böbrek I/R hasarı sonucu endoplazmik retikulum ve mitokondri hasarına karşı TMZ'nin etkilerini inceledikleri çalışmada, TMZ'in I/R hasarı sonucu artış gösteren Cyt-C seviyelerini, I/R grubuna göre anlamlı olarak düşürdüğünü ve bunun TMZ'nin ATP sentezini yeniden düzenlemesi ve mitokondri dış membran bütünlüğünü koruyucu etkisine bağlı olduğunu bildirmişlerdir. Bir başka çalışmada ise myokard I/R hasar modelinde TMZ'nin mitokondri geçirgenliğini kontrol grubuna göre anlamlı düşürdüğünü ve Cyt-C düzeylerinde azalmaya neden olduğu göstermişlerdir (Li ve ark., 2014).

Çalışmamızda TMZ uygulanmasının I/R hasarına bağlı artış gösteren Cyt-C düzeylerini düşürmesi bu bulgularla benzerlik göstermektedir, bu sonuç TMZ'nin NAFLD komplikasyonlarına karşı tedavi edici bir ajan olabileceğini düşündürmektedir.

Oksidatif stresteki aşırı artışlar, hücrelerde birçok biyomolekülü olumsuz yönde etkiler. Öyle ki hücrenin en önemli yapıtaşlarından biri olan DNA molekülü de bu hasardan nasibini alır. Oksidatif strese bağlı DNA hasarını gösteren birçok biyokimyasal belirteç bulunmaktadır. Ancak, günümüzde hücre zarından geçebilmesi, idrar ve serumda ölçülebilmesi açısından 8-OHdG daha çok tercih edilmektedir.

8-OHdG'nin somatik mutasyonlardan olan G > T geçişlerini indükleme kabiliyeti birçok kanser türünde gözlemlenmiştir. Yüksek yağlı diyet ile beslenme sonucu oksidatif stresin arttığı ve buna bağlı olarak özellikle guanin bazına OH[•] radikalının saldırıları sonucu, 8-OHdG'nin düzeylerinin arttığı çalışmalarla gösterilmiştir (Chen ve ark., 2015). Karaciğer I/R hasarı sonrası DNA hasarının meydana geldiği, 8-OHdG düzeylerinin arttığı ve bu hasarın aşırı ROT üretimi sonucu olduğunu gösteren çalışmalar mevcuttur (Keleş ve ark., 2008; Yamagami ve ark., 2000).

Bu olguların yanında, Kimura ve ark. (2016), yağlı karaciğer I/R hasarı üzerine yaptıkları çalışmalarında, yağlı karaciğerde, normal karaciğere göre I/R hasarı sonrası 8-OHdG düzeylerinin daha çok yükseldiğini, bunun nedeninin oksidatif strese karşı yağlı karaciğerin daha savunmasız oluşundan kaynaklandığını bildirmişlerdir.

Çalışmamızda gruplar arası 8-OHdG düzeyleri istatistiksel olarak anlamlı farklılık göstermemiştir. TMZ'nin oksidan ve antioksidan enzimler üzerine etkisini gösteren birçok çalışma olmasına karşın, 8-OHdG düzeyleri üzerine yeterli çalışmalar mevcut değildir. Mevcut olan çalışmaların sonuçları çalışmamıza benzer şekilde genellikle TMZ'nin 8-OHdG düzeylerine pek etki göstermediği yönündedir. Örneğin; üretral yaralanmalar üzerine TMZ'nin etkisi ile ilgili bir çalışma sonucu tüm gruplar arasında serum ve idrar 8-OHdG düzeyleri arasında istatistiksel olarak bir fark olmadığı, TMZ'nin 8-OHdG üzerine düşürücü bir etki meydana getirmediği bildirilmiş ve daha kapsamlı çalışmaların yapılması yönünde tavsiyelerde bulunulmuştur (Ayyıldız ve ark., 2016).

Serum aminotransferazları karaciğer hücre hasarının duyarlı bir göstergesi olup, karaciğer hastalığının tayininde en çok ölçülen iki aminotransferaz ALT ve AST'dir. AST karaciğer, kalp, kas ve böbrek gibi birçok dokuda bulunmasına rağmen ALT yalnızca karaciğerde bulunur.

Çalışmamızda yağlı karaciğer iskemi ve reperfüzyon grubunda (grup 3) serum AST ve ALT düzeyleri diğer tüm gruplara göre istatistiksel olarak anlamlı yükselişler göstermiş, TMZ ile tedavi edilen grupta (grup 4) ise AST ve ALT düzeyleri grup 3'e göre anlamlı olarak düşmüştür. Hepatik I/R hasarı sonrası bu enzimlerin serum düzeylerinin yükselmesinin beklenmesi aşikâr bir durumdur. Nitekim yapılan onlarca çalışma hepatik I/R hasarı sonrası hepatosit harabiyetine bağlı olarak bu enzimlerin serum düzeylerinin çok fazla bir şekilde arttığını göstermektedir (Li ve ark., 2018; Wang ve ark., 2017; Zhang ve ark., 2017). Bununla birlikte, NAFLD olgularında hastalığın seyrine göre hepatositlerde orta ve şiddetli hasar meydana gelir, bunun sonucu serum AST ve ALT düzeyleri hücre harabiyetinin bir göstergesi olarak yükselir (Alexander ve ark., 2018).

Çalışmamızda hepatik I/R hasarı sonucu AST ve ALT serum düzeylerinin TMZ uygulamasına bağlı olarak düşüşü hücre harabiyetini azaltmasının bir sonucu olduğunu düşünmekteyiz. Nitekim çalışmamıza benzer şekilde Boussaid ve ark. (2016), yaptığı çalışmada ratlara TMZ uygulanmasının, hepatik I/R hasarı sonucu artan AST ve ALT serum düzeylerini düşürdüğünü göstermişlerdir. Yine başka bir yağlı karaciğer I/R hasarı modelinde, I/R öncesi yıkama solusyonuna TMZ ilavesinin, ratlarda serum AST ve ALT düzeylerini anlamlı olarak düşürdüğü ve hepatositler TMZ uygulamasının hücrel oksidatif stresine karşı hücreleri harabiyetten koruduğunun bir göstergesi olduğu kabul edilmektedir. (Zaouali ve ark., 2013).

Çalışmamızda karaciğer dokusu histolojik bulguları; yağlı karaciğer iskemi ve reperfüzyon grubunda hücre ve hücre grupları şeklinde gözlenen hepatosit hasarı, yaygın skor 4 şiddetinde saptandı. Kontrol grubunda ise hepatositlerin genel histolojik yapısı normal görünümde ve skor 0 olarak gözlendi. Sham grubunda, sinüzoidlerin şiddetli dilatasyon gösterdiği ve steatozis başlangıcında olan hepatositte veziküler lipid depolanmasının görüldüğü nükleusu kondanse olmuş

apoptozise doğru giden hepatosit hücrelerinin olduğu gözlemlendi ve hepatosit hasarı skor 1 olarak saptandı. TMZ ile tedavi edilen grupta ise mikroveziküler ve makroveziküler steatozis gösteren az sayıda hepatositlerin görüldüğü, hafif skor 2 şiddetinde bir steatozis gözlemlendi. Bununla beraber TMZ ile tedavi edilen grupta sinüzoidlerin dilatasyonu ve inflamasyonu iskemi grubuna göre azalmıştı. Hepatik plakların yapısal bütünlüğünde yağlı karaciğer iskemi ve reperfüzyon grubuna göre düzelme gözlemlendi.

Karaciğer I/R hasarı sonucu, sinüzoid ve hepatositlerin yapısal bütünlüğünde bozulma, hepatik plakların yapısal bütünlüğünde dejenerasyon, merkezi ven ve portal alan periferinde de lenfosit infiltrasyonu, hepatosit apoptozu ve nekrozu görülür (Messiha ve Youssef 2015; Zhang ve ark., 2017; Al-saeedi ve ark., 2018). Bununla beraber NAFLD hasarı sonucu da lipid depolanmasına bağlı olarak hepatositlerde yaralanma ve apoptoz görülür (Oseini ve ark., 2018).

Çalışmamızda TMZ ile tedavinin sinüzoidlerin dilatasyonu ve inflamasyonunu azalttığı, ayrıca hepatositlerin yapısal bütünlüğünü I/R hasarına karşı koruduğu görülmüştür. Nitekim TMZ'nin iskemik ön koşullanmayı sağlayarak karaciğer I/R hasarı sonucu hepatosit bütünlüğünü koruduğu bildirilmiştir (Casillas ve ark., 2006). Ancak TMZ'nin I/R hasarına karşı bu koruyucu etkinliği üzerine moleküler yolaklar hala bir tartışma konusudur. Zaouali ve ark. (2017), karaciğer nakli sonucu hepatosit hasarının TMZ uygulanması ile azaldığını göstermişler ve bu etkinin TMZ'nin ER stresi azaltarak sağladığını bildirmişlerdir.

