

T.C.  
İNÖNÜ ÜNİVERSİTESİ  
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**KARACİĞERİ REJENERE OLAN VE OLMAYAN  
SIÇANLARDA, KARBONTETRAKLORÜRLE  
(CCl<sub>4</sub>) İNDÜKLENEN AKUT KARACİĞER  
HASARI VE N-ASETİLSİSTEİNİN KORUYUCU  
ETKİSİ**

**DOKTORA TEZİ**

**Sedat BİLGİÇ**  
**TIBBİ BİYOKİMYA ANABİLİM DALI**

**DANIŞMAN**  
**Doç. Dr. Elif ÖZEROL**

**MALATYA-2011**

T.C.  
İNÖNÜ ÜNİVERSİTESİ  
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**KARACİĞERİ REJENERE OLAN VE  
OLMAYAN SIÇANLARDA,  
KARBONTETRAKLORÜRLE (CCl<sub>4</sub>)  
İNDÜKLENEN AKUT KARACİĞER HASARI  
VE N-ASETİLSİSTEİNİN KORUYUCU  
ETKİSİ**

**Sedat BİLGİÇ**  
**TIBBİ BİYOKİMYA ANABİLİM DALI**

**DANIŞMAN**  
**Doç. Dr. Elif ÖZEROL**

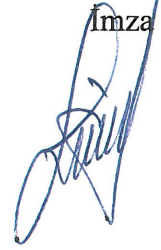
**Bu araştırma İnönü Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi tarafından  
2009/52 proje numarası ile desteklenmiştir.**

**MALATYA-2011**

Sağlık Bilimleri Enstitüsü Müdürlüğü'ne

Bu çalışma jürimiz tarafından Tıbbi Biyokimya Programında Doktora Tezi olarak kabul edilmiştir.

Jüri Başkanı: Prof. Dr. İsmail TEMEL  
İnönü Üniversitesi

İmza  


Üye: Prof. Dr. Ömer AKYOL  
Hacettepe Üniversitesi



Üye: Prof. Dr. Yusuf TÜRKÖZ  
İnönü Üniversitesi



Üye: Doç. Dr. Alaadin POLAT  
İnönü Üniversitesi



Danışman: Doç. Dr. Elif ÖZEROL  
İnönü Üniversitesi



ONAY :

Bu tez, İnönü Üniversitesi Lisansüstü Eğitim-Öğretim Yönetmeliği'nin ilgili maddeleri uyarınca yukarıdaki jüri üyeleri tarafından uygun görülmüş ve Enstitü Yönetim Kurulu ...../...../ 2011 tarih ve 2011 /..... sayılı kararıyla kabul edilmiştir.

Prof. Dr. Ali OTLU  
Enstitü Müdürü

## TEŞEKKÜR

Bu çalışmanın her aşamasında bana yol gösteren ve yardım eden tez danışmanım Doç.Dr. Elif ÖZEROL'a, anabilim dalımız Yüksek Lisans öğrencisi Kevser TANBEK'e, laboratuvar çalışmalarında emeği geçen Patoloji Anabilim Dalından Prof.Dr. Engin AYDIN'a, Uzm.Dr. Nurhan ŞAHİN'e, cerrahi işlemlerdeki katkılarından dolayı Farmakoloji Anabilim Dalından Doç.Dr. Mustafa IRAZ'a ve İnönü Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimine (İ.Ü.BAPB) en derin sevgi ve şükranlarımı sunarım.

## ÖZET

Parsiyel hepatektomi (PH); tümör, travma ve karaciğer transplantasyonu gibi bazı durumlarda uygulanan cerrahi tedavidir. Karaciğerin rejenerasyon kapasitesi onu diğer organlardan ayırır. Rejenerasyon; büyüme faktörleri, sitokinler, transkripsiyon faktörleri, hormonlar ve oksidatif stres ürünlerinin de dahil olduğu kompleks bir olaydır. Çalışmamızda sıçanlarda normal ve %70 PH sonrasında rejenerasyon karaciğerde karbontetraklorür (CCl<sub>4</sub>) toksisitesine duyarlılıkları ve antioksidan N-Asetilsistein'in (NAC) koruyucu özelliğinde farklılık olup olmadığının araştırılması amaçlandı.

Çalışmada 67 adet 12 haftalık 200-250 gram ağırlığında Wistar albino tipi erkek sıçan kullanıldı. Sıçanlar, PH yapılan ve yapılmayan olmak üzere iki ana grup altında 9 alt gruba ayrıldı. Her iki ana grupta sırasıyla 1. Kontrol, 2. CCl<sub>4</sub> (0,5 ml/kg,i.p.), 3. NAC+CCl<sub>4</sub> (50 mg/kg,i.p. NAC, 0,5 ml/kg,i.p. CCl<sub>4</sub>) 4. NAC (50 mg/kg,i.p.) grupları olmak üzere dört alt gruba ayrıldı. Ayrıca PH yapılan gruplara bir de sham kontrol grubu eklendi. PH uygulanan alt gruplarda denek sayısı 8, sham kontrol ve PH uygulanmayan alt gruplarda 7 olarak belirlendi. PH yapılan gruplara işlemin 8. gününde, yapılmayan gruplara ise dokular alınmadan 24 saat önce intraperitoneal (i.p) yoldan 0,5 ml/kg CCl<sub>4</sub>, 50 mg/kg NAC verildi. İlaç uygulaması yapılan alt gruplara 50 mg/kg NAC, CCl<sub>4</sub> uygulamasından 3 saat önce ve sonrasında 1., 3., 6., 12. ve 18. saatlerde toplam 6 doz uygulandı. Diğer taraftan kontrol gruplarına ise CCl<sub>4</sub> yerine aynı hacimde serum fizyolojik verildi. Bütün gruplara ilaç uygulamaları eş zamanlı olarak yapıldı. PH uygulaması sıçan karaciğerinin yaklaşık %70'inin genel anestezi altında cerrahi yolla çıkarılmasıyla yapıldı. Postoperatif 9. günde bütün sıçanlar usulünce kesilerek serum ve karaciğer doku örnekleri elde edildi.

Alınan karaciğer dokusunun bir parçası histopatolojik inceleme amacıyla %10 formaldehid içerisine alındı. Kalan karaciğer dokusunda katalaz (CAT), süperoksit dismutaz (SOD), glutatyon peroksidaz (GSH-Px) aktiviteleri ve malondialdehit (MDA), glutatyon (GSH), protein karbonil (PC) analizleri yapıldı.

Çalışmamızda CAT enzim aktivitesi hem PH'den sonra CCl<sub>4</sub> hem de PH yapılmayan CCl<sub>4</sub> gruplarında kendi kontrol grubuna göre anlamlı olarak azaldığı gözlemlendi. CCl<sub>4</sub>'e maruz bırakılan gruplara NAC verilmesi, CAT ve SOD enzim

aktivitelerinde anlamlı yükselmeye neden oldu. Ayrıca PH yapılmayan CCl<sub>4</sub> grubu GSH-Px aktivitesinin PH yapılmayan kontrol grubuna göre anlamlı olarak düşük olduğu gözlemlendi. CCl<sub>4</sub>'ün neden olduğu GSH-Px aktivitesindeki azalma NAC uygulaması ile kontrol grubu değerlerine yaklaşırsa da düzelme istatistiksel olarak anlamlı değildi. Diğer taraftan NAC+CCl<sub>4</sub> grupları, PH yapılan ve yapılmayan CCl<sub>4</sub> gruplarıyla kıyaslandığında GSH düzeyinde anlamlı olmayan bir artış olduğu görüldü. PH yapılmayan CCl<sub>4</sub> grubunun karaciğer dokularındaki MDA ve PC düzeyinin kendi kontrol grubuna göre anlamlı olarak yüksek olduğu tespit edildi. İnflamasyon süreci ve karaciğer rejenerasyonu sırasıyla H&E ve Ki-67 ile değerlendirildi. Ki-67 boyamalarında PH sonrası rejenerasyon gözlemlendi, ancak PH yapılan gruplar arasında mitotik aktivite farkı gözlemlenmedi.

Sonuç olarak elde edilen bulgular, PH sonrası rejenerasyon karaciğer dokusunda oksidasyon ürünlerinde artış olabileceğini göstermektedir. Rejenerasyon karaciğerdeki oksidasyon ürünlerindeki bu artış PH sonrası mitotik aktiviteyle birlikte artan oksidan madde artışına bağlı olabilir. Ancak bu sonuçlar, rejenerasyon karaciğer dokusunun CCl<sub>4</sub> toksisitesine duyarlılığında ve NAC'ın koruyuculuğunda herhangi bir değişiklik olmayabileceğine işaret etmektedir. Konunun tam olarak anlaşılabilmesi için daha çok zaman bağımlı çalışmaların yapılmasına ihtiyaç vardır.

**Anahtar Sözcükler:** Parsiyel hepatektomi, Karaciğer, NAC (N-Asetilsistein), CCl<sub>4</sub> (Karbontetraklorür),

## ABSTRACT

Partial hepatectomy (PH) can be an inevitable surgical therapy in some conditions such as malignancies, trauma or liver transplantation. Its capacity for regeneration distinguishes the liver from other organs. Regeneration is a complex process involving growth factors, cytokines, transcription factors, hormones, and oxidative stress products. In the present research, we aimed to investigate if there was an alteration in the hepatoprotective properties of N-acetylcysteine (NAC), an antioxidant agent, and the sensitivity to hepatotoxicity of carbon tetrachloride (CCl<sub>4</sub>), on regenerated liver after 70% PH and normal liver in rats.

67 male Wistar Albino rats (12 weeks old) weighing around 200-250 g were used. Rats were divided into 2 main groups to total 9 subgroups: group 1, underwent PH; group 2, not subjected to PH. Both main groups were assigned into four subgroups respectively: group 1, control; group 2, CCl<sub>4</sub> (0,5 ml/kg,i.p.); group 3, NAC+CCl<sub>4</sub> (50 mg/kg,i.p. NAC and 0,5 ml/kg,i.p. CCl<sub>4</sub>); group 4, NAC (50 mg/kg,i.p.). Besides to the groups that underwent a 70% PH, a sham control group was added. In subgroups which underwent PH were designated 8 tried number, in sham control and subgroups which not subjected to PH were designated 7 tried number. 0,5 ml/kg CCl<sub>4</sub> and 50 mg/kg NAC was given intraperitoneally (i.p.) to the groups which underwent PH in the 8th day of operation and to the groups which not subjected to PH 24 hours before the tissues were taken off. Treated subgroups were administered a total of 6 doses of NAC (50 mg/kg,i.p.), 3 hrs before CCl<sub>4</sub> and 1, 3, 6, 12, 18 hrs after CCl<sub>4</sub> administration. On the other hand, the same volume of serum physiologic was given to the control groups. Treatment to the whole groups was carried out synchronously. As for PH, approximately 70% of the rat liver was surgically removed under general anesthesia. On postoperative day 9, all rats were humanely killed then serum and liver tissues were removed.

A sample of removed liver tissue was kept in 10% formalin for histopathological analysis. Catalase (CAT), superoxide dismutase (SOD), glutathione peroxidase (GSH-Px) activities and malondialdehyde (MDA), glutathione (GSH), protein carbonyl (PC) levels were determined in remnant liver tissue.

In the present study, CAT enzymatic activity was significantly lower in both groups those subjected to CCl<sub>4</sub> with and without PH when compared to those

assigned as control groups. The groups that exposed to the CCl<sub>4</sub> treated with NAC concluded significantly high levels of SOD and CAT enzymatic activities. Moreover there was a more prominent decrease in the level of GSH-Px activity of not underwent PH-CCl<sub>4</sub> group than that of GSH-Px activity of not underwent PH-Control group. The reduction of GSH-Px induced by CCl<sub>4</sub> was not significantly altered by the treatment with NAC but was improved close to the values of control groups. On the other hand, comparing the level of GSH, a significant increase was not observed in the NAC+CCl<sub>4</sub> groups as compared to those subjected to and not to PH-CCl<sub>4</sub>. The tissue levels of MDA and PC were significantly greater in the group not subjected to PH-CCl<sub>4</sub> than level in its control group. Inflammatory process and liver regeneration were evaluated with H&E and Ki-67, respectively. Regeneration was observed after PH in Ki-67 immunostaining but no mitotic activity difference was observed between the groups which subjected to PH.

In conclusion, the results showed that there might be an increase in the oxidation products after 70% PH in regenerated liver tissue. The increase in oxidation products in the regenerated liver may be due to the increase of oxidant substance related to increasing mitotic activity after PH. However, these results indicate that there may be no change in the sensitivity of regenerated liver tissue to CCl<sub>4</sub> toxicity and the protective effect of NAC. Nevertheless, for a comprehensive understanding of the subject we need more studies independent to time.

Key words: Partial hepatectomy, liver, NAC (N-acetylcysteine), CCl<sub>4</sub> (carbon tetrachloride)



**İÇİNDEKİLER**

	SAYFA
ONAY SAYFASI	iii
TEŞEKKÜR	iv
ÖZET	v
ABSTRACT	vii
İÇİNDEKİLER	ix
SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ	xii
ŞEKİLLER DİZİNİ	xiv
TABLolar DİZİNİ	xv
1. GİRİŞ	1
2. GENEL BİLGİLER	3
2.1. Karaciğerin Anatomisi	3
2.1.1. Fonksiyonel Anatomi	4
2.2. Karaciğerin Histolojisi	5
2.3. Karaciğerin Biyokimyasal Fonksiyonları	7
2.3.1. Karaciğerin Sentez Fonksiyonu	7
2.3.2. Karaciğerin Ekskretuar Fonksiyonu	7
2.3.3. Karaciğerin Metabolik Fonksiyonu	8
2.4. Karaciğer Rezeksiyonu	9
2.5. Karaciğer Rejenerasyonu	12
2.5.1. Hepatosit Büyüme Faktörü (HGF)	13
2.5.2. Epidermal Büyüme Faktörü (EGF)	14
2.5.3. Tümör Nekroz Faktörü (TNF)	14
2.5.4. Transforme Edici Büyüme Faktörü Alfa (TGF- $\alpha$ )	14
2.5.5. Interlökin 6 (IL-6)	15
2.5.6. Norepinefrin	15
2.5.7. İnsülin	15
2.6. Karbontetraklorür (CCl <sub>4</sub> )	16
2.7. N-Asetilsistein	18
2.7.1. Farmakodinamik Özellikleri	18
2.7.2. Farmakokinetik Özellikleri	18

2.7.3. Endikasyonları	19
2.8. Serbest Radikaller	20
2.9. Oksidatif Stres	20
2.10. Oksidatif Stres Parametreleri	21
2.10.1. Malondialdehid (MDA)	21
2.10.2. Protein karbonil (PC)	21
2.11. Antioksidanlar	22
2.11.1. Süperoksit Dismütaz (SOD)	22
2.11.2. Katalaz	22
2.11.3. Glutasyon Peroksidaz (GSH-Px)	22
2.11.4. Glutasyon (GSH)	23
3. GEREÇ VE YÖNTEM	24
3.1. Deney Hayvanları ve Yaşam Alanları	24
3.2. Deney Gruplarının Oluşturulması	24
3.2.1. PH Yapılan Gruplar	24
3.2.1.1. PH'den Sonra Kontrol Grubu	24
3.2.1.2. PH'den Sonra CCl <sub>4</sub> Grubu	25
3.2.1.3. PH'den Sonra NAC+CCl <sub>4</sub> Grubu	25
3.2.1.4. PH'den Sonra NAC Grubu	25
3.2.1.5. Sham Kontrol Grubu	25
3.2.2. PH Yapılmayan Gruplar	25
3.2.2.1. PH Yapılmayan Kontrol Grubu	25
3.2.2.2. PH Yapılmayan CCl <sub>4</sub> Grubu	25
3.2.2.3. PH Yapılmayan NAC+CCl <sub>4</sub> Grubu	26
3.2.2.4. PH Yapılmayan NAC Grubu	26
3.3. NAC ve CCl <sub>4</sub> Uygulaması	26
3.4. Cerrahi Girişimler ve PH Modelinin Oluşturulması	26
3.5. Karaciğerin Rejenerasyon Miktarının Ölçümü	28
3.6. Kan ve Karaciğer Dokularının Analizlere Hazırlanması	28
3.7. Karaciğer Dokusunda Yapılan Analizler	29
3.7.1. Süperoksit Dismütaz (SOD) Enzim Aktivite Tayini	29
3.7.2. Katalaz (CAT) Enzim Aktivite Tayini	30
3.7.3. Glutasyon Peroksidaz (GSH-Px) Enzim Aktivite Tayini	31

3.7.4. Doku Homojenat, Süpernatant ve Ekstraktlarında Protein Tayini	32
3.7.5. Tiyobarbitürik Asit Reaktif Maddeleri (TBARS) Miktarının Tayini	33
3.7.6. PC Tayini	34
3.7.7. Redükte Glutasyon (GSH) analizi	34
3.8. Kullanılan Aletler	36
3.9. İmmünohistokimyasal Değerlendirme	36
3.10. İstatistik	37
4. BULGULAR	38
4.1. Ki-67 Düzeyinin Değerlendirilmesi	41
4.2. Karaciğerde Rejenerasyon Oranının Değerlendirilmesi	45
4.3. Sıçanların Karaciğer Dokularındaki CAT Aktiviteleri	45
4.4. Sıçanların Karaciğer Dokularındaki GSH-Px Aktiviteleri	47
4.5. Sıçanların Karaciğer Dokularındaki SOD Aktiviteleri	49
4.6. Sıçanların Karaciğer Dokularındaki MDA Düzeyleri	50
4.7. Sıçanların Karaciğer Dokularındaki GSH Düzeyleri	52
4.8. Sıçanların Karaciğer Dokularındaki PC Düzeyleri	53
5. TARTIŞMA	56
6. SONUÇ ve ÖNERİLER	67
7. KAYNAKLAR	69
DENEY HAYVANLARI ETİK KURULU KARARI	84
ÖZGEÇMİŞ	85

### SİMGELER VE KISALTMALAR

CCl <sub>4</sub>	: Karbontetraklorür
CYP	: Sitokrom
CCl <sub>3</sub> ·	: Triklorometil radikali
CCl <sub>3</sub> OO·	: Triklorometilperoksil
NAC	: N-Asetilsistein
SH	: Sülfidril
GSH	: Glutasyon
PH	: Parsiyel Hepatektomi
PH (+)	: Parsiyel Hepatektomi yapılan (PH'den sonra)
PH (-)	: Parsiyel Hepatektomi yapılmayan
ATP	: Adenozin trifosfat
DNA	: Deoksiribonükleik asit
HGF	: Hepatosit büyüme faktörü
EGF	: Epidermal Büyüme Faktörü
TNF	: Tümör Nekroz Faktörü
TGF-α	: Transforme Edici Büyüme Faktörü Alfa
IL-6	: Interlökin 6
AİDS	: Kazanılmış İmmün Yetmezlik Sendromu
2O <sub>2</sub> <sup>-</sup>	: Süperoksit anyonu
HO·	: Hidroksil radikali
NO·	: Nitrik oksit
ROO·	: Peroksil radikali
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	: Hidrojen peroksit
SOR	: Serbest oksijen radikalleri
MDA	: Malondialdehid
PC	: Protein karbonil
SOD	: Süperoksit dismutaz
CAT	: Katalaz
GSH-Px	: Glutasyon peroksidaz
GSH	: Glutasyon
i.p.	: İntraperitoneal

SF	: Serum fizyolojik
HCl	: Hidroklorik asit
XO	: Ksantin oksidaz
GSSG	: Okside glutatyon
FCF	: Folin-Ciocalteu-Fenol reaktifi
TBARS	: Tiyobarbitürük asit reaktif maddeleri
TCA	: Triklorasetik asit
TBA	: Tiobarbitürük asit
NBT	: Nitroblue tetrazolium
PBS	: Fosfat tamponu
DAB	: 3,3 Diaminobenzidine
H&E	: Hematoksilin&Eozin
RO <sup>•</sup>	: Alkoksil
HOCl	: Hipoklorik asit
O <sub>3</sub>	: Ozon
<sup>1</sup> O <sub>2</sub>	: Singlet oksijen
ONOO <sup>-</sup>	: Peroksinitrit
RCOs	: Karbonil bileşikleri
HO <sub>2</sub> <sup>•</sup>	: Hidroperoksil

## ŞEKİLLER

	SAYFA
Şekil 2.1. Karaciğerin anterior and posterior görünümü	3
Şekil 2.2. Sıçan karaciğeri	4
Şekil 2.3. Normal karaciğerin şematik diyagramı	6
Şekil 2.4. Karaciğer rejenerasyonunun cerrahi modelleri	10
Şekil 2.5. Karbontetraklorür	16
Resim 3.1. PH sırasında hepatoduodenal bağın kesilmesi	27
Resim 3.2. PH işleminde alınan sıçan karaciğeri	27
Şekil 3.1. GSH Standart Grafiği	35
Resim 4.1. PH'den sonra kontrol grubu; hepatositlerde reperatif değişiklikler x 200 H&E	42
Resim 4.2. PH'den sonra CCl <sub>4</sub> grubu; akut inflamasyon ve nekroz komşuluğunda hepatositlerde reperatif değişiklikler x 200 H&E	42
Resim 4.3. PH'den sonra NAC+CCl <sub>4</sub> grubu; hepatositlerde reperatif değişiklikler x 200 H&E	43
Resim 4.4. PH yapılmayan CCl <sub>4</sub> grubu; santral ven çevresinde steatozis ve inflamasyon x 100 H&E	43
Resim 4.5. PH'den sonra NAC+CCl <sub>4</sub> grubu; immünohistokimyasal olarak Ki-67'nin pozitifliği (Ki-67 x 200 nükleer boyanma)	44
Resim 4.6. PH sonrası NAC grubu; immünohistokimyasal olarak Ki-67'nin pozitifliği (Ki-67 x 200 nükleer boyanma)	44
Şekil 4.1. Sıçanların karaciğer dokularındaki CAT aktivitesi grafiği	46
Şekil 4.2. Sıçanların karaciğer dokularındaki GSH-Px aktivitesi grafiği	48
Şekil 4.3. Sıçanların karaciğer dokularındaki SOD aktivitesi grafiği	50
Şekil 4.4. Sıçanların karaciğer dokularındaki MDA düzeyi grafiği	52
Şekil 4.5. Sıçanların karaciğer dokularındaki GSH düzeyi grafiği	53
Şekil 4.6. Sıçanların karaciğer dokularındaki PC düzeyi grafiği	55

**TABLULAR**

	Sayfa
Tablo 4.1. Karaciğer dokusunda antioksidan enzim aktiviteler	39
Tablo 4.2. Karaciğer dokusunda malodialdehit, glutatyon ve protein karbonil miktarları	40
Tablo 4.3. Karaciğer dokusunda Ki-67 değerleri tablosu	41
Tablo 4.4. Karaciğer dokusunda rejenerasyon oranı tablosu	45

## 1.GİRİŞ

Karaciğer dokusunun cerrahi bir işlem sonucu ya da toksik maddelerin etkisiyle kaybı, karaciğer hücrelerinin bölünmesini başlatan ve dokunun olaydan önceki ilk kitlesine ulaşınca kadar devam eden bir mekanizmanın başlamasına neden olur.

(1). Karaciğer rejenerasyonu patofizyolojik bir işlem olup hem hipertrofi (hücre boyutunda veya prereplikasyon fazındaki protein içeriğinde artış) hem de hiperplazi (hücre sayısında artış) şeklindedir. Bu olayların her biri diğerinden bağımsız işleyebilir (2).

İnsan ve kemirgenlerde karaciğerin rejenerasyon süreci birbirine benzerdir. Bu nedenle kemirgenlerde elde edilen sonuçlar insan karaciğeri için önemli bir yol göstericisidir (3). Kemirgenlerde karaciğer rezeksiyonları, genellikle karaciğer rejenerasyonu, akut karaciğer yetmezliği, karaciğer metastazi, transplantasyon ve hasara karşı metabolik cevabı çalışmak için gerçekleştirilir. Çoğu karaciğer rezeksiyon modelleri hızlı, güvenilir ve tekrarlanma oranı yüksek olup sadece temel beceri gerektirir. Küçük kemirgenler (fare, sıçan), karaciğer cerrahi araştırmalarında en çok kullanılan deney hayvanlarıdır (4). Sıçanlarda karaciğer dokusunun %70 oranında uzaklaştırılarak oluşturulan karaciğer rejenerasyon modeli, deney hayvanları arasında en çok çalışılan karaciğer modeli olmuştur (5).

Karbontetraklorür ( $CCl_4$ ) gibi karaciğer hasarına neden olan hepatotoksik ajanların kullanımı çeşitli ölçülerde hepatosit dejenerasyonu ve hücre ölümü ile karakterize tablonun oluşmasına neden olur (6).  $CCl_4$  insanlarda olduğu gibi deney hayvanlarında da hepatotoksite oluşturan bir ksenobiyotiktir (7).  $CCl_4$  günümüzde hala yağ dejenerasyonu, fibrozis, hepatosellüler ölüm, kanser oluşumu gibi hepatotoksik etkilerin etki mekanizmasını aydınlatmada kullanılan önemli bir maddedir.  $CCl_4$ , sitokrom CYP2E1, CYP2B1, CYP2B2 ve yüksek olasılıkla CYP3A tarafından aktive edilip triklorometil radikali ( $CCl_3\cdot$ ) oluşturulur. Bu radikal nükleik asit, protein ve lipit yapılı hücrel moleküllere bağlanabilir. Özellikle yağları dejenere ederek lipit metabolizması gibi önemli hücrel süreçleri bozar. Aynı zamanda oksijenle reaksiyona girip son derece reaktif olan triklorometil peroksil ( $CCl_3OO\cdot$ ) radikalini oluşturabilir. Bu oksijen radikali, poliansature yağ asitleri ile reaksiyona girerek lipit peroksidasyonu zincir reaksiyonunu başlatır. Bu durum



mitokondri, endoplazmik retikulum ve plazma membranındaki lipitlerin bozulmasına neden olarak geçirgenliklerini etkiler. Sonuçta hücre içi kalsiyum birikmesi ve hücre homeostazisinin bozulmasıyla ciddi hücre hasara yol açar (8).

N-Asetilsistein (NAC) antioksidan ve antiinflamatuvar etkiye sahip sülfidril (-SH) grubu içeren bir moleküldür. NAC'ın antioksidan özelliği birçok *in vivo* ve *in vitro* çalışmada gösterilmiştir (9,10). NAC aynı zamanda indirgenmiş glutatyon (GSH) öncüsü olup etkili bir hidroksil radikali temizleyicisi ve potansiyel antifibrotik etkiye sahiptir (11). Bununla birlikte NAC'ın CCl<sub>4</sub> zehirlenmelerinde de koruyucu etkisinin olduğu gösterilmiştir (9). Ancak rejenere karaciğerde CCl<sub>4</sub> toksisitesine duyarlılıkta herhangi bir değişiklik olup olmadığı ve yine rejenere karaciğeri CCl<sub>4</sub> toksisitesinden NAC'ın koruyucu özelliğinde değişiklik olup olmadığı henüz bilinmemektedir.

Karaciğer nakillerinde çoğunlukla canlı vericilerden alınan kısmi karaciğer dokusu nakledilmektedir. Bu durumda vericilerin karaciğerleri her ne kadar rejenere oluyor olsalar da bu tip sağlıklı karaciğer vericilerinin hepatotoksik ajanlara duyarlılığında değişiklikler olup olmadığı ve oluşan toksisitenin antioksidanlarla tedavisinin verici olmayan bireylerle farklılık gösterip göstermediği henüz yeterince araştırılmamıştır. Bu çalışmanın amacı, kısmi hepatektomi yapılan ve hiç hepatektomi yapılmayan deneysel bir hayvan modelinde, uygulandığında serbest radikaller oluşturarak ağır karaciğer hasarı yaptığı kesin olarak bilinen CCl<sub>4</sub> uygulayıp, yine koruyucu etkileri daha önceden bilinen NAC'ı aynı deney hayvanlarına vererek sonuçları mevcut literatür bilgileri ışığında tartışmaktır. Bu çalışma ile ulaşmak istediğimiz ana hedefimiz parsiyel hepatektomiden (PH) sonra oluşan serbest radikal hasarını potansiyel olarak önleyebilecek bir ajanın deneysel çalışmalarını yapmak ve bunun klinik uygulama alanlarının olup olamayacağını ilgili bilim dünyası ile paylaşmaktır.

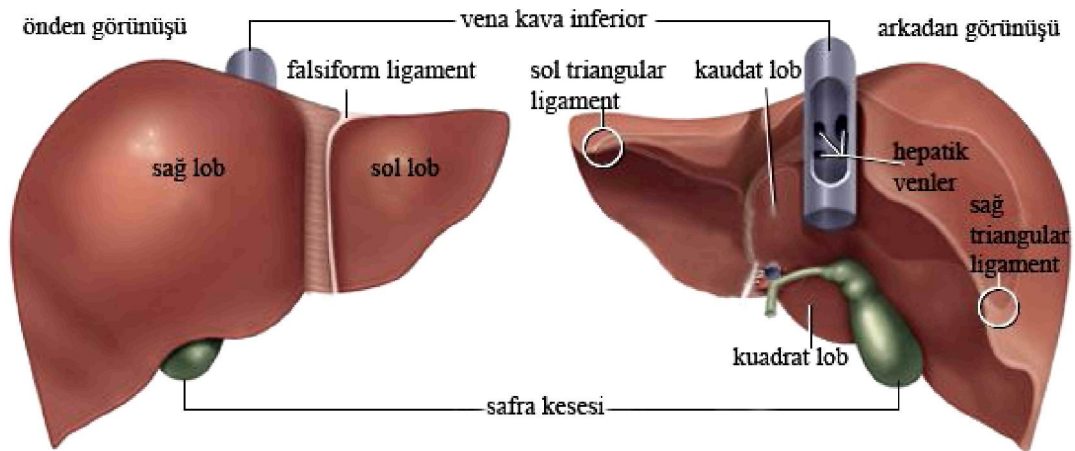
## 2.GENEL BİLGİLER

### 2.1. Karaciğerin Anatomisi

Karaciğer, gebeliğin üçüncü haftasında duodenumdan içi boş bir endodermal tomurcuk olarak oluşmaya başlar. Bu yapı karaciğer ve safra oluşturmak üzere ikiye ayrılır. Hepatik bölümü, çift potansiyelli öncül hücreler içerir. Bunlar hepatositler ya da erken primitif safra kanal yapılarına katılan kanal hücrelerine dönüşür. Bu değişime, hücre içerisinde sitokeratin tipin değişimide eşlik eder (12,13).

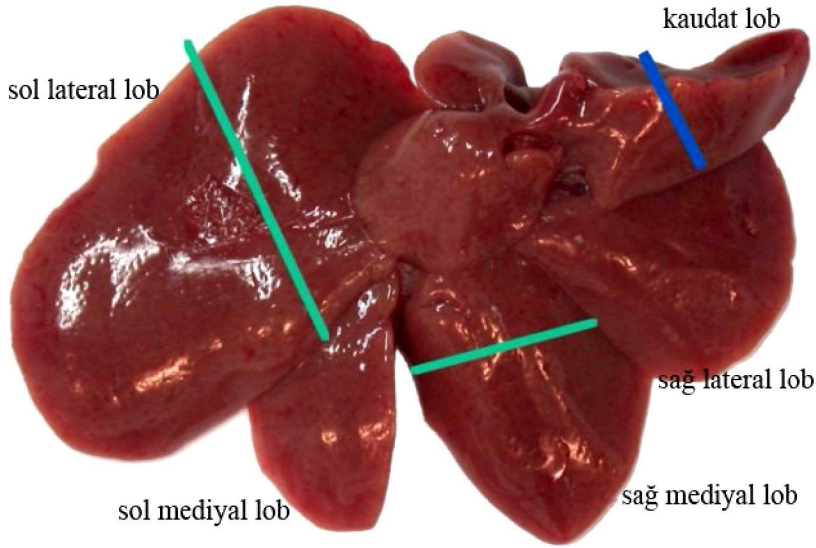
Karaciğer vücudun en büyük organıdır. Ağırlığı 1200-1500 g arasında olup yetişkinlerde toplam vücut ağırlığının 1/50'si kadardır. Yenidoğanlarda karaciğer nispeten daha büyüktür. Doğum ağırlığının 1/80'ini oluşturur. Bu durum sol lobun büyük olmasından kaynaklanır.