Bununla beraber Mahfoudh-Boussaid ve ark. (2012), böbrek I/R hasarı üzerine TMZ tedavisinin ER stresi azaltmadığını ancak mitokondri fonksiyon bütünlüğünü koruyarak etki gösterdiğini bildirmişlerdir. Mosbah ve ark. (2006), TMZ tedavisinin I/R hasarına karşı vasküler direnci ve perfüzyon akış oranını arttırdığını, özellikle reperfüzyon esnasında azalmış ATP seviyelerini yükselterek etki ettiğini bildirmişlerdir. Ayrıca yine bu çalışmada yağlı karaciğere bağlı olarak hepatositlerin sitoplazmasındaki yağ birikmesi ve hücre hacminde artışlara sebep olmasının hepatik sinüzoidal boşluğun kısmi veya tam tıkanmaların neden olabileceğini ve I/R hasarına karşı daha da savunmasız kalacağını, TMZ'nin ise yağlı karaciğerde I/R hasarını

iskemi sırasında damar akış hızı ve direncine olan olumlu etkileri sonucu hepatosit yaralanmasını azalttığını göstermiştir.

Çalışmamızda TMZ tedavisinin I/R hasarı üzerine yukarıda da değinildiği üzere oksidatif stresi ve Cyt-C salınımını azalttığı, ayrıca hücresel düzeyde hepatosit bütünlüğünü koruyucu etkisi histolojik olarak da gösterilmiştir ve bu sonuç TMZ'in hücresel bütünlüğü koruyucu etkisini güçlü şekilde destekleyen bir bulgudur.



6. SONUÇ VE ÖNERİLER

Ülkemizde karaciğer gibi hayati organ nakilleri çok önemli sorunlar içerir. Verici sayısının yeterli olmaması, bulunan donörlerin de çoğunun steatotoik karaciğere sahip olması, böyle hayati bir olgu için endişe taşımaktadır. Bu yüzden steatotoik karaciğerin en az hasar ile nasıl naklinin sağlanacağı ve nakil sonrası hastanın vücutsal fonksiyonlarının normal bir şekilde idame ettireceğine ilişkin artan sayıda çalışmalar bulunmaktadır.

Normal bir karaciğer dokusu naklinde ve sonrasında birçok hücre ve doku harabiyetleri meydana gelmektedir. Karaciğerin steatotik oluşu bu hasar mekanizmalarına karşı daha da savunmasız olmasına yol açar ve oluşacak harabiyet daha da fazla olur.

Bu çalışmamızın sonucunda, TMZ uygulamasının yağlı karaciğer I/R sonucu oksidatif hasara neden olan NADPH Oksidaz ve MPO aktivitelerini düşürdüğü gösterilmiştir. NAFLD ve karaciğer I/R hasarına bağlı olarak vücut antioksidan savunmasının önemli bir enzimi olan CAT seviyelerinin azaldığı, TMZ'nin ise CAT seviyelerini artırarak antioksidan savunmaya katkısı olduğu görülmüştür.

Yağlı karaciğer I/R hasarı sonrası, hücre mitokondri bütünlüğünün bozulduğu ve Cyt-C salınımına bağlı olarak hücrelerin apoptosize yöneldiği ve TMZ'nin Cyt-C salınımı azaltıcı etkisinin olduğu saptanmıştır.

NAFLD ve karaciğer I/R hasarı sonrası TMZ'nin oksidatif stres belirteçleri arasında yer alan MDA ve 8-OHdg seviyeleri üzerine etkisi olmadığı, bunun yanında TMZ'nin histolojik bulgular sonucu yağlı karaciğer I/R hasarını önemli derece azalttığı gösterilmiştir.

Çalışmamız sonucunda, TMZ uygulamasının yağlı karaciğer nakilleri sırasında önemli hücre harabiyetine yol açan bir etken olan oksidatif hasara karşı, antioksidan savunma mekanizmasına olumlu yönde artırıcı katkıda bulunduğu gösterilmiştir. Ayrıca, hücresel bütünlüğün korunmasında çok önemli bir faktör olan mitokondri bütünlüğünü koruyarak hücrelerin sağ kalımına destek sağladığı gösterilmiştir. Ancak çalışmamızda uyguladığımız doz ve sürede TMZ uygulanmasının lipit peroksidasyonu ve DNA hasarı gibi belirteçler üzerinde etkisinin olduğunun gösterilememesi, farklı doz ve sürelerde TMZ uygulamaları gerçekleştirilerek daha ileri çalışmaların yapılmasına ihtiyaç olduğunu düşündürmektedir.



KAYNAKLAR

- Abdelsameea AA, Abbas NA, Abdel Raouf SM. (2017). Liraglutide attenuates partial warm ischemia-reperfusion injury in rat livers. *Naunyn Schmiedeberg's Arch Pharmacol*, 390(3), 311-319.
- Adams LA, Angulo P. (2005). Recent concepts in non-alcoholic fatty liver disease. *Diabet Med*, 22(9), 1129-1133.
- Adik A. 2006. Nonalkolik Karaciğer yağlamasında statin tedavisinin karaciğer enzim profili üzerine olan etkileri. Uzmanlık tezi, Sağlık Bakanlığı Haydarpaşa Numune Hastanesi İç Hastalıkları Kliniği, İstanbul.
- Ajamieh H, Merino N, Candelario-Jalil E, Menéndez S, Martinez-Sanchez G, Re Lve ark. (2002). Similar protective effect of ischaemic and ozone oxidative preconditionings in liver ischaemia/reperfusion injury. *Pharmacol Res*, 45(4), 333-339.
- Ajamieh H, Farrell GC, McCuskey RS, Yu J, Chu E, Wong HJ ve ark. (2015). Acute atorvastatin is hepatoprotective against ischaemia-reperfusion injury in mice by modulating eNOS and microparticle formation. *Liver Int*, 35(9), 2174-2186.
- Akdogan R. ,Yildiray K., Levent T., Halil R., Elif A. (2016). The effects of infliximab on laminin, NF κ B, and anti-TNF expression through Its effect on ischemic liver tissue. *Gastroenterol Res Pract*, 1-6.
- Akkuş İ. (1995). Serbest radikaller ve fizyopatolojik etkileri. İstanbul: Mimoza yayınları.
- Alexander KS, Zakai NA, Lidofsky SD, Callas PW, Judd SE, Tracy RP. ve ark. (2018). Non-alcoholic fatty liver disease, liver biomarkers and stroke risk: The Reasons for Geographic and Racial Differences in Stroke cohort. *PLoS One*, 13(3), 1-7.
- Altaş S, Gürsu MF, Bulmus GF, (2011). Adipoz dokudan salınan yeni adipokinler . *Firat Sağlık Hizmetleri Dergisi*, 6(17), 1-6.
- Al-Khafaji A , Samer T, Hamza O, David M, Hai H, Allan T. (2016). Superoxide induces neutrophil extracellular trap formation in a TLR-4 and NOX-dependent. *Mechanism Mol Med*, 621-631.

- Alwahsh SM, Xu M, Seyhan HA, Ahmad S, Mihm S, Ramadori G. ve ark. (2014). Diet high in fructose leads to an overexpression of lipocalin-2 in rat fatty liver. *World J Gastroenterol*, 20(7), 1807-1821.
- Al-Saeedi M, Steinebrunner N, Kudsi H, Halama N, Mogler C, Büchler MW ve ark. (2018). Neutralization of CD95 ligand protects the liver against ischemia-reperfusion injury and prevents acute liver failure. *Cell Death Dis*, 9(2), 132.
- Alshammari GM, Balakrishnan A, Chinnasamy T. (2018). Butein protects the nonalcoholic fatty liver through mitochondrial reactive oxygen species attenuation in rats. *Biofactors*, 44(3):289-298.
- Andrew J, Ronald W , Jerzy W. (2008). Molecular Mediators of Liver Ischemia and Reperfusion Injury. *A Brief Review Mol Med*, 14(5-6), 337–345.
- Arumugam V, Trent M, Justin D, Pradeep K, Mark P, Taylor SM. (2009). Neuroprotection in stroke by complement inhibition and immunoglobulin. *Therapy*, 158(3), 1074–1089.
- Ayyildiz A , Ayyildiz S , Benli E , Erdem H , Cirrik S , Noyan T. ve ark. (2016). The effect of oral and intraurethral trimetazidine use on urethral healing. *Iran J Basic Med Sci*, 19(9), 932–939.
- Babior BM, Curnutte JT, Kipnes BS. (1975). Pyridine nucleotide-dependent superoxide production by a cell-free system from human granulocytes. *J Clin Invest*, 56 (1), 1035–1042.
- Bae UJ, Yang JD, Ka SO, Koo JH, Woo SJ, Lee YR ve ark. (2014). attenuates ischemia/reperfusion-induced liver injury in mice. *Exp Mol Med*, 32, 169-173.
- Bavarsad K, Barreto GE, Hadjzadeh MA, Sahebkar A. (2018). Protective effects of curcumin against ischemia-reperfusion injury in the nervous system. *Mol Neurobiol*, 10(1007), 1-14.
- Baykara B, Tekmen I. (2005). Karaciğer iskemi reperfüzyon hasarı. *DEÜ TIP Fakültesi Dergisi*, 19(3), 185 – 194.
- Bedard K, Krause KH. (2007). The NOX family of ROS-generating NADPH oxidases: physiology and pathophysiology. *Physiol Rev*, 87(1), 245-313.

Bergheim I, Weber S, Vos M, Kramer S, Volynets V, Kaserouni S ve ark. (2008). Antibiotics protect against fructose-induced hepatic lipid accumulation in mice: role of endotoxin. *J Hepatol*, 48, 983–992.

Bettermann K, Hohensee T, Haybaeck J. (2014). Steatosis and steatohepatitis: complex disorders. *Int J Mol Sci*, 15(6), 9924-44.

Bennett MJ, Rinaldo P, Strauss AW. (2000). Inborn errors of mitochondrial fatty acid oxidation. *Critical Reviews Clinical Laboratory Sciences*, 37(1), 1-44.

Besikci A., Özkan SA.(2008). Trimetazidine Revisited: a comprehensive review of the pharmacological effects and analytical techniques for the determination of trimetazidine. *Cardiovascular therapeuticks*, 26(2), 147-165.

Bin L, Zhen-Yu M, Gang W, Jian-Min Q. (2015). Butyrate protects rats from hepatic ischemia/reperfusion injury. *Int J Clin Exp Med*, 8(4), 5406–5413.

Bojana Kc, Dijana M, Ilija D, Julijana R, Ljiljana P. (2016). Role of myeloperoxidase in patients with chronic kidney disease. *Oxid Med Cell Longev*, 43, 1-10.

Boussaid A, Zaouali MA, Hauet T, Hadj-Ayed K, Miled AH, Ghouli-Mazgar S ve ark. (2012). Attenuation of endoplasmic reticulum stress and mitochondrial injury in kidney with ischemic postconditioning application and trimetazidine treatment. *J Biomed Sci*, 19(71), 1-14.

Boussaid A., Selmi R, Bejaoui M, HadjAyed K, Zaouali, MA, Ben Abdennebi H. (2016). Effectiveness of a single versus repeated administration of trimetazidine in the protection against warm ischemia/reperfusion injury of rat liver. *Turk J Med Sci*, 46(4), 1258-1264.

Bottje W, Enkvetchakul B, Wideman RF. (1995). Antioxidants, hypoxia and lipid peroxidation involvement in pulmonary hypertension syndrome (Ascites). *Nutrition Update*, 35-45.

Bradley PP, Priebat DA, Christensen RD, Rothstein G. (1982). Measurement of cutaneous inflammation: estimation of neutrophil content with an enzyme marker. *J Invest Dermatol*, 78(3), 206-209.

Broughton BR, Reutens DC, Sobey CG. (2009). Apoptotic mechanisms after cerebral ischemia. *Stroke*, 40(1), 331–339.

- Browning JD. (2006). Statins and hepatic steatosis: perspectives from the dallas heart study. *Hepatology*, 44(1), 466-471.
- Cadenas S. (2018). ROS and redox signaling in myocardial ischemia-reperfusion injury and cardioprotection. *Free Radic Biol Med*, 117,76-89.
- Cahova M, Palenickova E, Dankova H, Sticova E, Burian M, Drahota Z, ve ark. (2015). Metformin prevents ischemia reperfusion-induced oxidative stress in the fatty liver by attenuation of reactive oxygen species formation. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*, 309(2),100-111.
- Cale CM, Jones AM, Goldblatt D. (1990). Follow up of patients with chronic granulomatous disease diagnosed since. *Clin Exp Immunol*, 120, 351–355.
- Cartland SP, Harith HH, Genner SW, Dang L, Cogger VC, Vellozzi M. (2017). Non-alcoholic fatty liver disease, vascular inflammation and insulin resistance are exacerbated by TRAIL deletion in mice. *Sci Rep*, 7(1), 1898.
- Casillas A, Mosbah IB, Ramalho F, Roselló-Catafau J, Peralta C. (2006). Past and future approaches to ischemia-reperfusion lesion associated with liver transplantation. *Life Sci*, 79(20), 1881-1894.
- Caskurlu T, Kanter M, Erboga M, Erboga ZF, Ozgul M, Atis G. (2016). Protective Effect of Nigella Sativa on Renal Reperfusion Injury in Rat. *Iran J Kidney Dis*, 10(3), 135-143.
- Champe p, Harvey R, Ferrier D. (2007). Biyokimya Lippincott's (Engin Ulukaya çeviri editörü). İstanbul: Nobel Tıp Kitabevi (2007). S: 187-188.
- Cheeseman KH, Slater TF. (1993). An introduction to free radical biochemistry, *Br. Med. Bul*, 49, 479-490.
- Chen G, Xu R, Zhang S, Wang Y, Wang P, Edin ML. (2015). CYP2J2 overexpression attenuates nonalcoholic fatty liver disease induced by high-fat diet in mice. *Am J Physiol Endocrinol Metab*, 308(2),97-110.
- Chen Q, Wang T, Li J, Wang S, Qiu F, Yu H. ve ark. (2017). Effects of natural productson fructose-induced nonalcoholic fatty liver disease (NAFLD). *Nutrients*, 9(2), 31-39.
- Cherubini A, Ruggiero C, Polidori MC, Mecocci C. (2005). Potential markers of oxidative stres in stroke. *Free Radical Biology& Medicine*, 39, 841-852.

- Chelikani P, Fita I, Loewen PC. (2004). Diversity of structures and properties among catalases. *Cell Mol Life Sci*, 61(2),192-208.
- Cnubben NH, Rietjens IM, Wortelboer H, Zanden J, Bladeren PJ. (2001). The interplay of glutathione-related processes in antioxidant defense. *Environmental Toxicology and Pharmacology*, 10,141-152.
- Cohen JC, Horton JD, Hobbs HH. (2011). Human fatty liver disease: old questions and new insights. *Science*, (6037),1519-1523.
- Czyzewska M, Wolska A, Cwiklińska A, Kortas-Stempak B, Wróblewska M. (2010). Disturbances of lipoprotein metabolism in metabolic syndrome. *Postepy Hig Med Dosw*, 64,1-10.
- Çolak Yaşar, Tuncer İlyas. (2010). Nonalkolik karaciğer yağlanması ve steatohepatit *Ġst Tıp Fak Derg*, 73(3), 85-91.
- Coşkun G, Özgür H. (2011). Apoptoz ve Nekrozun Moleküler Mekanizması *Arşiv*, 20, 145-158.
- Da Silveira M, Yoshida WB. (2009). Trimetazidine and N-acetylcysteine in attenuating hind-limb ischemia and reperfusion injuries: experimental study in rats. *Int Angiol*, 28(5),412-417.
- Dean RT., Fu S., Stocker R., Davies MJ. (1997). Biochemistry and pathology of radical- mediated protein oxidation, Review article. *Biochem. J*, 324(1), 1-18.
- Duilio C, Ambrosio G, Kuppusamy P, DiPaula A, Becker LC, Zweier JL. (2001). Neutrophils are primary source of O₂ radicals during reperfusion after prolonged myocardial ischemia. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, 280, 2649–2657.
- Engin A. (2017). Non-alcoholic fatty liver disease. *Adv Exp Med Biol*, 960(10), 443-467.
- Esterbauer H, Gebicki J, Puhl H, Jürgens G. (1992). The role of lipid peroxidation and antioxidants in oxidative modification of LDL. *Free Radic Biol Med*, 13(4),341-390.
- Evora PR, Evora PM, Celotto AC, Rodrigues AJ, Joviliano EE. (2012). Cardiovascular therapeutics targets on the NO-sGC-cGMP signaling pathway: a critical overview. *Curr Drug Targets*, 13(1), 1207–1214.

Evelyn P, Raquel S, Edgar E, Karine L, Isalira P, Igor J. ve ark. (2017). Hepatic microvascular dysfunction and increased advanced glycation end products are components of non-alcoholic fatty liver disease. *PLoS One*, 12(6), 1-20

Fath-ordoubadi F, Beatt KJ. (1997). Glucose–insulin–potassium therapy for treatment of acute myocardial infarction: an overview of randomized placebocontrolled trials. *Circulation*, 96(4), 1152–1166.

Fantini E, Demaison L, Sentex E, Grynberg A, Athias P. (1994) Some biochemical aspects of the protective effect of trimetazidine on rat cardiomyocytes during hypoxia and reoxygenation. *J Mol Cell Cardiol*, 26(8),949-958.

Flath B, Rolinski B, Roscher AA. (1997). Simple high-performance liquid chromatographic method for the detection of phenylpropionylglycine in urine as a diagnostic tool in inherited medium-chain acyl-coenzyme A dehydrogenase deficiency. *J Chromatogr B Biomed Sci Appl*, 694(1), 227-232.

Forman HJ. (2016). Redox signaling: an evolution from free radicals to aging. *Free Radic Biol Med*, 97(1), 398-407.

Fuchs M. (2015). New medical treatment strategies for nonalcoholic steatohepatitis. *Curr Treat Options Gastroenterol*,13(2), 259-273.

Fukazawa K, Vitin AA, Pretto EA. (2016). Serum acidosis prior to reperfusion facilitates hemodynamic recovery following liver transplantation. *J Anesth*, 30(1), 80-88.

Gao W, Bentley RC, Madden JF, Clavien PA. (1998). Apoptosis of sinusoidal endothelial cells is a critical mechanism of prevention of injury in rat liver transplantation. *Hepatology*, 27, 1652–1660.

Gedik E , Sadullah G, Hayrettin O, Basra O, Hulya O, Huseyin B. (2008). Resveratrol attenuates oxidative stress and histological alterations induced by liver ischemia/reperfusion in rats *World J Gastroenterol*, 14(46), 7101–7106.

Gillery P, Monboisse JC, Maquart FX, Borel JP (1988). Glycation of proteins as a source of superoxide. *Diabetes*,14(1), 1114-1120.

Gibbins JM. (2004). Platelet adhesion signalling and the regulation of thrombus formation. *J Cell Sci*, 117(16), 3415-3425.