Karaciğer, sağ üst kadranda kostalar tarafından korunur. Üst sınırı yaklaşık olarak meme başı seviyesindedir. İki anatomik lobu bulunur. Sağ lob, sol lobdan altı kat daha büyüktür (13,14).



**Şekil 2.1:** Karaciğerin anterior and posterior görünümü (15).

(www.britannica.com'dan adapte edilmiştir.)



**Şekil 2.2:** Sıçan karaciğeri (16). (www.item.fraunhofer.de'den adapte edilmiştir.)

Sağ lobun üst sınırı, 5. kosta seviyesinde ve sağ midklaviküler hattın 2 cm medialinde bulunur. Sol lobun üst sınırı, 6. kostanın üst seviyesine tekabül edip sol midklaviküler hatta bulunur. Alt sınır, 9. sağ kosta kartilajdan 8. sol kosta kartilaja yukarı doğru eğik olarak geçer.

Karaciğer, kanı iki kaynaktan temin eder. Portal ven, venöz kanı bağırsaklardan ve dalaktan getirir. Hepatik arter ise kolia aksisten arteriyal kanı karaciğere taşır. Bu damarlar, sağ lobun inferior yüzünde bulunan porta hepatis fissüründen geçerek karaciğere girer (13,14). Karaciğerde venöz drenaj, karaciğerin arkasından çıkan sağ ve sol hepatik venle olur. Bu venler aynı anda inferior vena kavaya girerler. Karaciğer, peritoneal ligamentlerle ve karın duvarı kası tarafından iletilen intraabdominal basınçla pozisyonunu korur (13).

### 2.1.1. Fonksiyonel Anatomi

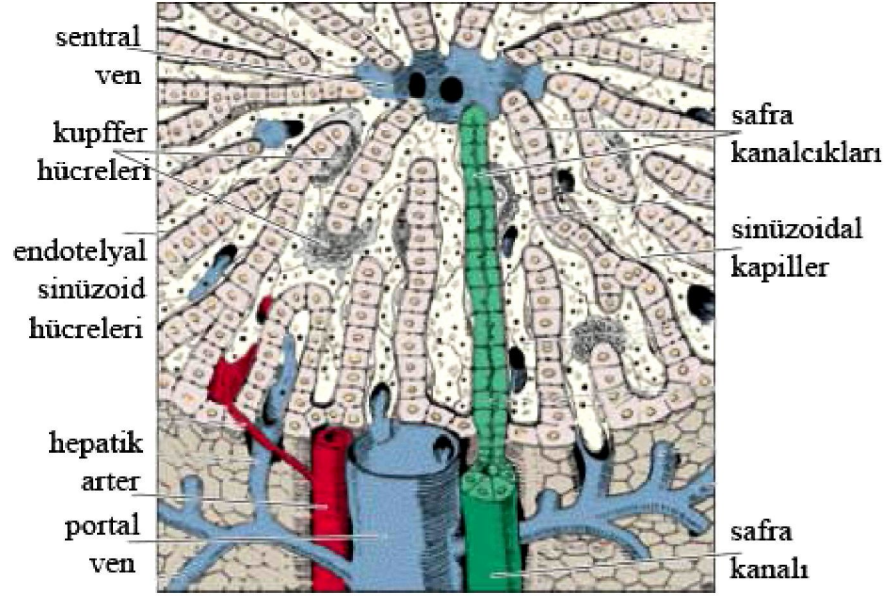
Karaciğer, falsiform ligamentin araladığı hat boyunca ayrılmış olan sağ ve sol loblara sahiptir. Ana portal ven, sağ ve sol dallara ayrılır. Daha sonra bunlardan her biri ayrıca iki subüniteyi oluşturur. Bunlara sektör denir. Sağda anterior ve posterior sektörler, solda ise medial ve lateral sektörler olmak üzere toplam dört sektörden oluşur.

Bu dört sektör ayrıca segment denilen alt bölümler oluştururlar. Sağ anterior sektör V. ve VIII. segmenti, sağ posterior sektör VI. ve VII. segmenti, sol medial sektör IV. segmenti, sol lateral sektör ise II. ve III. segmenti içerir. Segmentlerin makroskopik damarları arasında vasküler anastomoz bulunmaz. Fakat iletişim sinüzoidal seviyede olur. Bu fonksiyonel anatomik sınıflandırma, radyolojik verinin yorumlanmasında ve karaciğer rezeksiyonunun cerrahi planlanmasında önemlidir (13,17).

## **2.2. Karaciğerin Histolojisi**

Karaciğer büyük hacimli ve oldukça damarlı bir organdır. Ayrıca kollajen lifler, yaygın fibroblastlar, miyeloblastlar, küçük kan damarları ve lenfatiklerden oluşmuş ince bir kapsül tarafından çevrilmiştir. Kapsül, kan damarlarının karaciğere giriş yaptığı ve safra kanallarının ayrıldığı yer olan porta hepatis çevresinde en kalın yapıdadır. Parankimada kapsül, portal sistemleri çevreleyen bağ doku ile birleşir.

Portal sisteme giren damarlar ve santral venler hepatik sinüzoitlere uzanır. Bu alanlarda kan ve karaciğerin tek hücreli tabakaları arasında alış veriş meydana gelir. Histolojik kesitlerde, portal sistemler (hepatik arter dalları, portal ven, bir ya da iki safra kanalı, lenfatikler, sinirler, lenfositler ve yumuşak bağ dokuda fibroblastlar), santral lobüler ven (terminal hepatik ven) ve lobüler parankima tanımlanmıştır. Karaciğerin görünen yapısal üniteleri çok yüzlü prizma şeklinde lopçuklardır. Bunların merkezinde sentrolobüler ven bulunur (18,19). Portal sistemi çevreleyen hepatositler, sistemin bağ dokusu ile hepatik parankima arasında sınırlayıcı tabakadan bir ara yüzey oluşturur.



**Şekil 2.3:** Normal karaciğerin şematik diyagramı (20). (www.mc.vanderbilt.edu'den adapte edilmiştir.)

Sinüzoidal membran (total hücre yüzey alanının %70'i), yüzey alanını altı kat artıran mikrovilli ile kaplıdır. Disse aralığı boyunca kan ve hepatositler arasında madde değişimi yalnızca sinüzoidal plazma membranının görevidir.

Karaciğerin parankim hücrelerinin fonksiyonları oldukça fazla sayıdadır. Genel olarak bakıldığına şu fonksiyonlar en önde gelenleridir; onarım, transport, sentez, biyotransformasyon ve yıkım (protein, lipit, karbonhidrat, hormon, ksenobiyotik ve safra). Yaşlandıkça hepatosit sayısı azalır ve hipertrofi görülür. Diğer taraftan poliploidi, lizozom ve düz endoplazmik retikulum sayısı artar.

Sinüzoidler özel kapillerlerdir. Bunlar; geçirgen endotelial bariyerine, sinüzoidlerin girişinde koruma sağlayan yerleşik makrofajlara (kupffer hücreleri), bazıları büyük granüler lenfositler olmak üzere karaciğere birleşik lenfositlere ve vitamin A depolayan stellat hücrelerine sahiptirler (19,21). Sinüzoidler, gerçek taban membranlarına sahip olmaması vasıtasıyla Disse aralığı boyunca hepatositlerle giren kan arasındaki alış verişi ve immünolojik savunma mekanizmalarını kolaylaştırır. Sinüzoidal hücreler, lobüler parankimanın %6'sını (%2,5 endotelial, %2 kupffer ve %1,4 stellat hücreleri) ve karaciğerin plazma membranının %26,5' ini temsil eder. Endotelial hücreler, sinüzoidlerin bariyerini oluştururlar (22). Ana karakterleri; geniş

bir alanı kapsayan çok ince bir oluşum (karaciğerin tüm plazma membranının %15'i) ve grup halinde kümelenip daha küçük moleküllerin geçişine izin veren ortalama 100 nm çaplı gözeneklere sahiptirler (19).

Kupffer hücreleri, sinüzoidal lümen içerisinde yer alır ve endotelial duvarın geniş bir alanını kaplar (23). Bu hücreler, lateks partikülleri gibi çoğu maddeyi, denatüre albuminleri, bakteri ve immün kompleksleri fagositoya uğratar (19).

Hepatik stellat hücreleri aynı zamanda perisinüzoidal ya da Ito hücreleri olarak da bilinirler (24). Bunlar sıklıkla interhepatositik girintide yer alarak lipit ve vitamin A içerirler. Endotelial hücreleri çevreleyen uzun ve ince bir sitoplazmik yapıdadır (21). Hepatik stellat hücrelerini çevreleyen taban membran bulunmaz. Bu hücreler vitamin A depolar, mikrovasküler tonüsün düzenlenmesine ve ekstrasellüler matriksin sentezine katılırlar (19).

### **2.3. Karaciğerin Biyokimyasal Fonksiyonları**

Karaciğer çeşitli sentez, salgı ve metabolik fonksiyonları kapsayan çok fonksiyonlu bir organdır. Amino asitleri, karbonhidratları, lipitleri, vitaminleri ve mineralleri alır, işler ve depolar.

#### **2.3.1. Karaciğerin Sentez Fonksiyonu**

Karaciğer protein, trigliserit, yağ asidi, kolesterol ve safra asidi sentezlerinin de dahil olduğu çok geniş sentez fonksiyonlarına sahiptir. Glukoz, aminoasitler, serbest yağ asitleri, diğer besinler ve öncüllerinin çift yönlü akışı hepatosit membranından gerçekleşir. Normal kan glukoz konsantrasyonu kısa süreli açlık sırasında hepatik glikojen yıkımıyla, uzamış açlık sırasında ise hepatik glukoz sentezi ile (glukoneogenez) korunmaktadır. Glukoneogenezde karbon atomları için primer kaynaklar kas proteinlerinden gelen aminoasitlerdir. Metabolik süreçlerden oluşan başlıca enerji kaynağı olan adenzin trifosfat (ATP), yağ asidi oksidasyonu ve glukozun hepatik metabolizması sonucu oluşmaktadır.

#### **2.3.2. Karaciğerin Ekskretuar Fonksiyonu**

Endojen ve eksojen orijinli organik anyonlar sinüzoidal kandan uzaklaştırılarak, biyotransformasyona uğrarlar ve safra ya da idrarla atılırlar. Salgılatıcı işlevin değerlendirilmesi klinik açıdan değerli bilgiler sağlamaktadır. En sık kullanılan testler, bilirubin ve safra asitleri gibi endojen olarak oluşan bileşiklerin

ölçümü ve indosiyenin yeşili veya amino-pirin gibi ekzojen bileşiklerin klirenslerinin saptanmasıdır.

Bilirubin yaşlanan eritrositlerden türeyen sarı pigmenttir. Karaciğerden uzaklaştırılıp biyotransforme edildikten sonra safra ve idrarla atılır. Karaciğerin başlıca fonksiyonlarından biri de safra asidi metabolizmasının düzenlemesidir. Kolesterol dengesi, büyük ölçüde kolesterolün safra asitlerine dönüşümü ve bunun sonucunda da safra asidi metabolizmasının düzenlenmesi ile sağlanmaktadır. Safra asitleri hem kolesterolün hepatik atılımını hem de lipitlerin intestinal absorpsiyonu için çözünürlüğünü kolaylaştıran yüzey aktif temizleyici molekülleri sağlarlar. Karaciğerde kolesterol safra asitlerine dönüştürülüp safraya salınır. Böylece ateroskleroz riski oluşturacak şekilde kolesterol birikimi önlenmiş olur.

Kolesterol metabolizmasının ürünleri hepatik kökenlerinden dolayı primer safra asitleri olarak adlandırılan kolik asit ve kenodeoksikolik asittir. Primer safra asitleri safra kanalına salınmadan önce glisin veya taurin ile kendi yapısında bulunan karboksilik asit karbonundan konjuge edilirler. Bunun sonucunda polariteleri ile suda çözünürlükleri artar. Bu konjugasyon mekanizması yolu ile dört adet primer safra asidi oluşur. Bunlar; koliltaurin, kolilglisin, kenodeoksikoliltaurin ve kenodeoksikolilglisin'dir. Ankonjuge (serbest) safra asitleri safrada bulunmazlar.

İnce barsak ve kolondan geçiş sırasında safra asidi bakteriyel flora tarafından üretilen enzimler ile çeşitli değişimlere maruz kalarak sekonder safra asitleri deoksikolik asit ve litokolik asit oluşur. Sekonder safra asitleri de karaciğerde glisin veya taurin ile konjuge edilirler ve safranın bileşenleri olarak primer safra asitlerine katılırlar.

Vücut, enterohepatik dolaşım olarak bilinen dolaşım sistemi ile safra asidi havuzunu oluşturur. Enterohepatik dolaşımın anatomik bileşenleri karaciğer, biliyer sistem, terminal ileum ve portal venöz dolaşımdır (25).

### **2.3.3. Karaciğerin Metabolik Fonksiyonu**

Karaciğer karbonhidrat, lipit ve protein metabolizmalarının düzenlenmesinde çok önemli rol oynamaktadır. Ayrıca ksenobiyotikler de karaciğer tarafından metabolize edilen ve temizlenen yabancı maddelerdir. Birçok ksenobiyotik lipofiliktir ve klirens için karaciğer tarafından hidrofilik maddelere biyotransformasyonları gerekmektedir. Sentetik boyalar gibi hidrofilik olan diğer

ksenobiyotikler ya direkt olarak konjüge edilirler ya da atılırlar. Uygulamada, böyle boyaların atılımı ölçülür ve karaciğer fonksiyonunu göstermesi açısından kullanılır (25,26).

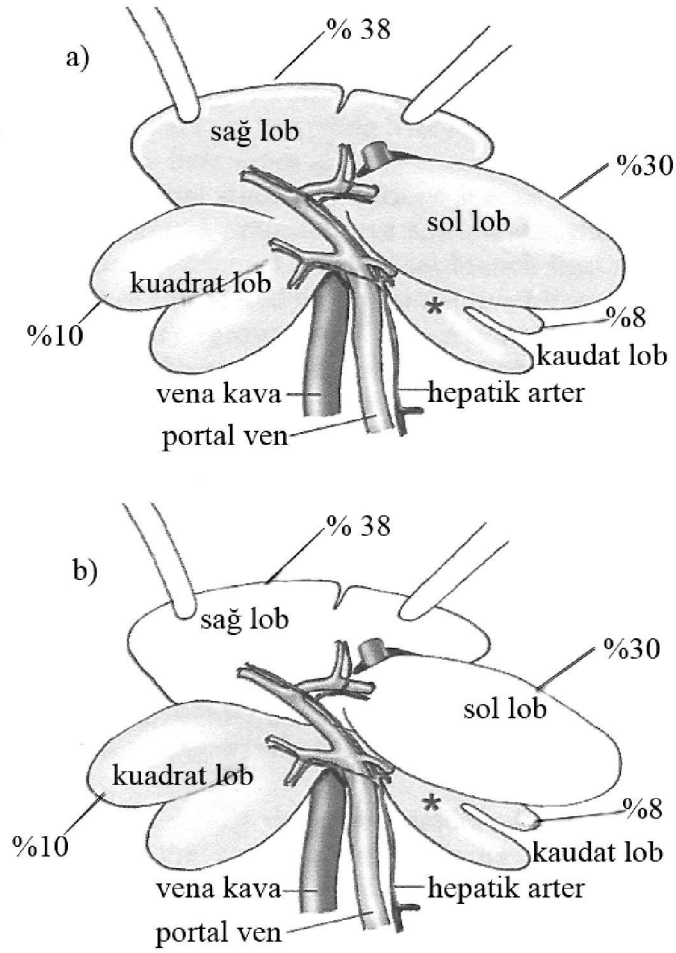
Karaciğerin diğer önemli bir fonksiyonu da ilaçların metabolizması (aktivasyon ve detoksifikasyon) ile amonyak ve galaktoz gibi endojen ve ekzojen maddelerin düzenlenmesidir. Bununla birlikte, spesifik ve kalıtsal enzim eksikliklerinden kaynaklanan metabolik bozukluklar karaciğeri etkilemektedir. Klasik bir örneği galaktozemidir. Bu durumda galaktoz-1-fosfat üridiltransferaz enziminin konjenital eksikliği karaciğer, beyin ve böbreklerde hasara neden olan galaktoz-1-fosfat toksik metabolitinin birikmesine yol açmaktadır.

#### **2.4. Karaciğer Rezeksiyonu**

Sıçanlar ve fareler, karaciğer cerrahi araştırmalarında en yaygın kullanılan deneysel modellerdir. Kemirgenlerde genellikle hepatik rezeksiyon; karaciğer rejenerasyonu, akut karaciğer yetmezliği, hepatik metastaz, hepatik fonksiyon, transplantasyon ve hasara karşı metabolik cevabı araştırmak için yapılır. Kemirgenlerde karaciğer rezeksiyonu, minimal düzeyde operatif mortalite ile çok iyi tolere edilebilir.

Bazı sınırlamalara rağmen PH'nın kemirgen modellerinin kullanımı, karaciğer araştırmalarında çok önemli olguları çalışmak için gerekli bir vasıtaadır (4). Sıçanlarda 2/3 hepatektomi modeli, ilk kez uzun yıllar önce Higgins ve Anderson tarafından tariflendi ve geniş bir uygulama alanı buldu (27,28).





**Şekil 2.4:** Karaciğer rejenerasyonunun cerrahi modelleri (28). a) Sıçan karaciğeri anatomisi, b) 2/3 PH, \*=kaudat lob, gri alan= geriye kalan karaciğer fonksiyonel kütlesi, beyaz alan=non-fonksiyonel karaciğer kütlesi.

Sıçanlarda karaciğer kütlesi, vücut ağırlığının %4'ünü meydana getirir. Karaciğer sabit oranlardan meydana gelmiştir. Ayrıca segmental portal ven, hepatik arter, safra kanalının geçtiği uzun bir vasküler aralığa sahiptir. Sağ lob karaciğer kütlesinin %38'ini, sol lob %30'unu, kaudat lob %8'ini ve kuadrat lob ise %10'unu oluşturur (28,29). İnsanlarda olduğu gibi sıçanlarda ve farelerde de karaciğer damar ve safra sistemi büyük bir anatomik değişiklik gösterir. Ayrıca kemirgenlerin

karaciğer anatomisi ve insan karaciğeri ile ilişkisi tam olarak anlaşılammıştır (4,30,31).

Medyan laparotomi yaptıktan sonra ilk adımda sağ ve sol lobların ligamentleri bölünerek karaciğer mobilize edilir. Vasküler aralığın uzun olmasından dolayı karaciğerin sağ ve sol lobları beraber rezekte edilebilir. Her iki lob yukarı doğru hareket ettirilip sonra her birinin vasküler aralığı gevşek bir biçimde bağlanır. Her iki lobun bağlarını sıkmadan önce herhangi bir hemodinamik komplikasyondan kaçınmak için asıl anatomik pozisyonlarına getirilir. Ancak bağı sıktıktan sonra vasküler aralıkla beraber karaciğerde sağ ve sol lobların hepatik ven akışları da kesilmiş olur. Dolayısıyla her iki lobda solar. Renk değişimi, iskeminin meydana geldiğini ve lobların rezekte edilebileceğini gösterir.

Geri kalan iskemik karaciğer dokusunu olabildiğince doğal konumunda bırakmak mediatör salınımı için önemlidir. Aksi takdirde karaciğer rejenerasyonu etkilenebilir. Diğer taraftan ligasyon, sağ ve sol lobların hepatik venlerini kapatacak kadar sıkı olmamalıdır. Bu durum inferior vena kavanın lümenini daraltabilir. Loblar, rezekte edildikten sonra karın ılık, tuzlu solüsyon ile yıkanır ve iki katmanda kapatılır.

Sıçanlarda 2/3 hepatektomi ile karaciğer rejenerasyonunu indüklemenin avantajları, sıçan anatomisi ile tutarlı ve düzenli olmasıdır. Bu durum, operatöre değişik oranlarda rezeksiyon için yüksek ölçüde doğruluk (örneğin; 2/3 rezeksiyon sonrası karaciğer kaybı her zaman yaklaşık olarak %68'tir) ve tekrarlanabilirlik sağlar. Karaciğer rezeksiyonu, basit bir operasyon olup basit cerrahi deneyimler dışında bir şey gerektirmez. 2/3 hepatektomi, ustaca gerçekleştirilirse sıçanlarda perioperatif mortalite olmaksızın iyi tolere edilir. Rezekte edilen karaciğer dokusu oranının modifikasyonu, karaciğerin rejeneratif tepkisini değiştirir. Rezeksiyon oranının, karaciğerin 2/3 rezeksiyonundan az veya çok olması daha yavaş rejenerasyona yol açar. %90 gibi büyük miktarlarda rezeksiyondan sonra ensefalopati veya koagülopati gibi akut karaciğer yetmezliğinin komplikasyonları meydana gelebilir ve mortalite oranı yükselir (28,29,32). %85'ten büyük veya %30'dan küçük rezeksiyonlar, yavaş hücre proliferasyonuna ile sonuçlanır (3,4).

Değişik türlerde karaciğer rejenerasyonunun kinetiği aynı olmadığından kemirgen modellerden elde edilen sonuçlar tam olarak insanlara uygulanamaz.

Rezeksiyon sonrası kalan karaciğer dokusunun miktarı, kemirgenlerde hayatta uyumluluğu insanlardakine göre daha az olduğu görülmüştür. İnsanların tolere edebileceği maksimum karaciğer miktarı, orjinal hacmin %70-80'i kadardır (4,33). Kemirgenler ise %90-95 hepatektomi sonrası yaşamını sürdürebilir (4,34).

### **2.5. Karaciğer Rejenerasyonu**

Hem kemirgenlerde hem de insanlarda PH sonrası karaciğer rejenerasyonu olarak bilinen işlem rezekte hepatik lobları rejenere etmez. Bu, kayıp fonksiyonel kütleyi tekrar yerine koymak amacıyla hücre proliferasyonunun bir sonucu olarak kalan lobların boyutunda artış şeklinde olan telafi edici hiperplazik bir işlemdir (5,35). Karaciğer rejenerasyonunun başlama mekanizması sıçanlar, fareler ve insanlarda benzer olmasına rağmen işlemin süresi yönünden türler arasında farklılık gösterir (5,36).

Sıçanlarda %70 hepatektomi sonrası kalan karaciğerin ağırlığı 24. ve 72. saatlerde sırasıyla orijinal karaciğer ağırlığının %45'i ve %70'i kadardır. 7. ve 14. günler arasında karaciğer volümü, kalan lobların hiperplazisi ile orijinal volümün %93'ü ve 20. günde ise tamamı iyileşir (4,27).

İnsanlarda da rejenerasyon işlemi hızla meydana gelir. Karaciğer kütlesi, sağ lob transplantasyonundan sonra donör karaciğerinde 7 günde ve alıcıda ise 14 günde iki katına çıkar. Donör ve alıcı karaciğerleri, ameliyattan sonra 60 günde orijinal ağırlıklarına ulaşır (4,37). Bununla birlikte, rejenerasyon parankimal ağırlığının düzelmesi ve yeniden şekillenme işlemi sürer. Karaciğer rejenerasyon hızı, rezekte hepatik dokunun miktarı ile orantılıdır (4).

Yetişkin karaciğerinde büyüme, oval hücreler olarak bilinen progenitör (stem) hücreler ve hepatositlerin oluşturduğu iki dizi hücre sistemine bağlıdır (5,38). Normalde durgun olan hepatositler, şaşırtıcı şekilde yüksek bir proliferatif kapasiteye sahiptir. Bu durum, farelerde hepatositlerin seri transplantasyonu ile en iyi şekilde gösterilmiştir. Aynı zamanda bu hücreler, replikasyonun 70 turundan daha fazlasını yapabilmektedir (5,39). İşlevsel olarak Kupffer hücreleri, endotelial hücreleri ve muhtemelen stellat hücreleri normal hepatosit proliferasyonu için gereklidir. Bu hücreler, hepatosit replikasyonu için gerekli hemen hemen tüm büyüme faktörleri ve sitokinleri sağlar (5). Normal karaciğerde çok az hepatosit replike olur. Standart bir PH (karaciğerin yaklaşık olarak %70'i çıkarılınca) sonrası kemirgen karaciğerinde

rejenerasyon süresinde genç hayvanların karaciğerinde hepatositlerin hemen hemen %95'i bölünür. Bu oran, karaciğer kütlelerinin yenilenmesi gençlere göre önemli ölçüde yavaş olan yaşlı hayvanlarda, %70'e kadar düşer. Karaciğer rejenerasyonu süresince replike olan hepatositlerin oranı ile ilişkisiz olarak replikasyon, PH'dan birkaç saat sonrasına kadar başlamaz (sıçanlarda 12 saat ve farelerde ise 32 saat). Hepatositlerin durgun statüleri, hücrelerin döngüde olmadıklarını gösteren  $G_0$  olarak bilinen statüdür. PH'dan sonra hücre döngüsüne girerler ( $G_1$  faz), deoksiribonükleik asit (DNA) replikasyonu ile devam eder (S faz) ve daha sonra mitoz'a uğrar (M faz). PH sonrası hepatosit replikasyonunun tepe noktası ve başlama zamanındaki farklılıklar (sıçanlarda 24 saat ve farelerde 42 saat), türler arasındaki  $G_1$  fazının süresindeki değişkenliği gösterir (5,40). İnsan köküllü hepatositlerden elde edilen verilere göre replikasyon zamanlaması, sıçan ve fare hepatositlerinde gözlemlenen ile aynı hızda olduğunu göstermiştir. Fakat insan parsiyel karaciğer transplantasyonları veya hepatik rezeksiyon sonrasında insan hepatositlerinin replikasyon zamanlaması hakkında bilgi bulunmamaktadır. Aynı zamanda yaşlanma ile insan hepatositlerinin replikasyon kapasitesinin hangi ölçüde azalacağı bilinmemektedir.

Hepatositler,  $CCl_4$  gibi kimyasalların sebep olduğu akut hasardan sonra oluşan karaciğer rejenerasyonuna da katılan hücrelerdir (41). Kemirgenlerde  $CCl_4$  tarafından indüklenen karaciğer hasarını, stem hücrelerinin katılımı olmaksızın karaciğerin rejenerasyonunun tamamlanması ve hepatosit replikasyonu takip eder (5,42).

Karaciğer rejenerasyonunda birçok büyüme faktörü ve sitokinler rol alır. Bu faktörler şunlardır:

### **2.5.1. Hepatosit Büyüme Faktörü (HGF)**

HGF, büyük oranda karaciğer matriksinde olmak üzere akciğer, dalak, plasenta ve beyin gibi organların matrikslerinde de bulunur (43,44). PH'lı sıçanların plazmalarından izole edilen HGF, çalışmalarda PH sonrasında artan sirküle mitojenler için araştırılır (44,45). Karaciğer rejenerasyonunda HGF;

1. Plazmada HGF seviyesi, PH sonrası 10-20 kat artar (46).
2. Aktif HGF, PH sonrası ilk 3 saat içerisinde intrahepatik stoklar tarafından tüketilir. Daha sonra 3. ve 48. saatler arasında yeni HGF sentezi yapılır (47).

3. HGF, kültürde hepatositlerin klonal büyümesine ve güçlü bir mitojenik cevaba neden olur (48).

4. Normal sıçanların ve farelerin portal veninden HGF enjeksiyonu, karaciğerin büyümesine ve hepatositlerin proliferasyonuna neden olur (49).

Karaciğerde HGF, ağırlıklı olarak stellat hücreleri tarafından üretilmekle (50) beraber hepatic endotelial hücreleri tarafından da kısmen üretilir (51).

### **2.5.2. Epidermal Büyüme Faktörü (EGF)**

EGF, duodenumun Brunner bezlerinden üretilerek portal ven yoluyla karaciğere sürekli verilir. Erkek farelerde, tükürük bezleri tarafından üretilen EGF büyük ölçüde sirküle olur (52). Epinefrinin ve norepinefrinin dahil olduğu katolaminler, duodenumun Brunner bezlerinden EGF'nin üretimini stimüle ettiği bilinir. Ayrıca bu katekolaminler, PH sonrası plazmada artış gösterirler (53). Sağlam hayvanlara verilen EGF, hepatosit proliferasyonuna neden olur (44,54).

### **2.5.3. Tümör Nekroz Faktörü (TNF)**

TNF, birçok hücre ve doku üzerine çeşitli etkileri olan bir protein olarak bilinir. Hücreler üzerine promitojenik etkiler yapabilir (55). TNF, hepatositler için direkt bir mitojen değildir. Ayrıca, ne serum serbest ortamında hepatositlerin primer kültüründe DNA sentezini indükler ne de tüm hayvanlara enjeksiyonunda hepatosit DNA sentezini indükler. Fakat hem *in vivo* hem de hücre kültüründe HGF gibi direkt mitojenlerin mitojenik etkilerini artırır (56). TNF, PH sonrası plazmada artar. Hücresel kaynağının hepatic makrofajlar (Kupffer hücreleri) olduğu düşünülmekte ve diğer hücre tipleri tarafından üretimi kabul edilmemektedir. PH sonrası TNF'yi indükleyen stimülüs, bağırsaklardan bakteriler tarafından üretilen bir endotoksin olabilir (44).

### **2.5.4. Transforme Edici Büyüme Faktörü Alfa (TGF- $\alpha$ )**

TGF- $\alpha$ , PH'dan 2-3 saat sonra başlayıp 48 saatten daha uzun bir süre yüksek seviyede kalarak rejenerasyon süresince hepatositler tarafından üretilir (57). Aynı zamanda endotelial hücreler ve safra kanalı epitelyal hücreleri için bir mitojendir. Hepatositler tarafından üretilen TGF- $\alpha$ , hepatositlerin stimüle ettiği parakrin etkileri tetikleyebilir ve proliferasyonda bitişik hepatic hücreleri birbirine tutturabilir (58).

### **2.5.5. Interlökin 6 (IL-6)**

IL-6, hepatik makrofajlar tarafından üretilir (59). Ayrıca, hepatositler için direkt mitojen değildir ve diğer büyüme faktörlerinin mitojenik etkilerini arttırmaz. Fakat safra hücreleri için direkt mitojendir (60). IL-6, kolanjiositler vasıtasıyla prolinden zengin küçük proteinlerin üretimini düzenleyerek intrahepatik safra bütünlüğü üzerine önemli etkileri vardır (61). PH sonrasında plazmada artış gösterir. IL-6, muhtemelen karaciğer rejenerasyonunun erken evrelerinin optimize işlemleri için katkıda bulunan bir faktördür. Fakat işlemlerin başlatıcısı olarak görülmemektedir (44).

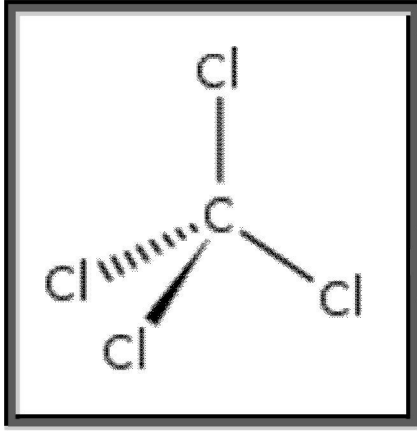
### **2.5.6. Norepinefrin**

Norepinefrin, santral ve periferel otonom sinir sisteminde bir nörotransmitterdir. Epinefrin ve norepinefrin, periferel sirkülasyonda sinir uçlarından ve adrenal medulladan salınırlar. Norepinefrin, hepatosit kültüründe EGF'nin ve HGF'nin mitojenik etkilerini önemli ölçüde artırır (62). Ayrıca PH sonrası plazmada hızlıca yükselir ve EGF üretimi üzerine etkili olabilir (63).