- Goth L. (1992). A simple method for determination of serum catalase activity and revision of reference range. *Clin Chim Acta*, 196(2-3), 143-151.
- Govindaraj R, Paulraj MG, Toppo E, Pandikumar P, Ignacimuthu S, Al-Dhabi NA.(2016).Hepatoprotective effect of tricholoma giganteum (Agaricomycetes) in a nonalcoholic fatty liver disease rat model. *IntJMed Mushrooms*, 18(8), 661-669.
- Granger DN, Kvietys PR. (2015). Reperfusion injury and reactive oxygen species: The evolution of a concept. *Redox Biol*, 6,524-551.
- Green CJ, Gower JD, Healing G, Cotterill LA, Fuller BJ, Simpkin S.(1989). The importance of iron, calcium and free radicals in reperfusion injury: an overview of studies in ischaemic rabbit kidneys. *Free Radic Res Commun*, 7(3-6), 255-264.
- Green K, Brand MD, Murphy MP (2004). Prevention of mitochondrial oxidative damage as a therapeutic strategy in diabetes. *Diabetes*, 53(1),110-118.
- Gören B, Fen T. (2005). Non-alkolik yağlı karaciger hastalığı. *Turkiye Klinikleri J Med Sci*, 25(6), 841-850.
- Gupta NA, Kolachala VL, Jiang R, Abramowsky C, Shenoi A, Kosters A ve ark. (2014). Mitigation of autophagy ameliorates hepatocellular damage following ischemia-reperfusion injury in murine steatotic liver. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*, 307(11), 1088-1099.
- Guang-Jin Y, Jin-Chun Ma, Zuo-Jiong G, Xiao-Mei S, Shi-Hua Z, and Xi Li. (2005).Modulation of liver oxidant-antioxidant system by ischemic preconditioning during ischemia/reperfusion injury in rats. *World J Gastroenterol*, 11(12), 1825–1828.
- Gujral JS, Bucci TJ, Farhood A, Jaeschke H. (2001). Mechanism of cell death during warm hepatic ischemia-reperfusion in rats: apoptosis or necrosis? *Hepatology*, 33(2), 397-405.
- Ha SY, Paik YH, Yang JW, Lee MJ, Bae H, Park CK. (2016). NADPH oxidase 4 have opposite prognostic effects for patients with hepatocellular carcinoma after hepatectomy. *Gut Liver*, 10(5),826-835.

- Haggai-Carmiel M, Cederbaum AI, Nieto N. (2005). A high-fat diet leads to the progression of non-alcoholic fatty liver disease in obese rats. *FASEB J*, 19, 136–138.
- Halliwell B. (1994). Antioxidants and human disease: curiosity, cause or consequence? *Lancet*, 344(8924), 721-724.
- Halliwell B, Gutteridge JMC. (2001). Free Radicals in Biology and Medicine, Third Edition, Londra: *Oxford Science Publications*, 22-24.
- Hammad A , Laura W, Malik Z. (2018). The role of the complement system in traumatic brain injury: a review. *J Neuroinflammation*, 15(1),15- 24.
- Han KH, Hashimoto N, Fukushima M. (2016). Relationships among alcoholic liver disease, antioxidants, and antioxidant enzymes. *World J Gastroenterol*, 22(1), 37-49.
- Harada H, Hines IN, Flores S, Gao B, McCord J, Scheerens H. ve ark. (2004). Role of NADPH oxidase-derived superoxide in reduced size liver ischemia and reperfusion injury. *Arch Biochem Biophys*, 423 (1), 103–108.
- Hassanzadeh G, Hosseini A, Pasbakhsh P, Akbari M, Ghaffarpour M, Takzare N. ve ark. (2015). Trimetazidine prevents oxidative changes induced in a rat model of sporadic type of Alzheimer's disease. *Acta Med Iran*, 53 (1),17-24.
- Hawkins, CL, Davies, MJ. (2001). Generation and propagation of radical reactions on proteins. *Biochim. Biophys. Acta*, 1504 (2-3), 196-219.
- He L, He T, Farrar S, Ji L, Liu T, Ma X. (2017). Maintain Cellular redox homeostasis by elimination of reactive oxygen species. *Cell Physiol Biochem*, 44 (2), 532-553.
- Hong X, Zhao X, Wang G, Zhang Z, Pei H, Liu Z. (2017). Luteolin treatment protects against renal ischemia-reperfusion injury in rats. *Mediators Inflamm*, 1-10.
- Hsieh YW, Lin KC, Korivi M, Lee TH, Wu CY, Wu KY. (2014). The reliability and predictive ability of a biomarker of oxidative DNA damage on functional outcomes after stroke rehabilitation. *Int J Mol Sci*, 15(4), 6504–6516.

- Ibdah JA, Perlegas P, Zhao Y, Angdisen J, Borgerink H, Shadoan MK. ve ark. (2005). Mice heterozygous for a defect in mitochondrial trifunctional protein develop hepatic steatosis and insulin resistance. *Gastroenterology*, 128(5), 1381-1390.
- Irani K. (2000). Oxidant signaling in vascular cell growth, death, survival: a review of the roles of reactive oxygen species in smooth muscle and endothelial cell mitogenic and apoptotic signaling. *Circ Res*, 87(1),179–183.
- Inci I, Dutly A, Inci D, Boehler A, Weder W. (2001). Recipient treatment with trimetazidine improves graft function and protects energy status after lung transplantation. *J Heart Lung Transplant*, 20(10), 1115-1122.
- Jaeschke H, Farhood A, Bautista AP, Spolarics Z, Spitzer JJ. (1993). Complement activates Kupffer cells and neutrophils during reperfusion after hepatic ischemia. *Am J Physiol*, 264(4), 801-809.
- Jaeschke H. (2006). Mechanisms of Liver Injury. II. Mechanisms of neutrophil-induced liver cell injury during hepaticischemia-reperfusion and other acute inflammatory conditions. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*, (6), 1083-1088.
- Jaeschke H, Lemasters JJ. (2003). Apoptosis, versus oncotic necrosis in hepatic ischemia/reperfusion injury. *Gastroenterology*, 125(4), 1246-1257.
- Jahn D, Kircher S, Hermanns HM, Geier A. (2018). Animal models of NAFLD from a hepatologist's point of view. *Biochim Biophys Acta*, 4439(18), 1-7.
- Jegatheesan P, Beutheu S, Freese K, Waligora-Dupriet AJ, Nubret E, Butel MJ ve ark. (2016). Preventive effects of citrulline on Western diet-induced non-alcoholic fatty liver disease in rats. *Br J Nutr*, 116(2),191-203.
- Jorgačević B, Mladenović D, Ninković M, Prokić V, Stanković MN, Aleksić V. ve ark. (2014). Dynamics of oxidative/nitrosative stress in mice with methionine-choline-deficient diet-induced nonalcoholicfatty liver disease. *Hum Exp Toxicol*, 33(7),701-709.
- Kagan VE, Bayir HA, Belikova NA, Kapralov O, Tyurina YY, Tyurin VA. (2009). Cytochrome c/cardiolipin relations in mitochondria: a kiss of death. *Free Radic Biol Med*, 46(11), 1439-1453.

- Kato H, Kuriyama N, Duarte S, Clavien PA, Busuttill RW, Coito AJ. (2014). MMP-9 deficiency shelters endothelial PECAM-1 expression and enhances regeneration of steatotic livers after ischemia and reperfusion injury. *J Hepatol*, 60(5), 1032-1039.
- Kalogeris T, Baines CP, Krenz M, Korthuis RJ. (2016). Ischemia/Reperfusion. *Compr Physiol*, 7(1), 113-170.
- Kapoor M, Sharma N, Sandhir R, Nehru B. (2018). Effect of the NADPH oxidase inhibitor apocynin on ischemia-reperfusion hippocampus injury in rat brain. *Biomed Pharmacother*, 97(1), 458-472.
- Kara M, Erdal M. (2014). A public health issue that increased prevalence: Non-alcoholic fatty liver disease. *TAF Prev Med Bull*, 13(1), 65–76.
- Karabulut H, Gülay MŞ. (2016). Antioksidanlar. *MAKÜ Sag. Bil. Enst. Derg*, 4(1), 50-59.
- Keleş MS , Demirci N , Yıldırım A , Atamanalp SS , Altinkaynak K . (2008). Sıçanlarda iskemi- reperfüzyona neden olan hepatik DNA hasarı üzerine N-asetilsistein ve Ginkgo biloba ekstraktının koruyucu etkileri. *Clin Exp Med*, 8 (4), 193-198.
- Kehrer JP, Klotz LO. (2015). Free radicals and related reactive species as mediators of tissue injury and disease: implications for health. *Crit Rev Toxicol*, 45(9), 765-798.
- Khan BV , Harrison DG, Olbrych MT, Alexander RW, Medford RM. (1996). Nitric oxide regulates vascular cell adhesion molecule 1 gene expression and redox-sensitive transcriptional events in human vascular endothelial cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 93(17), 9114–9119.
- Kleikers PW., Wingler K., Hermans JJ., Diebold I., Altenhofer S., Radermacher K.A. ve ark. (2012). NADPH oxidases as a source of oxidative stress and molecular target in ischemia/reperfusion injury. *J. Mol. Med*, 90(2), 1391–1406.
- Kılınç K, Kılınç A. (2003). Nitrik oksit biyolojik fonksiyonları ve toksik etkileri. İstanbul: Palme yayıncılık. S:104-108.

- Kim J, Kim HY, Lee SM. (2013). Protective effects of geniposide and genipin against hepatic ischemia/reperfusion injury in mice. *Biomol Ther (Seoul)*, 21(2), 132-137.
- Kim MY. (2017). The progression of liver fibrosis in non-alcoholic fatty liver disease. *Korean J Gastroenterol*, 69(6), 341-347.
- Kimura K, Shirabe K, Yoshizumi T, Takeishi K, Itoh S, Harimoto N. ve ark. (2016). Ischemia-reperfusion injury in fatty liver is mediated by activated NADPH Oxidase 2 in rats. *Transplantation*, 100(4), 791-800.
- Kinnula VL, Paakko P, Soini Y. (2004). Antioxidant enzymes and redox regulating thiol proteins in malignancies of human lung. *FEEBS*, 569(1-3), 1-6.
- Kloek J, Marechal X, Roelofsen J, Houtkooper R, van Kuilenburg A, Kulik W. ve ark. (2012). Cholestasis is associated with hepatic microvascular dysfunction and aberrant energy metabolism before and during ischemia-reperfusion. *Antioxid Redox Signal*, 17(1), 1109–1123.
- Kohli V, Selzner M, Madden JF, Bentley RC, Clavien PA. (1999). Endothelial cell and hepatocyte deaths occur by apoptosis after ischemia-reperfusion injury in the rat liver. *Transplantation*, 67(1), 1099–1105.
- Kopáni M, Celec P, Danisovic L, Michalka P, Biró C. (2006). Oxidative stress and electron spin resonance. *Clin Chim Acta*, 364(1), 61-66.
- Krause KH, Bedard K. (2008). NOX enzymes in immuno-inflammatory pathologies. *Semin Immunopathol*, 30(3), 193-194.
- Krijnen PA, Meischl C, Hack CE, Meijer CJ, Visser CA, Roos D. ve ark. (2003). Increased Nox2 expression in human cardiomyocytes after acute myocardial infarction. *J Clin Pathol*, 56(1), 194–199.
- Kroemer G, Galluzzi L, Brenner C. (2007). Mitochondrial membrane permeabilization in cell death. *Physiol. Rev*, 87(1), 99–163.
- Kuralay F, Yıldız C, Özütemiz O, İşlekel H, Çalışkan S, Bingöl B. ve ark. (2003). Dişi Swiss sıçanlarda trimetazidinin asetik asit kaynaklı kolit üzerine etkisi. *J Toxicol Environment Health A*, 66 (2), 169-79.

- Kuwabara Y, Tomoko N, Ken O, Tomohiro M, Bryan T, Emil F. ve ark. (2003). Unique amino acids cluster for switching from the dehydrogenase to oxidase form of xanthine oxidoreductase. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 100(14), 8170–8175.
- Lagouge M, Larsson NG. (2013). The role of mitochondrial DNA mutations and free radicals in disease and ageing. *J Intern Med*, 273(6), 529–543
- Lakshman R, Shah R, Reyes-Gordillo K, Varatharajalu RS. (2015). between NAFLD and AFLD and potential biomarkers. *Clin Res Hepatol Gastroenterol*, 39(1), 29-34.
- Lau D, Mollnau H, Eiserich JP, Freeman BA, Daiber A, ve ark. (2005). Myeloperoxidase mediates neutrophil activation by association with CD11b/CD18 integrins. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 102(1), 431–436.
- Lazarević-Pasti T, Leskovic A, Vasić V. (2015). Myeloperoxidase inhibitors as potential drugs. *Curr Drug Metab*, 16(3):168-190.
- Lee YS, Kang YS, Lee JS, Nicolova S, Kim JA. (2004). Involvement of NADPH oxidase-mediated generation of reactive oxygen species in the apoptotic cell death by capsaicin in HepG2 human hepatoma cells. *Free Radical Res*, 38(1), 405–412.
- Leghi GE, Domenici FA, Vannucchi H. (2015). Influence of oxidative stress and obesity in patients with nonalcoholic steatohepatitis. *Arq Gastroenterol*, 52(3), 228-33.
- Lien YH, Lai L W, Silva AL. (2003). Pathogenesis of renal ischemia/reperfusion injury: lessons from knockout mice. *Life Sci*, 74(5), 543-552.
- Li YL, Xie H, Musha H, Xing Y, Mei CX, Wang HJ ve ark. (2015). The risk factor analysis for type 2 diabetes mellitus patients with nonalcoholic fatty liver disease and positive correlation with serum uric acid. *Cell, Biochem Biophys*, 72(3), 643-647.
- Li S, Takahara T, Fujino M, Fukuhara Y, Sugiyama T, Li XK. ve ark. (2017). Astaxanthin prevents ischemia-reperfusion injury of the steatotic liver in mice. *PLoS One*, 12(11), 1-16.

- Li X, Liu J, Lin L, Guo Y, Lin C, Zhang C. ve ark. (2014). Traditional chinese medicine shuang shen ning xin attenuates myocardial ischemia/reperfusion injury by preserving of mitochondrial function. *Evid Based Complement Alternat Med*, 180(1), 1-10.
- Li X, Li J, Lu X, Ma H, Shi H, Li H ve ark. (2015). Treatment with PPAR δ agonist alleviates non-alcoholic fatty liver disease by modulating glucose and fatty acid metabolic enzymes in a rat model. *Int J Mol Med*, 36(3),767-775.
- Li Y, Lou C, Wang W.(2018). STIM1 deficiency protects the liver from ischemia/reperfusion injury in mice. *Biochem Biophys Res Commun*, 496(2), 422-428.
- Lida S, Kai K, Xun W, Yonggang C, Haifeng Z, Xueying S ve ark. (2014). Carvacrol alleviates ischemia reperfusion injury by regulating the PI3K-Akt pathway in Rats. *PLoS One*, 9(8),104043.
- Lieber S, Maria A, Ki M, Youqing X, Qi C, Chaoling R. ve ark. (2004). American society for clinical nutrition model of nonalcoholic steatohepatitis 1–4. *Am J Clin Nutr*, 79(1), 502–509.
- Lim K , Kandiah J, Matthew W, Andrew J, Barry H. (2006). Oxidative damage in mitochondrial DNA is not extensive. *Annals of the new york academy of sciences*, 1042(1), 210-220.
- Lingjuan P, Jiyeon C, Guideock K, Hunjoo H. (2017). Endogenous catalase delays high-fat diet-induced liver injury in mice. *Korean J Physiol Pharmacol*, 21(3), 317–325.
- Liu X, Gai Y, Liu F, Gao W, Zhang Y, Xu M. ve ark. (2010) Trimetazidine inhibits pressure overload-induced cardiac fibrosis through NADPH oxidase-ROS-CTGF pathway. *Cardiovasc Res*, 88(1), 150-158.
- Liu Q, Rehman H, Krishnasamy Y, Ramshesh V, Theruvath T, Chavin K. ve ark. (2013). Role of inducible nitric oxide synthase in mitochondrial depolarization and graft injury after transplantation of fatty livers. *Free Radic Biol Med*, 53(2): 250–259.
- Liu B , Zhen-Yu M, Gang W, Jian-Min Q. (2015). Butyrate protects rats from hepatic ischemia/reperfusion injury. *Int J Clin Exp Med*, 15(8), 5406–5413.

- Liu F , Hsin-I T, Huang-Ping Y. (2015). Organ-protective effects of red wine extract, resveratrol in oxidative stress-mediated reperfusion injury. *Oxid Med Cell Longev*,159(3), 1-15.
- Liu Z, Chen JM, Huang H, Kuznicki M, Zheng S, Sun W. (2016). The protective effect of trimetazidine on myocardial ischemia/reperfusion injury through activating AMPK and ERK signaling pathway. *Metabolism*, 65(3), 122-130.
- Lobo V., Patil A., Phatak A., Chandra N. (2010). Free radicals, antioxidants and functional foods: Impact on human health. *Pharmacogn Rev*, 4(8), 118-126.
- Lonardo A, Fabio N, Mauro M, Alessandra M, Luca R, Luigi A. (2017). Nonalcoholic fatty liver disease: Evolving paradigms. *World J Gastroenterol*, 23(36), 6571–6592.
- Longo N , Frigeni M , Pasquali M. (2016). Carnitine transport and fatty acid oxidation. *Biochim Biophys Acta*, 1863(10), 2422–2435.
- Luo XY, Takahara T, HouJ, KawaiK, SugiyamaT, Tsukada K ve ark. (2012). Theaflavin attenuates ischemia-reperfusion injur a mouse fatty liver model. *Biochem Biophys Res Commun*, 417(1),287-293.
- Luo ZL, Tang LJ, Wang T, Dai RW, Ren JD, Cheng L. ve ark. (2014). Effects of treatment with hydrogen sulfide on methionine-choline deficient diet-induced non-alcoholic steatohepatitis in rats. *J GastroenterolHepatol*, 29(1), 215-222.
- Magierowski M, Jasnos K, Sliwowski Z, Surmiak M, Krzysiek-Maczka G, Ptak-Belowska A ve ark. (2014). Exogenous asymmetric dimethylarginine (ADMA) in pathogenesis of ischemia-reperfusion-induced gastric lesions: interaction with protective nitric oxide (NO) and calcitonin gene-related peptide (CGRP). *Int J Mol Sci*, 15(3), 4946-4964.
- Mahfoudh-Boussaid A, Zaouali MA, Hauet T, Hadj-Ayed K, Miled AH, Ghoul-Mazgar S. ve ark. (2012). Attenuation of endoplasmic reticulum stress and mitochondrial injury in kidney with ischemic postconditioning application and trimetazidine treatment. *J Biomed Sci*, 19 (1), 71-85.