### **2.5.7. İnsülin**

Karaciğer, portal ven aracılığıyla insülini dağıttığı için endokrin pankreası tarafından üretilen tüm insülinin ilk alıcısıdır (64). Kültürdeki hepatositler, insülin yokluğunda mitojene cevapta düşüş gösterir (62). İnsülin, genellikle hepatosit fonksiyonların önemli bir düzenleyicisidir. Aynı zamanda, karaciğer rejenerasyonu süresince homeostatik fonksiyonları sağlamak için hepatositlerin uğradığı metabolik adaptasyona katılır. Fakat insülin, hepatositler için direkt mitojen değildir (44).

## 2.6. Karbontetraklorür (CCl<sub>4</sub>)



**Şekil 2.5:** Karbontetraklorür (65). (www.en.wikipedia.org'dan adapte edilmiştir.)

CCl<sub>4</sub>, tetraklor metan ve karbon tetraklorür gibi birçok şekilde isimlendirilen organik bir bileşiktir. Düşük seviyelerde tespit edilebilen tatlı kokulu ve renksiz bir sıvıdır. CCl<sub>4</sub> ilk olarak 1839 yılında klor ile kloroform reaksiyonu sonucu Fransız kimyager Henri Victor Regnault tarafından sentez edilmiştir. Fakat günümüzde esas olarak metandan sentezlenir. CCl<sub>4</sub>, ozon tabakasına zarar veren bir sera gazıdır (65). Aynı zamanda, hem insanlarda hem de çeşitli deney hayvanlarında hepatotoksisite oluşturan bir ksenobiyotiktir (7,66). CCl<sub>4</sub>; kimyasal çözücü, temizlik ajanı, yangın söndürücü ve tahıl dezenfektanı olarak geçmiş yıllarda çokca kullanılmış bir kimyasal maddedir. Ayrıca kloroflorokarbonların sentezinde ara madde olarak sanayide de kullanılmaktadır.

Zehirlenmeler maddenin inhalasyon yoluyla veya ağızdan alınmasıyla oluşur. CCl<sub>4</sub> deriden de emilebilmektedir. CCl<sub>4</sub> ile akut zehirlenmelerde karaciğer, böbrek, beyin, akciğer, adrenal bezler ve miyokard gibi pek çok organda değişiklikler meydana gelmektedir. İlk bulgular, merkezi sinir sistemine aittir. Konfüzyon, sersemlik hissi, baş ağrısı, görme bozuklukları, hızla koma ve ölüm görülebilir. Bu değişiklikler muhtemelen maddenin anestetik özelliklerine bağlıdır. Akut zehirlenmede ölümlerin çoğu böbrek yetmezliğinden olmaktadır. Oligüri genellikle CCl<sub>4</sub> ile karşılaşmadan 3 gün sonra gelişir ve 1-15 gün devam edebilir. Akciğerde çoğunlukla böbrek yetmezliğinin sonucu olan nonspesifik değişiklikler meydana

gelir. Üremi ve karaciğer yetmezliğinden dolayı kanama görülebilir. Madde, kapillerlerde doğrudan da hasar yapabilir (67).

$CCl_4$ , genellikle deneysel olarak indüklenmiş karaciğer hasarı oluşturmak için kullanılan bir ajandır. Akut  $CCl_4$  uygulanması, karaciğer iltahabı, kronik uygulanması ise karaciğer sirozu (8) ve karaciğer kanserine neden olabilmektedir (67).  $CCl_4$  günümüzde hala yağların dejenerasyonu, fibrozis, hepatosellüler ölüm, kanser oluşumu gibi hepatotoksik etkilerin etki mekanizmasını aydınlatmada kullanılan önemli bir maddedir (8).

Ayrıca karaciğer yağlanması ve nekrozu olmak üzere birbirinden ayrı iki belirgin bozukluk yapmaktadır. Yağlanmayı yapan sebep diğer karaciğer yağlanması yapan ajanlarda olduğu gibi çoğunlukla trigliseridlerin karaciğerden transportunun engellenmesidir. Apolipoprotein sentezinin bozulması, trigliseridlerin apolipoproteinlere bağlanmasının bozulması, lipoproteinlerin hepatosit membranından transferindeki bozukluklar trigliseritlerin taşınmasını bozabilir. Bunun yanında  $CCl_4$  periferik adipoz dokudan yağ serbestleşmesini de artırmaktadır.

$CCl_4$ 'ün toksik tesiri birden fazla mekanizmayla izah edilmektedir (67).  $CCl_4$ , sitokrom CYP2E1, CYP2B1, CYP2B2 ve daha yüksek olasılıkla da CYP3A tarafından aktive edilip triklorometil radikali ( $CCl_3\cdot$ ) oluşturulur. Bu radikal nükleik asit, protein ve lipit yapılı hücrenel moleküllere bağlanabilir. Özellikle yağları dejenere ederek lipit metabolizması gibi önemli hücrenel süreçleri bozar. Aynı zamanda oksijenle reaksiyona girip son derece reaktif olan triklorometilperoksil ( $CCl_3OO\cdot$ ) radikalini oluşturabilir.  $CCl_3OO\cdot$ , poliansature yağ asitleri ile reaksiyona girerek lipit peroksidasyonu zincir reaksiyonunu başlatır. Bu durum mitokondri, endoplazmik retikulum ve plazma membranındaki lipitlerin bozulmasına neden olarak geçirgenliklerini etkiler. Sonuçta hücre içi kalsiyum sekestrasyonu (birikmesi) ve hücre homeostazisinin bozulmasıyla ciddi hücrenel hasara yol açar (8).

Beş ml kadar  $CCl_4$ 'ün alınması karaciğer hasarı yapmaya yetmektedir. Günümüzde  $CCl_4$  toksisitesi maddenin kullanımının azalması sonucunda çok seyrek görülmektedir.  $CCl_4$  toksisitesi için spesifik bir tedavi yoktur. Yüksek karbonhidrat sağlanmasının yanısıra böbrek yetmezliği ve ensefalopati yoksa protein verilmesi de gerekir. Bunun yanında böbrek yetmezliğine yönelik diyaliz de dahil gerekli önlemler alınmalıdır. Bunlar; kanama diyatezi için taze donmuş plazma verilmesi,



elektrolit ve sıvı dengesinin normal sınırlarda tutulması sayılabilir. Hipoksi, doku hasarının artmasına sebep olduğu için iyi bir ventilasyon şarttır.

CCl<sub>4</sub> zehirlenmesinden sonra mortalite %10-25 arasında değişmektedir. Çoğunlukla ölümler böbrek yetmezliğine bağlıdır ve intoksikasyonun ikinci haftasında görülür. Karaciğer hasarına bağlı ölümler ise ilk hafta içinde görülmektedir. Zehirlenmeden kurtarılan olgularda bir sekel kalmamaktadır. Çok nadir olarak karaciğer fibrozisi ve siroz tanımlanmıştır (67).

## **2.7. N-Asetilsistein**

### **2.7.1. Farmakodinamik Özellikleri**

N-Asetilsistein doğal bir aminoasit olan L-Sistein'in N-Asetillenmiş türevidir olup mukolitik olarak kullanılan ajandır. Yapısında bulunan -SH grubu ile glikoprotein içerisindeki disülfid bağlarını koparma özelliğinden dolayı mukoid ve mukopürülan sekresyonlar üzerine mukolitik etki göstermektedir. Solunum yollarında biriken balgam yoğunluğunu ve yapışkanlığını azaltır. Bu özelliği sayesinde balgamı su gibi akıcı kıvama getirir. Balgamın çözülmesine de yardımcı olur. Bronşiyal sekresyonların atılımına ve solunumu kolaylaştırarak akciğer fonksiyonlarının düzenlenmesine yardımcı olur. Mukolitik etkisinden başka asetaminofen zehirlenmesinde de tedavi edici bir ajan olarak kullanılır. Asetilsistein, asetaminofenin doz aşımına bağlı olarak oluşan hepatotoksisite üzerine etkisini karaciğer glutatyon seviyesini koruyarak veya arttırarak gösterir. Glutatyon, hepatotoksik olduğu bilinen asetaminofenin ara metabolitini inaktif etmek için gerekmektedir. Doz aşımı sonucu primer metabolik yolu (glukoronid ve sülfat konjugasyon) satüre olduğu için bu ara metabolit düzeyinde artış görülmektedir. Asetil sistein etkisini, bu ara metaboliti ana madde haline dönüştürerek veya metabolitin konjugasyonu için -SH vererek gösteriyor olabilir. Deneysel çalışmalar da asetilsistein ve -SH içeren diğer maddelerin kullanımının bu ara metabolitin inaktivasyonu üzerine direkt etkisini göstermektedir (68).

### **2.7.2. Farmakokinetik Özellikleri**

Asetilsistein, oral olarak uygulandıktan sonra hızlı bir şekilde absorbe edilir. İlk olarak akciğer, böbrek ve karaciğere geçer. Mide ve barsak sıvılarında stabildir. Akciğer ve plazmada asetilsistein, serbest veya disülfid köprüleri yardımıyla proteinlere geri dönüşümlü olarak bağlanmış halde bulunur. İlacın alınımından 4 saat

sonra dağılım oranı 0.33-0.47 l/kg arasında değişir ve proteinlere %50 oranında bağlanır. Aç veya tok karna uygulanmasında bir farklılık yoktur. Uygulamadan 30-60 dakika sonra plazma konsantrasyonu tepe noktasına ulaşır. Genellikle vücutta birikmemekle beraber akciğer dokusunda yüksek konsantrasyonda bulunabilir. Karaciğerde metabolize olur. Böbrek, karaciğer ve akciğer yolu ile vücuttan atılmaktadır. %70 atılımı böbrek dışı olup böbrek klirensi 0.190-0.211 l/h/kg olarak belirtilmiştir.

### **2.7.3. Endikasyonları**

Alt solunum yollarında soğuk algınlığı ve üşütme sonucu oluşan balgamların atılmasında, ekspektorasyonun kolaylaştırılması gereken durumlarda, bronkopulmoner hastalıklarda ve bronşiyal sekresyon bozukluklarının tedavisinde endikedir (69). Bunun yanı sıra; N-asetilsistein sülfür tabanlı bir amino asit olup, bağışıklık sistemi için çok önemli bir antioksidan olan glutatyonun oluşumunda yer alır. Ayrıca sistein; tırnaklarda, deride ve saçlarda bulunan ana protein beta-keratinde yer alır. Kollagen üretiminde de bulunur, cildin elastikiyetini sağlar. N-asetilsistein; kanser, ağır metal zehirlenmesi, sigara kaynaklı öksürük, bronşit, kalp hastalığı, kistik fibrozis, asetaminofen zehirlenmesi, septik şokun önlenmesi ve tedavisinde etkili olabilir.

Antioksidan etkisi sporun faydasını artırabilir. T4 lenfositlerinin üretimini uyardığından N-asetilsistein takviyesi Kazanılmış İmmün Yetmezlik Sendromu (Acquired Immuno Deficiency Syndrome/AIDS) tedavisinde de denenmektedir. Asetilsisteinin bağışıklık sistemini kuvvetlendirici etkisi, gribe karşı koruma sağlayabilir. Asetilsistein takviyesi grip virüslerine karşı en dayanıksız grup olan yaşlılar ve kronik rahatsızlıkları olanlar için faydalı olabilir. Bazı çalışmalarda da asetilsisteinin akciğerleri sigaranın kanserojen etkilerinden, karaciğeri alkolün toksik etkilerinden koruyabileceği ve kanser ilaçlarının yan etkilerini azaltabileceği gösterilmektedir. Asetilsistein, arsenik ve cıva zehirlenmelerine karşı da kullanılmaktadır.

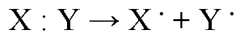
Asetilsisteinin, günlük tavsiye edilen kullanım dozu yoktur. Vücut tarafından üretilmektedir. Et, yumurta gibi yüksek protein içeren hayvansal gıdalar, buğday, brokoli, sarmısak, soğan ve kırmızı biber asetilsistein bakımından zengindir (70).

## 2.8. Serbest Radikaller

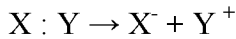
Serbest radikaller, dış orbitalinde paylaşılmamış bir elektron taşıyan bileşiklerdir. Ömürleri çok kısa olan ve kararsız bir yapı gösteren bu tanecikler, etrafındaki moleküllerle etkileşime girerek elektron almaya çalışır ve bir an önce kararlı hale ulaşmak ister. Serbest radikaller organizmada metabolik olaylar sırasında oluştukları gibi, radyasyon, ilaçlar ve zararlı kimyasal maddeler gibi çeşitli dış etkenler nedeniyle de oluşur. Bu radikallerin çok önemli bir bölümü oksijen ve azot kaynaklıdır. Organizmada ayrıca karbon ve kükürt merkezli radikaller de oluşur (71).

Bir serbest radikal 3 yolla ortaya çıkabilir (72,73).

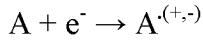
1. Kovalent bağ taşıyan normal bir molekülün homolitik yıkımı sonucu oluşurlar (Bölünme sonrası her bir parçada ortak elektronlardan biri kalır).



2. Normal bir molekülden tek bir elektronun kaybı ya da bir molekülün heterolitik olarak bölünmesi ile oluşurlar. Heterolitik bölünmede kovalent bağı oluşturan her iki elektron, atomlardan birisinde kalır.



3. Normal bir moleküle tek bir elektronun eklenmesi ile oluşurlar.



Serbest radikaller, pozitif yüklü, negatif yüklü ya da nötral olabilirler. Biyolojik sistemlerde en fazla elektron transferi ile oluşurlar (73).

Serbest radikaller; hücrelerin lipid, protein, DNA, karbohidrat gibi tüm önemli bileşiklerine etki ederler ve yapılarının bozulmasına neden olurlar. Biyolojik sistemlerdeki serbest oksijen radikalleri (SOR), süperoksit anyonu ( $2O_2^-$ ), hidroksil radikali ( $HO^\cdot$ ), nitrik oksit ( $NO^\cdot$ ), peroksil radikali ( $ROO^\cdot$ ) ve radikal olmayan hidrojen peroksit ( $H_2O_2$ ) gibi serbest radikaller oksidatif stresin en önemli nedenlerini oluştururlar (74).

## 2.9. Oksidatif Stres

Organizmada serbest radikallerin oluşum hızı ile bunların ortadan kaldırılma hızı bir denge içerisinde ve bu durum oksidatif denge olarak adlandırılır. Oksidatif denge sağlandığı sürece organizma, serbest radikallerden etkilenmemektedir. Bu radikallerin oluşum hızında artma ya da ortadan kaldırılma hızında düşme oksidatif dengenin bozulmasına neden olur. Oksidatif stres; serbest radikal oluşumu ile

antioksidan savunma mekanizması arasındaki dengesizliği göstermekte olup doku hasarına yol açmaktadır (75).

## **2.10. Oksidatif Stres Parametreleri**

### **2.10.1. Malondialdehid (MDA)**

Lipid peroksidasyonu; membranda bulunan fosfolipid, glikolipid, gliserid ve sterol yapısında yer alan poliansatüre yağ asitlerinin SOR tarafından peroksitler, alkoller, aldehidler, hidroksi yağ asitleri, etan ve pentan gibi çeşitli ürünlere yıkılması reaksiyonudur. Lipid hidroperoksitlerinin yıkımı ile oluşan ve biyolojik olarak aktif olan aldehidler ya hücre düzeyinde metabolize edilirler veya başlangıçtaki etki alanlarından diffüze olup hücrenin diğer bölümlerine hasarı yayarlar (76,77). Üç veya daha fazla çift bağa sahip yağ asitlerinin peroksidasyonu sonucu MDA oluşmaktadır. Bu da tiyobarbütirik asit reaktif maddeleri olarak ölçülmektedir. MDA lipid peroksidasyonunun şiddetiyle orantılı olarak artar. Ancak spesifik değildir. Aynı zamanda membran bileşenlerinin polimerizasyonuna ve çapraz bağlanmasına neden olabilir (78,79).

### **2.10.2. Protein Karbonil (PC)**

Proteinlerin, SOR veya oksidatif stresin sekonder ürünleri ile reaksiyonu, karbonil gruplarına sahip peptit fragmanların veya protein türevlerinin oluşumunu sağlar. Karbonil gruplarının oluşumu birkaç mekanizma ile gerçekleşebilmektedir.

1. Proteinlerin, SOR tarafından okside edilmesi aracılığıyla peptit bağlarının yıkılması sonucu karbonil grupları ortaya çıkabilir.
2. Metal kataliz aracılı oksidasyon sistemleri ile bazı proteinlerin amino asit rezidülerinin yan zincirlerinin oksidasyonu sonucu da karbonil grupları ortaya çıkabilmektedir (80,81).
3. İndirgeyici şekerler veya onların oksidasyon ürünleri ile proteinlerin lizin rezidülerinin primer amino gruplarının sekonder reaksiyonları sonucu karbonil grupları oluşabilir (81,82).

Proteinlerin oksidasyonu aromatik amino asit bakiyelerinin nitratlaşmasına, tiyol gruplarının oksidasyonuna, ileri oksidasyon protein ürünlerinin oluşmasına ve bazı amino asit bakiyelerinin karbonil türevlerine dönüşümüne yol açar (83).

## 2.11. Antioksidanlar

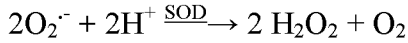
Antioksidan moleküller endojen ve eksojen kaynaklı yapılar olup, oluşan oksidan moleküllerin neden olduğu hasarı hem hücre içi hem de hücre dışı savunma ile etkisiz hale getirirler. Hücre içi serbest radikal toplayıcı enzimler asıl antioksidan savunmayı sağlamaktadır. Bu enzimler süperoksit dismutaz (SOD), glutatyon-S-transferaz, glutatyon peroksidaz, glutatyon redüktaz, katalaz ve sitokrom oksidazdır. Bakır, çinko ve selenyum gibi eser elementler ise bu enzimlerin fonksiyonları için gereklidir (73,84).

### 2.11.1. Süperoksit Dismutaz (SOD)

Mc Cord ve Fridovich tarafından 1968'de keşfedilmiştir. 3 tür SOD vardır. Birincisi mitokondride lokalize Mn-SOD, ikincisi sitozolde lokalize Cu-Zn SOD ve üçüncüsü de Cu içeren ve plazmadaki süperoksit radikallerini metabolize eden vasküler endotele bağlı Cu-SOD'dur (79,85).

SOD enzimi, süperoksit radikalini dismutasyona uğratarak  $H_2O_2$  ve moleküler oksijene dönüşümünü sağlar. Organizmada substrat olarak serbest radikal kullanan tek enzim SOD'dur (71).

Katalizlediği reaksiyon:

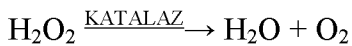


### 2.11.2. Katalaz

Sumer ve Dounce tarafından 1937'de kristalize halde saflaştırıldı. Her biri bir prostetik grup olan ve yapısında  $Fe^{+3}$  bulunduran 4 hem grubundan oluşmuş bir hemoproteindir (85).

Katalaz esas olarak peroksidazlarda bulunmakla beraber az miktarda sitozolde ve mikrozomal fraksiyonda bulunur (86). Hidrojen peroksiti  $H_2O$  ve  $O_2$ 'ye çevirir (87).

Katalizlediği reaksiyon:



### 2.11.3. Glutatyon Peroksidaz (GSH-Px)

Glutatyon peroksidaz (GSH-Px) sitozolde bulunup 4 selenyum atomu içerir ve tetramerik yapıdadır (86). Redükte glutatyonu yükseltirken  $H_2O_2$ 'i de suya çevirir. Böylece membran lipitlerini ve hemoglobini oksidan strese karşı korur (88).



GSH-Px'in fagositik hücrelerde de önemli fonksiyonları vardır. Diğer antioksidanlarla birlikte GSH-Px, solunum patlaması sırasında serbest radikal peroksidasyonu sonucu fagositik hücrelerin zarar görmesini önler. GSH-Px, eritrositlerde oksidatif strese karşı en etkili antioksidandır. Eritrosit GSH-Px aktivitesi yaşlılarda ve Down sendromlu hastalarda yüksek, prematürelere ise düşük bulunmuştur.

#### **2.11.4. Glutatyon (GSH)**

GSH, 1921 yılında Hopkins tarafından keşfedilmiştir. 1929 yılında kristal halde elde edildikten sonra yapısının tripeptit olduğu anlaşılmıştır. 1935 yılında ise Harrington ve Meacl tarafından  $\delta$ -L-glutamyl-L-cysteinyl-glycine halinde sentez edilmiştir (89).

GSH, karaciğerde genetik bilgiye ihtiyaç olmadan sentezlenebilen bir tripeptittir. Ayrıca GSH çok önemli bir antioksidan olup serbest radikaller ve peroksitlerle reaksiyona girerek hücreleri oksidatif hasara karşı korur. Hemoglobinin oksitlenerek methemoglobine dönüşümünün engellenmesinde rol alır. Aynı zamanda proteinlerdeki -SH gruplarını redükte halde tutar ve bu grupları oksidasyona karşı korur. Böylece fonksiyonel proteinlerin ve enzimlerin inaktivasyonunu engellemiş olur. GSH, yabancı bileşiklerin detoksifikasyonunu ve amino asitlerin membranlardan transportunu da sağlar (86).

### 3. GEREÇ VE YÖNTEM

#### 3.1. Deney Hayvanları ve Yaşam Alanları

Çalışmamızda, İnönü Üniversitesi Deney Hayvanları Üretim ve Araştırma Merkezinden temin edilen 67 adet 12 haftalık 200-250 gram ağırlığında Wistar albino tipi erkek sıçanlar kullanıldı. Çalışmaya deney hayvanları etik kurulu onayı alındıktan sonra başlandı. Sıçanlar deney gününe kadar standart barınma kafeslerinde tutuldu. İçme suları günlük değiştirildi ve gün aşırı kafes temizliği yapıldı. Çalışma süresince ortam şartları oda sıcaklığı 24-27 °C arasında tutulup, havalandırma şartları sağlandı, ışık döngüsü 12 saat aydınlık ve 12 saat karanlık olacak şekilde ayarlandı. Sıçanlar çalışma boyunca standart pellet yemle *ad libitum* beslendi. Bir kafeste en çok 4 sıçan olacak şekilde rastgele gruplara bölündü. Sıçanlar, PH yapılan ve PH yapılmayan olmak üzere iki ana gruba ayrıldı. Her iki ana grupta sırasıyla 1. Kontrol, 2. CCl<sub>4</sub>, 3. NAC+CCl<sub>4</sub>, 4. NAC grupları olmak üzere dört alt gruba ayrıldı. Ayrıca PH yapılan gruplara bir de sham kontrol grubu eklendi. Böylece tüm hayvanlar iki ana grup altında, toplam 9 alt gruba ayrıldı. PH uygulanan alt gruplarda denek sayısı 8, sham kontrol ve PH uygulanmayan alt gruplarda 7 olarak belirlendi. İlgili alt gruba 0,5 ml/kg CCl<sub>4</sub>, 50 mg/kg NAC intraperitoneal (i.p.) yoldan; kontrol grubuna ise serum fizyolojik aynı yoldan uygulandı. Bütün hayvanlara PH yapılmadan önce tekniğin oturtulması ve standardizasyonu için 3 hayvanda bir ön çalışma yapıldı. Deneyler boyunca standardizasyon sağlamak amacıyla tüm cerrahi işlemler aynı kişi tarafından yapıldı.

#### 3.2 Deney Gruplarının Oluşturulması

##### 3.2.1. PH Yapılan Gruplar

##### 3.2.1.1. PH'den Sonra Kontrol Grubu (N=8):

Bu gruptaki sıçanlara deneyin başlangıç gününde (0. Gün) %70 PH yapıldı. PH sonrasında 8. günde hayvanlara i.p. yoldan CCl<sub>4</sub> verilen gruplara yapılan uygulamalar ile eş zamanlı olarak CCl<sub>4</sub> yerine aynı hacimde serum fizyolojik verildi. Uygulamadan 24 saat sonra PH'nın 9. gününde kan ve rejenere karaciğer dokuları alındı.

**3.2.1.2. PH'den Sonra CCl<sub>4</sub> Grubu (N=8):**

Bu gruptaki sıçanlara %70 PH işlemini takip eden 8. günde i.p. yoldan tek doz 0,5 ml/kg CCl<sub>4</sub> yapıldı. Uygulamadan 24 saat sonra cerrahinin 9. gününde kan ve rejenere karaciğer dokuları alındı.

**3.2.1.3. PH'den Sonra NAC+CCl<sub>4</sub> Grubu (N=8):**

Bu gruptaki sıçanlara %70 PH işlemini takip eden 8. günde i.p. yoldan 0,5 ml/kg CCl<sub>4</sub>, 50 mg/kg NAC verildi. CCl<sub>4</sub> tek doz, NAC ise CCl<sub>4</sub> uygulamasından 3 saat önce ve sonrasında 1., 3., 6., 12. ve 18. saatlerde toplam 6 doz olarak uygulandı. CCl<sub>4</sub> uygulamasından 24 saat sonra cerrahinin 9. gününde kan ve rejenere karaciğer dokuları alındı.

**3.2.1.4. PH'den Sonra NAC Grubu (N=8):**

Bu gruptaki sıçanlara %70 PH işlemini takip eden 8. günde i.p. yoldan 50 mg/kg NAC verildi. NAC, CCl<sub>4</sub> uygulanan diğer gruplarla eş zamanlı olarak CCl<sub>4</sub> uygulamasından 3 saat önce ve sonrasında 1., 3., 6., 12. ve 18. saatlerde toplam 6 doz olarak uygulandı. Yine CCl<sub>4</sub> uygulanan gruplarla birlikte cerrahinin 9. gününde kan ve rejenere karaciğer dokuları alındı.

**3.2.1.5. Sham Kontrol Grubu (N=7):**

Bu gruptaki sıçanların birinci günde batınları orta hattan açılıp karaciğeri tutan ve PH sırasında kesilen bağlar kesilip, karaciğerin %70'lik kısmı ise çıkarılmadan, karaciğer bütünlüğü korunarak kapatıldı. Cerrahinin 9. gününde tekrar açılıp kan ve karaciğer dokuları alındı.

**3.2.2. PH Yapılmayan Gruplar****3.2.2.1. PH Yapılmayan Kontrol Grubu (N=7):**

Bu gruptaki sıçanlara dokuları alınmadan bir gün önce i.p. yoldan CCl<sub>4</sub> verilen gruplara yapılan uygulamalar ile eş zamanlı olarak CCl<sub>4</sub> yerine eşit hacimde serum fizyolojik verildi. Uygulamadan 24 saat sonra kan ve karaciğer dokuları alındı.

**3.2.2.2. PH Yapılmayan CCl<sub>4</sub> Grubu (N=7):**

Bu gruptaki sıçanlara dokuları alınmadan bir gün önce i.p. yoldan tek doz 0,5 ml/kg CCl<sub>4</sub> uygulandı. Uygulamadan 24 saat sonra kan ve karaciğer dokuları alındı.



### 3.2.2.3. PH Yapılmayan NAC+CCl<sub>4</sub> Grubu (N=7):

Bu gruptaki sıçanlara dokuları alınmadan bir gün önce i.p. yoldan 0,5 ml/kg CCl<sub>4</sub>, 50 mg/kg NAC verildi. CCl<sub>4</sub> tek doz, NAC ise CCl<sub>4</sub> uygulamasından 3 saat önce ve sonrasında 1., 3., 6., 12. ve 18. saatlerde toplam 6 doz olarak uygulandı. CCl<sub>4</sub> uygulamasından 24 saat sonra kan ve karaciğer dokuları alındı.

### 3.2.2.4. PH Yapılmayan NAC Grubu (N=7):

Bu gruptaki sıçanlara dokuları alınmadan bir gün önce i.p. yoldan CCl<sub>4</sub> uygulanan diğer gruplarla eş zamanlı olarak CCl<sub>4</sub> uygulamasından 3 saat önce ve sonrasında 1., 3., 6., 12. ve 18. saatlerde toplam 6 doz olarak 50 mg/kg NAC uygulandı. Yine CCl<sub>4</sub> uygulanan gruplarla eş zamanlı olarak 24. saatte kan ve karaciğer dokuları alındı.

### 3.3. NAC ve CCl<sub>4</sub> Uygulaması

NAC ve CCl<sub>4</sub> uygulaması 100 ünitelik (1 mililitrelik) insülin enjektörü ile yapıldı. Enjeksiyon karın alt kısmından cilt, ciltaltı ve karın kasları geçilerek peritonun içine yapıldı. Enfeksiyona karşı korumak amacıyla her enjeksiyon işlemi öncesi sıçanların karın altı kısımları antiseptik betadin solüsyonu ile silindi.

### 3.4. Cerrahi Girişimler ve PH Modelinin Oluşturulması

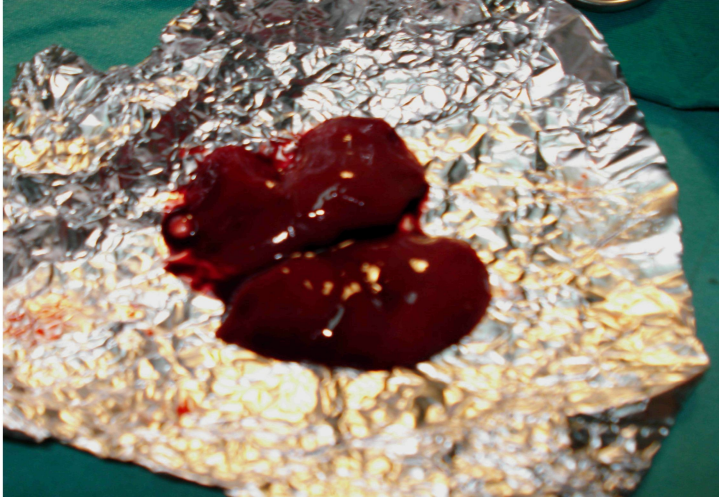
PH işleminin 6 saat önce uygulama yapılacak olan sıçanlar aç bırakıldı. Genel anestezi amacıyla 50 mg/kg dozunda ketamin ile 5 mg/kg dozunda xyalazine aynı enjektöre çekildi ve intraperitoneal olarak uygulandı. Anestezik maddeler uygulandıktan sonra sıçanların refleksleri kontrol edilerek cerrahi anesteziye girmeleri için beklendi, anestezi derinliğinin kontrolü için parmak kısırtma testi kullanıldı.

PH işlemi Higgins ve Anderson prosedürüne uygun olarak yapıldı. Kısaca steril şartlarda batın orta hattan açılıp sağ ve sol lobları tutan ligamentler kesilerek karaciğer lobları serbestleştirildikten sonra iki anterior lob yani median lob ve sol lateral lob çıkarılarak (total karaciğerin %70'i) PH işlemi gerçekleştirildi (27,28). PH esnasında çıkarılan karaciğer kısımlarının ağırlıkları tartılarak kaydedildi. Hepatektomi sonrasında kanama kontrolü yapıp emin olunduktan sonra batın kapatıldı. Bu işlemler bittikten sonra kesi bölgesi 4/0'luk atravmatik cerrahi ipek ile dikildi. Daha sonra sıçanlar ayılmaya bırakıldı. Vücut ısıları 37 °C'de tutulmaya çalışıldı. Ayılma esnasında bütün sıçanların solunumları ve refleksleri takip edildi.

Deneilerin son gününe kadar sıçanların tedavisi yapılırken kesi bölgesini enfeksiyona karşı korumak amacıyla günlük yara bakımı (antiseptik betadin solüsyonu ile) yapıldı. Deney işlemleri süresince sıçanların kesi bölgesinde enfeksiyon gözlenmedi.



**Resim 3.1:** PH sırasında hepatoduodenal bağın kesilmesi



**Resim 3.2:** PH işleminde alınan sıçan karaciğeri

İlaç uygulamaları yapılan gruplara NAC, CCl<sub>4</sub> uygulamasından 3 saat önce ve sonrasında 1., 3., 6., 12. ve 18. saatlerde toplam 6 doz olarak uygulandı. PH yapılan gruplara işlemin 8. gününde, yapılmayan gruplara ise dokular alınmadan 24 saat önce i.p. yoldan 0,5 ml/kg CCl<sub>4</sub>, 50 mg/kg NAC verildi. Kontrol gruplarına ise aynı hacimde CCl<sub>4</sub> yerine i.p. yoldan serum fizyolojik (SF) verildi. Bütün gruplara ilaç uygulamaları eş zamanlı olarak yapıldı.