- Marra F, Gastaldelli A, Svegliati BG, Tell G, Tiribelli C. (2008). Molecular basis and mechanisms of progression of non-alcoholic steatohepatitis. *Trends Mol Med*, 14(1), 72–81.
- Mark A, Odile D, Jorge V, Michael R., Nada A., ve ark. (2012). A novel ChREBP isoform in adipose tissue regulates systemic glucose metabolism. *Nature*, 484(7394), 333–338.
- Maritim AC, Sanders RA, Watkins JB. (2003). Diabetes, oxidative stress and antioxidants: Review. *Journal of Biochemical and Molecular Toxicology*, 17(1), 4-38.
- Malle E, Furtmuller PG, Sattler W, Obinger C. (2007). Myeloperoxidase: a target for new drug development? *Br J Pharmacol*, 152(1), 838–854.
- McDorman KS, Pachkowski BF, Nakamura J, Wolf DC, Swenberg JA (2005). Oxidative DNA damage from potassium bromate exposure in long-evans rats is not enhanced by a mixture of drinking water disinfection by-products. *Chem Biol Interact*, 152 (2-3), 107-117.
- McCarthy CP, Mullins KV, Kerins DM. (2016). The role of trimetazidine in cardiovascular disease: beyond an anti-anginal agent. *Eur Heart J Cardiovasc Pharmacother*, 2(4), 266-272.
- Megan J, Rowan F, Thomas M, Michal H. (2014). Reactive oxygen and nitrogen species in steatotic hepatocytes: a molecular perspective on the pathophysiology of ischemia-reperfusion injury in the fatty liver. *Antioxid Redox Signal*, 21(7), 1119–1142.
- Messiha B, Youssef A. (2015). Protective effects of fish oil, allopurinol, and verapamil on hepatic ischemia-reperfusion injury in rats. *J Nat Sci Biol Med*, 6(2): 351–355.
- Moris D, Spartalis M, Tzatzaki E, Spartalis E, Karachaliou GS, Triantafyllis AS ve ark. (2017). The role of reactive oxygen species in myocardial redox signaling and regulation. *Ann Transl Med*, 5(16), 324.
- Mosbah I, Araní C, Carme X, Anna S, Joan R, and Carmen P. (2006). Trimetazidine: Is it a promising drug for use in steatotic grafts? *World J Gastroenterol*, 12(6), 908–914.

- Nadkarni GN, Konstantinidis I, Patel A, Yacoub R, Kumbala D, Patel RA ve ark. (2015). Trimetazidine Decreases Risk of Contrast-Induced Nephropathy in Patients With Chronic Kidney Disease: A Meta-Analysis of Randomized Controlled Trials. *J Cardiovasc Pharmacol Ther*, 20(6), 539-546.
- Niki E, Yoshida Y, Saito Y, Noguchi N. (2005). Lipid peroxidation: Mechanisms, inhibition and biological effects. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 338(1), 668-676.
- Nelson D, Cox M. (2013). Lehninger Biyokimyanın İlkeleri (Murat elçin çeviri editörü). Ankara: Palme yayıncılık (2013). S:653-655.
- Nomura K, Yamanouchi T. (2012). The role of fructose-enriched diets in mechanisms of nonalcoholic fatty liver disease. *J Nutr Biochem*, 23(3), 203-208.
- Ock CY, Kim EH, Choi DJ, Lee HJ, Hahm KB, Chung MH. (2012). 8-Hydroxydeoxyguanosine: not mere biomarker for oxidative stress, but remedy for oxidative stress-implicated gastrointestinal diseases. *World J Gastroenterol*, 18(4), 302-308.
- Omar M.E. , Nadia A, Amany A. (2011). Sleem The effects of trimetazidine on lipopolysaccharide-induced oxidative stress in mice. *EXCLI J*, 10(1), 162–172.
- Ortadeveci A, ÖZ S. (2017). Böbrek iskemi-reperfüzyon hasarı üzerine bir derleme Osmangazi Tıp Dergisi, 39(3), 115-124.
- Ouelaa W, Jegatheesan P, M'bouyou-Boungou J, Vicente C, Nakib S, Nubret E. ve ark. (2017). Citrulline decreases hepatic endotoxin-induced injury in fructose-induced non-alcoholic liver disease: an ex vivo study in the isolated perfused rat liver. *Br J Nutr*, 117(11),1487-1494.
- Oseini AM, Cole BK, Issa D, Feaver RE, Sanyal AJ. (2018). Translating scientific discovery: the need for preclinical models of nonalcoholic steatohepatitis. *Hepatol Int*, 12(1), 6-16.
- Özkaya F, Koçdor H. (2008). İskemi-reperfüzyon ve kanser metastazı: biyokimyasal bakış. *DEÜ TIP Fakültesi Dergisi*, 22 (2), 89 – 98.

- Öztürk M, Eroğlu H, Çiriş M, Koca S, Sarı M, Bülbül M. (2009). Etanol ile oluşturulmuş deneysel ülser modelinde Omeprazol, Famotidin, Misoprostol ve Trimetazidini'in koruyucu etkinliklerinin karşılaştırılması. *SDÜ Yaşam Dergisi*, 1(2), 1-5.
- Özcan O, Huseyin E, Zafer Y. (2015). İskemi-reperfüzyon hasarı ve oksidatif stres ilişkisine biyokimyasal bakış. *Mustafa Kemal Üniv Tıp Derg*, 6(23), 27-33.
- Parakaw T, Suknuntha K, Vivithanaporn P, Schlagenhaut A, Topanurak S, Fucharoen S ve ark. (2017). Platelet inhibition and increased phosphorylated vasodilator-stimulated phosphoprotein following sodium nitrite inhalation. *Nitric Oxide*, 66(1),10-16.
- Park HS, Jang JE, Ko MS, Woo SH, Kim BJ, Kim HS. ve ark. (2016). Statins increase mitochondrial and peroxisomal fatty acid oxidation in the liver and prevent non-alcoholic steatohepatitis in mice. *Diabetes Metab J*, 40(5), 376-385.
- Pathan RA, Singh BK, Pillai KK, Dubey K. (2010). Naproxen aggravates doxorubicin-induced cardiomyopathy in rats. *Indian J Pharmacol*, 42(1),44-49.
- Pereira E, Silvaes RR, Flores EEI, Rodrigues KL, Ramos IP, Da Silva IJ. ve ark. (2017). Hepatic microvascular dysfunction and increased advanced glycation end products are components of non-alcoholic fatty liver disease *PLoS One*, 12(6),1-6.
- Prieto I, Monsal M. (2017). ROS homeostasis, a key determinant in liver ischemic-preconditioning. *Redox Biol*,12(1), 1020–1025.
- Pradhan AA, Bertels Z, Akerman S. (2018). Targeted nitric oxide synthase inhibitors for migraine. *Neurotherapeutics*, 15(2), 391-401.
- Pilger A, Rüdiger HW. (2006). 8-Hydroxy-2'-deoxyguanosine as a marker of oxidative DNA damage related to occupational and environmental exposures. *Int Arch Occup Environ Health*, 80(1), 1-15.

- Rao XJ, Wu YM, Wang Y, Shi SW. (2017). JIP3 deficiency protects mice from high fat diet-induced liver injury. *Biochem Biophys Res Commun*, 109(1), 569-574.
- Rensen S, Veerle B, Sofia X, Evi A, Jaap A. ve ark. (2012). Neutrophil-Derived Myeloperoxidase Aggravates Non-Alcoholic Steatohepatitis in Low-Density Lipoprotein Receptor-Deficient Mice. *PLoS One*, 7(12),1-10.
- Reiniers MJ, Van Golen RF, Van Gulik TM, Heger M. (2014). Reactive oxygen and nitrogen species in steatotic hepatocytes: a molecular perspective on the pathophysiology of ischemia-reperfusion injury in the fatty liver. *Antioxid Redox Signal*, 21(7), 1119-1142.
- Ricklin D, Hajishengallis G, Yang K, Lambris JD. (2010). Complement: a key system for immune surveillance and homeostasis. *Nat Immunol*, 11(1),785–797.
- Reilly PM, Schiller HJ, Bulkley GB (1991). Pharmacologic approach to tissue injury mediated by free radicals and other reactive oxygen metabolites, *Am J Surg*, 161(4), 488-503.
- Rüdiger HA, Clavien PA. (2002). Tumornecrosisfactor alpha, but not Fas mediates hepato cellular apoptosis in the murine ischemic liver. *Gastroenterology*, 122(1), 202-210.
- Ruthenborg J , Jae-Jun B, Anum W, Norihiko T, Jung-whan K. (2014). Regulation of wound healing and fibrosis by hypoxia and hypoxia-inducible factor-1. *Mol Cells*, 37(9), 637–643.
- Rüdiger HA, Graf R, Clavien PA. (2003). Liver ischemia: apoptosis as a central mechanism of injury. *J Invest Surg*, 16(3), 149-159.
- Satman İ, Kocabay G. (2006). Diabetes mellitus and fatty liver. *Turkiye Klinikleri J Med Sci*, 26(1),176-188.
- Sanal MG. (2008). The blind men ‘see’ the elephant-the many faces of fatty liver disease. *World J Gastroenterol*, 14(6), 831–844.