PH işlemi yapılan gruplar için işleminin 9. gününde, yapılmayan gruplar için CCl<sub>4</sub> uygulamasından 24 saat sonra 5 mg/kg xylazine ile 50 mg/kg ketamin kokteyli i.p. yoldan uygulanarak genel anestezi yapıldı. Genel anestezi altında sıçanların karın derisi bistüri yardımıyla açıldı. Duodenum üst uçtan asılarak abdominal vena kava inferior görünür hale getirildi. Heparinle yıkanmış enjektörlerle sıçanların kanları alındı. Alınan kan örnekleri 3000 g'de 10 dakika santrifüj edildikten sonra elde edilen plazma tüplere aktarıldı. Sonrasında sıçanların total karaciğer dokuları çıkarıldı. Tüm sıçanların total karaciğerin ağırlığı tartılarak kaydedildi. Alınan karaciğer dokusunun bir parçası histopatolojik inceleme amacıyla %10 formaldehid içerisine alındı. Diğer parçası ise grup numaraları belirtilerek hemen alüminyum folyoya sarılıp plastik kaplara konuldu ve zaman geçirilmeden tüm numuneler -70 dereceye ayarlı derin dondurucuya (Kendro HFU 586 Basic-Almanya) konularak biyokimyasal parametrelerin tespit edileceği güne kadar muhafaza edildi.

### **3.5. Karaciğerin Rejenerasyon Miktarının Ölçümü**

PH'den, rezekte edilen karaciğer hemen ölçüldü ve karaciğer ağırlığının vücut ağırlığına oranı hesaplandı. Bu arada rezekte edilen karaciğerin ağırlığı, orijinal tüm karaciğerin ağırlığının %70'i varsayımına dayanarak, rezekte edilen karaciğer, her bir sıçanın başlangıçtaki karaciğer ağırlığını hesaplamak için kullanıldı. Hepatektomi sonrası kesilen sıçanlarda kalan karaciğer çıkarılıp tartıldı. Karaciğer rejenerasyon oranı (%) şu şekilde hesaplandı.  $100 \times [C - (A - B)] / A$ , A=orijinal tüm karaciğer ağırlığı (=B/0.7), B=rezekte edilen karaciğer ağırlığı, C=kesilmiş karaciğer ağırlığı (rejenere karaciğer) (90).

### **3.6. Kan ve Karaciğer Dokularının Analizlere Hazırlanması.**

Deneyin yapıldığı gün derin dondurucudan çıkarılan karaciğer dokuları soğuk SF ile yıkandı. Kurutma kağıdı ile kurulanan dokular iki eşit parçaya ayrıldıktan sonra tartılarak her bir örneğin yaş doku ağırlığı kayıt edildi. Homojenizasyon öncesi

bistüri yardımıyla yaklaşık 1 (bir) gram ağırlığında küçük parçalara ayrılan doku örnekleri, içi buz dolu taşıma kaplarına yerleştirilmiş cam tüplere aktararak soğukluğu muhafaza edildi. Daha önce ikiye ayrılmış olan dokuların bir bölümünün üzerine soğuk 2 mL Tris-HCl tamponu (pH 7.4, 0.2 mM) eklenerek homojenizatörde (T25 Basic Ultra Turrax-Almanya) 16000 devir/dakika hızda 2 dakika süreyle homojenize edildi. Homojenat üzerine 2 mL daha tampon ilave edildi ve 1 dakika süreyle tekrar homojenize edilerek süre 3 dakikaya tamamlandı. Elde edilen homojenata 2 mL daha tampon ilave edilerek 6 mL'ye tamamlandı. Homojenat vortekslendikten sonra eppendorf tüplere aktarıldı ve bu homojenatlarda MDA, PC ve protein tayinleri yapıldı. Homojenatların bir bölümü, 1 saat süreyle 2200 g'de +6 °C soğutmalı santrifüjde (Rotina 46R-Almanya) santrifüj edilerek süpernatant elde edildi. Ayrılan süpernatantlar, CAT, GSH-Px ve protein tayinlerinde kullanıldı. Ekstrakt'ta SOD bakıldı. Ayrıca GSH için doku homojenatları 3340 g'de, +4°C'de 20 dakika santrifüj edildi. Elde edilen süpernatanta TCA çözeltisi ilave edilip karıştırıldı. Tekrar 2012 g'de, +4°C'de 20 dakika santrifüj edilerek proteinlerin çökmesi sağlandı. Renksiz berrak süpernatant nünuneleri GSH analizinde kullanıldı.

### **3.7. Karaciğer Dokusunda Yapılan Analizler**

#### **3.7.1. Süperoksit Dismutaz (SOD) Enzim Aktivite Tayini**

Kullanılan Reaktifler: Substrat solüsyonu [0.3 mmol/L ksantin, 0.6 mmol/L. Na<sub>2</sub>EDTA, 150 µmol/L NBT, 400 mmol/L Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>, 1 g/L sığır serum albümini (BSA)], ksantin oksidaz (XO:167 Ü/L), 2M (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, 0.8 mmol/L CuCl<sub>2</sub>.

Deneyin Prensibi: SOD aktivitesi Sun ve arkadaşları tarafından tanımlanan, (91) Durak ve arkadaşları tarafından modifiye edilen (92). NBT indirgeme yöntemiyle çalışıldı. Bu metotta, ksantin/ksantin oksidaz sistemi ile üretilen süperoksit radikalleri NBT'yi indirgeyerek renkli formazon oluşturur. Bu kompleks 560 nm'de maksimum absorban verir. Enzimin olmadığı ortamda meydana gelen indirgenme mavi-mor renk oluşturmaktadır. Ortamda SOD olduğunda ise NBT indirgenmesi tam olmayıp enzim miktar ve aktivitesine bağlı olarak açık renk oluşmakta, buradan aktivite hesabı yapılabilmektedir.

Bir SOD ünitesi; NBT redüksiyonunu %50 oranında inhibe eden enzim aktivitesidir.

SOD aktivitesinin hesaplanması:

$$\% \text{ İnhibisyon} = (A_K - A_N) / A_K \times 100$$

$A_K$ :Kör absorbansı

$A_N$ :Numune absorbansı

%50'lik inhibisyona 1 Ü denildiği için

$$\text{Aktivite (Ü/mL)} = [(\% \text{ inhibisyon}/50) \times (1/0.1)] \text{ mL}$$

Spesifik aktivite (Ü/mg protein)= [Ü/mL/mg/mL protein]. Sonuçlar, Ü/mg protein olarak ifade edildi.

Deneyin yapılışı: Daha önce elde edilen homojenat süpernatantının bir kısmı 1/1 (v/v) oranında kloroform/etanol (3/5, v/v) karışımı içinde vortekslenip 1 saat süreyle 2200 g'de soğutmalı santrifüjde santrifüj edildi. Üstte oluşan etanol fazından SOD enzim aktivite tayini yapıldı.

	Kör	Nümune
Substrat solüsyonu	2.85 mL	2.85 mL
Kloroform-Etanol Ekstraktı	-	0.100 mL
Bidistile su	0.100 mL	-
XO (167 Ü/l)	0.050 mL	0.050 mL

25 °C'de 20 dakika inkübasyon süresi başlatılır.

CuCl <sub>2</sub>	1 mL	1 mL
-------------------	------	------

Distile suya karşı körden başlanarak nünuneler 560 nm'de okundu.

### 3.7.2. Katalaz (CAT) Enzim Aktivite Tayini

Kullanılan Reaktifler: Fosfat tamponu (pH 7.0, 50 mM) ve fosfat tamponu kullanarak absorbansı 0.500'e ayarlanmış olan H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> çözeltisi.

Deneyin Prensibi: Katalaz aktivitesi Aebi'nin metoduna göre çalışıldı (93). 240 nm'de maksimum absorbans veren H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> deney ortamına ilave edilen katalaz aktivitesiyle su ve oksijene parçalanır. Bu durum uv spektrumunda absorbans azalmasına neden olup absorbanstaki azalma CAT enziminin aktivitesi ile doğru orantılıdır.

Bir CAT ünitesi: Birim zamanda bir mikromol H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>'i suya çeviren enzim miktarıdır.

Deneyin Yapılışı: Kör olarak fosfat tamponunun kullanıldığı uv spektrofotometrede 240 nm dalga boyunda sıfır ayarı yapıldıktan sonra H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> çözeltisi 0.500 absorbans verecek şekilde aynı tampon ile dilüe edildi ve substrat olarak kullanıldı. Substrat içine numune ilavesiyle her 15 saniyede bir defa olmak üzere 5 dakika süre ile absorbans azalması kaydedildi. Hesaplama 1 dakikalık lineer absorbans azalması değerleri esas alındı.

	Kör	Nümune
Fosfat Tamponu (50 mM, pH=7)	3 mL	-
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> çözeltisi (A <sub>240</sub> =0.500)	-	2.99 mL
Süpernatant	-	0.01 mL

Hesaplama:  $k = [2.3 \times \log (OD_1/OD_2)] / \Delta t$  (sn)

$k/\text{gr protein} = k / [(\text{g/mL protein}) \times 1000]$

Sonuçlar, k/gr protein olarak hesaplandı. Burada k, reaksiyon hız sabitidir.

### 3.7.3. Glutasyon Peroksidaz (GSH-Px) Enzim Aktivite Tayini

Kullanılan Reaktifler: 150 mM redükte GSH, 8 mM NADPH, 1 M NaN<sub>3</sub>, enzim [1.5 mL 3.2 M (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> + 50 µL GSH-redüktaz], 2 mM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, fosfat tamponu (50 mM, pH= 7.5).

Deneyin Prensibi: GSH-Px aktivitesi Paglia ve arkadaşlarının metoduna göre çalışıldı (94). GSH-Px hidrojen peroksit varlığında redükte glutasyonun (GSH) okside glutasyon (GSSG)'a yükseltgenmesini katalizler. Hidrojen peroksidin bulunduğu ortamda GSH-Px'in oluşturduğu GSSG, glutasyon redüktaz ve NADPH yardımı ile GSH'a indirgenir. GSH-Px aktivitesi NADPH'ın NADP<sup>+</sup>'ya yükseltgenmesi sırasındaki absorbans azalmasınının 340 nm'de okunmasıyla hesaplanır. Enzim ünitesi; birim zamanda okside olan mikromol NADPH miktarıdır.

Deneyin yapılışı: Dalga boyu 340 nm'ye ayarlanan spektrofotometrede numunelerin absorbans değerleri 5 dakika boyunca kaydedildi. Lineer aktivite azalışınının 1 dakikalık süresi esas alınarak hesap yapıldı.

Fosfat tamponu 5 mM EDTA'lı	2.65 mL
Redükte GSH (150 mM)	0.10 mL
NADPH (8 mM)	0.10 mL
Enzim (23.3 Ü/L)	0.01 mL
NaN <sub>3</sub> (1 M)	0.01 mL
Süpernatant	0.02 mL

30 dakika oda ısısında inkübe edilir.

H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> (2 mM)	0.100 mL
--------------------------------------	----------

GSH-Px aktivitesinin hesaplanması:

$$\text{Hesap: IU/L} = [(\Delta A/t) / 6.22 \times 10^{-6}] \times (1/0.02)$$

$$\text{Spesifik aktivite (IU/mg protein)} = (\text{IU/L}) / (1000 \times W)$$

W: gram protein miktarı

#### 3.7.4. Doku Homojenat, Süpernatant ve Ekstraktlarında Protein Tayini

Kullanılan Reaktifler: A reaktifi: 20 mmol CuSO<sub>4</sub>, 34 mmol Na<sub>3</sub>Sitrat, B reaktifi: 0.19 mmol Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>, 0.1 mol NaOH ve D reaktifi: Folin-Ciocalteu-Fenol (FCF) reaktifleri kullanıldı.

Deneyin Prensipleri: Protein miktarı Lowry metoduna göre tayin edildi (95). Bu yöntemde, alkali çözeltide bakır-protein kompleksi oluşarak fosfomolibdat-fosfotungstat reaktifini (Folin-Ciocalteu-Fenol reaktifi) redükler ve koyu mavi bir renk oluşur. Burada rengin koyuluğu ortamdaki protein konsantrasyonu ile doğru orantılıdır. Folin reaktifinin ilavesinde şunlara dikkat edilmesi gerekmektedir: Bu reaktif sadece asit ortamda dayanıklıdır. Fakat ifade edilen bu redükleme ise pH 10'da oluşmaktadır. Bu yüzden folin reaktifi süratle alkali bakır-protein çözeltisine ilave edilmeli ve vortekslenmelidir. Bu uygulama ile fosfomolibdat-fosfotungstat reaktifi parçalanmadan önce redüklenme olayı gerçekleşir.

Deneyin Yapılışı: Standart grafiği çizmek için konsantrasyonu bilinen sığır serum albümininden hazırlanmış çözeltiler kullanıldı. "OD-mg/mL protein

konsantrasyonu” grafiği çizilerek protein değerleri bu grafikten okundu. Standart ve nümuneler köre karşı 700 nm’de okundu.

$$\text{Hesabı: Protein (mg/mL)} = (K_{st}/A_{st}) \times A_N$$

$K_{st}$ : Standardın konsantrasyonu

$A_{st}$ : Standardın absorpsiyonu

$A_N$ : Nümunenin absorpsiyonu

	Nümune	Kör
Nümune	10 µL	-
Deiyonize su	490 µL	500 µL
C Reaktifı (5/1:B/A)	2.5 mL	2.5 mL

Karıştırılır, 5-10 dakika beklenir.

D Reaktifı (1/1:FCF/d.s.)	0.25 mL	0.25 mL
---------------------------	---------	---------

30 dakika oda ısısında bekletilir ve 700 nm’de köre karşı OD okunur.

### 3.7.5. Tiyobarbitürik Asit Reaktif Maddeleri (TBARS) Miktarının Tayini

Esterbauer ve Cheeseman’nın metodu ile çalışıldı (96). En çok kullanılan lipit peroksidasyon tayin yöntemidir. Asidik ortamdaki tiyobarbitürik asit ile 90-95 °C’de reaksiyona giren malondialdehit (MDA) ve diğer TBARS, pembe renkli kromojen meydana gelir. Onbeş dakika kaynatıldıktan sonra hızla soğutulan nümunelerin absorbansları 532 nm’de spektrofotometrik olarak okundu.

Kullanılan reaktifler: % 0,675 tiobarbitürik asit (TBA) çözeltisi, % 10 triklorasetik asit (TCA) çözeltisi ve 20 mM/L 1,1,3,3-tetrametoksipropan (standart).

MDA standart grafiği: 20 mM/L stok standart çözeltisinden değişik konsantrasyonlarda hazırlanan standartlar, nümunelerle aynı şartlarda çalışıldı ve spektrofotometrede okunmalarından elde edilen birimler ile standart grafiği çizildi. Bu grafikten elde edilen eğim sabiti nümunelere uygulanarak MDA miktarı yağ gram doku başına nanomol olarak hesaplandı.



Deneyin yapılışı:

	Nümune	Kör
TCA (%10)	2.5 mL	2.5 mL
Homojenat	0.5 mL	
Deiyonize su		0.5 mL

90 derecede 15 dakika bekletildikten sonra 3000 g'de 10 dakika santrifüj edilir.

Süpernatant	2 mL	2 mL
TBA (% 675)	1 mL	1 mL

90 derecede 15 dakika bekletildikten sonra, soğutulur ve köre karşı 532 nm'de okunur.

### 3.7.6. PC Tayini

Levine ve arkadaşlarının metodu ile çalışıldı (97). Dilüe edilmiş proteinler, soğuk trikloroasetik asit (TCA, %20) ile çökteldikten sonra 3-5 dakika santrifüj edilir. 2 N HCl'de 10 mM DNPH'ın (2,4-dinitrophenylhydrazine) solüsyonu her bir nümunenin protein pelletine eklenerek 1-2 mg/ml protein konsantrasyonu elde edilir. Nümuneler oda ısısında 1 saat karanlıkta bekletilip her 10 dakikada bir vortekslenir. Daha sonra %10-20 TCA ile çökteltilip 5 dakika santrifüj edilir. Süpernatant atılır ve protein pelletleri %10-20 TCA ile bir kez daha yıkanır. Kalan DNPH'ı uzaklaştırmak için 1 ml etanol/etil asetat (1:1, v/v) ile 3 kez yıkanır. Nümuneler 6 M guanidin hidroklorid içinde 37<sup>0</sup>C'de 15 dakika çalkalayıcıda yeniden askıya alınır. Karbonil içeriği 366 nm absorbansda tespit edilir.

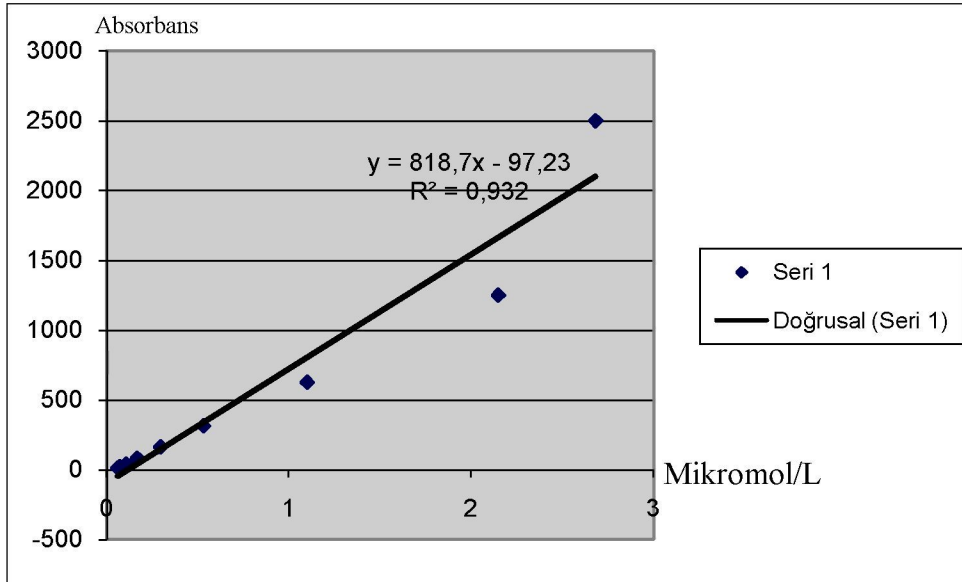
### 3.7.7. Redükte Glutasyon (GSH) Analizi

GSH analizi, Ellman metoduna göre çalışıldı (98). Metodun GSH ölçüm prensibi, analiz tüpünde bulunan glutasyonun 5,5'-ditiyobis 2-nitrobenzoik asit ile reaksiyona girerek sarı yeşilimsi renk vermesi ve bu rengin ışık şiddetinin 410 nm dalga boyundaki spektrofotometrede okunarak redükte glutasyon miktarının tayin edilmesi şeklindedir.

Alınan karaciğer nümunelerine %10'luk homojenat oluşturacak şekilde distile su ilave edildi. Buz içerisinde 1-2 dakika süreyle 12000 devir/dakika homojenize edildi. Daha sonra doku homojenatları 3340 g'de, +4°C'de 20 dakika santrifüj edilip elde edilen süpernatant'a TCA çözeltisi ilave edilip karıştırıldı. Tekrar 2012 g'de, +4°C'de 20 dakika santrifüj edilerek proteinlerin çökmesi sağlandı. Açık renkli süpernatant nümuneleri GSH analizinde kullanıldı.

	Nümunne	Kör
%10'luk Homojenat	500 µl	-
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> (0,3 M)	4 ml	4 ml
DTNB	500 µl	500 µl
Distile Su	-	500 µl

Tablodaki şemaya göre hazırlanan deney tüplerindeki çözeltilerin iyice karışması için tüpler vortekslendi. Nümuneler oda ısısında 5 dakika bekletildikten sonra oluşan rengin şiddeti spektrofotometrede 410 nm'de okundu ve glutatyon standart grafiğinden yararlanarak µmol/L cinsinden GSH düzeyleri bulundu.



Şekil 3.1.: GSH Standart Grafiği

### 3.8. Kullanılan Aletler

Tez çalışmamızdaki laboratuvar deneyleri esnasında SIGMA, MERCK ve diğer ticari firmalara ait kimyasallar ve aşağıda belirtilen aletler kullanıldı: T25 Basic Ultra Turrax marka homojenizatör (Almanya), Visemix VM10 marka vorteks (Kore), Memmert SV1422 marka Ben Mary (Almanya), Shimadzu AEG-320 marka hassas terazi (Japon), Rotina 46R marka soğutmalı maksimum 5000 g kapasiteli santrifüj (Almanya), Shimadzu UV-120IV marka Spektrofotometre (Japon) ve Kendro HFU 586 Basic marka derin dondurucu (Almanya).

### 3.9. İmmünohistokimyasal Değerlendirme

İmmünohistokimyasal değerlendirme İnönü Üniversitesi Tıp Fakültesi Patoloji laboratuvarında yapıldı. Alınan doku örnekleri histopatolojik inceleme için %10'luk tamponlanmış formalinde tespit edildi. Çalışmaya alınan olgularda Ki-67 oranını belirlemek amacı ile parafin bloklardan 5 mikrometre kalınlığında hazırlanan kesitler 'Poly-L-Lysine'li lamlara alındı. Ki-67 (MMI) (Leica, United Kingdom) kullanıma hazır mouse monoklonal antikoru ile immünohistokimyasal boyama yöntemi uygulandı.

Kesitler etüvde 62 °C'de 60 dakika bekletildikten sonra deparafinizasyon için 30 dakika ksilende ve 2 kez 10'ar dakika absolü alkolde bekletildi. Rehidratasyon için 1 dakika distile suda sonrasında 1/10 oranında distile su ile sulandırılan antijen retrieval solüsyonu (sitrata buffer) mikrodalgada 700 wattta üçer kez altışar dakika bekletildi. Mikrodalgadan çıkarılan kesitler oda sıcaklığında 20 dakika tutulduktan sonra distile su ile yıkandı. Endojen peroksidaz nötralizasyonu için peroksidaz blok 5 dakika bekletildi. Kesitler, PBS (phosphate buffer saline) ile iki kez beşer dakika yıkandı. Protein blok ile 5 dakika inkübe edildi. Ki-67 antikoru ile 1,5 saat oda ısısında inkübasyon sağlandı. Önce Post primer blokla sonrasında Novolink polymer ile 30'ar dakika inkübe edildikten sonra PBS ile ikişer kez beşer dakika yavaşça çalkalandı. Peroksidaz aktivitesi geliştirmek için 3,3 Diaminobenzidine (DAB) kromojen ile 20 dakika inkübe edilip 3 dakika hematoksilende bekletildi. Distile sudan geçirildi. 2 dakika alkol ve 2 dakika ksilende tutuldu. Sonrasında Novolink Max Polymer Detection System yöntemi ile rutin boyama işlemi tamamlandı.

Ki-67 boyama paterni değerlendirilirken Wintzer ve arkadaşlarının yöntemi esas alındı (99). Değerlendirmeye alınan lamlar üzerinde 400 büyük büyütme

alanında 150 ile 500 hücre sayıldı. Ki-67 nükleer boyanma gösteren hücrelerin sayısının toplam hücre sayısına oranı yüzde olarak hesaplandı.

### **3.10. İstatistik**

Çalışmada elde edilen bulgular değerlendirilirken, istatistiksel analizler için SPSS 15.0 programı kullanıldı. Gruplar dağılım açısından Shapiro Wilk testi ile değerlendirildi. GSH dışındakiler normal dağılım gösterdiğinden parametrik, GSH ise nonparametrik testler ile değerlendirildi. Gruplar arası fark parametrik testlerden One Way ANOVA ve post hoc testlerden LSD ile değerlendirilirken nonparametrik testlerden Kruskal-Wallis ve gruplar arası karşılaştırmada Mann Whitney U testi ( $P$  değeri kritik  $P$ 'ye göre değerlendirildi) ile değerlendirildi.  $P < 0,05$  anlamlı kabul edildi. Sonuçlar ortalama $\pm$  standart hata olarak verildi.

#### 4. BULGULAR

Tüm gruplara ait karaciğer dokusu enzim aktivitelerinin değerleri (CAT, GSH-Px ve SOD) Tablo 4.1'de, PC, MDA, GSH düzeyleri Tablo 4.2'de, Ki-67 değerleri Tablo 4.3'te ve rejenerasyon oranı ise Tablo 4.4'te verilmiştir. Çalışılan parametreler grafikler halinde de gösterilmiştir; (CAT) Şekil 4.1'te, (GSH-Px) Şekil 4.2'de, (SOD) Şekil 4.3'te, (MDA) Şekil 4.4'da, (GSH) Şekil 4.5'de ve (PC) ise Şekil 4.6'te verilmiştir. Hematoksilin&Eozin (H&E) ile boyanan karaciğer kesitleri resim 4.1.,4.2.,4.3.,4.4.'te ve Ki-67 ile nükleer boyanma görüntüleri ise resim 4.5., 4.6.'da verilmiştir.

**Tablo 4.1.** Karaciğer dokusunda antioksidan enzim aktiviteleri. Sonuçlar ortalama  $\pm$  standart hata (SEM) olarak verilmiştir. (CAT: katalaz, SOD: süperoksit dismutaz, GSH-Px: glutatyon peroksidaz, PH: parsiyel hepatektomi, CCl<sub>4</sub>: karbontetraklorür, NAC: N-asetilsistein, A.D.: anlamlı değil)

Gruplar	CAT (k/g protein)	GSH-Px (Ü/g protein)	SOD (Ü/g protein)
1. PH'den Sonra Kontrol (n=8)	1,703 $\pm$ 0,184	1,864 $\pm$ 0,202	0,138 $\pm$ 0,012
2. PH'den Sonra CCl <sub>4</sub> (n=8)	1,030 $\pm$ 0,164	1,951 $\pm$ 0,101	0,108 $\pm$ 0,010
3. PH'den Sonra NAC+CCl <sub>4</sub> (n=8)	2,516 $\pm$ 0,276	2,261 $\pm$ 0,103	0,199 $\pm$ 0,012
4. PH'den Sonra NAC (n=8)	1,940 $\pm$ 0,163	2,491 $\pm$ 0,183	0,189 $\pm$ 0,007
5. Sham Kontrol (n=7)	2,415 $\pm$ 0,149	2,138 $\pm$ 0,187	0,213 $\pm$ 0,027
6. PH yapılmayan Kontrol (n=7)	2,379 $\pm$ 0,259	2,311 $\pm$ 0,247	0,194 $\pm$ 0,010
7. PH yapılmayan CCl <sub>4</sub> (n=7)	1,756 $\pm$ 0,164	1,766 $\pm$ 0,085	0,115 $\pm$ 0,006
8. PH yapılmayan NAC (n=7)	2,250 $\pm$ 0,137	2,193 $\pm$ 0,085	0,201 $\pm$ 0,011
9. PH yapılmayan NAC+CCl <sub>4</sub> (n=7)	2,377 $\pm$ 0,210	2,053 $\pm$ 0,241	0,185 $\pm$ 0,015
Gruplar	p değerleri		
1-2	0,015	A.D.	A.D.
1-3	0,004	A.D.	0,002
1-4	A.D.	0,009	0,008
1-5	0,013	A.D.	0,000
1-6	0,018	A.D.	0,005
1-7	A.D.	A.D.	A.D.
1-8	A.D.	A.D.	0,002
1-9	0,018	A.D.	0,018
2-3	0,000	A.D.	0,000
2-4	0,001	0,023	0,000
2-5	0,000	A.D.	0,000
2-6	0,000	A.D.	0,000
2-7	0,012	A.D.	A.D.
2-8	0,000	A.D.	0,000
2-9	0,000	A.D.	0,000
3-4	0,036	A.D.	A.D.
3-5	A.D.	A.D.	A.D.
3-6	A.D.	A.D.	A.D.
3-7	0,008	0,044	0,000
3-8	A.D.	A.D.	A.D.
3-9	A.D.	A.D.	A.D.
4-5	A.D.	A.D.	A.D.
4-6	A.D.	A.D.	A.D.
4-7	A.D.	0,004	0,000
4-8	A.D.	A.D.	A.D.
4-9	A.D.	A.D.	A.D.
5-6	A.D.	A.D.	A.D.
5-7	0,025	A.D.	0,000
5-8	A.D.	A.D.	A.D.
5-9	A.D.	A.D.	A.D.
6-7	0,034	0,032	0,000
6-8	A.D.	A.D.	A.D.
6-9	A.D.	A.D.	A.D.
7-8	A.D.	A.D.	0,000
7-9	0,035	A.D.	0,001
8-9	A.D.	A.D.	A.D.

**Tablo 4.2.** Karaciğer dokusunda malondialdehit, glutatyon ve protein karbonil miktarları. Sonuçlar ortalama  $\pm$  standart hata (SEM) olarak verilmiştir. (MDA: malondialdehit, GSH: glutatyon, PC: protein karbonil, PH: parsiyel hepatektomi, CCl<sub>4</sub>: karbontetraklorür, NAC: N-asetilsistein, A.D.: anlamlı değil)

Gruplar	MDA (nmol/g yaş doku)	GSH ( $\mu$ mol/g yaş doku)	PC (nmol/mg protein)
1. PH'den Sonra Kontrol (n=8)	89,085 $\pm$ 9,233	1,197 $\pm$ 0,062	0,625 $\pm$ 0,046
2. PH'den Sonra CCl <sub>4</sub> (n=8)	99,281 $\pm$ 5,607	1,201 $\pm$ 0,038	0,836 $\pm$ 0,088
3. PH'den Sonra NAC+CCl <sub>4</sub> (n=8)	61,210 $\pm$ 2,816	1,494 $\pm$ 0,237	0,398 $\pm$ 0,060
4. PH'den Sonra NAC (n=8)	54,427 $\pm$ 5,585	1,214 $\pm$ 0,026	0,494 $\pm$ 0,046
5. Sham Kontrol (n=7)	53,322 $\pm$ 3,670	1,228 $\pm$ 0,041	0,296 $\pm$ 0,028
6. PH yapılmayan Kontrol (n=7)	63,334 $\pm$ 5,937	1,256 $\pm$ 0,046	0,347 $\pm$ 0,035
7. PH yapılmayan CCl <sub>4</sub> (n=7)	94,531 $\pm$ 3,752	1,384 $\pm$ 0,099	0,846 $\pm$ 0,165
8. PH yapılmayan NAC (n=7)	62,864 $\pm$ 7,222	1,450 $\pm$ 0,062	0,377 $\pm$ 0,059
9. PH yapılmayan NAC+CCl <sub>4</sub> (n=7)	53,018 $\pm$ 4,547	1,600 $\pm$ 0,133	0,480 $\pm$ 0,062
Gruplar	p değerleri		
1-2	A.D.	A.D.	0,044
1-3	0,001	A.D.	0,030
1-4	0,000	A.D.	A.D.
1-5	0,000	A.D.	0,003
1-6	0,003	A.D.	0,011
1-7	A.D.	A.D.	0,042
1-8	0,002	0,014	0,023
1-9	0,000	0,021	A.D.
2-3	0,000	A.D.	0,000
2-4	0,000	A.D.	0,002
2-5	0,000	A.D.	0,000
2-6	0,000	A.D.	0,000
2-7	A.D.	A.D.	A.D.
2-8	0,000	0,021	0,000
2-9	0,000	0,002	0,003
3-4	A.D.	A.D.	A.D.
3-5	A.D.	A.D.	A.D.
3-6	A.D.	A.D.	A.D.
3-7	0,000	A.D.	0,000
3-8	A.D.	A.D.	A.D.
3-9	A.D.	A.D.	A.D.
4-5	A.D.	A.D.	A.D.
4-6	A.D.	A.D.	A.D.
4-7	0,000	A.D.	0,002
4-8	A.D.	0,009	A.D.
4-9	A.D.	0,014	A.D.
5-6	A.D.	A.D.	A.D.
5-7	0,000	A.D.	0,000
5-8	A.D.	0,038	A.D.
5-9	A.D.	0,038	A.D.
6-7	0,000	A.D.	0,000
6-8	A.D.	0,038	A.D.
6-9	A.D.	A.D.	A.D.
7-8	0,000	A.D.	0,000
7-9	0,000	A.D.	0,003
8-9	A.D.	A.D.	A.D.

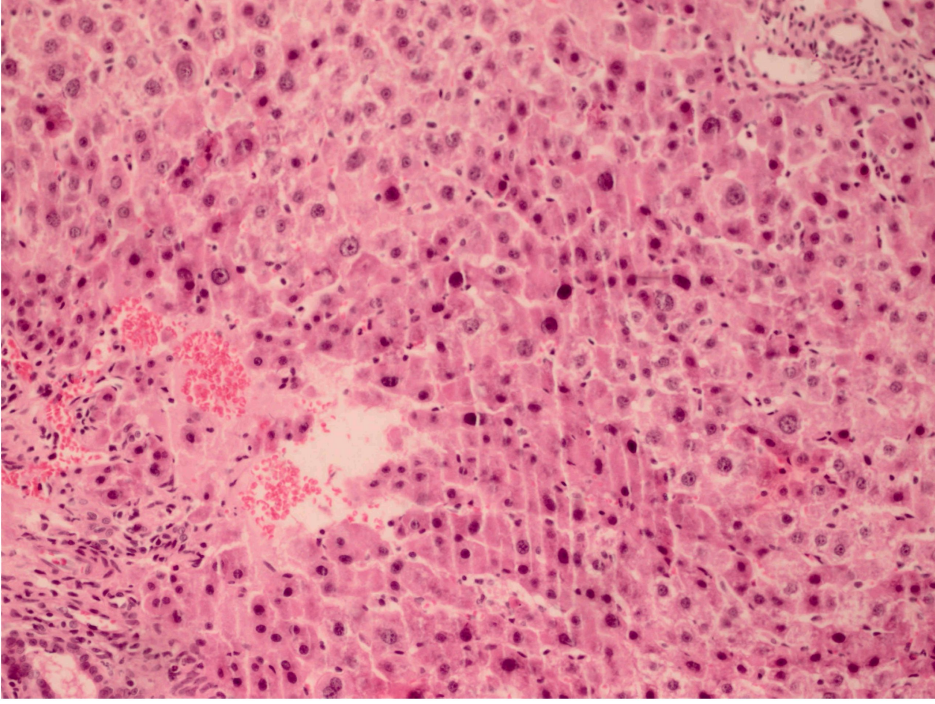
#### 4.1. Ki-67 Düzeyinin Değerlendirilmesi

Ki-67 ile nükleer boyanma görüntüleri değerlendirildiğinde karaciğer dokusunda artmış hücresel proliferasyona dair birçok gösterge saptanmıştır. Hematoksilin&Eozin (H&E) ile boyanan karaciğer kesitlerinde reperatif, inflamasyon ve yağlanma ile sonuçlanan değişiklikler görülmüştür. Ayrıca immünohistokimyasal olarak Ki-67 pozitifliği birçok görüntüde tespit edilmiştir. PH yapılan ve yapılmayan CCl<sub>4</sub> gruplarının karaciğer dokusu proliferasyon aktiviteleri kontrol gruplarına göre azalmasına rağmen NAC uygulaması ile CCl<sub>4</sub>'ün neden olduğu proliferasyon aktivitesindeki azalma belirgin olarak önlenip artış sağlanmıştır. Diğer taraftan iki ana gruba bağlı alt grupların yani PH yapılan rejenere grupların ve PH yapılmayan grupların Ki-67 değerleri arasında ciddi bir fark bulunmamaktadır. Bu durumda her iki ana grupta da mitotik aktivite bakımından belirgin bir farkın olmadığı söylenebilir.

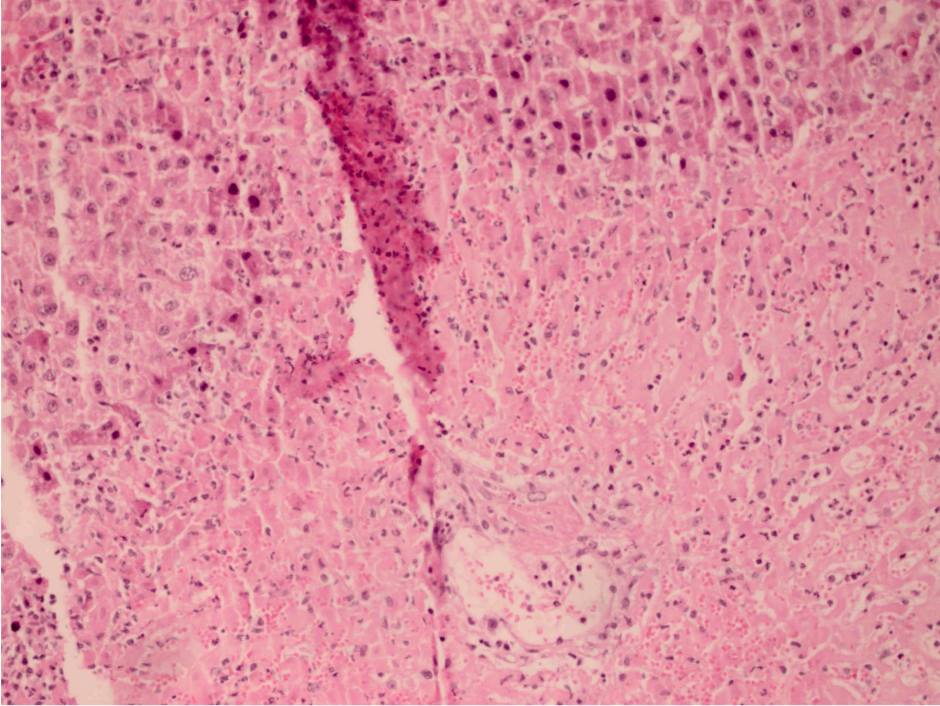
**Tablo 4.3.** Karaciğer dokusunda Ki-67 değerleri tablosu. Sonuçlar % olarak verilmiştir. (PH: parsiyel hepatektomi, CCl<sub>4</sub>: karbontetraklorür, NAC: N-asetilsistein)

Gruplar	Ki-67 değerleri (%)
1. PH'den Sonra Kontrol (n=8)	2
2. PH'den Sonra CCl <sub>4</sub> (n=8)	0,9
3. PH'den Sonra NAC+CCl <sub>4</sub> (n=8)	4
4. PH'den Sonra NAC (n=8)	3,5
5. Sham Kontrol (n=7)	3
6. PH yapılmayan Kontrol (n=7)	2,5
7. PH yapılmayan CCl <sub>4</sub> (n=7)	0,8
8. PH yapılmayan NAC (n=7)	1,5
9. PH yapılmayan NAC+CCl <sub>4</sub> (n=7)	6

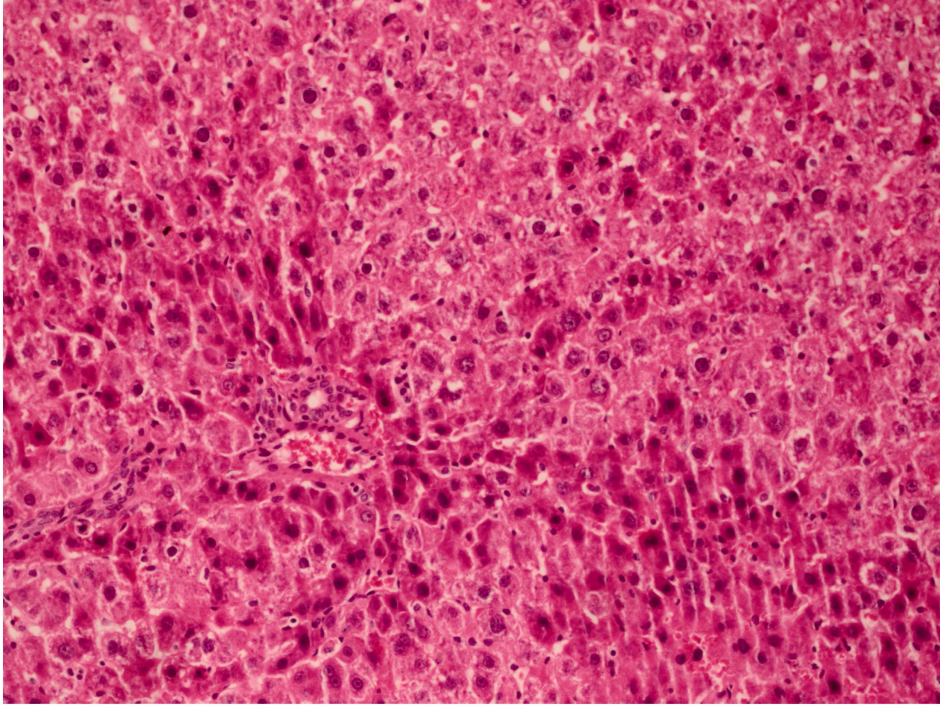




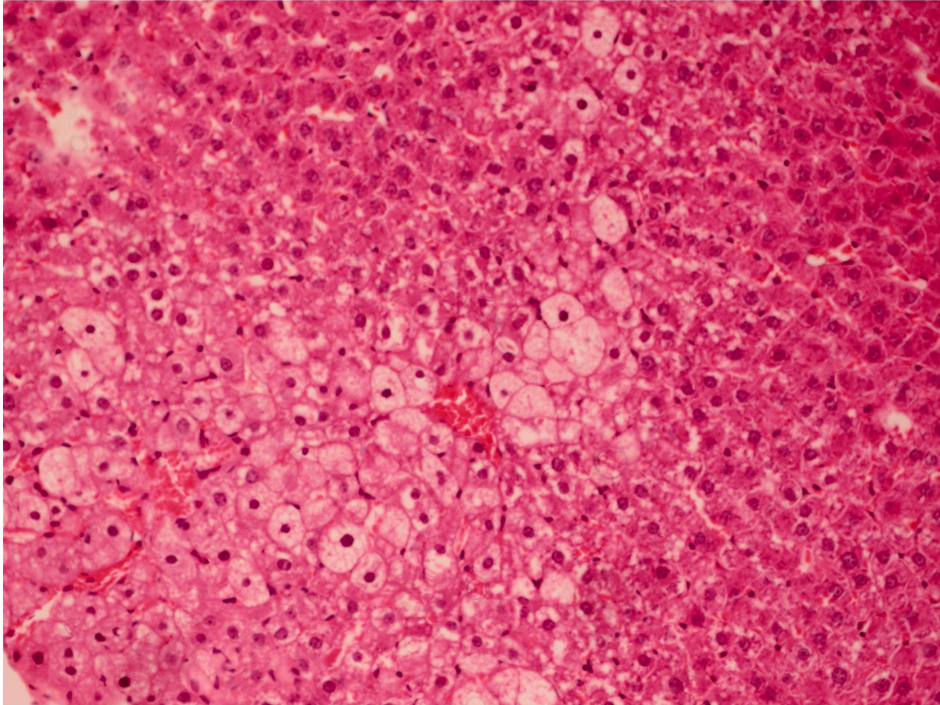
**Resim 4.1.** PH'den sonra kontrol grubu; hepatositlerde reperatif değişiklikler x 200 H&E



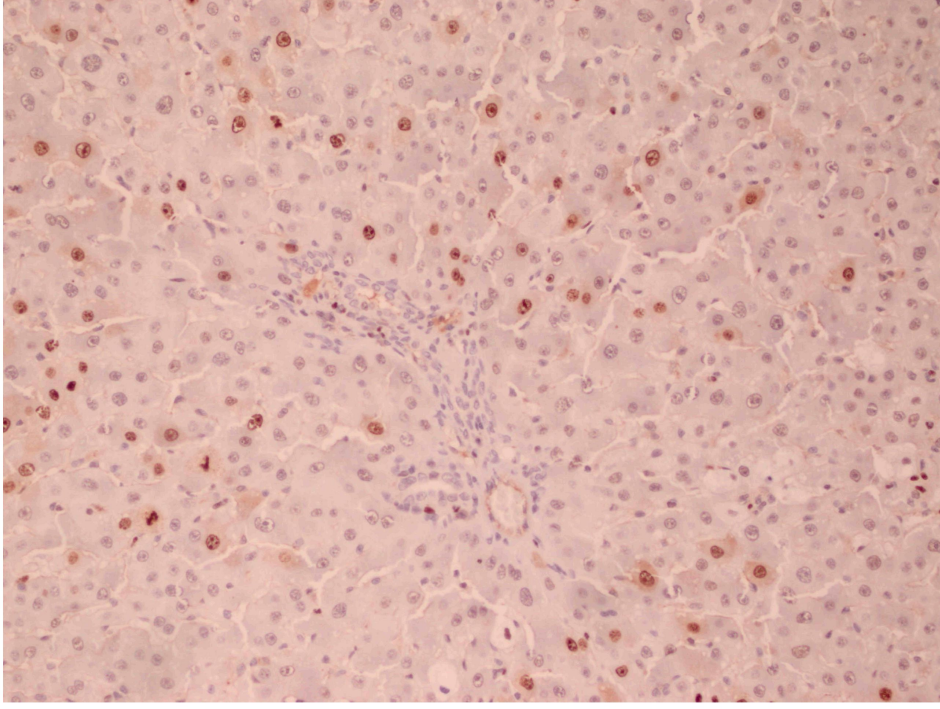
**Resim 4.2.** PH'den sonra CCl<sub>4</sub> grubu; akut inflamasyon ve nekroz komşuluğunda hepatositlerde reperatif değişiklikler x 200 H&E



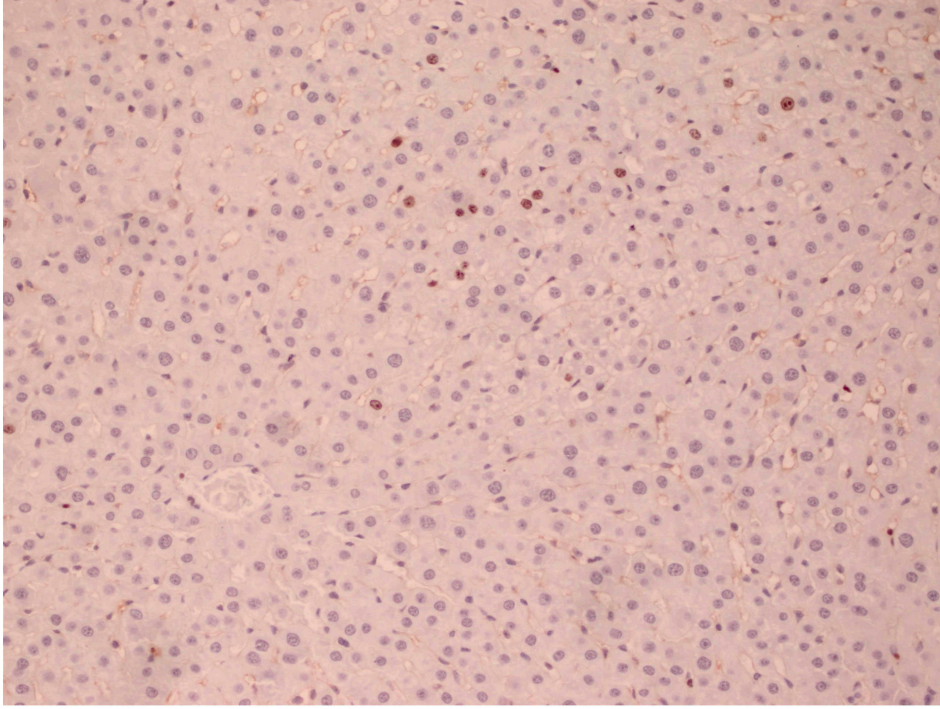
**Resim 4.3.** PH'den sonra NAC+CCl<sub>4</sub> grubu; hepatositlerde reperatif değişiklikler x 200 H&E



**Resim 4.4.** PH yapılmayan CCl<sub>4</sub> grubu; santral ven çevresinde steatozis ve inflamasyon x 100 H&E



**Resim 4.5.** PH'den sonra NAC+CCl<sub>4</sub> grubu; immünohistokimyasal olarak Ki-67'nin pozitifliği (Ki-67 x 200 nükleer boyanma)



**Resim 4.6.** PH sonrası NAC grubu; immünohistokimyasal olarak Ki-67'nin pozitifliği (Ki-67 x 200 nükleer boyanma)

#### 4.2. Karaciğerde Rejenerasyon Oranının Değerlendirilmesi

Karaciğer rejenerasyon oranının (%), hesaplanmasında  $100 \times [C - (A - B)] / A$  formülü kullanıldı. A=orjinal tüm karaciğer ağırlığı (=B/0.7), B=rezekte edilen karaciğer ağırlığı, C=kesilmiş karaciğer ağırlığı (rejenere karaciğer). Rejenerasyon oranının değerlendirilmesinde sırasıyla PH'den sonra kontrol, CCl<sub>4</sub>, NAC+CCl<sub>4</sub> ve NAC gruplarının rejenerasyon miktarında belirgin olarak artış görülmektedir.

**Tablo 4.4.** Karaciğer dokusunda rejenerasyon oranı tablosu. Sonuçlar % olarak verilmiştir. (PH: parsiyel hepatektomi, CCl<sub>4</sub>: karbontetraklorür, NAC: N-asetilsistein)

Gruplar	Karaciğer Rejenerasyon Oranı (%)
1. PH'den Sonra Kontrol (n=8)	57,88
2. PH'den Sonra CCl <sub>4</sub> (n=8)	60,77
3. PH'den Sonra NAC+CCl <sub>4</sub> (n=8)	63,31
4. PH'den Sonra NAC (n=8)	69,43

#### 4.3. Sıçanların Karaciğer Dokularındaki CAT Aktiviteleri

PH'den sonra kontrol grubunda karaciğer dokusu CAT aktivitelerinin; PH yapılmayan kontrol grubuna ve sham kontrol grubuna göre anlamlı olarak düşük olduğu gözlemlendi ( $1,703 \pm 0,184$  k/g prot,  $p < 0,05$ ).

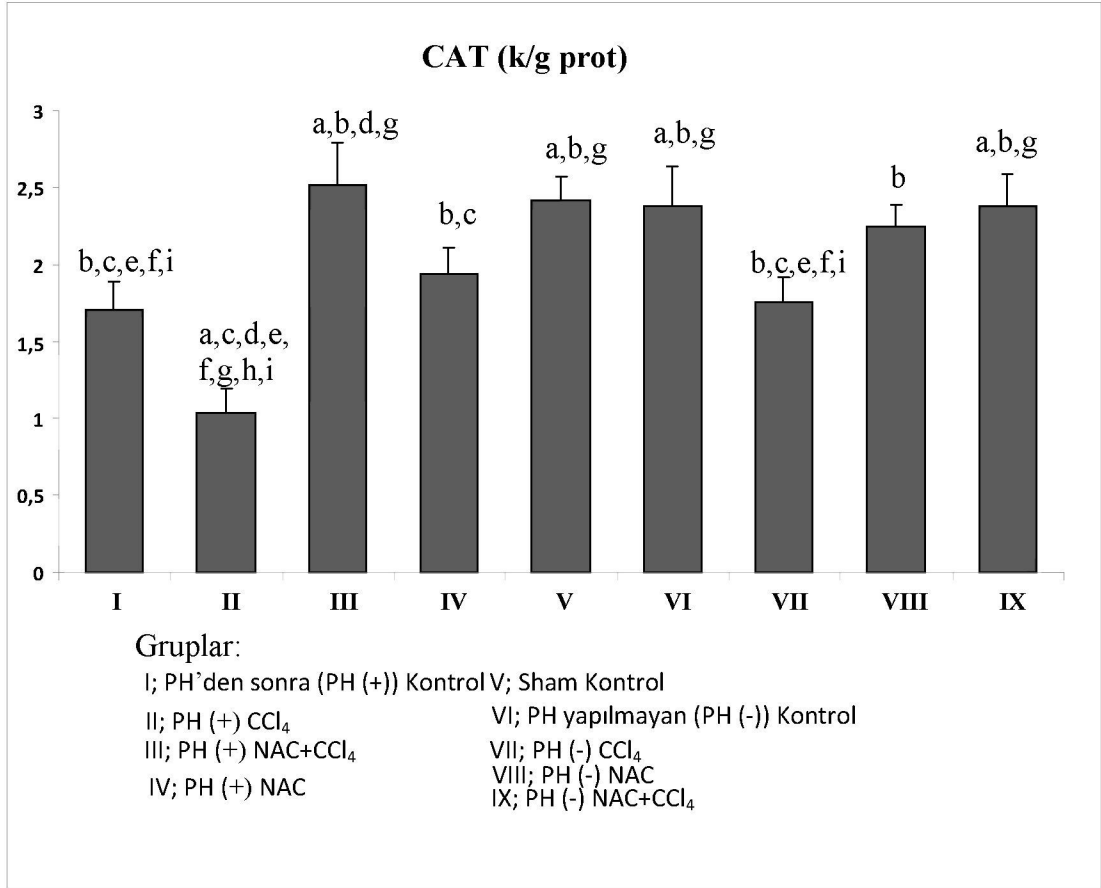
Sıçan karaciğer dokularında CAT aktivitesi, PH'den sonra CCl<sub>4</sub> grubunda diğer tüm gruplar ile karşılaştırıldığında belirgin olarak azaldığı gözlemlendi. CCl<sub>4</sub>'ün neden olduğu hasarın CAT aktivitesinde yol açtığı azalma NAC uygulaması ile anlamlı olarak önlemlendi ( $2,516 \pm 0,276$  k/g prot,  $p = 0,000$ ).

PH'den sonra CCl<sub>4</sub> grubunda karaciğer dokusu CAT aktivitelerinin; PH yapılmayan CCl<sub>4</sub> grubuna göre anlamlı olarak düşük olduğu gözlemlendi ( $1,030 \pm 0,164$  k/g,  $p = 0,012$ ).

PH yapılmayan CCl<sub>4</sub> grubunda karaciğer dokusu CAT aktivitelerinde; PH yapılmayan kontrol grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı düşüş gözlemlendi. NAC uygulaması CCl<sub>4</sub>'ün neden olduğu CAT aktivitesindeki azalmayı belirgin olarak önlemiştir ( $2,377 \pm 0,210$  k/g prot,  $p = 0,035$ ).

PH yapılan ve PH yapılmayan ana grupların hem kontrol hem de CCl<sub>4</sub> alt grupları karşılaştırıldığında rejenere gruplarda CAT enzim aktiviteleri bakımından istatistiksel olarak anlamlı bir düşüş görülmektedir.

Sham kontrol grubu ile PH yapılmayan kontrol grubu arasında istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık bulunmamaktadır.



**Şekil 4.1.:** Sıçanların karaciğer dokularındaki CAT aktivitesi grafiği. Grafikte sütunlar grup ortalamalarını, hata çizgileri ise standart hatayı göstermektedir. Grup ortalamaları arasındaki farkın önemini belirtmek için  $p < 0.05$  anlamlılık düzeyi olarak seçilmiştir. a; PH (+) kontrol grubuna kıyasla, b; PH (+) CCl<sub>4</sub> grubuna kıyasla, c; PH (+) NAC+CCl<sub>4</sub> grubuna kıyasla, d; PH (+) NAC grubuna kıyasla, e; sham kontrol grubuna kıyasla, f; PH (-) kontrol grubuna kıyasla, g; PH (-) CCl<sub>4</sub> grubuna kıyasla, h; PH (-) NAC grubuna kıyasla, i; PH (-) NAC+CCl<sub>4</sub> grubuna kıyasla, PH: parsiyel hepatektomi, CCl<sub>4</sub>: karbontetraklorür, NAC: N-asetilsistein, k: enzimin hız sabiti.

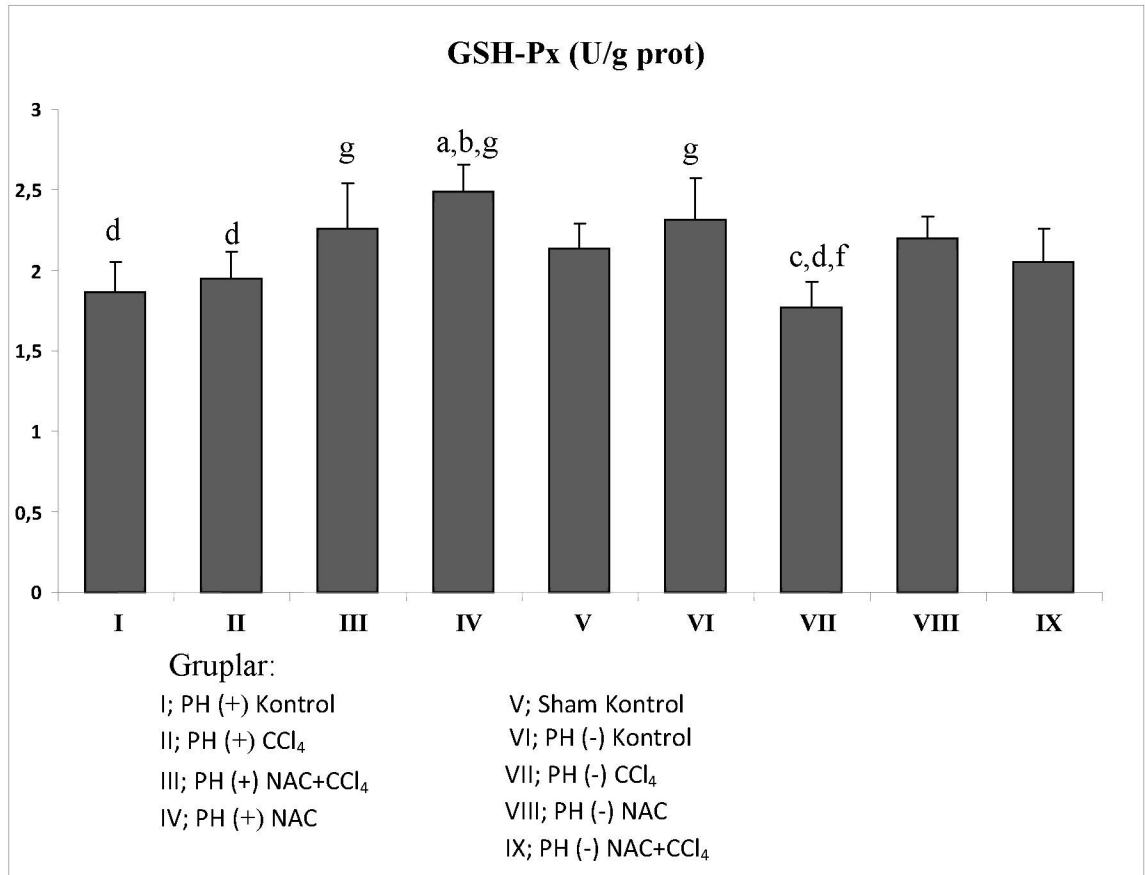
#### 4.4. Sıçanların Karaciğer Dokularındaki GSH-Px Aktiviteleri

PH'den sonra NAC grubunda karaciğer dokusu GSH-Px aktiviteleri; PH'den sonra kontrol grubuna, PH'den sonra CCl<sub>4</sub> grubuna ve PH yapılmayan CCl<sub>4</sub> grubuna göre anlamlı olarak yüksek bulundu (2,491±0,183 Ü/g prot, p<0.05).

PH yapılmayan CCl<sub>4</sub> grubunda karaciğer dokusu GSH-Px aktivitelerinde; PH yapılmayan kontrol grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı düşüş gözlemlendi. NAC uygulaması ile CCl<sub>4</sub>'ün neden olduğu GSH-Px aktivitesindeki azalma anlamlı bir değişiklik göstermemekle birlikte belirgin olarak önlenerek PH yapılmayan kontrol grubundaki değerlere yakın düzelme gösterdi (2,053±0,241 Ü/g prot, p>0.05).

Her iki anagrubun altgrupları GSH-Px enzim aktiviteleri bakımından karşılaştırıldığında istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık görülmemektedir.

Sham kontrol grubu ile PH yapılmayan kontrol grubu arasında istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık bulunmamaktadır.



**Şekil 4.2.:** Sıçanların karaciğer dokularındaki GSH-Px aktivitesi grafiği. Grafikte sütunlar grup ortalamalarını, hata çizgileri ise standart hatayı göstermektedir. Grup ortalamaları arasındaki farkın önemini belirtmek için  $p < 0.05$  anlamlılık düzeyi olarak seçilmiştir. a; PH (+) kontrol grubuna kıyasla, b; PH (+) CCl<sub>4</sub> grubuna kıyasla, c; PH (+) NAC+CCl<sub>4</sub> grubuna kıyasla, d; PH (+) NAC grubuna kıyasla, e; sham kontrol grubuna kıyasla, f; PH (-) kontrol grubuna kıyasla, g; PH (-) CCl<sub>4</sub> grubuna kıyasla, h; PH (-) NAC grubuna kıyasla, i; PH (-) NAC+CCl<sub>4</sub> grubuna kıyasla, PH: parsiyel hepatektomi, CCl<sub>4</sub>: karbontetraklorür, NAC: N-asetilsistein.

#### 4.5. Sıçanların Karaciğer Dokularındaki SOD Aktiviteleri

PH'den sonra kontrol grubu SOD aktiviteleri; PH'den sonra NAC, sham kontrol ve PH yapılmayan kontrol grubuna göre anlamlı olarak düşük olduğu gözlemlendi ( $0,138 \pm 0,012$  Ü/g prot,  $p < 0,05$ ).

PH'den sonra  $CCl_4$  grubunda karaciğer dokusu SOD aktiviteleri; PH'den sonra kontrol grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı bir değişiklik göstermemekle birlikte NAC uygulaması  $CCl_4$ 'ün neden olduğu SOD aktivitesindeki azalmayı anlamlı olarak önlemiştir ( $0,199 \pm 0,012$  Ü/g prot,  $p = 0,000$ ).

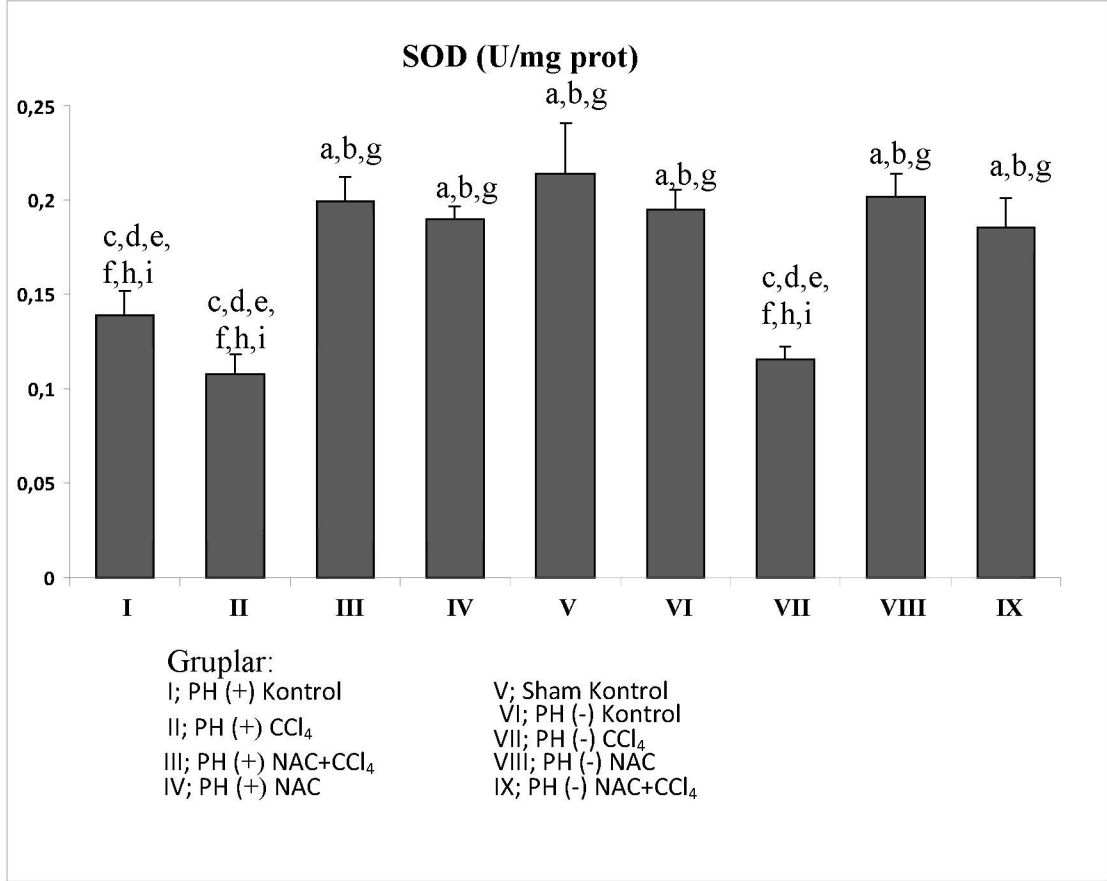
Ayrıca PH'den sonra  $CCl_4$  grubu SOD aktivitelerinde; PH'den sonra NAC, sham kontrol ve PH yapılmayan kontrol grubuna göre anlamlı olarak düşük olduğu gözlemlendi ( $0,199 \pm 0,012$  Ü/g prot,  $p < 0,05$ ).