- Selzner N, Selzner M, Jochum W, Clavien PA. (2003). Ischemic preconditioning protects the steatotic mouse liver against reperfusion injury: an ATP dependent mechanism. *J Hepatol*, 39(1), 55-61.
- Shakeri R, Kheirollahi A, Davoodi J. (2017). Apaf-1: Regulation and function in cell death. *Biochimie*, 135(1), 111-125.
- Shalini S, Dorstyn L, Dawar S, Kumar S. (2015). Old, new and emerging functions of caspases. *Cell Death Differ*, 22(4), 526–539.
- Shimobayashi M, Albert V, Woelnerhanssen B, Frei IC, Weissenberger D, Meyer-Gerspach AC, ve ark. (2018). Insulin resistance causes inflammation in adipose tissue. *J Clin Invest*, 128(4), 1538-1550.
- Siemionow M, Arslan E. (2004). Ischemia/reperfusion injury: a review in relation to free tissue transfers. *Microsurgery*, 24, 468-475.
- Simone S, Rascio F, Castellano G, Divella C, Chieti A, Ditunno P. ve ark. (2014). Complement-dependent NADPH oxidase enzyme activation in renal ischemia/reperfusion injury. *Free Radic. Biol. Med*, 74 (1), 263–273.
- Staroverov VN, Davidson ER. Distribution of effectively unpaired electrons. *Chem Phys Lett*, 330(1), 161-168.
- Southoin PA, Powis G. (1988). Free radical in medicine chemical nature and biologic reactions, *Mayo Clin. Proc*, 63(1), 381-389.
- Sonsuz A. (2007). Nonalkolik karaciğer yağlanması. *İ.Ü. Cerrahpaşa Tıp Fakültesi Sürekli Tıp Eğitimi Etkinlikleri Sempozyum Dizisi*, 58(1), 91-98.
- Sonsuz A, Baysal B. (2011). Karaciğer yağlanması ve non alkolik steatohepatit. *Güncel gastroenteroloji*, 98(1), 15-22.
- Spiteller G. (2005).The relation of lipid peroxidation processes with atherogenesis: a new theory on atherogenesis. *Mol Nutr Food Res*, 49(11), 999-1013.
- Spruss A, Bergheim I. (2009). Dietary fructose and intestinal barrier: potential risk factor in the pathogenesis of nonalcoholic fatty liver disease. *J Nutr Biochem*, 20(9), 657-662.

- Steggall A, Mordi IR, Lang CC. (2017). Targeting metabolic modulation and mitochondrial dysfunction in the treatment of heart Failure. *Diseases*, 5(2), 1-18.
- Sun S, Empie M. (2012). Fructose metabolism in humans-what isotopic tracer studies tell us. *Nutr. Metab*, 9(89), 1-15.
- Sun Z, Lazar MA. (2013). Dissociating fatty liver and diabetes. *Trends Endocrinol Metab*, 24(1), 4-12.
- Tacke F, Luedde T, Trautwein C. (2009). Inflammatory pathways in liver homeostasis and liver injury. *Clin Rev Allergy Immunol*, 36(1), 4-12.
- Takhtfooladi MA, Asghari A, Hoseinzadeh HA, Mokhtari F. (2016). Effect of *Otostegia persica* extract on ischemia/reperfusion induced renal damage in diabetic rats. A biochemical study. *Acta Cir Bras*, 31(6):417-421.
- Tao X, Sun X, Xu L, Yin L, Han X, Qi Y. et al. (2016). Total flavonoids from *Rosalaevigata* mich fruit ameliorates hepatic ischemia/reperfusion injury through 1. *Nutrients*, 8(7), 1-14.
- Tashiro H, Kuroda S, Mikuriya Y, Ohdan H. (2014). Ischemia–reperfusion injury in patients with fatty liver and the clinical impact of steatotic liver on hepatic surgery. *Surg Today*, 44(9), 1611-1625.
- Takahashi Y, Sugimoto K, Inui H, Fukusato T. (2015). Current pharmacological therapies for nonalcoholic fatty liver disease/nonalcoholic steatohepatitis. *World J Gastroenterol*, 21(13), 3777-3785.
- Tilg H, Moschen AR. (2010). Evolution of inflammation in nonalcoholic fatty liver disease: the multiple parallel hits hypothesis. *Hepatology*, 52(5), 1836-1846.
- Tran C. (2017). Inborn errors of fructose metabolism. what can we learn from them? *Nutrients*, 9(4), 356.
- Tokatlı A. (2001). Metabolik kardiyomiyopatiler. *Hacettepe Tıp Dergisi*, 32(2), 169 – 183.
- Ulukaya E, Acilan C, Yilmaz Y. (2011). Apoptosis: why and how does it occur in biology? *Cell Biochem Funct*, 29 (6), 468-480.

Uylaş M. (2015) Karaciğer İskemi ve Reperfüzyonda Quercetin'in Koruyucu Etkisi. Tıpta Uzmanlık Tezi, Osmangazi Üniversitesi Tıp Fakültesi, Eskişehir.

Varman T., Gerald I. (2012). Shulman integrating mechanisms for insulin resistance: common threads and missing links. *Cell*, 148(5), 852–871.

Vatner DF, Majumdar SK, Kumashiro N, Petersen MC, Rahimi Y, Gattu AK. (2015). Insulin-independent regulation of hepatic triglyceride synthesis by fatty acids. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 112(4), 1143-1148.

Venarucci D, Venarucci V, Vallese A, Battilà L, Casado A, De la Torre R. ve ark. (1999). Free radicals: important cause of pathologies refer to ageing. *Panminerva Med*, 41(4), 335-339.

Walder CE, Green SP, Darbonne WC, Mathias J, Rae J, Dinauer MC. ve ark.(1997). Ischemic stroke injury is reduced in mice lacking a functional NADPH oxidase. *Stroke*, 28(11), 2252-2258.

Wanders RJA, Waterham HR. (2004). Peroxisomal disorders I: biochemistry and genetics of peroxisome biogenesis disorders. *Clin Gen*, 67, 107–133.

Wang L, Li N, Lin D, Zang Y. (2017). Curcumin protects against hepatic ischemia/reperfusion induced injury through inhibiting TLR4/NF-κB pathway. *Oncotarget*, 8(39), 65414-65420.

Wen-S , Xu Q , Ye L , Chun-H , Hong Z, Lei G. (2016). Effects of melatonin on liver function and lipid peroxidation in a rat model of hepatic ischemia/reperfusion injury. *Exp Ther Med*, 11(5), 1955–1960.

Wnag ZM, Heshka S, Pierson RN, Heymsfield SB. (1995). Systematic organization of body composition methodology overview with emphasis on component based methods. *Am J Clin Nutr*, 61(1), 457-465.

Wu CC, Bratton SB. (2013). Regulation of the intrinsic apoptosis pathway by reactive oxygen species. *Antioxid Redox Signal*, 19(6), 546-558.

Wu Q, Qi B, Liu Y, Cheng B, Liu L, Li Y. ve ark. (2013). Mechanisms underlying protective effects of trimetazidine on endothelial progenitor cells biological functions against H₂O₂-induced injury: involvement of antioxidation and Akt/eNOS signaling pathways. *Eur J Pharmacol*, 5(1-3), 87-94.

- Wu W, Hu X, Zhou X, Klenotic PA, Zhou Q, Lin Z. (2018). Myeloid deficiency of CCN3 exacerbates liver injury in a mouse model of nonalcoholic fatty liverdisease. *J Cell Commun Signal*, 12(1), 389-399.
- Wu MY, Yiang GT, Liao WT, Tsai AP, Cheng YL, Cheng PW. ve ark. (2018). Current mechanistic concepts in ischemia and reperfusion injury. *Cell Physiol Biochem*, 46 (4), 1650-1667.
- Xu J, Hui G, Li Z, Chang C, Wei Ya, Qianchun D. ve ark. (2014). A combination of flaxseed oil and astaxanthin alleviates atherosclerosis risk factors in high fat diet fed rats. *Lipids Health Dis*, 4(13), 1-7.
- Xufeng T, Xiance S, Lina X, Lianhong Y, Xu H, Yan Q. ve ark. (2016). Total flavonoids from *rosa laevigata* michx fruit ameliorates hepatic ischemia/reperfusion injury through inhibition of oxidative stress and inflammation in rats. *Nutrients*, 8(418), 1-14.
- Yalçın M, Bengi G, Akarsu M. (2014). Non-alkolik steatohepatit. *Güncel Gastroenteroloji*, 18(2), 232-243.
- Yalçın AD, Bisgin A, Erbay RH, Oguz O, Demir S, Yilmaz M. ve ark. (2012). Trimetazidine effect on burn-induced intestinal mucosal injury and kidney damage in rats. *Int J Burns Trauma*, 2(2), 110-117.
- Yamagami K, Yamamoto Y, Kume M, Ishikawa Y, Yamaoka Y, Hiai H. ve ark. (2000). Formation of 8-hydroxy-2'-deoxyguanosine and 4-hydroxy-2-nonenal-modified proteins in rat liverafter ischemia-reperfusion: distinct localization of the two oxidatively modified products. *Antioxid Redox Signal*, 2(1), 127-136.
- Yang Y , Jia L, Kang L, Lei Z, Qun L, Baolin L. ve ark. (2017). Ginsenoside Rg5 increases cardiomyocyte resistance to ischemic injury through regulation of mitochondrial hexokinase-II and dynamin-related protein 1. *Cell Death Dis*, 8(2), 1-14.
- Yang HJ, Tang LM, Zhou XJ, Qian J, Zhu J, Lu L. ve ark. (2015). Ankaflavin ameliorates steatotic liver ischemia-reperfusion injury in mice. *Hepatobiliary Pancreat Dis Int*, 14(6), 619-625.