PH yapılmayan  $CCl_4$  grubunda karaciğer dokusu SOD aktivitelerinde; PH yapılmayan kontrol grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı düşüş gözlemlendi. NAC uygulaması ile  $CCl_4$ 'ün neden olduğu SOD aktivitesindeki azalma belirgin olarak önlenerek PH yapılmayan kontrol grubundaki değerlere yakın düzelme gösterdi ( $0,185 \pm 0,015$  Ü/g prot,  $p = 0,001$ ).

Her iki ana grubun kontrol grupları SOD enzim aktiviteleri bakımından karşılaştırıldığında rejenere grupta istatistiksel olarak anlamlı bir düşüş görülmektedir.

Sham kontrol grubu ile PH yapılmayan kontrol grubu arasında istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık bulunmamaktadır.





**Şekil 4.3.** Sıçanların karaciğer dokularındaki SOD aktivitesi grafiği. Grafikte sütunlar grup ortalamalarını, hata çizgileri ise standart hatayı göstermektedir. Grup ortalamaları arasındaki farkın önemini belirtmek için  $p < 0,05$  anlamlılık düzeyi olarak seçilmiştir. a; PH (+) kontrol grubuna kıyasla, b; PH (+) CCl<sub>4</sub> grubuna kıyasla, c; PH (+) NAC+CCl<sub>4</sub> grubuna kıyasla, d; PH (+) NAC grubuna kıyasla, e; sham kontrol grubuna kıyasla, f; PH (-) kontrol grubuna kıyasla, g; PH (-) CCl<sub>4</sub> grubuna kıyasla, h; PH (-) NAC grubuna kıyasla, i; PH (-) NAC+CCl<sub>4</sub> grubuna kıyasla, PH: parsiyel hepatektomi, CCl<sub>4</sub>: karbontetraklorür, NAC: N-asetilsistein.

#### 4.6. Sıçanların Karaciğer Dokularındaki MDA Düzeyleri

Doku MDA değerleri PH'den sonra kontrol grubunda PH'den sonra NAC +CCl<sub>4</sub>, PH'den sonra NAC, sham kontrol ve PH yapılmayan kontrol gruplarına göre anlamlı olarak yüksek olduğu gözlemlendi ( $89,085 \pm 9,233$  nmol/g yaş doku,  $p < 0,05$ ).

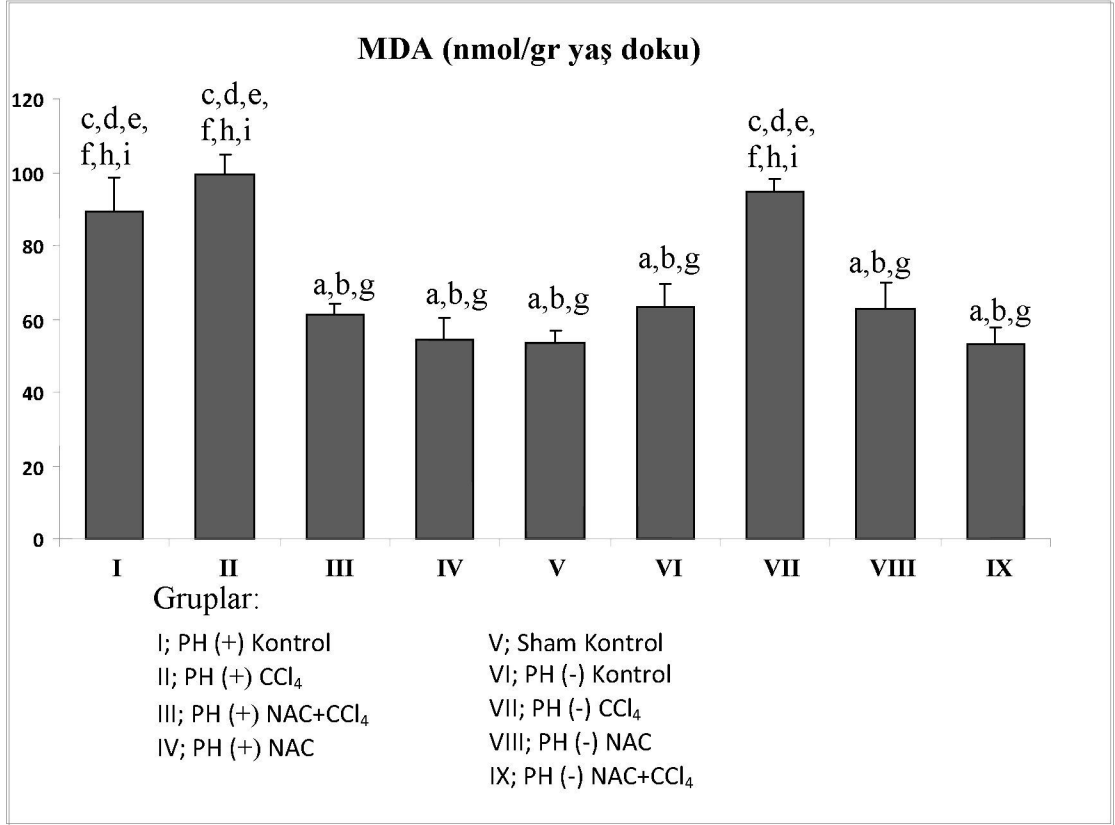
PH'den sonra CCl<sub>4</sub> grubunda doku MDA değerleri PH'den sonra kontrol grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı bir değişiklik göstermemekle birlikte NAC uygulaması CCl<sub>4</sub>'ün neden olduğu MDA değerindeki artışı anlamlı olarak önlemiştir ( $61,210 \pm 2,816$  nmol/g yaş doku,  $p = 0,000$ ).

Ayrıca PH'den sonra CCl<sub>4</sub> grubunda doku MDA değerleri PH'den sonra NAC, sham kontrol ve PH yapılmayan kontrol grubuna göre anlamlı olarak yüksek olduğu gözlemlendi (99,281±5,607 nmol/g yaş doku, p<0.05).

PH yapılmayan CCl<sub>4</sub> grubunda doku MDA değerleri PH yapılmayan kontrol grubuna göre anlamlı olarak yüksek olduğu gözlemlendi. NAC uygulaması ile CCl<sub>4</sub>'ün neden olduğu MDA değerlerindeki artış belirgin olarak önlenerek PH yapılmayan kontrol grubundaki değerlerden daha fazla düzelme gösterdi (53,018±4,547 nmol/g yaş doku, p=0,000).

Ayrıca PH yapılan ve PH yapılmayan her iki ana grubun kontrol grupları MDA seviyeleri bakımından da karşılaştırıldığında rejenere grupta istatistiksel olarak anlamlı bir artış görülmektedir.

Diğer taraftan sham kontrol grubu ile PH yapılmayan kontrol grubu arasında istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık bulunmamaktadır.



**Şekil 4.4.** Sıçanların karaciğer dokularındaki MDA düzeyi grafiği. Grafikte sütunlar grup ortalamalarını, hata çizgileri ise standart hatayı göstermektedir. Grup ortalamaları arasındaki farkın önemini belirtmek için  $p < 0.05$  anlamlılık düzeyi olarak seçilmiştir. a; PH (+) kontrol grubuna kıyasla, b; PH (+) CCl<sub>4</sub> grubuna kıyasla, c; PH (+) NAC+CCl<sub>4</sub> grubuna kıyasla, d; PH (+) NAC grubuna kıyasla, e; sham kontrol grubuna kıyasla, f; PH (-) kontrol grubuna kıyasla, g; PH (-) CCl<sub>4</sub> grubuna kıyasla, h; PH (-) NAC grubuna kıyasla, i; PH (-) NAC+CCl<sub>4</sub> grubuna kıyasla, PH: parsiyel hepatektomi, CCl<sub>4</sub>: karbontetraklorür, NAC: N-asetilsistein.

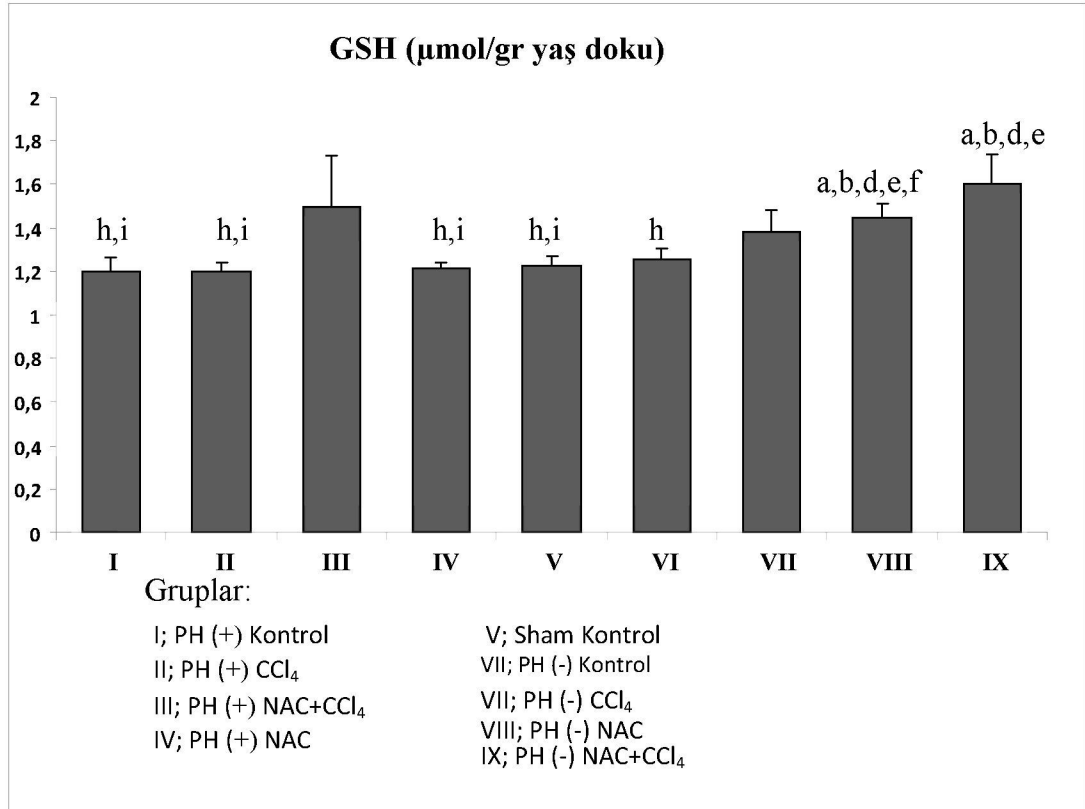
#### 4.7. Sıçanların Karaciğer Dokularındaki GSH Düzeyleri

PH yapılmayan NAC grubunda doku GSH değerleri PH'den sonra kontrol, PH'den sonra CCl<sub>4</sub>, PH'den sonra NAC, sham kontrol ve PH yapılmayan kontrol gruplarına göre anlamlı olarak yüksek bulundu.

PH yapılmayan NAC+CCl<sub>4</sub> grubunda doku GSH değerleri PH'den sonra kontrol, PH'den sonra CCl<sub>4</sub>, PH'den sonra NAC ve sham kontrol gruplarına göre anlamlı olarak yüksek bulundu.

Ayrıca PH yapılan ve PH yapılmayan her iki anagrup GSH seviyeleri bakımından karşılaştırıldığında gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık görülmemektedir.

Diğer taraftan sham kontrol grubu ile PH yapılmayan kontrol grubu arasında istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık bulunmamaktadır.



**Şekil 4.5.** Sıçanların karaciğer dokularındaki GSH düzeyi grafiği. Grafikte sütunlar grup ortalamalarını, hata çizgileri ise standart hatayı göstermektedir. Grup ortalamaları arasındaki farkın önemini belirtmek için  $p < 0.05$  anlamlılık düzeyi olarak seçilmiştir. a; PH (+) kontrol grubuna kıyasla, b; PH (+) CCl<sub>4</sub> grubuna kıyasla, c; PH (+) NAC+CCl<sub>4</sub> grubuna kıyasla, d; PH (+) NAC grubuna kıyasla, e; sham kontrol grubuna kıyasla, f; PH (-) kontrol grubuna kıyasla, g; PH (-) CCl<sub>4</sub> grubuna kıyasla, h; PH (-) NAC grubuna kıyasla, i; PH (-) NAC+CCl<sub>4</sub> grubuna kıyasla, PH: parsiyel hepatektomi, CCl<sub>4</sub>: karbontetraklorür, NAC: N-asetilsistein.

#### 4.8. Sıçanların Karaciğer Dokularındaki PC Düzeyleri

PH'den sonra kontrol grubunda doku PC değerleri PH'den sonra NAC+CCl<sub>4</sub>, sham kontrol, PH yapılmayan kontrol ve PH yapılmayan NAC gruplarına göre

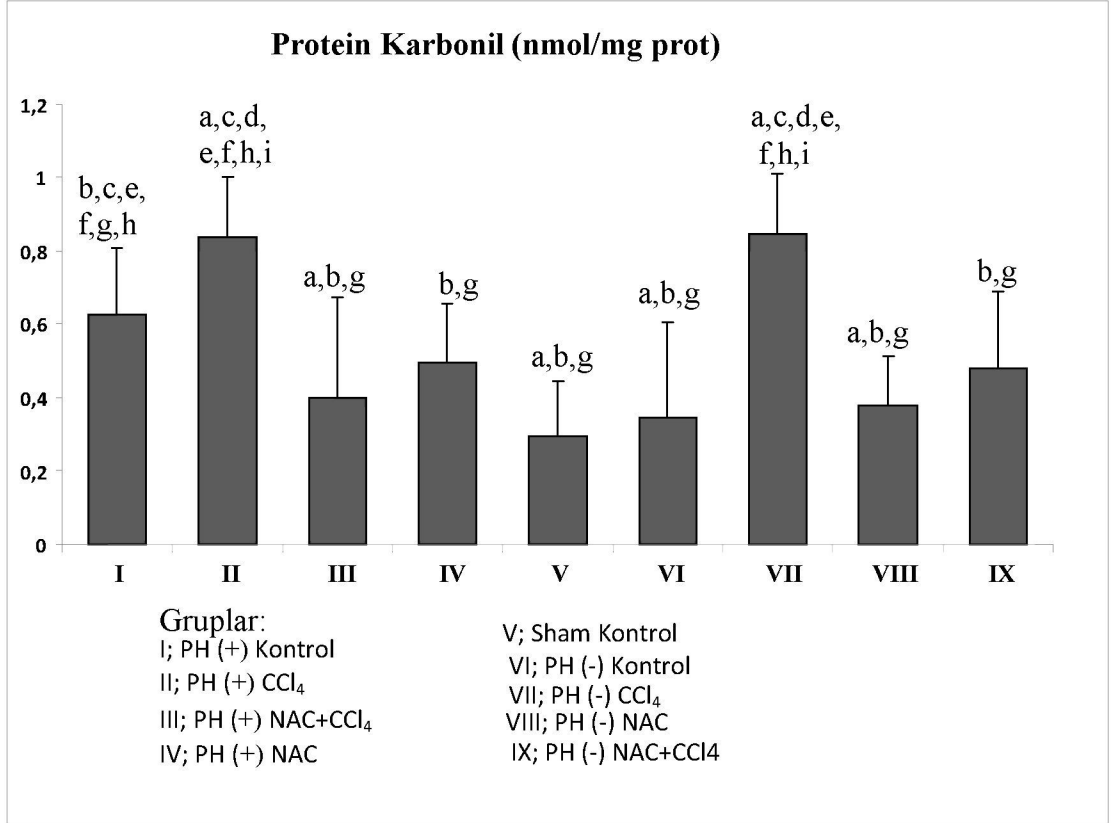
anlamli olarak yuiksek olmasına ragmen PH yapilmayan CCl<sub>4</sub> grubuna gore duisuk olduğu gozlendi (0,625±0,046 nmol/mg protein, p<0.05)

PH'den sonra CCl<sub>4</sub> grubunda doku PC değerleri PH'den sonra kontrol grubuna gore istatistiksel olarak anlamlı bir yukseliş gösterdi. NAC uygulaması CCl<sub>4</sub>'ün neden olduğu protein karbonil değerindeki artışı anlamlı olarak önlemiştir (0,398±0,060 nmol/mg protein, p=0,000).

Ayrıca PH'den sonra CCl<sub>4</sub> grubunda doku PC değerleri PH'den sonra NAC, sham kontrol ve PH yapilmayan kontrol, PH yapilmayan NAC ve PH yapilmayan NAC+CCl<sub>4</sub> gruplarına gore anlamlı olarak yuiksek olduğu gozlendi (0,398±0,060 nmol/mg protein, p<0.05)

PH yapilmayan CCl<sub>4</sub> grubunda doku PC değerleri PH yapilmayan kontrol grubuna gore istatistiksel olarak anlamlı bir yukseliş gösterdi. NAC uygulaması CCl<sub>4</sub>'ün neden olduğu protein karbonil değerindeki artışı anlamlı olarak önlemiştir (0,480±0,062 nmol/mg protein, p=0,003).

Ayrıca PH yapilmayan CCl<sub>4</sub> grubunda doku PC değerleri PH'den sonra kontrol, PH'den sonra NAC+CCl<sub>4</sub>, PH'den sonra NAC, sham kontrol, PH yapilmayan NAC ve PH yapilmayan NAC+CCl<sub>4</sub> gruplarına gore anlamlı olarak yuiksek olduğu gozlendi (0,846±0,165 nmol/mg protein, p<0.05)



**Şekil 4.6.** Sıçanların karaciğer dokularındaki PC düzeyi grafiği. Grafikte sütunlar grup ortalamalarını, hata çizgileri ise standart hatayı göstermektedir. Grup ortalamaları arasındaki farkın önemini belirtmek için  $p < 0.05$  anlamlılık düzeyi olarak seçilmiştir. a; PH (+) kontrol grubuna kıyasla, b; PH (+) CCl<sub>4</sub> grubuna kıyasla, c; PH (+) NAC+CCl<sub>4</sub> grubuna kıyasla, d; PH (+) NAC grubuna kıyasla, e; sham kontrol grubuna kıyasla, f; PH (-) kontrol grubuna kıyasla, g; PH (-) CCl<sub>4</sub> grubuna kıyasla, h; PH (-) NAC grubuna kıyasla, i; PH (-) NAC+CCl<sub>4</sub> grubuna kıyasla, PH: parsiyel hepatektomi, CCl<sub>4</sub>: karbontetraklorür, NAC: N-asetilsistein.

## 5.TARTIŞMA

Karaciğer, memelilerde hasar ya da cerrahi rezeksiyon sonrası büyük bir rejenerasyon potansiyeli gösteren tek organdır (90,100). Aslında karaciğerin bu rejenerasyon aktivitesi, cerrahi rezeksiyondan sonra hepatik doku kaybına verilen fizyolojik bir cevaptır (101). Klinik olarak hastalarda, tümör rezeksiyondan veya karaciğer transplantasyonundan sonra iyileşme geri kalan karaciğerin rejeneratif kapasitesine bağlıdır (90,100). Karaciğerde kütle kaybı, CCl<sub>4</sub> gibi hepatotoksik kimyasalların verilmesiyle indüklenebilir. Bunun ardında ise doku yıkıntısını kaldıran inflamatuvar ve rejeneratif cevap gelir (27). Karaciğerin rejenerasyonunu düzenleyen ve başlamasına katkıda bulunan faktörler çok çeşitli ve karmaşıktır. Bu karmaşık araçlar ağında sitokinler, büyüme faktörleri, transkripsiyon faktörleri, hormonlar ve oksidatif stres ürünleri önemli rol oynarlar (102). Genel olarak karaciğer rejenerasyonu, büyümeyle ilgili genler tarafından düzenlenir. Ayrıca hem stimüle edici hem de inhibe edici sinyal yollarına karışan değişik büyüme faktörleri aracılık eder. SOR'un da, değişik sinyal yollarını ayarlayarak karaciğer rejenerasyonunu etkilediği rapor edilmiştir (103). Karaciğer rejenerasyonunun bozulması, bireyde karaciğer yetmezliği veya fibrozis gelişimi ile sonuçlanabilir (90,104).

Genellikle karaciğer rejenerasyonu çalışmalarında üçte iki (2/3) PH olarak bilinen ve kemirgenlerin (sıçan ve fare) karaciğer kütlelerinin 2/3'ünün çıkarıldığı cerrahi işlem uygulanır (27). PH, primer ve metastatik karaciğer tümörlerinin tedavisi, majör karaciğer travması ve canlı donörden karaciğer transplantasyonu gibi bazı durumlarda kaçınılmaz bir cerrahi tedavi olarak uygulanabilir (105). Kemirgen karaciğerinin çok loplu yapısından dolayı lopların beşte üçü (yaklaşık olarak karaciğer kütlelerinin 2/3'ü) geriye kalan iki loba herhangi bir doku hasarı vermeden kolay bir cerrahi işlem ile çıkarılır. Sonrasında orijinal beş lobun toplam külesine eşdeğer boyutta büyüme meydana gelir. PH, ilk 5 dakikadan 5-7 güne kadar gözlemlenebilen ve düzenli bir biçimde ilerleyen bir takım olayları tetikler. Örneğin: yetişkin sıçanlarda yapılan bir çalışmada %70 PH'den sonra kalan karaciğerin hücresel proliferasyonu önemli ölçüde artmaktadır (106,107). Karaciğer dokusunda indüksiyon yapan herhangi bir ajan veya işlemde sonra DNA sentezini ilk olarak

başlatan hücreler hepatositlerdir. Sıçanlarda 24 saatte, farelerde ise 36 saatte hepatositlerin %60'ı DNA sentezinde sentez işleminin bir turunu gerçekleştirir. (108). PH'den kısa süre sonra hemen hemen tüm hepatositler  $G_0$ 'dan (dinlenme durumu)  $G_1$  (proliferatif durum) fazına girip hücre döngüsüne yeniden katılır (109). Hepatosit miktarı, 96 saat sonra hepatektomiden önceki seviyesinin yaklaşık %90'ına yakın yenilenir (110,111). Kayıp hepatik kütle, olgun hepatositlerin ve diğer hepatik hücre tiplerinin proliferasyonu yoluyla yenilenir. Deri ve ince bağırsaktaki gibi seçici kök hücrenin alt popülasyonunun proliferasyonu rol oynamaz. Normal karaciğer ağırlığı 5-7 günde (insanlarda 8-15 günde) yeniden eski halini alır. Rejenerasyon sonunda karaciğer loplalarının boyutu önemli ölçüde genişler ve hepatosit plağın kalınlığı normal bir hücre kalınlığının iki katı ölçüsündedir (106).

Çalışmamızda rejenerasyon göstergesi olarak Ki-67 kullanılarak, karaciğerdeki hücre proliferasyonu değerlendirildi. Ki-67 çoğalan hücrelerde görülen bir çekirdek proteinidir. Esas olarak  $G_1$ , S, M ve  $G_2$  fazında görülür ve  $G_0$  fazında yoktur (112). İnterfaz sırasında iken çekirdek içinde saptanan konu ile ilgili proteinlerin çoğu, mitoz safhasında iken büyük bir hızla kromozomların yüzeyinde taşınırlar (113). Bu yapı çoğalan bütün hücrelerde izlenmiş ve araştırılan hücre popülasyonunun büyüyen bölümünü araştırmada kullanılan önemli bir gösterge olmuştur (112). Ki-67 hücre proliferasyonunun morfolojik özelliklerini iyi bir şekilde gösteren protein olup, mitotik aktivite ve tümör evrelemesinde sıklıkla kullanılmaktadır (113). Yaptığımız çalışmada da Ki-67 proteini immünohistokimyasal olarak belirlenip karaciğer hücrelerindeki artmış hücresel proliferasyonu saptamak amacı ile kullanıldı. Ki-67 değerleri karşılaştırıldığında, nükleer boyanma görüntülerinde karaciğer dokusunda artmış hücresel proliferasyona dair birçok gösterge saptanmıştır. H&E ile boyanan karaciğer kesitlerinde reperatif, inflamasyon ve yağlanma ile sonuçlanan değişiklikler görülmüştür. Ayrıca immünohistokimyasal olarak Ki-67 pozitifliği birçok görüntüde tespit edilmiştir. Kısacası PH yapılan ve yapılmayan  $CCl_4$  gruplarında karaciğer dokusu proliferasyon aktivitelerinin kontrol gruplarına göre önemli ölçüde azaldığı NAC uygulaması  $CCl_4$ 'ün neden olduğu proliferasyon aktivitesindeki bu azalmayı belirgin olarak önleyip artış sağladığı görülmektedir. Diğer taraftan PH yapılan rejenerasyon gruplarının ve PH yapılmayan grupların Ki-67 değerleri karşılaştırıldığında belirgin bir fark



bulunmamaktadır. Bu durumda her iki ana grupta da mitotik aktivite bakımından ciddi bir farkın olmadığı söylenebilir. Sıçan karaciğerinde rejenerasyon süreci 5-7 günde tamamlanma safhasına ulaşır ve hücre proliferasyonu yavaşlar. Yaptığımız çalışmada PH işleminin ardından sonra 9. günde rejenerasyon karaciğer alınıp Ki-67 değerlendirilmesi yapıldı. PH sonrası bu süreçte rejenerasyon işlemi önemli ölçüde tamamlanmış olup gruplar arasında mitotik aktivite bakımından belirgin bir farklılık bulunmamasına yol açmış olabilir.

Yine rejenerasyon oranının değerlendirilmesinde gruplar arasında önemli bir farklılık bulunmamasına rağmen sırasıyla PH'den sonra kontrol, CCl<sub>4</sub>, NAC+CCl<sub>4</sub> ve NAC gruplarının rejenerasyon miktarında belirgin olarak artış görülmektedir. Ayrıca sadece CCl<sub>4</sub>, NAC+CCl<sub>4</sub> veya sadece NAC verilen PH'lı grupların PH'dan sonra kontrol grubu ile kıyaslandığında NAC'ın rejenerasyonu önemli ölçüde arttırdığı görülmektedir. Dolayısıyla PH sonrası karaciğer rejenerasyonunun stimüle olduğu ve NAC'ın karaciğer rejenerasyonuna olumlu yönde etki yaptığı söylenebilir.

Yapılan çalışmalarda, hepatektomiden sonra hepatik dokunun cerrahi eksizyonundan dolayı hepatik kitlenin küçüldüğü ve karaciğerin madde temizleme gücünün düştüğü gösterilmiştir. Örneğin: ham indosiyenin'in yarılanma süresi, %60 hepatektomiden sonra 4 kat ve %40 hepatektomiden sonra ise %33 artmıştır (114). Sıçanlarda üçte iki (2/3) hepatektomi sonrası sitokrom P450 aktivitesinin önemli ölçüde düştüğü görülmüştür. Yine sitokrom P450 gen ile ilgili genetik veriler, ilaç metabolizması için sorumlu spesifik enzimlerin metabolik aktivitesinin PH sonrası kalan hepatik dokuda düştüğünü göstermektedir. Marie ve ekibi de sitokrom P450 aktivitesinin sıçanlarda üçte iki (2/3) hepatektomi sonrası düştüğünü ve postoperatif 2. haftada başlangıç aktivitesinin %90'ına geri ulaştığını rapor etmiştir. Kısacası, hepatik rejenerasyonu destekleyen enzimlerin aktivitesi artar, ilaç metabolizması için sorumlu enzimlerin aktivitesi ise düşer (115).

Genellikle deneysel olarak indüklenmiş karaciğer hasarını oluşturmak için potansiyel bir hepatotoksik ajan olan CCl<sub>4</sub> kullanılır. CCl<sub>4</sub>'ün metabolizması sitokrom P450 tarafından başlatılır. CCl<sub>4</sub>, hepatosit endoplazmik retikulumun sitokrom P450E1'i tarafından triklorometil (CCl<sub>3</sub>) radikaline hızlıca dönüştürüldüğü bilinmektedir (116). Triklorometil serbest radikalleri indirgenmiş glutatyon ve protein tiyollerini gibi -SH grupları ile reaksiyona girebilir. Aynı zamanda

bu serbest triklorometil radikallerin hücre proteinleri ile kovalent bağlanması, membran lipid peroksidasyonu ve hücre nekrozu ile sonuçlanan zincirleme olayların başlangıç adımı olabilir (117). Bu radikaller, oksidatif stresi başlatır ve sonunda lipid peroksidasyonu yoluyla mitokondrinde dahil olduğu intrasellüler organellere hasar verir (118). Membran yapılarının bozulması, membranla ilişkili enzim kaybı ve nekroz dahil olmak üzere CCl<sub>4</sub> ile indüklenen intoksikasyonların karaciğer dokusu ve kan plazmasında biyokimyasal parametrelerin önemli bir kısmında değişiklik meydana gelmektedir. Sıçanlarda CCl<sub>4</sub>'e ağır maruziyet sonrası histolojik incelemelerde, karaciğerde önemli morfolojik değişimler (yağlanma ve hidrofik distrofi, hepatosit sitoplazmasında yıkıcı değişimler, hepatositlerin ağır nekrozu) görülmüştür (119). Ugazio ve ekibinin gerçekleştirdiği bir çalışmada hepatektomi yapılan sıçanların, CCl<sub>4</sub>'ün öldürücü etkisine karşı daha az duyarlı olduğunu tespit etmiştir (120). Bu koruyucu etki, CCl<sub>4</sub>'ü metabolize ederek dokuya hasar veren serbest radikaller üreten hepatik sitokrom P450 enzimindeki düşüşe bağlıdır (121). Dolayısıyla P450 tarafından CCl<sub>4</sub>'ün biyoaktivasyonundaki azalış rejenere karaciğerde CCl<sub>4</sub>'ün toksisitesinde de düşüşe yol açar. Zhang ve ekibi yaptığı çalışmada, PH'den 96 saat sonra rejenere sıçan karaciğerinin hem *in vivo* hem de *in vitro* olarak CCl<sub>4</sub> kaynaklı hepatotoksositeye dirençli olduğunu göstermiştir. Bu koruyucu etki mekanizmasını, rejenere karaciğerin hepatik mitokondriyal solunum aktivitesindeki ve rejenere hepatositlerin plazma membran akışkanlığındaki artışa bağlamıştır (111). CCl<sub>4</sub> gibi hepatik toksinler, plazma membran akışkanlığını azaltır. Bu yüzden CCl<sub>4</sub> toksisitesine karşı plazma membran akışkanlığındaki artışın, membran bütünlüğünün korunmasında önemli olduğuna inanılır (122).

Karaciğerin, CCl<sub>4</sub>'ün indüklediği hasara karşı korunmasında ve tedavisinde antioksidanların kullanımı katkı sağlayabilir. Çalışmamızda %70 PH modelinde CCl<sub>4</sub> (0,5 ml/kg, i.p) uygulanmasından sonra gelişen oksidatif işlemlerin engellenmesi için antioksidan olarak NAC (50 mg/kg, i.p) kullanıldı. NAC'ın antioksidan, antisitotoksik ve antiapoptik özelliklerinden dolayı CCl<sub>4</sub> indüklü hepatit hasarın sonuçlarının önlenmesinde kullanılması yararlı olabilir (123). NAC, mikrosirkülasyonda düzelme ve indirgenmiş glutatyon seviyelerinde artışa yol açarak oksidatif doku hasarına karşı koruma sağlar (124). Ayrıca bozulmuş hepatik mikrosirkülasyon ile ilişkili süperoksit anyonlarına karşı da koruyabilir (125). NAC

ekstra antioksidan özellikleri yoluyla direkt olarak hidrojen peroksiti temizleme özelliğine sahiptir. Aynı zamanda NAC'ın yapısında bulunan tiyol fonksiyonel gruplarının kimyasal özelliğinden dolayı bu molekül farklı bir kısım amaçlarla kullanılabilir. Örneğin okside olmuş glutatyonun rejenerasyon ve restorasyonunda kullanılacak olan sisteini sağlar ve hücre membranını geçebilen bir -SH grubu donörü olarak fonksiyon görür. NAC indirgenmiş tiyol grupları sayesinde SOR'u temizleme işlemlerini gerçekleştirmektedir (126,127). Tiyol grupları redoks potansiyeli sayesinde oksidatif stresi azaltır. Böylece oksidatif metabolizmalar üzerinden ve nötrofil ve monositlerin kemotaksisini inhibe eder. Süperoksit, hidrojen peroksit ve hidroksil radikallerini temizler (126). Ayrıca NAC'ın kemotaksis'i ve antiinflamatuvar etki yoluyla insan fagositik hücreleri tarafından oksijen radikallerinin üretimini bozduğu gösterilmiştir (128). Özetle NAC, nötrofil aktivasyonunu inhibe eder ve makrofajların fonksiyonunu düzenler (129). Diğer taraftan NAC, hepatik kan akışını düzeltir. Kardiyak göstergede, hepatik ve splanik perfüzyonda artış yoluyla oksijen dağıtımını düzelttiği de gösterilmiştir. NAC hepatik disfonksiyonlu, ağır hastalıklı ve septik şoklu hastalarda hepatik fonksiyonu düzeltir (130,131). Yine yapılan çalışmalarda NAC'ın karaciğer transplantasyonu sonrası oluşan komplikasyonları engelleyebildiği gösterilmiştir (132). Aynı zamanda NAC'ın rutin kullanımının, majör karaciğer cerrahisi sonrası komplikasyonları engelleyebildiği kanıtlanmıştır (133).

Normal hücreler kendilerini reaktif türlere karşı birçok enzimatik ve nonenzimatik endojen savunma sistemleri ile koruyabilirler. SOR'u elemine etmede görev yapan SOD, CAT ve GSH-Px gibi enzimler bu savunma sistemlerinin bir parçasını oluştururlar (134). Çalışmamızda CAT enzim aktivitesi hem PH'den sonra CCl<sub>4</sub> hem de PH yapılmayan CCl<sub>4</sub> gruplarında kendi kontrol grupları ile kıyaslandığında anlamlı olarak daha düşük olduğu tespit edildi. CCl<sub>4</sub>'e maruz bırakılan gruplara NAC tedavisinin verilmesi, özellikle yüksek CAT ve SOD enzim aktiviteleri ile sonuçlandı. Bu durum NAC metabolitlerinin içerdiği -SH grupları ile antioksidan aktivite göstermesinden kaynaklanabilir. Ayrıca NAC, antioksidanların reaksiyon işlemine yardımcı olarak onların ortamdaki kaybını da engellemiş olabilir. Kısacası PH sonrası; hepatik dokunun cerrahi eksizyonundan dolayı hepatik kitlenin küçülmesinden, karaciğer madde temizleme gücünün düşmesinden ve enzimlerin

metabolik aktivitelerinin kalan hepatik dokuda azalmasından kaynaklanabilir. Antioksidan enzim aktivitelerinde farklı sonuçların bulunması, biyolojik nümunelerde enzim aktivitelerinin analizlerindeki zorluktan kaynaklanıyor olabilir. Diğer taraftan PH yapılan ve PH yapılmayan ana grupların hem kontrol hem de CCl<sub>4</sub> alt grupları karşılaştırıldığında rejenere gruplarda CAT enzim aktiviteleri bakımından istatistiksel olarak anlamlı bir düşüş görülmektedir. Bu durumda rejenerasyonun CAT enzim aktiviteleri üzerine olumsuz etkisinin olduğu söylenebilir. Benzer şekilde her iki ana grubun kontrol grupları SOD enzim aktiviteleri bakımından da karşılaştırıldığında yine rejenere grupta istatistiksel olarak anlamlı bir düşüş görülmektedir. Bu tabloda da rejenerasyonun SOD enzim aktiviteleri üzerine olumsuz etkisinin olduğunu gösterebilir. Ayrıca sham kontrol grubu ile PH yapılmayan kontrol grubu arasında istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık bulunmaması cerrahi işlemin SOD enzim aktivitesi üzerine etkisinin olmadığını gösterebilir.

GSH-Px, antioksidan savunma sisteminde oldukça önemli bir enzimdir. Ayrıca selenyum ve indirgenmiş glutatyona bağımlı olarak suda hidrojen peroksidin dönüşümünü katalizler (135). Bu enzim hepatik nekrozda majör bir koruyucu role sahiptir (136). NAC glutasyon için substrat olarak görev yaptığından dolayı bu enzimin hepatik seviyesini de yeniden düzenler (137). Çalışmamızda PH yapılmayan CCl<sub>4</sub> grubu GSH-Px aktivitesinde PH yapılmayan kontrol grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı düşüş gözlemlendi. Bu durum CCl<sub>4</sub> uygulaması ile GSH-Px enzim aktivitesinde azalma olduğunu göstermektedir. Hem PH yapılan hem de PH yapılmayan gruplarda CCl<sub>4</sub>'n neden olduğu GSH-Px aktivitesindeki azalma NAC uygulaması ile anlamlı bir değişiklik göstermemekle birlikte belirgin olarak nlenerken kontrol gruplarındaki değerlere yakın düzelme gösterdi. Bu tablo NAC'ın GSH-Px aktivitesini indüklediğini ve hepatik antioksidan savunmaya katkıda bulunduğunu gösterebilir. Daha önce yapılmış bir çalışmada da NAC tedavisi ile GSH-Px aktivitesinde önemli ölçüde artış görülmüştür (138). Her iki ana grubun alt grupları GSH-Px enzim aktiviteleri bakımından karşılaştırıldığında istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık görülmemektedir. Bu durum rejenerasyonun GSH-Px enzim aktiviteleri üzerine etkisinin olmadığını gösterebilir. Ayrıca sham kontrol grubu ile PH yapılmayan kontrol grubu arasında istatistiksel olarak anlamlı bir

farklılık bulunmaması cerrahi işlemin GSH-Px enzim aktivitesi üzerine etkisinin olmadığını gösterebilir.

Genellikle karaciğerde yüksek konsantrasyonlarda bulunan bir antioksidan olan GSH, SOR'un oksidatif hasarına karşı hücrel savunma mekanizmalarında önemli bir rol oynar (139). CCl<sub>4</sub>'ün indüklediği hepatotoksisitenin mekanizması üzerine yapılan çalışmalar ile CCl<sub>4</sub>'ün reaktif toksik metabolitlerinin detoksifikasyonunda GSH'ın anahtar rol oynadığı ve GSH depolarının önemli ölçüde tüketildiğinde karaciğer nekrozunun başladığı gösterilmiştir (140,141). NAC, GSH prekürsörü olarak görev yapar ve intrasellüler GSH depolarını yeniden doldurabilir. Böylece SOR'a karşı koruma sağlayabilir (142). GSH seviyeleri muhtemelen apoptozisde düzenleyici bir fonksiyona sahiptir. Yüksek seviyede GSH'ın hücre ölümünü engellediği, düşük seviyesinin ise hücre ölümünü artırdığı gösterilmiştir (139). Muhtemelen NAC, GSH seviyelerini devam ettirme yeteneğinden dolayı hücre ölümüne karşı koruma da sağlayabilir (133). Valles ve ekibi CCl<sub>4</sub>'den sonra NAC'ın verilmesi ile karaciğer nekrozunun engellendiğini göstermişlerdir. Bu durum NAC'ın sisteine ve glutatyona çevrilmesi ile sağlanmış olabilir (143). Çalışmamızda PH yapılan ve PH yapılmayan NAC+CCl<sub>4</sub> grupları, CCl<sub>4</sub> grupları ile kıyaslandığında GSH seviyesinde artış olduğu gözlemlendi. Dolayısıyla NAC tedavisi uygulanmış NAC+CCl<sub>4</sub> gruplarında GSH seviyesinde anlamlı bir değişiklik görülmemekle birlikte belirgin olarak kontrol ve CCl<sub>4</sub> gruplarına nazaran artış olduğu söylenebilir. Bu durumda NAC tedavisinin CCl<sub>4</sub>'ün indüklediği hepatotoksisiteye karşı hücrel GSH içeriğindeki artış ile ilişkisi olabilir. Ayrıca NAC, SH grubu donörü ve GSH sentezi prekürsörü olarak GSH tüketimini engellemiş olabilir. Benzer şekilde daha önce yapılan çalışmalarda NAC tedavisi ile hepatik antioksidan GSH seviyesinde önemli ölçüde artış görülmüştür (144). Ayrıca PH yapılan ve PH yapılmayan her iki ana grup GSH seviyeleri bakımından karşılaştırıldığında gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık görülmemektedir. Bu durum rejenerasyonun GSH seviyeleri üzerine etkisinin olmadığını gösterebilir. Diğer taraftan sham kontrol grubu ile PH yapılmayan kontrol grubu arasında istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık bulunmaması cerrahi işlemin GSH seviyeleri üzerine etkisinin olmadığını gösterebilir.

Lipoperoksidasyon hücre membranı hasarında bir gösterge olup lipoperoksidasyon ara bileşikleri ve malondialdehit oluşumu ile ölçülebilir. Bu bileşikler, CCl<sub>4</sub>'ün P450 sitokrom enzim kompleksi tarafından metabolize edilmesinden sonra oluşan triklorometil radikalının üretimindeki artış ile önemli ölçüde artar (145). Çalışmamızda, PH yapılmayan CCl<sub>4</sub> grubundaki sıçanların karaciğer dokusunda MDA miktarları PH yapılmayan kontrol grubuna nazaran anlamlı olarak daha yüksek bulundu. Bu tablo, CCl<sub>4</sub> uygulanmasının sıçan karaciğer dokusunda hasar oluşturduğunu göstermektedir. Yani uygulama karaciğerde SOR miktarını arttırmış ve bunun sonucunda lipid peroksidasyonunu meydana getirmiştir. Diğer tarafta hem PH yapıp CCl<sub>4</sub> uygulanan hem de PH yapılmayıp CCl<sub>4</sub> uygulanan gruplara NAC tedavisi verildiğinde MDA seviyesinde, anlamlı düşüş gözlemlendi. Bu durum lipid peroksidasyonunun, NAC tedavisi tarafından engellendiğini gösterir. Yine yapılan çalışmalarda, CCl<sub>4</sub> uygulanması süresince NAC verilmesi, karaciğer nekrozunu engelleyebildiği, CCl<sub>4</sub> reaktif metabolitlerinin kovalent bağlarını kısmen azalttığı ve lipid peroksidasyonunda artışı düşürdüğü rapor edilmiştir (143). Benzer şekilde 10 haftalık uzun vadeli sıçan CCl<sub>4</sub> intoksikasyonu deneysel modelinde; CCl<sub>4</sub> uygulanmasından 7 gün önce başlanan NAC'ın (150 mg/kg), karaciğer malondialdehit oluşumunu inhibe ettiği gösterilmiştir (146). Ayrıca PH yapılan ve PH yapılmayan her iki ana grubun kontrol grupları MDA seviyeleri bakımından karşılaştırıldığında rejenerasyon grupta istatistiksel olarak anlamlı bir artış görülmektedir. Bu tablo rejenerasyonun MDA seviyelerini ve lipid peroksidasyonunu artırdığını gösterebilir. Ayrıca sham kontrol grubu ile PH yapılmayan kontrol grubu arasında istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık bulunmaması cerrahi işlemin MDA seviyeleri üzerine etkisinin olmadığını gösterebilir.

PC içeriği protein oksidasyonunda kullanılan en yaygın göstergedir (147). PC türlerinin kullanımı, diğer oksidasyon ürünlerinin ölçümü ile kıyaslandığında göreceli erken oluşmaları ve karbonile proteinlerin stabiliteleri nedeniyle bazı avantajlar içermektedir. Alzheimer hastalığı, romatoit artrit, diyabet, sepsis, kronik renal yetmezlik ve respiratuvar distres sendromu gibi birçok hastalıkta PC miktarlarının artmış olduğu rapor edilmiştir (148). PC türleri erken oluşurlar ve hastaların kanında uzun periyotlarla sirküle olurlar. Serumdaki yüksekliği en az 4

saat stabil kalır (149). Protein oksidasyonu PC'de artış ve protein tiyol gruplarında düşüş ile karakterizedir (150). Bu bağlamda radikallerin yol açtığı protein oksidasyonu polipeptit zincirin kırılmasına, amino asit yan zincirlerinin oksidasyonuna ve protein-protein çapraz bağlantıların oluşumuna neden olur (151). Karbonil grupları (aldehit ve ketonlar) protein yan zincirleri üzerinde üretilirler (147). PC türlerinin oluşumu hemen hemen tüm reaktif oksijen türleri tarafından indüklenebilir (152). Hücrel oksidatif hasar SOR'un üretim ve temizlenme sistemleri arasındaki denge bozulup üretim yönünde artış gösterince gelişebilir (153). Süperoksit ( $O_2^-$ ), hidroksil (OH), peroksil ( $RO_2^-$ ), alkoksil ( $RO^-$ ), hidroperoksil ( $HO_2$ ) gibi radikal türlerin ve hidrojen peroksit ( $H_2O_2$ ), hipoklorik asit (HOCl), ozon ( $O_3$ ), singlet oksijen ( $^1O_2$ ), peroksinitrit ( $ONOO^-$ ) gibi nonradikal türlerin dahil olduğu reaktif oksijen türleri protein oksidasyonuna yol açarlar (154). Ayrıca karbonhidrat ve lipid yapılarının oksidasyonu sonucu ortaya çıkan reaktif karbonil bileşikleri (RCOs) de protein modifikasyonlarına yol açmaktadır (155). Reaktif karbonil gruplarının oluşumu, SOR'ların birçok formu tarafından indüklenmiş hücrel hasarı yansıtır ve proteinlerin oksidatif modifikasyonunun majör göstergesidir (156). Yapılan çalışmalardan Mimic-Oka ve ekibi protein SH gruplarının düşüşünü lipid peroksit radikallerinin ve MDA gibi yıkım ürünlerinin birikimi sonucu proteinlerin oksidasyonuna bağlamışlardır (157). Aynı zamanda yüksek seviyede PC'nin tespiti genellikle oksidatif stresin ya da protein disfonksiyonunun işaretidir (152). Karbonil oluşumu aktif proteinlerin enzimatik olarak inaktivasyonuna da yol açabilirler. PC içeriği, protein oksidasyonunun bir ürünüdür (158). Protein oksidasyonu, protein disfonksiyonu ve hastalıklar arasındaki ilişki henüz yeterince aydınlatılamamıştır. Fakat enzimlerin ve yapısal proteinlerin oksidatif modifikasyonu hastalıkların etiolojisinde önemli bir rol oynayabilir (159).

Çalışmamızda karaciğerde oksidatif hasarın bir göstergesi olarak protein karbonil oluşumunu değerlendirdik. PC içeriği hem PH'den sonra  $CCl_4$  hem de PH yapılmayan  $CCl_4$  gruplarında kendi kontrol grupları ile kıyaslandığında anlamlı olarak daha yüksek olduğu tespit edildi. Miyata ve ekibi bunun mekanizmasının iki şekilde olabileceğini bildirmişlerdir. Birincisi oksidatif strese bağlı olarak bunların oluşumunun artması ikincisi ise detoksifikasyonunun azalmasıdır (155). Diğer taraftan hem PH'den sonra  $CCl_4$  hem de PH yapılmayan  $CCl_4$  gruplarına NAC

tedavisi verildiğinde artmış protein karbonil gruplarının seviyesinde anlamlı düşüş gözlemlendi. Bu durumda NAC'ın uygulamasıyla artmış protein karbonil gruplarının seviyesinin düştüğü ve düşmüş protein -SH düzeylerini arttırarak antioksidan etkinin artmasına yardımcı olduğu söylenebilir. Ayrıca PH yapılan ve PH yapılmayan her iki ana grubun kontrol grupları PC gruplarının seviyeleri bakımından karşılaştırıldığında rejenerere grupta istatistiksel olarak anlamlı bir artış görülmektedir. Bu durumda rejenerasyonla PC gruplarının seviyeleri artmış olabilir. Diğer taraftan sham kontrol grubu ile PH yapılmayan kontrol grubu arasında istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık bulunmaması cerrahi işlemin PC gruplarının seviyeleri üzerine etkisinin olmadığını gösterebilir.

Antioksidan aktivite ve serbest radikal üretiminin inhibisyonu karaciğeri  $CCl_4$ 'ün indüklediği hasardan koruma sürecinde oldukça önemlidir. Deney sonuçlarımıza göre NAC serbest radikalleri temizleme aktivitesini  $CCl_4$  metabolizması sırasında oluşturulan SOR'ları temizleyerek göstermiştir. Aynı zamanda bu durum NAC'ın sıçanlarda  $CCl_4$ 'ün indüklediği hepatik hasar üzerine potansiyel bir hepatoprotektif aktiviteye sahip olduğunu gösterilebilir. NAC'ın uygulanmasıyla  $CCl_4$  reaktif metabolitlerin kovalent bağlarının kısmen azalması, serbest radikallerin temizlenmesi, antioksidan aktivitenin artışı, glutasyon seviyesinin artışı ve lipid peroksidasyonunun inhibisyonu hepatosellüler hasarın azaldığının bir göstergesi olabilir.

Çalışmamızın sonuçlarından da görüleceği gibi karaciğer dokusunda  $CCl_4$  uygulanan gruplara NAC tedavisi belirgin olarak oksidan/antioksidan tabloyu olumlu yönde değiştirmiştir. Kısacası NAC total intrasellüler -SH deposunun yenilenmesini ve GSH konsantrasyonunda artışı sağlamıştır. Diğer taraftan toksik metabolitlere karşı detoksifiye sistemini sürdürmüş ve potansiyel bir antioksidan aktiviteye sahip olduğunu göstermiştir. Bu durum dolaylı olarak NAC tedavisinin  $CCl_4$ 'ün oluşturduğu hasarı belirgin olarak geriletmediği ve koruyucu etkide bulunduğunu gösteren bir diğer önemli bulgudur.

Sonuç olarak, karaciğerde  $CCl_4$  uygulanması hem PH yapılan hem de yapılmayan gruplarda lipid peroksidasyonunu ve PC oluşumunu artırarak doku hasarı oluşturmuştur. Aynı zamanda bu süreç antioksidan enzim aktivitelerinin azalması ile neticelenmiştir. NAC uygulanması ise bu süreçten sonra karaciğer dokusundaki



artmış MDA ve PC gruplarının seviyesini düşürmüştür. Diğer taraftan NAC antioksidan enzim aktivitelerini (SOD, CAT, GSH-Px) ve GSH seviyesini artırıp lipid peroksidasyonunu düşürerek hasarı önlemede katkısı olduğunu göstermiştir. PH yapılan rejenere karaciğer sahip ve PH yapılmayan normal karaciğere sahip ana grupların alt grupları karşılaştırılarak rejenerasyonun CAT, SOD enzim aktiviteleri üzerine olumsuz etkisinin olduğu ve PC gruplarını, MDA seviyelerini, lipid peroksidasyonunu arttırdığı tespit edilmiştir. Sham kontrol grubu ile PH yapılmayan kontrol grubu arasında istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık bulunmaması cerrahi işlemin enzim aktiviteleri ve MDA, GSH, PC gruplarının seviyeleri üzerine etkisinin olmadığını gösterebilir. Kısacası yaptığımız çalışma, rejenere karaciğere sahip grubun hepatotoksik ajanlara duyarlılığı konusunda bazal verilerin oluşmasına katkı sağlayabilir. Ayrıca rejenere karaciğerin hepatotoksik ajanlara duyarlılığında bir artış olmaması; gönüllülerin verici olma kararlarını olumlu etkileyebilir. Böylece hem toplumun hem de sağlık çalışanlarının henüz bilgi birikiminin yeterli olmadığı bir konuda bilinçlenmesini sağlayabilir.

## 6. SONUÇ VE ÖNERİLER

Bu çalışmada sağlıklı karaciğer donörlerinin PH sonrasında hepatotoksik ajanlara duyarlılığında ve rejenere karaciğerin hepatotoksik ajanlara maruziyeti durumunda, rejenere olmamış karaciğere sahip olanlara göre antioksidanların koruyucu etkisinde değişiklik olup olmadığını deneysel hayvan modeli ile araştırmayı amaçladık.

Sonuçlarımıza göre PH sonrası rejenere karaciğerde ve PH yapılmayan gruplarda CCl<sub>4</sub> toksisitesine karşı NAC'ın uygulanmasıyla serbest radikallerin temizlenmesi, antioksidan aktivitenin artışı, glutatyon seviyesinin artışı, lipid peroksidasyonunun inhibisyonu ve protein karbonil gruplarının oluşumunun engellenmesi sağlanarak NAC'ın, hepatosellüler hasarın önlenmesinde katkısı olduğu gösterilmiştir. Ayrıca, %70 PH sonrası rejenere karaciğerde ve PH yapılmayan grupların karaciğer dokularında CCl<sub>4</sub> uygulanan gruplara NAC tedavisi belirgin olarak oksidan/antioksidan tabloyu olumlu yönde değiştirmiş, lipid peroksidasyonunun inhibisyonu ve protein karbonil gruplarının oluşumunu engellemiştir. Bu durum %70 PH sonrası rejenere karaciğerde ve PH yapılmayan grupların karaciğer dokularında NAC tedavisinin CCl<sub>4</sub>'ün oluşturduğu hasarı belirgin olarak geriletmiş ve koruyucu etkide bulunduğunu gösterebilir. Diğer taraftan PH yapılan rejenere karaciğere sahip ve PH yapılmayan normal karaciğere sahip ana grupların alt grupları karşılaştırılarak rejenerasyonun CAT, SOD enzim aktiviteleri üzerine olumsuz etkisinin olduğu ve PC gruplarını, MDA seviyelerini, lipid peroksidasyonunu artırdığı tespit edilmiştir. Aynı zamanda sham kontrol grubu ile PH yapılmayan kontrol grubu arasında istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık bulunmaması cerrahi işlemin enzim aktiviteleri ve MDA, GSH, PC gruplarının seviyeleri üzerine etkisinin olmadığını gösterebilir.

Sonuç olarak elde edilen bulgular, PH sonrası rejenere karaciğer dokusunda oksidasyon ürünlerinde artış olabileceğini göstermektedir. Rejenere karaciğerdeki oksidasyon ürünlerindeki bu artış PH sonrası mitotik aktiviteyle birlikte artan oksidan madde artışına bağlı olabilir. Ancak bu sonuçlar, rejenere karaciğer dokusunun CCl<sub>4</sub> toksisitesine duyarlılığında ve NAC'ın koruyuculuğunda herhangi bir değişiklik olmayabileceğine işaret etmektedir. Rejenere karaciğerin hepatotoksik

ajanlara duyarlılığında bir artış olmaması; gönüllülerin verici olma kararlarını olumlu etkileyebilir. Kısacası yaptığımız çalışma, rejenere karaciğere sahip grubun hepatotoksik ajanlara duyarlılığı konusunda bazal verilerin oluşmasına katkı sağlayabilir. Böylece hem toplumun hem de sağlık çalışanlarının henüz bilgi birikiminin yeterli olmadığı bir konuda bilinçlenmesini sağlayabilir. Fakat konunun tam olarak anlaşılabilmesi için daha çok zaman bağımlı çalışmaların yapılmasına ihtiyaç vardır. Dolayısıyla deneysel hayvan modelleri doğrudan klinik uygulamalara uyarlanmasa da çalışmamızın sonuçları bu konuda ışık tutabilir. NAC'ın bu çalışmada olduğu gibi deneysel hayvan modellerinde ortaya konulan bu koruyucu etkisinin, klinik bazı uygulamalar için cesaret verici olduğu söylenebilir.

## 7. KAYNAKLAR

1. Junqueira, L., Carnerio, J., Kelley, O. R. (1993). *Temel Histoloji* (393). Barış Kitabevi.
2. Rozga, J. (2001). Animal models of liver regeneration. In: Souba WW, Wilmore DW, editors. *Surgical Research* (703-7). San Diego: Academic Pres.
3. Fausto, N. (2001). Liver regeneration: from laboratory to clinic. *Liver Transpl*, 7, 835-44.
4. Martins, P.N., Theruvath, T.P., Neuhaus, P. (2007). Rodent models of partial hepatectomies. *Liver Int.* 28(1), 3-11.
5. Fausto, N., Riehe, K.J. (2005). Mechanisms of liver regeneration and their clinical implications. *J Hepatobiliary Pancreat Surg* 12, 181-9.
6. Wu, J., Danielsson, A., Zern, MA., (1999). Toxicity of hepatotoxins: new insights into mechanisms and therapy. *Expert Opin Investig Drugs*, 8, 585-607.
7. Lee, K.J., Choi, J.H., Jeong, H.G., (2007). Hepatoprotective and antioxidant effects of the coffee diterpenes kahweol and cafestol on carbon tetrachloride-induced liver damage in mice. *Food Chem Toxicol*, 45, 2118-2125.
8. Weber, L.W., Boll, M., Stampfl, A. (2003). Hepatotoxicity and mechanism of action of haloalkanes: carbon tetrachloride as a toxicological model. *Crit Rev Toxicol*, 33(2), 105-36.
9. Howard, R.J., Blake, D.R., Pall, H., Williams, A., Green, I.D. (1987). Allopurinol/N-acetylcysteine for carbon monoxide poisoning. *Lancet*, 2, 628-629.
10. Majano, P.L., Medina, J., Zubia, I., Sunyer, L., Lara-Pezzi, E., Maldonado-Rodriguez, A., Lopez-Cabrera, M., Moreno-Otero, R. (2004). N-Acetylcysteine modulates inducible nitric oxide synthase gene expression in human hepatocytes. *J Hepatol.* 40, 632-637.
11. Tahan, G., Tarcin, O., Tahan, V., Eren, F., Gedik, N., Sahan, E., Biberoglu, N., Guzel, S., Bozbas, A., Tozun, N., Yucel, O. (2007). The effects of N-

- Acetylcysteine on bile duct ligation–induced liver fibrosis in rats. *Dig Dis Sci.* 52, 3348-3354.
12. Van Eyken, P., Desmet, V.J. (1993). Cytokeratins and the Liver. *Liver*, 13, 113-22.
  13. Sherlock, S., Dooley, J. (2002). *Diseases of the Liver and Biliary System* (11. bs.) Milan: Blackwell Science.
  14. Bioulac-Sage, P., Lafon, M.E., Saric, J., Balabaud, C. (1990). Nerves and perisinusoidal cells in human liver. *J Hepatol*, 10, 105-12.
  15. Liver (anatomy) - Britannica Online Encyclopedia. Erişim: 12 Ekim 2009, <http://www.britannica.com/EBchecked/topic-art/344579/68633/Anterior-and-posterior-views-of-the-liver>.
  16. Liver, Gall Bladder (mouse only). Erişim: 12 Ekim 2009, [http://www.item.fraunhofer.de/reni/trimming/img1/liver\\_m1.jpg](http://www.item.fraunhofer.de/reni/trimming/img1/liver_m1.jpg)
  17. Van Leeuwen, M.S., Noordzij, J., Fernandez, M.A., Hennipman, A., Feldberg, M.A., Dillon, E.H. (1994). Portal venous and segmental anatomy of the right hemiliver: observations based on three-dimensional spiral CT renderings. *AJR Am J Roentgenol.* 163, 1395-404.
  18. Schroder, R., Muller, O., Bircher, J. (1985). The portacaval and splenocaval shunt in the normal rat. A morphometric and functional reevaluation. *J Hepatol* 1, 107-123.
  19. Bioulac-Sage, P., Le Bail, B., Balaboud, C. (2007). Liver and biliary tract histology. J. Rodes, J.P. Benhamou, A.T. Blei, J. Reichen, M. Rizzetto. (Ed). *Textbook of Hepatology* (s. 9-19). Singapore: Blackwell Publishing.
  20. Digestive System. Erişim:12 Ekim 2009, <http://www.mc.vanderbilt.edu/histology/labmanual2002/labsection3/PancreasLiverGallbladder03.htm>
  21. Wake, K. (1995). Structure of the sinusoidal wall in the liver. In E,Wisse. D.L., Knook. K, Wake. (Ed). *Cells of the Hepatic Sinusoid*. Leiden:Kupffer Cell Foundation (s. 241-246).
  22. Enomoto, K., Nishikawa, Y., Omori, Y., Tokairin, T., Yoshida, M., Ohi, N., Nishimura, T., Yamamoto, Y., Li, Q. (2004). Cell biology and pathology of liver sinusoidal endothelial cells. *Med Electron Microsc.* 37, 208-215.

23. Naito, M., Hasegawa, G., Ebe, Y. Yamamoto, T. (2004). Differentiation and function of Kupffer cells. *Med Electron Microsc.* 37, 16-28.
24. Li, D., Friedman, S. (2001) Hepatik stellate cells:morphology, function, and regulation in the liver. In: I.M. Arias, J.L. Boyer, F.V. Chisari (Ed.). *The Liver. Biology and Pathobiology*, (4. bs.) 455-473, New York:Raven Press.
25. Burtis, Carl.A., Ashwood, Edward.R.(2005). *Tietz Klinik Kimyada Temel İlkeler.* (D. Aslan, Çev.).(5. bs.) Palme Yayıncılık.
26. Tolman, KG., REJ, R. (1999). Liver Function. In CA, Burtis., ER, Ashwood. (Ed.). *Tietz Textbook of Clinical Chemistry*, 3. bs., 1125-1157. Philadelphia: WB Saunders.
27. Higgins, G.M., Anderson, R.M. (1931) Experimental pathology of the liver. I:restoration of the liver of the white rat following partial surgical removal. *Arch Pathol*, 12, 186-202.
28. Palmes, D., Spiegel, H.U. (2004). Animal models of liver regeneration. *Biomaterials.* 25, 1601-1611.
29. Sakamoto, T., Ezure, T., Lunz, J., Murase, N., Tsuji, H., Fung, J.J., Demetris, A.J. (2000) Concanavalin A simultaneously primes liver hematopoietic and epithelial progenitor cells for parallel expansion during liver regeneration after partial hepatectomy in mice. *Hepatology.* 32, 256-267.
30. Martins, P.N., Neuhaus, P. (2007) Surgical anatomy of the liver, hepatic vasculature and bile ducts in the rat. *Liver Int.* 27, 384-392.
31. Lorente, L., Aller, M.A., Rodriguez, J. (1995) Surgical anatomy of the liver in Wistar rats. *Surg Res Comm.* 17, 113-121.
32. Emond, J.C., Renz, J.F., Ferrell, L.D., Rosenthal, P., Lim, R.C., Reberts, J.P., Lake, J.R., Ascher, N.L. (1996) Functional analysis of grafts from living donors. Implications for the treatment of older recipients. *Ann Surg.* 224, 544-552.
33. Zou, Y., Brandacher, G., Margreiter, R., Steurer, W. (2000) Cervical heterotopic arterialized liver transplantation in the Mouse. *J Surg Res.* 93, 97-100.
34. Madrahimov, N., Dirsch, O., Broelsch, C., Dahmen, U. (2006) Marginal hepatectomy in the rat: from anatomy to surgery. *Ann Surg.* 244, 89-98.