- Yazıcı P, Alizadehshargh S, Akdoğan G. (2009). Apoptoz: düzenleyici moleküller, hastalıklarla ilişkisi ve apoptozu saptama yöntemleri. *Türkiye Klinikleri Tıp Bilimleri Dergisi*, 29(6), 1677-1686.
- Young IS, Woodside JV. (2001). Antioxidants in health and disease. *J Clin Pathol*, 54(1),176-186.
- Yu S ,Jie Z, Zhengchen J, Caixing S, Jin L, Xiaodong D. ve ark. (2013). Protective effect of *N*-Acetylserotonin against acute hepatic ischemia-reperfusion injury in mice. *Int J Mol Sci*, 14(9), 17680–17693.
- Yu B, Huang Z. (2015). Variations in antioxidant genes and male infertility. *Biomed Res Int*, 513196(1), 1-10.
- Yuan S, Akey CW. (2013). Apoptosome structure, assembly, and procaspase activation. *Structure*, 21(4), 501-515.
- Yüzügülü Y, Ögel Z. (2013). Çift aktiviteli katalaz-fenol oksidazının ve diğer katalazların gıda sanayisindeki önemi. *Gıda*, 38 (2), 111-118.
- Zaouali MA, Boncompagni E, Reiter RJ, Bejaoui M, Freitas I, Pantazi E. (2013). AMPK involvement in endoplasmic reticulum stress and autophagy modulation after fatty liver graft preservation: a role for melatonin and trimetazidine cocktail. *J Pineal Res*, 55(1), 65-78.
- Zaouali M, Arnau P, Alexandre L, Carlos C, Emma F, Teresa C. (2017). GSK3 β and VDAC Involvement in ER Stress and Apoptosis Modulation during Orthotopic Liver Transplantation. *Int J Mol Sci*, 18(3), 591-606.
- Zhang D, Liu ZX, Choi CS, Tian L, Kibbey R, Dong J. ve ark. (2007). Mitochondrial dysfunction due to long-chain Acyl-CoA dehydrogenase deficiency causes hepatic steatosis and hepatic insulin resistance. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 104(43), 17075-17080.
- Zhang W, Kudo H, Kawai K, Fujisaka S, Usui I, Sugiyama T. ve ark. (2010). Tumor necrosis factor- α accelerates apoptosis of steatotic hepatocytes from a murine model of non-alcoholic fatty liver disease. *Biochem Biophys Res Commun*, 391(1)8, 1731–1736.

- Zhang F , Huang B , Zhao Y , Tang S , Xu H , Wang L. (2013). BNC protects H9c2 cardiomyoblasts from H₂O₂ -induced oxidative injury through ERK1/2 signaling pathway. *Evid Komplement Alternat Med*, 802(784), 1-12.
- Zhang T, Xiu HH, Liu JX, Ma Y, Xu KQ, Huang WQ. (2017). Protective effect of aspirin-triggered resolvin D1 on hepatic ischemia/reperfusion injury in rats: The role of miR-146b. *Int Immunopharmacol*, 51(1), 140-147.
- Zhang Y, Wang X, Mao L, Yang D, Gao W, Tian Z. ve ark. (2017). Dual roles of IL-22 at ischemia-reperfusion injury and acute rejection stages of rat allograft livertransplantation. *Oncotarget*, 8(70), 115384-115397.
- Zhang Y , Zhenzhen C, Nianhai F, Junxia T, Xingbo Z, Chengxiao L. (2017). Protective effect of propofol preconditioning on ischemia-reperfusion injury in human hepatocyte. *J Thorac Dis*, 9(3), 702–710.
- Zhou XJ, De Schepper, D De Craemer, M Delhase, G Gys, J Smits. ve ark. (1998). Pituitary growth hormone release and gene expression in cafeteria-diet-induced obese rats. *Journal of Endocrinology*, 159(1), 165–172.
- Zhou X, Li C, Xu W, Chen J. (2012). Trimetazidine protects against smoking-induced left ventricular remodeling via attenuating oxidative stress, apoptosis, and inflammation. *PLoS One*, 7(7), 1-7.
- Zou Z, Chang H, Li H, Wang S. (2017). Induction of reactive oxygen species: an emerging approach for cancer therapy. *Apoptosis*. 22(11), 1321-1335.
- Zuidema MY, Zhang C. (2010). Ischemia/reperfusion injury: The role of immune cells. *World J Cardiol*, 2(10), 325-332.

EKLER

Ek-1.Etik Kurul İzni



T.C.
ORDU ÜNİVERSİTESİ
Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu Başkanlığı

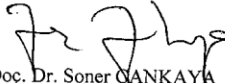
Sayı : 82678388/ 16
Konu: Onay belgesi

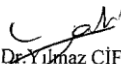
11.02.2015

Sayın Prof. Dr. Tevfik NOYAN

Sorumlu yürütücü olduğunuz “Non Alkolik Yağlı Karaciğer Oluşturulmuş Ratlarda Trimetazidin’in Sıcak İskemi Reperfüzyon Hasarına Karşı Koruyuculuğu Etkisinin Araştırılması” isimli araştırmanız Ordu Üniversitesi Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu’nun 11.02.2015 tarih ve 1 sayılı toplantısında aldığı 2 nolu kararına göre etik ilke ve kurallara uygunluk açısından incelenmiş olup kurulumuzca uygun bulunmuştur.

Gereğini rica ederim.

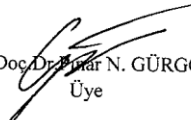

Doç. Dr. Soner ÇANKAYA
Başkan

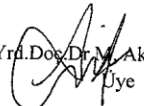

Yrd.Doç.Dr.Yılmaz ÇİFTÇİ
(Başkan Yardımcısı)

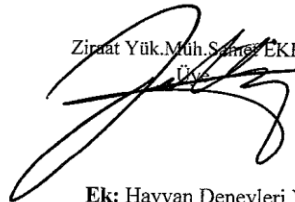

Doç.Dr.Derya BOSTANCI
Üye

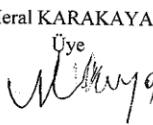

Doç.Dr.Orhan BAŞ
Üye


Doç.Dr.M. Cankat KARA
Üye


Yrd.Doç.Dr.Emir N. GÜRGÖR
Üye


Yrd.Doç.Dr.M. Akif ÖZCAN
Üye


Ziraat Yük.Müh. Samir EKER
Üye


Meral KARAKAYA
Üye

Ek: Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurul Kararları nüshası

Cumhuriyet Yerleşkesi 52200 / ORDU
Telefon: (0 452) 226 52 14/5309
E-posta: sonercankaya@odu.edu.tr

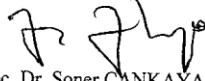
Ayrıntılı bilgi için irtibat: A.BAYRAM
Belgegeçer: (0 452) 226 52 28

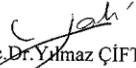
**T.C.
ORDU ÜNİVERSİTESİ
HAYVAN DENEYLERİ YEREL ETİK KURULU KARARLARI**

Toplantı Tarihi	Toplantı Sayısı	Toplantı Saati	Karar Sayısı
11.02.2015	1	12:30	2

Ordu Üniversitesi Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu 11.02.2015 tarihinde, Saat 12.30'da Ordu Üniversitesi Tıp Fakültesi Morfoloji Binası toplantı Salonunda aşağıda imzası bulunan üyelerin katılımıyla toplanarak bir araya geldi.

Karar No 2. Sorumlu yürütücü Prof. Dr. Tevfik NOYAN'ın 10.02.2015 tarihli başvurusunun değerlendirilmesi sonucu "Non Alkolik Yağlı Karaciğer Oluşturulmuş Ratlarda Trimetazidin'in Sıcak İskemi Reperfüzyon Hasarına Karşı Koruyuculuğu Etkisinin Araştırılması" isimli araştırmasının etik ilke ve kurallara uygunluk açısından yapılabilirliğine ve konunun ilgili öğretim üyesine tebliğine oybirliği ile karar verildi.

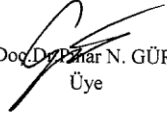

Doç. Dr. Soner ÇANKAYA
Başkan

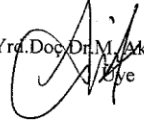

Yrd. Doç. Dr. Yılmaz ÇİFTÇİ
(Başkan Yardımcısı)


Doç. Dr. Derya BOSTANCI
Üye



Doç. Dr. Orhan BAŞ
Üye


Doç. Dr. M. Bankat KARA
Üye


Yrd. Doç. Dr. Pinar N. GÜRGÖR
Üye


Yrd. Doç. Dr. M. Akif ÖZCAN
Üye

Ziraat Yük. Müh. Samet EKER
Üye


Meral KARAKAYA
Üye

ÖZGEÇMİŞ

Adı Soyadı : Burhanettin Sertaç AYHAN

Doğum Yeri : GİRESUN

Doğum Tarihi : 11/10/1980

Yabancı Dili : İngilizce

E-posta : ayhan_974@hotmail.com

İletişim Bilgileri : 05372544585

Öğrenim Durumu : Yüksek lisans

Derece	Bölüm/ Program	Üniversite	Yıl
Lisans	Eczacılık fakültesi	İstanbul üniversitesi	2001
Y. Lisans	Biyoloji	Giresun üniversitesi	2018

İş Deneyimi:

Görev	Görev Yeri	Yıl
Eczacı	AYHAN Eczanesi sahibi ve mesul müdürlüğü	2001- 2015