35. Fausto, N., Webber, E.M. (1994). Liver regeneration. I, Arias., J, Boyer., N, Fausto., W, Jakoby., D, Schacter., D, Shafritz. *The Liver Biology and Pathobiology*. (1059-1084) New York: Raven Press.
36. Bucher, N.L. (1963). Regeneration of mammalian liver. *Int Rev Cytol*. 15, 245-300.
37. Marcos, A., Fisher, R.A., Ham, J.M., Shiffman, M.L., Sanyal, A.J., Luketic, V.A., Sterling, R.K., Fulcher, A.S., Posner, M.P. (2000). Liver regeneration and function in donor and recipient after right lobe adult to adult living donor liver transplantation. *Transplantation*. 69, 1375-1379.
38. Fausto, N., Campbell, J.S. (2003). The role of hepatocytes and oval cells in liver regeneration and repopulation. *Mech Dev*. 120, 117-130.
39. Overturf, K., al-Dhalimy, M., Ou, C.N., Finegold, M., Grompe, M. (1997). Serial transplantation reveals the stem-cell-like regenerative potential of adult mouse hepatocytes. *Am J Pathol*. 151, 1273-1280.
40. Weglarz, T.C., Sandgren, E.P. (2000). Timing of hepatocyte entry into DNA synthesis after partial hepatectomy is cell autonomous. *Proc Natl Acad Sci USA*. 97, 12595-600.
41. Farber, J.L., El-Mofty, S.K. (1975). The biochemical pathology of liver cell necrosis. *Am J Pathol*. 81, 237-250.
42. Dabeva, M.D., Shafritz, D.A. (1993). Activation, proliferation, and differentiation of progenitor cells into hepatocytes in the D-galactosamine model of liver regeneration. *Am J Pathol*. 143, 1606-1620.
43. Matsumoto, K., Nakamura, T. (1996). Emerging multipotent aspects of hepatocyte growth factor. *J Biochem*. 119, 591-600.
44. Michalopoulos, G.K. (2007). Liver regeneration. *J Cell Physiol*. 213, 286-300.
45. Michalopoulos, G., Houck, K.A., Dolan, M.L., Leutteke, N.C. (1984). Control of hepatocyte replication by two serum factors. *Cancer Res*. 44, 4414-4419.
46. Lindroos, P.M., Zarnegar, R., Michalopoulos, G.K. (1991). Hepatocyte growth factor (hepatopoietin A) rapidly increases in plasma before DNA

- synthesis and liver regeneration stimulated by partial hepatectomy and carbon tetrachloride administration. *Hepatology*. 13, 743-750.
47. Pediaditakis, P., Lopez-Talevera, J.C., Peterson, B., Monga, S.P., Michalopoulos, G.K. (2001). The processing and utilization of hepatocyte growth factor/scatter factor following partial hepatectomy in the rat. *Hepatology*. 34, 688-693.
  48. Block, G.D., Locker, J., Bowen, W.C., Petersen, B.E., Katyal, S., Strom, S.C., Riley, T., Howard, T.A., Michalopoulos, G.K. (1996). Population expansion, clonal growth, and specific differentiation patterns in primary cultures of hepatocytes induced by HGF/SF, EGF and TGF alpha in a chemically defined (HGM) medium. *J Cell Biol*. 132, 1133-1149.
  49. Liu, M.L., Mars, W.M., Zarnegar, R., Michalopoulos, G.K. (1994). Collagenase pretreatment and the mitogenic effects of hepatocyte growth factor and transforming growth factor-alpha in adult rat liver. *Hepatology*. 19, 1521-1527.
  50. Schirmacher, P., Geerts, A., Jung, W., Pietrangelo, A., Rogler, C.E., Dienes, H.P. (1993). The role of Ito cells in the biosynthesis of HGF-SF in the liver. *Exs*. 65, 285-299.
  51. LeCouter, J., Moritz, D.R., Li, B., Phillips, G.L., Liang, X.H., Gerber, H.P., Hillan, K.J., Ferrara, N. (2003). Angiogenesis-independent endothelial protection of liver: Role of VEGFR-I. *Science*. 299, 890-893.
  52. Skov Olsen, P., Boesby, S., Kirkegaard, P., Therkelsen, K., Almdal, T., Poulsen, S.S., Nexø, E. (1998). Influence of epidermal growth factor on liver regeneration after partial hepatectomy in rats. *Hepatology*. 8, 992-996.
  53. Olsen, P.S., Poulsen, S.S., Kirkegaard, P., (1985). Adrenergic effects on secretion of epidermal growth factor from Brunner's glands. *Gut*. 26, 920-927.
  54. Bucher, N.L., Patel, U., Cohen, S. (1977). Hormonal factors concerned with liver regeneration. *Ciba Found Symp*. 55, 95-107.
  55. Kirillova, I., Chaisson, M., Fausto, N. (1999). Tumor necrosis factor induces DNA replication in hepatic cells through nuclear factor kappaB activation. *Cell Growth Differ*. 10, 819-828.



56. Webber, E.M., Bruix, J., Pierce, R.H., Fausto, N. (1998). Tumor necrosis factor primes hepatocytes for DNA replication in the rat. *Hepatology*. 28, 1226-1234.
57. Mead, J.E., Fausto, N. (1989). Transforming growth factor alpha may be a physiological regulator of liver regeneration by means of an autocrine mechanism. *Proc Natl Acad Sci USA*. 86, 1558-1562.
58. Aaronson, S.A., Rubin, J.S., Finch, P.W., Wong, J., Marchese, C., Falco, J., Taylor, W.G., Kraus, M.H. (1990). Growth factor-regulated pathways in epithelial cell proliferation. *Am Rev Respir Dis*. 142, 7-10.
59. Northemann, W., Hattori, M., Baffet, G., Braciak, T.A., Fletcher, R.G., Abraham, L.J., Gauldie, J., Baumann, M., Fey, G.H. (1990). Production of interleukin 6 by hepatoma cells. *Mol Biol Med*. 7, 273-285.
60. Liu, Z., Sakamoto, T., Ezure, T., Yokomuro, S., Murase, N., Michalopoulos, G., Demetris, A.J. (1998). Interleukin-6, hepatocyte growth factor, and their receptors in biliary epithelial cells during a type I ductular reaction in mice: Interactions between the periductal inflammatory and stromal cells and the biliary epithelium. *Hepatology*. 28, 1260-1268.
61. Nozaki, I., Lunz, J.G.3rd., Specht, S., Stolz, D.B., Taguchi, K., Subbotin, V.M., Murase, N., Demetris, A.J. (2005). Small proline-rich proteins 2 are noncoordinately upregulated by IL-6/STAT3 signaling after bile duct ligation. *Lab Invest*. 85, 109-123.
62. Cruise, J.L., Houck, K.A., Michalopoulos, G.K. (1985). Induction of DNA synthesis in cultured rat hepatocytes through stimulation of alpha 1 adrenoreceptor by norepinephrine. *Science*. 227, 749-751.
63. Cruise, J.L., Knechtle, S.J., Bollinger, R.R., Kuhn, C., Michalopoulos, G. (1987). Alpha 1-adrenergic effects and liver regeneration. *Hepatology*. 7, 1189-1194.
64. Bucher, N.L., (1976). Insulin, glucagon, and the liver. *Adv Enzyme Regul*. 15, 221-230.
65. Carbontetrachloride. Erişim: 08 Aralık 2009, [http://en.wikipedia.org/wiki/Carbon\\_tetrachloride](http://en.wikipedia.org/wiki/Carbon_tetrachloride)'den adapte edilmiştir.

66. Hsu, Y.W., Tsai, C.F., Chang, W.H., Ho, Y.C., Chen, W.K., Lu, F.J. (2008). Protective effect of *Dunaliella salina*-a carotenoids-rich alga, against carbon tetrachloride-induced hepatotoxicity in mice. *Food Chem Toxicol.* 46, 3311-3317.
67. İliçin, G., Biberöglu, K., Süleymanlar, G., Ünal, S. (2005). *İç hastalıklar*. Ankara: Güneş Kitabevi.
68. Asetilsistein. Erişim:14 Aralık 2009, <http://tr.wikipedia.org/wiki/Asetilsistein>.
69. Asetilsistein. Erişim: 14 Aralık 2009 <http://www.genesis.gen.tr/mentopin/mentopros.htm>.
70. N-Asetilsistein. Erişim: 14 aralık 2009, <http://www.sifalibitkilervedogal tedavi.com/aminoasitler/Sistein.html>
71. Gürdöl, F., Ademoğlu, E. (2006). Serbest radikaller ve oksidatif stres. *Biyokimya*. İstanbul: Nobel Tıp Kitabevi.
72. Halliwell, B., Gutteridge, J.M.C. (2001). Free radicals in biology and medicine, Third edition, *Oxford Science Publications*, 22-24.
73. Altan, N., Dinçel, A.S., Koca, C. (2006). Diabetes mellitus and oxidative stress. *Turk J Biochem.* 31 (2), 51-56.
74. Babior, B.M. (2000). Phagocytes and oxidative stress. *Am J Med.* 109 (1), 33-44.
75. Serafini, M., Del Rio, D. (2004). Understanding the association between dietary antioxidants, redox status and disease: is the total Antioxidant Capacity the right tool?. *Redox Rep.* 9 (3), 145-152.
76. Aleynik, S.I., Leo, M.A., Ma, X., Aleynik, M.K., Lieber, C.S. (1997). Polyenylphosphatidylcholine prevents carbon tetrachloride-induced lipid peroxidation while it attenuates liver fibrosis. *J Hepatol.* 27, 554-561.
77. Yılmaz S., Bahçecioğlu, İ.H. (2000). Karbontetraklorür ile siroz oluşturulmuş ratlarda lipid peroksidasyonu, antioksidant enzim ve pirüvat kinaz aktiviteleri. *Turk J Vet Anim Sci.* 24, 25-28.
78. Young, I.S., Woodside, J.V. (2001). Antioxidants in health and disease. *J Clin Pathol.* 54, 176-186.
79. Memişoğulları, R. (2005). Diyabette Serbest radikallerin rolü ve antioksidanların etkisi. *Düzce Tıp Fakültesi Dergisi.* 3, 30-39.

80. Stadtman, E.R., Levine, R.L. (2003). Free radical-mediated oxidation of free amino acids and amino acid residues in proteins. *Amino Acids*. 25, 207-218.
81. Gülbahar, Ö. (2007). Protein oksidasyonunun mekanizması, önemi ve yaşlılıkla ilişkisi. *Turkish J Geriatrics*.10(1), 43-48.
82. Grandhee, S.K., Monnier, V.M. (1991). Mechanism of formation of the Maillard protein cross-link pentosidine. Glucose, fructose, and ascorbate as pentosidine precursors. *J Biol Chem*. 266, 11649-11653.
83. Kayalı, R., Çakatay, U. (2004). Protein oksidasyonunun ana mekanizmaları. *Cerrahpaşa J Med*. 35, 83-89.
84. Halliwell, B. (1995). Antioxidant characterization. Methodology and mechanism. *Biochem Pharmacol*. 49(10), 1341-1348.
85. Cherubini, A., Ruggiero, C., Polidori, M.C., Mecocci, P. (2005). Potential markers of oxidative stress in stroke. *Free Radic Biol Med*. 39, 841-852.
86. Antioksidanlar. (Bitirme Ödevi). Erişim: 31 aralık 2009. <http://www.zayim.com/?tag=ozellikleri>.
87. Murray, R.K., Granner, D.K., Mayes, P.A., Rodwell, V.W. (2004). *Harper Biyokimya* (25.bs.). (N. Dikmen, T. Özgünen, Çev.). İstanbul: Nobel Tıp Kitabevi.
88. Akkuş, I., Kalak, S., Vural, H., Çağlayan, O., Menekşe, E., Can, G., Durmuş, B. (1996). Leukocyte lipid peroxidation, superoxide dismutase, glutathione peroxidase and serum and leukocyte vitamin C levels of patients with type II diabetes mellitus. *Clin Chim Acta*. 244, 221-227.
89. Glutasyon. Erişim: 31 aralık 2009. [http://www.odevarsivi.com/dosya.asp?islem=gor&dosya\\_no=145696](http://www.odevarsivi.com/dosya.asp?islem=gor&dosya_no=145696).
90. Yao, X.M., Zhao, J., Li, Y., Li, Y. (2009). Effects of Bicyclol on liver regeneration after partial hepatectomy in rats. *Dig Dis Sci*. 54(4), 774-81.
91. Sun, Y., Oberley, L.W., Li, Y. (1988). A simple method for clinical assay of superoxide dismutase. *Clin Chem*. 34, 497-500.
92. Durak, I., Yurtaslani, Z., Canbolat, O., Akyol, O. (1993). A methodological approach to superoxide dismutase activity assay based on inhibition of nitroblue tetrazolium (NBT) reduction. *Clin Chim Acta*. 214, 103-104.

93. Aebi, H. (1974). Catalase. In: Bergmeyer HU (ed). Methods of enzymatic analysis. *Academic pres*: New York and London. 673-677.
94. Paglia, D.E., Valentine, W.N. (1967). Studies on the quantitative and qualitative characterization of erythrocyte glutathione peroxidase. *J Lab Clin Med.* 70, 158-169.
95. Lowry, O.H., Rosebrough, N.J., Farr, A.L., Randall, R.J. (1951). Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J Biol Chem.* 193, 265-75.
96. Esterbauer, H., Cheeseman, K.H. (1990). Determination of aldehydic lipid peroxidation products: malonaldehyde and 4-hydroxynonenal. *Methods Enzymol.* 186, 407-21.
97. Levine, R.L., Williams, J.A., Stadtman, E.R., Shacter, E. (1994). Carbonyl assays for determination of oxidatively modified proteins. *Methods Enzymol.* 233, 346-57.
98. Elman, G.L. (1979). Tissue sulphhydryl groups. *Arch Biochem Biophys.* 95, 351-358.
99. Wintzer, H.O., Zipfel, I., Schulte-Mönting, J., von Hellrich, U., Kleist, S. (1991). Ki-67 immunostaining in human breast tumors and its relationship to prognosis. *Cancer.* 67(2), 421-428.
100. Uemoto, S., Inomata, Y., Sakurai, T. Egawa, H., Fujita, S., Kiuchi, T., Hayashi, M., Yasutomi, M., Yamabe, H., Tanaka, K. (2000). Living donor liver transplantation for fulminant hepatic failure. *Transplantation.* 70, 152-157.
101. Bolitho, G., Engelbrecht, G., Lotz, Z. Tyler, M., McLeod, H., Jaskiewicz, K., Hickman, R. (1993). Liver regeneration after hepatic ischemia and reduced liver autotransplantation in the rat. *Hepatology.* 17, 273-279.
102. Karaman, A., Kırımlıoğlu, H., Tas, E., Karadag, N., Gülsul, C., Fadilloğlu, E., Demircan, M. (2010). Effect of leflunomide on liver regeneration after partial hepatectomy in rats. *Pediatr Surg Int.* 26(2), 219-226.
103. Albright, C.D., Salganik, R.I., Craciunescu, C.N., Mar, M.H., Zeisel, S.H. (2003). Mitochondrial and microsomal derived reactive oxygen species mediate apoptosis induced by transforming growth factor-beta 1 in immortalized rat hepatocytes. *J Cell Biochem.* 89, 254-261.
104. Diehl, A.M. (2002). Liver regeneration. *Front Biosci.* 7, 301-314.

105. Delva, E., Camus, Y., Nordlinger, B., Hannoun, L., Parc, R., Deriaz, H., Lienhart, A., Huguet, C. (1989). Vascular occlusions for liver resections. Operative management and tolerance to hepatic ischemia: 142 cases. *Ann Surg.* 209, 211-218.
106. Michalopoulos, G.K., DeFrances, M.C. (1997). Liver regeneration. *Science.* 276, 60-66.
107. Alison, M.R. (1986). Regulation of hepatic growth. *Physiol Rev.* 66, 499-541.
108. Sakamoto, T., Liu, Z., Murase, N., Ezure, T., Yokomuro, S., Poli, V., Demetris, A.J. (1999). Mitosis and apoptosis in the liver of interleukin-6-deficient mice after partial hepatectomy. *Hepatology.* 29, 403-411.
109. Koniaris, L.G., McKillop, I.H., Schwartz, S.I., Zimmers, T.A. (2003). Liver regeneration. *J Am Coll Surg.* 197, 634-659.
110. Fabrikant, J.I. (1968). The kinetics of cellular proliferation in regenerating liver. *J Cell Biol.* 36, 551-65.
111. Zhang, B.H., Gong, D.Z., Mei, M.H. (1999). Protection of regenerating liver after partial hepatectomy from carbon tetrachloride hepatotoxicity in rats: role of hepatic stimulator substance. *J Gastroenterol Hepatol.* 14, 1010-1017.
112. Gerdes, J., Schwab, U., Lemke, H., Stein, H. (1983). Production of a mouse monoclonal antibody reactive with a human nuclear antigen associated with cell proliferation. *Int J Cancer.* 31(1), 13-20.
113. Scholzen, T., Gerdes, J. (2000). The Ki-67 protein: from the known and the unknown. *J Cell Physiol.* 182, 311-22.
114. Prasse, K.W., Bjorling, D.E., Holmes, R.A., Cornelius, L.M. (1983). Indocyanine green clearance and ammonia tolerance in partially hepatectomized and hepatic devascularized, anesthetized dogs. *Am J Vet Res.* 44, 2320-2323.
115. Nagayoshi, S., Kawashita, Y., Eguchi, S., Kamohara, Y., Takatsuki, M., Miyamoto, S., Mochizuki, S., Soyama, A., Tokai, H., Hidaka, M., Tajima, Y., Kanematsu, T. (2008). Metabolism for cyclosporin A during liver regeneration after partial hepatectomy in rats. *World J Gastroenterol.* 7, 6355-6359.

116. Maksimchik, Y.Z., Lapshina, E.A., Sudnikovich, E.Y. Zabrodskaya, S.V., Zavodnik, I.B. (2008). Protective effects of N-acetyl-L-cysteine against acute carbon tetrachloride hepatotoxicity in rats. *Cell Biochem Funct.* 26, 11-18.
117. Brautbar, N., Williams, J 2nd. (2002). Industrial solvents and liver toxicity: risk assessment, risk factors and mechanism. *Int J Hyg Environ Health.* 205, 479-491.
118. Tomasi, A., Albano, E. Banni, S., Batti, B., Corongiu, F., Dessi, M.A., Iannone, A., Vannini, V., Dianzani, M.U. (1987). Free-radical metabolism of carbon tetrachloride in rat liver mitochondria. A study of the mechanism of activation. *Biochem J.* 246, 313-17.
119. Zavodnik, L.B., Zavodnik, I.B., Lapshina, E.A. Belonovskaya, E.B., Martinchik, D.I., Kravchuk, R.I., Bryszewska, M., Reiter, R.J. (2005). Protective effects of melatonin against carbon tetrachloride hepatotoxicity in rats. *Cell Biochem Funct.* 23, 353-359.
120. Ugazio, G., Danni, O., Milillo, P., Burdino, E., Congiu, A.M. (1982). Mechanism of protection against carbon tetrachloride toxicity. I. Prevention of lethal effects by partial surgical hepatectomy. *Drug Chem Toxicol.* 5, 115-24.
121. Decker, K., Kepler, D. (1972). Galactosamine induced liver injury. *Prog Liver Dis.* 4, 183-199.
122. Mei, M.H., An, W., Zhang, B.H., Shao, Q., Gong, D.Z. (1993). Hepatic stimulator substance protects against acute liver failure induced by carbon tetrachloride poisoning in mice. *Hepatology.* 17, 638-44.
123. Kelly, G.S., (1998). Clinical applications of N-acetylcysteine. *Altern Med Rev.* 3, 114-127.
124. Weinbroum, A.A., Rudick, V., Ben-Abraham, R., Karchevski, E. (2000). N-acetyl-L-cysteine for preventing lung reperfusion injury after liver ischemia-reperfusion: A possible dual protective mechanism in a dose-response study. *Transplantation.* 69, 853-859.
125. Koo, A., Komatsu, H., Tao, G., Inoue, M., Guth, P.H., Kaplowitz, N. (1992). Contribution of no-reflow phenomenon to hepatic injury after ischemia-reperfusion: evidence for a role for superoxide anion. *Hepatology.* 15, 507-514.

126. Aruoma, O.I., Halliwell, B., Hoey, B.M., Butler, J. (1989). The antioxidant action of N-acetylcysteine: its reaction with hydrogen peroxide, hydroxyl radical, superoxide and hypochlorous acid. *Free Radic Biol Med.* 6, 593-597.
127. Cuzzocrea, S., Mazzon, E., Costantino, G., Serraino, I., De Sarro, A., Caputi, A.P. (2000). Effects of N-acetylcysteine in a rat model of ischemia and reperfusion injury. *Cardiovasc Res.* 47, 537-548.
128. Kharazmi, A., Nielsen, H., Schiotz, P.O. (1988). N-acetylcysteine inhibits human neutrophil and monocyte chemotaxis and oxidative metabolism. *Int J Immunopharmacol.* 10, 39-46.
129. Victor, V.M., De la Fuente, M. (2002). N-acetylcysteine improves in vitro the function of macrophages from mice with endotoxin-induced oxidative stress. *Free Radic Res.* 36, 33-45.
130. Devlin, J., Ellis, A.E., McPeake, J., Heaton, N., Wendon, J.A., Williams, R. (1997). N-Acetylcysteine improves indocyanine green extraction and oxygen transport during hepatic dysfunction. *Crit Care Med.* 25, 236-242.
131. Rank, N., Michel, C., Haertel, C., Lenhart, A., Welte, M., Meier-Hellmann, A. Spies, C. (2000). N-Acetylcysteine increases liver blood flow and improves liver function in septic shock patients: results of a prospective, randomized, double-blind study. *Crit Care Med.* 28, 3799-3807.
132. Regueira, F.M., Cienfuegos, J.A., Pardo, F., Hernandez, J.L., Diez-Cabellero, A., Sierra, A. Nwose, E., Espi, A., Barxauli, J., Rotellar, F. (1997). Improvement in early function of the hepatic graft after treatment of the donor with N-acetylcysteine: clinical study. *Transplant Proc.* 29, 3350-3352.
133. McKay, A. Cassidy, D., Sutherland, F., Dixon, E. (2008). Clinical results of N-acetylcysteine after major hepatic surgery: a review. *J. Hepatobiliary Pancreat Surg.* 15, 473-478.
134. Halliwell, B., Gutteridge, J.M., Cross, C.E. (1992). Free radicals, antioxidants and human disease: where are we now? *J Lab Clin Med.* 119, 598-620.
135. Llessuy, S.F. (2002). Introduccion y especies activas de oxigeno in estresse oxidativo e antioxidantes. *Canoas:ULBRA.* 21-31.

136. Mitchell, J.R., Jollow, D.J., Potter, W.Z., Gillette, J.R., Brodie, B.B. (1973). Acetaminophen-induced hepatic necrosis. IV. Protective role of glutathione. *J Pharmacol Exp Ther.* 187, 211-217.
137. Vendemiale, G., Grattagliano, I., Caruso, M.L., Serviddio, G., Valentini, A.M., Pirrelli, M., Altomare, E. (2001). Increased oxidative stress in dimethylnitrosamine-induced liver fibrosis in the rat: effect of N-acetylcysteine and interferon-alpha. *Toxicol Appl Pharmacol.* 175, 130-139.
138. Mani, A.R., Ippolito, S., Ollosson, R., Moore, K.P. (2006). Nitration of cardiac proteins is associated with abnormal cardiac chronotropic responses in rats with biliary cirrhosis. *Hepatology.* 43, 847-856.
139. Hammond, C.L., Lee, T.K., Ballatori, N. (2001). Novel roles for glutathione in gene expression, cell death and membrane transport of organic solutes. *J Hepatol.* 34, 946-954.
140. Recknagel, R.O., Glende Jr, E.A., Britton, R.S. (1991). Free radical damage and lipid peroxidation. In: Meeks, R.G. (Ed.), *Hepatotoxicology.* CRC Press, Florida. 401-436.
141. Williams, A.T., Burk, R.F. (1990). Carbon tetrachloride hepatotoxicity: an example of free radical-mediated injury. *Semin Liver Dis.* 10, 279-284.
142. Demir, S., Inal-Erden, M. (1998). Pentoxifylline and N-acetylcysteine in hepatic ischemia/reperfusion injury. *Clin Chim Acta.* 275, 127-135.
143. Valles, E.G., de Castro, C.R., Castro, J.A. (1994). N-acetylcysteine is an early but also a late preventive agent against carbon tetrachloride induced liver necrosis. *Toxicol Lett.* 71, 87-95.
144. Yang, Y.Y., Lee, K.C., Huang, Y.T., Wang, Y.W., Hou, M.C., Lee, F.Y., Lin, H.C., Lee, S.D. (2008). Effects of N-acetylcysteine administration in hepatic microcirculation of rats with biliary cirrhosis. *J Hepatol.* 49, 25-33.
145. Recknagel, R.O., Glende EA, Jr., Dolak, J.A., Waller, R.L. (1989). Mechanisms of carbon tetrachloride toxicity. *Pharmacol Ther.* 43, 139-154.
146. Ulicna, O., Greksak, M., Vancova, O. Zlatos, L., Galbavy, S., Bazek, P., Nakano, M. (2003). Hepatoprotective effect of rooibos tea (*Aspalathus linearis*) on CCl<sub>4</sub>-induced liver damage in rats. *Physiol Res.* 52, 461-466.



147. Berlett, B.S., Stadtman, E.R. (1997). Protein oksidation in aging, disease and oxidative stress. *J Biol Chem.* 272, 20313-6.
148. Dalle-Donne, I., Rossi, R., Giustarini, D., Milzani, A., Colombo, R. (2003). Protein carbonyl groups as biomarkers of oxidative stress. *Clin Chim Acta.* 329, 23-38.
149. Pantke, U., Volk, T., Schmutzler, M., Kox, W.J., Sitte, N., Grune, T. (1999). Oxidized proteins as a marker of oxidative stress during coronary heart surgery. *Free Radic Biol Med.* 27(9-10), 1080-6.
150. Quinlan, G.J., Evans, T.W., Gutteridge, J.M. (1994). Oxidative damage to plasma proteins in adult respiratory distress syndrome. *Free Radic Res.* 20(5), 289-98.
151. Borg, D.C., Schaich, K.M. (1988). Iron-derived radicals. In: Halliwell, B., editor. Proceedings of an UpJohn symposium, *Fed Am Soc Exp Biol.* Bethesda, MD: 20-26.
152. Aksenov, M.Y., Aksenova, M.V., Butterfield, D.A., Geddes, J.W., Markesbery, W.R. (2001). Protein oxidation in the brain in Alzheimer's disease. *Neuroscience.* 103, 373-83.
153. Supinski, G., Nethery, D., DiMarco, A. (1993). Effect of free radical scavengers on endotoxin-induced respiratory muscle dysfunction. *Am Rev Respir Dis.* 148, 1318-1324.
154. Dean, R.T., Fu, S., Stocker, R., Davies, M.J. (1997). Biochemistry and pathology of radical-mediated protein oxidation. *Biochem J.* 324, 1-18.
155. Miyata, T., Van Ypersele de Strihou, C., Kurokawa, K. Baynes, J.W. (1999). Alterations in nonenzymatic biochemistry in uremia: Origin and significance of "carbonyl stress" in long-term uremic complications. *Kidney Int.* 55, 389-399.
156. Couillard, A., Maltais, F., Saey, D., Debigare, R., Michaud, A., Koechlin, C., LeBlanc, P., Prefaut, C. (2003). Exercise-induced quadriceps oxidative stress and peripheral muscle dysfunction in patients with chronic obstructive pulmonary disease. *Am J Respir Crit Care Med.* 167, 1664-1669.

157. Mimic-Oka, J., Simic, T., Djukanovic, L. Reljic, Z., Davicevic, Z. (1999). Alteration in plasma antioxidant capacity in various degrees of chronic renal failure. *Clin Nephrol.* 51, 233-241.
158. Köken, T., Kahraman, A., Serteser, M., Çetinkaya G. (2001). Hemodiyalizin protein karbonil içeriği ve sülfidril grupları düzeyi üzerine etkisi. *Türk Nefroloji Diyaliz ve Transplantasyon Dergisi.* 10(2), 83-85.
159. Hensley, K., Hall, N., Subramaniam, R., Cole, P., Harris, M., Aksenov, M. Aksenova, M., Gabbita, S.P., Wu, J.F., Carney, J.M. (1995). Brain regional correspondence between Alzheimer's disease histopathology and biomarkers of protein oxidation. *J Neurochem.* 65, 2146-56.

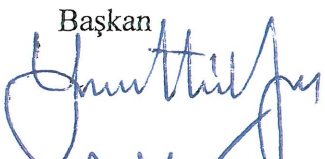
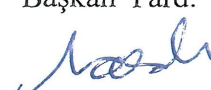
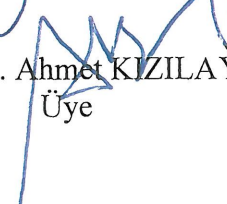
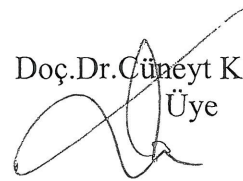
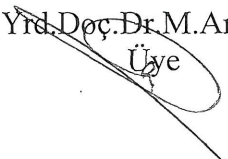



**İNÖNÜ ÜNİVERSİTESİ**  
**TIP FAKÜLTESİ**  
**DENEY HAYVANLARI ETİK KURULU KARARI**

Toplantı Tarihi : 25.05.2009  
Toplantı Yeri : Tıp.Fak.Toplantı Salonu-Malatya  
Araştırma Protokol No.su : 2009/11

Tıp Fakültesi Öğretim Üyelerinden Doç.Dr. Elif ÖZEROL'un yürütücüsü olduğu "KC'i rejenere olan ve olmayan sıçanlarda, CCl<sub>4</sub>'le indüklenen akut karaciğer hasarı ve N-Asetilsisteinin koruyucu etkisi" isimli 2009/11 Protokol no.lu çalışmanın dosyası incelendi.

Adı geçen araştırmanın; araştırma protokolüne tamamen uyulmak, İnönü Üniversitesi Tıp Fakültesi Deney Hayvanları Etik Kurul Yönergesi'nde belirtilen hususlar yerine getirilmek ve sorumluluk araştırmacılara ait olmak üzere çalışmanın yapılmasında herhangi bir etik sakınca bulunmadığına oy birliği ile karar verildi.

Prof.Dr.Yusuf TÜRKÖZ Başkan 	Doç.Dr.Nigar VARDI Başkan Yard. 	Doç.Dr. Yunus KARAKOÇ Raportör Katılmadı
Doç.Dr. Ahmet KIZILAY Üye 	Doç.Dr.Cüneyt KAYAALP Üye 	Yrd.Doç.Dr.M.Arif ALADAĞ Üye 
M.Zafer BOZDAĞ Üye 	Bekir ÜNAL Sivil Üye Katılmadı	Zafer KIRÇUVAL Sivil Toplum Örgütü Üyesi Katılmadı

### ÖZGEÇMİŞ

08.01.1977 tarihinde Bingöl-Karlıova ilçesinde doğdum. İlköğretimimi, 1984-1989 yılları arasında, Malatya 100. Yıl İlkokulunda, ortaöğretimimi 1989-1996 yılları arasında Malatya Anadolu Lisesinde tamamladım. 1998-2002 yılları arasında İnönü Üniversitesi Sağlık Yüksekokulu Sağlık Memurluğu bölümünde lisans eğitimimi tamamladım. 2002-2004 yılları arasında yüksek lisans, 2004-2011 yılları arasında ise doktora eğitimimi İnönü Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü bünyesinde Tıbbi Biyokimya Anabilim Dalında tamamladım. 2004 yılından itibaren sağlık memuru olarak çeşitli sağlık kuruluşlarında (Pütürge Devlet Hastanesi, Sürgü Sağlık Ocağı, Doğanşehir Toplum Sağlığı Merkezi) çalıştım.